

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la  
Recherche scientifique  
Université Dr. Taher Moulay Saida  
Faculté des sciences  
Département de Biologie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie  
Option : Biochimie et physiologie cellulaire

**Présenté Par :**

- M<sup>elle</sup> Hadjari Kheira
- M<sup>elle</sup> Alili Nadjjet

**Thème :**

**Contribution à l'étude de l'activité lipolytique et  
probiotique de quelques souches de bactéries  
lactiques sur les paramètres lipidiques du rat  
Wistar**

Soutenu publiquement le : 10 / 10/ 2016 devant la commission de jury composée de :

- **Président :** Mr. Ammam Abdelkader Maitre assistant A .U de Saida
- **Examineur :** Mme. Dahani Moufida Maitre assistant A. U de Saida
- **Encadreur :** M<sup>elle</sup> Amara .Sabrina Maitre assistant B .U de Saida.

Année Universitaire : 2015-2016.



## *Remerciements*

En premier lieu, Nous tenons à remercier **ALLAH** qui nous a aidé et nous adonné la patience et le courage durant ces longues années d'études, et nous avoir données la force à accomplir ce travail.

Nous remercions vivement, notre encadreur **Melle Amara Sabrina** pour son aide, sa compréhension, ses conseils et critiques pertinentes. Nous remercions également toutes les personnes qui nous ont aidés, de près ou de loin pour la réalisation de ce travail en particulier nos parents.

A Monsieur **Amam Abdelkader**, Maitre assistant A à l'Université de Saida nous somme très honorées que vous acceptiez de présider notre travail. Trouvez ici le témoignage de nos totales gratitudees.

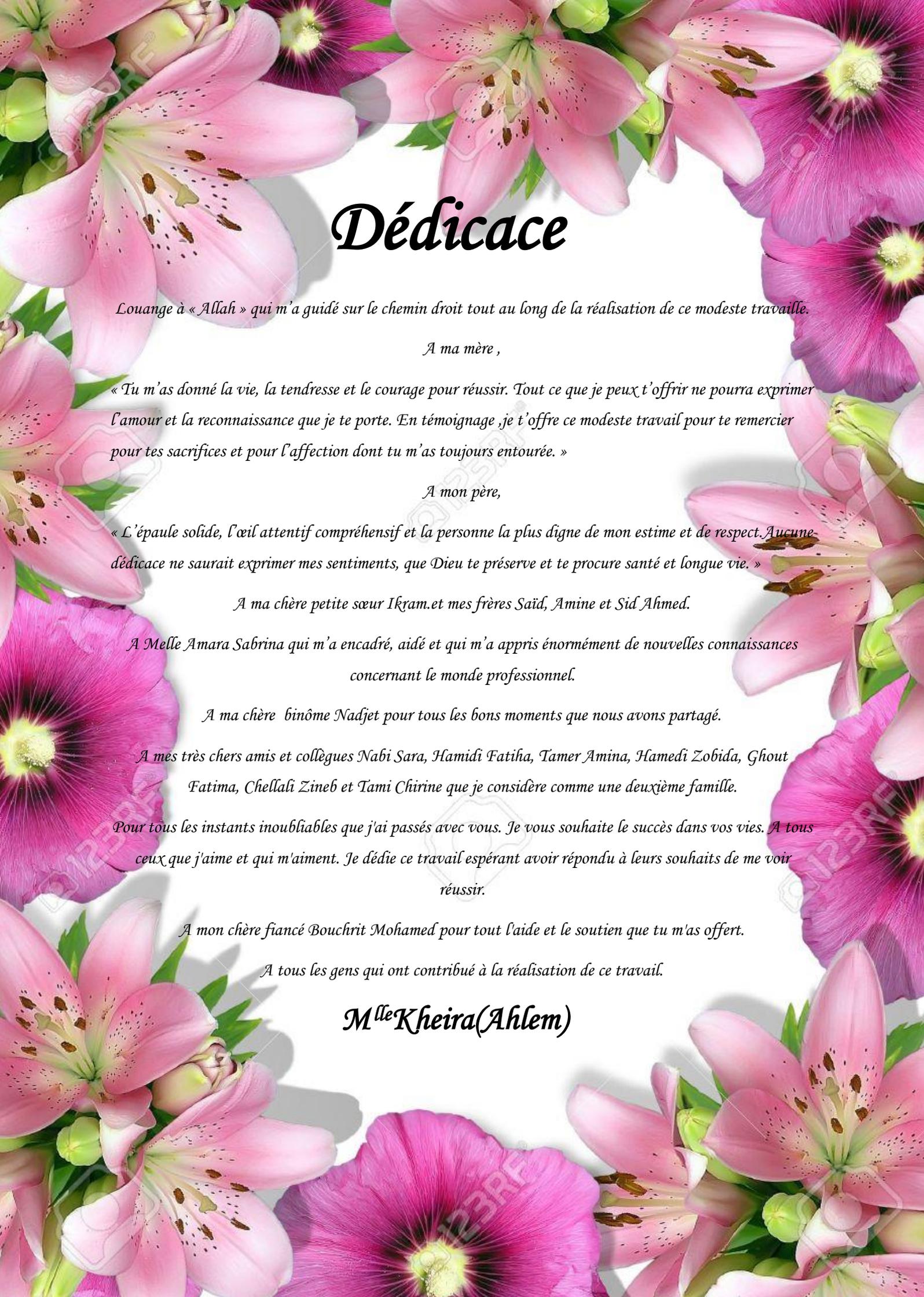
Sincères remerciements. A Madame **Dahani Moufida**, Maitre assistant A à l'Université de Saida nous somme très honorées que vous acceptiez d'examiner notre travail. Trouvez ici le témoignage de nos totales gratitudees.

Nous adressons aussi nos remerciements à tous nos enseignants qui ont veillé sur notre formation.

Nous tenons à mentionner le plaisir que nous avons eu à travailler au sein du laboratoire **Dr Boualem** (accueil et conseil) ainsi que tout le personnel de ce laboratoire.

Enfin, nombreuses sont les personnes que nous n'avons pas citées et que nous voudrions remercier pour leurs contributions à la réalisation de ce travail.





# Dédicace

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

*A ma mère ,*

*« Tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. Tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte. En témoignage, je t'offre ce modeste travail pour te remercier pour tes sacrifices et pour l'affection dont tu m'as toujours entourée. »*

*A mon père,*

*« L'épaulé solide, l'œil attentif compréhensif et la personne la plus digne de mon estime et de respect. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que Dieu te préserve et te procure santé et longue vie. »*

*A ma chère petite sœur Ikram. et mes frères Saïd, Amine et Sid Ahmed.*

*A Melle Amara Sabrina qui m'a encadré, aidé et qui m'a appris énormément de nouvelles connaissances concernant le monde professionnel.*

*A ma chère binôme Nadjat pour tous les bons moments que nous avons partagé.*

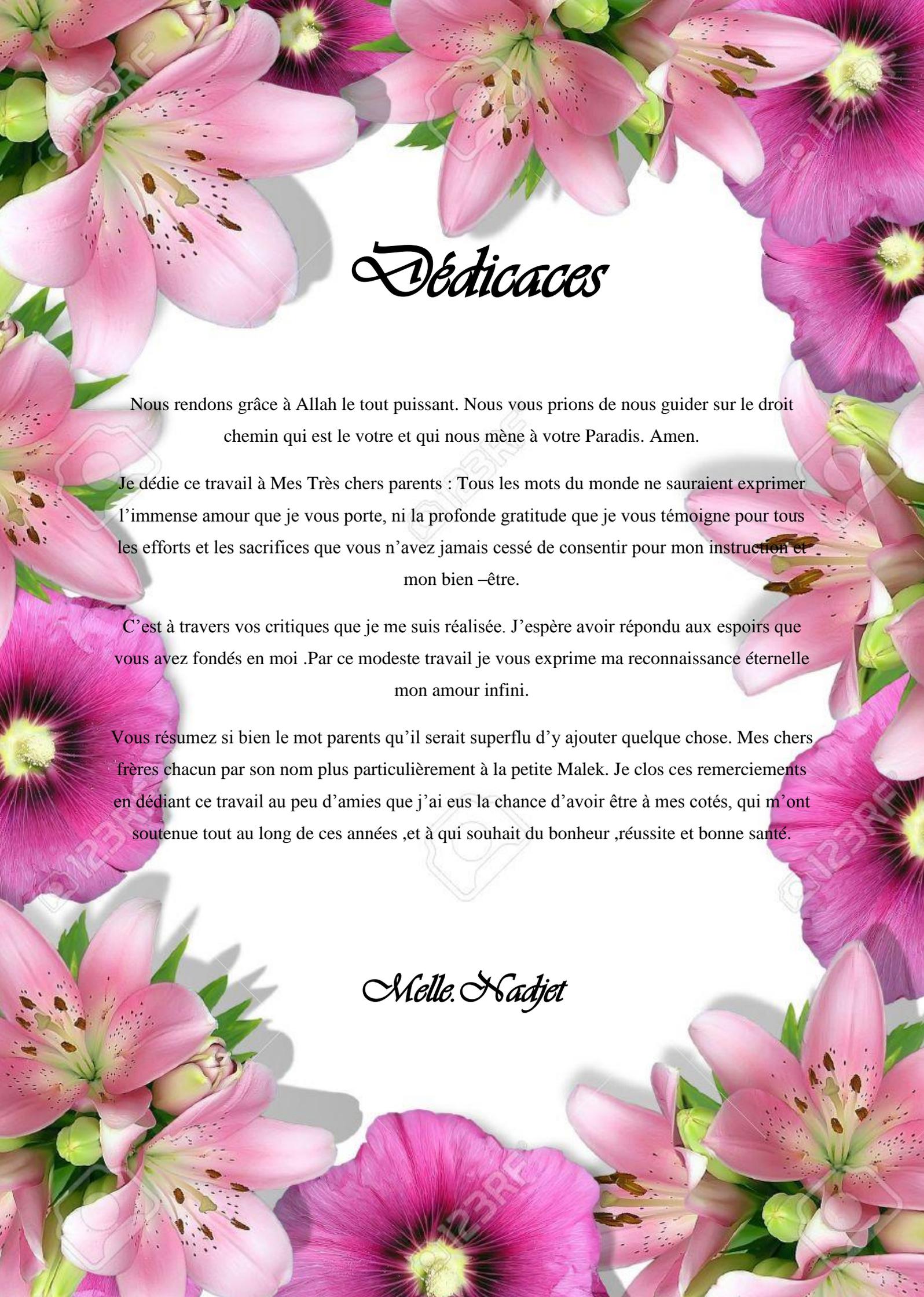
*A mes très chers amis et collègues Nabi Sara, Hamidi Fatiha, Tamer Amina, Hamedi Zobida, Ghout Fatima, Chellali Zineb et Tami Chirine que je considère comme une deuxième famille.*

*Pour tous les instants inoubliables que j'ai passés avec vous. Je vous souhaite le succès dans vos vies. A tous ceux que j'aime et qui m'aiment. Je dédie ce travail espérant avoir répondu à leurs souhaits de me voir réussir.*

*A mon chère fiancé Bouchrit Mohamed pour tout l'aide et le soutien que tu m'as offert.*

*A tous les gens qui ont contribué à la réalisation de ce travail.*

**M<sup>lle</sup> Kheira (Ahlem)**



# *Dédicaces*

Nous rendons grâce à Allah le tout puissant. Nous vous prions de nous guider sur le droit chemin qui est le votre et qui nous mène à votre Paradis. Amen.

Je dédie ce travail 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 jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

C'est à travers vos critiques que je me suis réalisée. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés 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. Mes chers frères chacun par son nom plus particulièrement à la petite Malek. Je clos ces remerciements en dédiant ce travail au peu d'amies que j'ai eus la chance d'avoir être à mes cotés, qui m'ont soutenue tout au long de ces années ,et à qui souhait du bonheur ,réussite et bonne santé.

*Melle. Nadjet*

## Résumé :

Les probiotiques sont des microorganismes bénéfiques constituant la flore buccale, intestinale et vaginale, leur présence permet de freiner la prolifération des germes nuisibles, les bactéries lactiques comptent parmi les principaux probiotiques dont les principaux genres étudiés sont les lactobacilles.

Notre étude s'est basée sur la recherche de souches à potentiel probiotique parmi un panel de bactéries lactiques de la collection du laboratoire LBMB, nous avons dirigé notre travail en premier lieu vers la sélection *in vitro* des souches présentant les meilleures aptitudes probiotiques dont la résistance aux conditions hostiles du tube digestif, l'antagonisme contre les pathogènes ainsi que le pouvoir lipolytique et hypocholestérolémiant, les résultats obtenus expriment une activité lipolytique significative dans le milieu MRS supplémenté des deux sources lipidiques naturelles (beurre et huile d'olive) à 1 % et 2 % et un excellent pouvoir à dégrader le cholestérol *in vitro* les concentrations du cholestérol résiduel chez les souches NSC5A, NSC5C et GHAR C2 est de 0,26, 0,34 et 0,43 g/l respectivement.

Les résultats de la partie *in vivo* montrent une diminution des paramètres lipidiques pour le cholestérol la JUM III4 à baisser le taux de 0,81 à 0,62 g/l tandis que la NSC5C à baisser le taux de 0,97 à 0,71 g/l, concernant les taux de triglycérides la JUM III4 à baisser le taux de 0,99 à 0,61 g/l tandis que la NSC5C à baisser le taux de 0,71 à 0,44 g/l. On compare les taux de cholestérols dans les tests *in vivo* et *in vitro* on conclut que la souche NSC5C à donner les bons résultats.

Suite à la consommation des pro et prébiotiques par les rats recevant un régime hyperlipidique, ce traitement a également contribué à rééquilibrer la flore intestinale et à améliorer l'état sanitaire des animaux.

**Mots clés :** probiotiques, lactobacilles, activité lipolytique, cholestérol, triglycérides.

**Abstract :**

Probiotics are beneficial microorganisms constituting the oral flora, intestinal and vaginal, their presence allows to curb the proliferation of harmful bacteria, lactic acid bacteria are among the major probiotics whose main genres studied are lactobacilli.

Our study is based on research of potential probiotic strains from a panel of lactic acid bacteria from the collection of laboratory LBMB, we led our work in the first place to the in vitro selection of probiotic strains with the best skills that the resistors the hostile conditions of the digestive tract, the antagonism against pathogens and the lipolytic and cholesterol-lowering power, the results express a significant lipolytic activity in MRS media supplemented both natural lipid sources (butter and olive oil) 1% and 2% and excellent to degrade cholesterol in vitro the concentrations of the residual cholesterol in NSC5A strains NSC5C GHAR and C2 is 0.26, 0, 34 and 0.43 g / l respectively.

The results of the in vivo portion show a decrease in lipid parameters for the cholesterol JUM III4 to lower the rate of 0.81 to 0.62 g / l while NSC5C to lower the rate of 0.97 to 0.71 g / l, for triglyceride levels in the JUMIII4 lower the rate of 0 99 to 0.61 g / l while NSC5C to lower the rate of 0.71 to 0.44 g / l .on compare rates cholesterols in the test in vivo and in vitro is concluded that the strain NSC5C to give good results. Following the consumption of pro and prebiotics in rats receiving a high fat diet, this treatment also helped to rebalance the intestinal flora and improve the health of the animals.

**Keywords:** probiotics, lactobacilli, lipolytic, cholesterol, triglycerids

## ملخص

البروبايوتيك هي كائنات حية دقيقة مفيدة تشكل النبيت الفموي والمعوي و التناسلي وجودها يسمح بكبح تكاثر البكتيريا الضارة البكتيريا اللبنية تعد من اهم البروبايوتيك ومن انواعها الرئيسية المدروسة العصيات اللبنية

اعتمدت دراستنا على البحث عن السلالات التي لها نفس إمكانية البروبايوتيك من بين مجموعة البكتيريا المعزولة من مخبر بيولوجيا الكائنات الدقيقة و البيوتكنولوجيا لقد وجهنا أعمالنا بالدرجة الأولى نحو انتقاء السلالات من المختبر التي تتميز بأهم القدرات للبروبايوتيك من بينها المقاومة في الظروف الصعبة للجهاز الهضمي و مقاومتها للبكتيريا الضارة و كذلك نشاط تحلل الدسم و قدرتها على خفض مستوى الكولسترول

النتائج المتحصل عليها تعبر عن نشاط تحليل الدسم لها دلالة في الوسط MRS مضاف إليه مصدرين دهنيين طبيعيين(زبدة وزيت الزيتون)بنسب 1 و 2 % و قدرة فائقة في انحلال الكولسترول في المختبر. تراكيز الكولسترول المتبقية عند السلالات NSC5A, NSC5C و GHARC2 هي كالاتي 0,34, 0,26 و 0,43غ/ل نتائج التجارب المنجزة على الحيوان بينت تناقص في المقاييس الدهنية للكولسترول JUMIII4 خفضت النسبة من 0,81 إلى 0,62 غ / كذلك NSC5C خفضت الكولسترول من 0,97 إلى 0,71 غ/ل أما في ما يخص تراكيز الدهون الثلاثية JUMIII4 خفضت التركيز من 0,99 إلى 0,61 غ/ل, بينما NSC5C خفضت أيضا التركيز من 0,71 إلى 0,44 غ/ل بمقارنة نسب الكولسترول حسب المقاييس المخبرية و المقامة على الحيوان نستخلص إن السلالة NSC5C أعطت نتائج جيدة تبعا لاستهلاكها للبرو و البيريبيوتيك من طرف الجرذان التي غذيت بنمط غذائي غني بالدهون. هذا العلاج ساهم في إعادة التوازن للجدار المعوي و تحسين الحالة الصحية للحيوانات .

**الكلمات المفتاحية:** البروبيوتيك،العصيات اللبنية،نشاط تحليل الدسم،الكولسترول،الدهون الثلاثية.

# Table de matières

---

Remerciement

Dédicace

Dédicace

Résumé en arabe

Résumé en Français

Résumé en Anglais

Tables des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Glossaire

Abréviation

Introduction

## **Partie bibliographique**

I-Les bactéries lactiques .....	P01
I--1-Historique .....	P03
I-2-Définition .....	P05
I-3- Caractéristiques des bactéries lactiques.....	P06
✓ Caractères morphologiques et structuraux .....	P06
✓ Caractères physiologiques et biochimiques .....	P07
✓ Caractères immunologiques .....	P07
I-4- Génétique des bactéries lactiques .....	P07
I-5-Origine des bactéries lactiques.....	P08
I-6- Habitat.....	P08
I-7- Classification des bactéries lactiques .....	P09
I-7-1. Les Lactobacilles.....	P12
❖ Les Lactobacilles hétérofermentaires stricts .....	P14
❖ Les Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs.....	P14
I-8- Métabolisme des bactéries lactiques .....	P17
I-8-1- La lipolyse .....	P 18

# Table de matières

---

I-9-Principales voies fermentaires des bactéries lactiques.....	P19
1-9-1- Voie homofermentaire ou EMP.....	P22
1-9-2- Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate.....	P22
I-10-Culture des bactéries lactiques .....	P22
I-11- Interaction chez les bactéries lactiques.....	P23
I-11-1- Les interactions positives.....	P23
I-11-2- Les interactions négatives.....	P23
I-12- rôle et intérêt des bactéries lactiques dans le domaine sanitaire .....	P23
II- Les probiotiques et les prébiotiques.....	P24
II-1-Définitions.....	P24
A. Les probiotiques.....	P24
A-1-Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé .....	P25
II-3- Les principales souches microbiennes à potentiel probiotique.....	P29
II-3-1- Les souches probiotiques utilisées en alimentation humaine et animale.....	P29
II-3-2- Les bifidobactéries.....	P30
II-4-Propriétés et critères de sélection des probiotiques.....	P33
II-5- Applications des probiotiques .....	P36
➤ Traitement des diarrhées.....	P36
➤ Traitements gastriques.....	P37
➤ Activité hypocholestérolémiante.....	P37
➤ Action anticarcinogène et action sur le système immunitaire.....	P37
II-6-Principales souches commercialisées.....	P37
B. Les prébiotiques.....	P39
C. Les symbiotiques.....	P40
IV-Métabolisme du cholestérol.....	P41
IV-1-Définition .....	P41
IV-2-Structure .....	P42
IV-3-Localisation .....	P43

# Table de matières

---

IV-4- Les rôles biologiques du cholestérol .....	P43
IV-5-Synthèse .....	P45
IV-6-Dégradation .....	P47
IV- 6-Régulation .....	P47
a) La régulation à court terme au niveau du foie.....	P47
b) La régulation à long terme au niveau périphérique.....	P47
IV-7- L'élimination du cholestérol.....	P48
V-Présentation de rat Wistar .....	P48
V-1-Caractéristiques du rat WISTAR .....	P49
V-2-Flore du rat .....	P49
<b>II-Matériel et méthodes .....</b>	<b>P50</b>
Objectif du travail .....	P50.
Lieu d'étude .....	P50
II-1-Matériel.....	P50
II-1-1-Origine des bactéries utilisées .....	P50
II-1-2-Prébiotiques .....	P51
II-1-3-Milieus de culture .....	P51
II-1-4-Les antibiotiques utilisés .....	P52
II-1-5-La nourriture des rats .....	P54
II-1-6-Les lipides utilisés .....	P54
<b>II-2--Méthodes .....</b>	<b>P55</b>
II-2-1-Confirmation de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique .....	P55
II-2-2-Conservation des souches lactiques .....	P55
II-2-3-Tests physiologiques et biochimiques.....	P57
II-2-3-1- Recherche de type fermentaire .....	P57
II-2-3-2Caractère hémolytique .....	P57
II-2-3-3-Activité antibactérienne .....	P58
II-2-3-4-Résistance au suc digestif simulé.....	P59
II-2-3-5-Résistance aux antibiotiques .....	P59

# Table de matières

---

II-2-3-6-Mise en évidence de l'activité lipolytique .....	P59
• Recherche de l'activité lipolytique sur milieu MRS non tamponnée additionne de substrats lipidiques naturel(Beurre naturelle et Huile d'olive )et artificielle (Tween) .....	P59
• Recherche de l'activité lipasique sur milieu MRS tamponnée additionne de substrats lipidiques naturels .....	P60
• Recherche de l'activité lipasique sur milieu MRS tamponnée additionne de substrats Lipidiques artificiels .....	P60
II-2-3-7-Méthode des puits .....	P60
II-2-3-8-Recherche de l'activité hypocholestérolémiant chez les lactobacilles <i>in vitro</i> ....	P61.
II-2-3-9-Acidité titrable .....	P62
II-2-4-Expérimentation <i>in vivo</i> .....	P64
II-2-4-1 Conditions d'élevage des rats.....	P64
▪ Habitat et nourriture.....	P64
▪ Nourriture .....	P65
II-2-4-2-Techniques d'administration des différentes souches lactiques.....	P66
▪ Préparation du lait fermenté.....	P66
II-2-5-Paramètre zootechniques.....	P66
II-2-5-1 Consommation.....	P.66
▪ Nourriture consommée.....	P66
▪ Pesée des animaux.....	P66
II-2-5-2-Paramètres de croissances.....	P67.
• Gain de poids moyen par semaine.....	P67
• L'indice de consommation.....	P67
• Le poids vif moyen.....	P67
II-2-6-Paramètres microbiologiques.....	P67
Dénombrement des bactéries lactiques dans la matière fécale.....	P68
Dénombrement de la flore totale (FTAM).....	P68
Dénombrement des coliformes fécaux.....	P68
Dénombrement des salmonelles et shigelles : .....	P69
Dénombrement des entérobactéries .....	P69
Dénombrement des Staphylocoques .....	P69

# Table de matières

---

II-2-7-Dosage de quelques paramètres biochimiques.....	P69
II-2-7-1 1. Prélèvement sanguin :.....	P69
II-2-7-2-Paramètres biochimiques :.....	P70
II-2-7-3-Le sacrifice des rats .....	P71
II-2-7-4-Le taux de mortalité.....	P72
II-2-7-5-Dénombrement des bactéries dans l'intestin l'estomac et le colon des rats:.....	P72
• Broyage des organes .....	P72
<b>Résultats et discussions</b> .....	P73
III-1-Confirmation de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique ....	P73
III-1-1-Observation macroscopique.....	P73
III-1-2-Observation microscopique .....	P73
III-1-3-Tests physiologiques et biochimiques .....	P74
III-2-Etude de l'activité antibactérienne des souches.....	P 76
III-3-L'antibiorésistance.....	P78
III-4-Test de résistance au suc gastrique simulé.....	P81
III-5-Test lipolytique .....	P83
-Test lipolytique sur milieu MRS tamponnée .....	P84
III-6-Préparation de lait fermenté .....	P88
III-7-Acidité titrable .....	P89
III-8-Partie <i>in vivo</i> .....	P90
III-8-1-Nourriture consommée .....	P90
III-8-2Gain de poids moyen.....	P91
III-8-3-Indice de consommation .....	P92
III-8-4-Poids vif moyen .....	P93
III-9-Paramètre biochimiques .....	P94
III-10-Paramètres microbiologiques .....	P97
III-11-Taux de mortalité .....	P101
III-12-Dénombrement des bactéries de l'intestin l'estomac et le colon .....	P102

## Conclusion et Perspectives

Références bibliographiques

Annexes

## *Liste des figures :*

### Liste des figures :

N°	Titres	Pages
<b>01</b>	Chronologie du développement de la vie sur Terre (Tailliez, 2001).	<b>04</b>
<b>02</b>	<i>Lactobacillus</i> (Rosell-11) observé au microscope électronique à transmission (x10000) (Référence électronique 1).	<b>05</b>
<b>03</b>	<i>Leuconostoc lactis</i> observé au M.E.T. (x 10000) (Référence électronique 2).	<b>05</b>
<b>04</b>	Différente forme microscopique de bactéries lactiques obtenues au laboratoire de microbiologie appliquée de l'université d'Oran par Saidi (2007)	<b>06</b>
<b>05</b>	Arbre phylogénétique des bactéries Gram positives basé sur la comparaison des séquences de l'ARNr 16S. La barre indique une divergence de séquence à 10%. (Schleifer et Ludwig., 1995)	<b>11</b>
<b>06</b>	Phase contraste (A–E) et électron (F) micrographes montre les différent morphologies cellulaire de <i>Lactobacillus</i> : A, <i>Lactobacillus gasseri</i> ; B, <i>Lactobacillus agilis</i> ; C, <i>Lactobacillus curvartus</i> ; D, <i>Lactobacillus minor</i> ; E, <i>Lactobacillus fermentum</i> ; et F, involution de <i>lactobacillus</i> dans une section mince de grain du kéfir. (Bergey's manual., 2009).	<b>13</b>
<b>07</b>	les principales voies métaboliques des bactéries lactiques((Thompson et Gentry –Weeks, 1994).	<b>18</b>
<b>08</b>	Principales voies de la lipolyse (Siegumfeldt <i>et al</i> 2000)	<b>19</b>
<b>09</b>	Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques (Makhloufi., 2012).	<b>21</b>
<b>10</b>	Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques. Adapté de Mercenier <i>et al.</i> (2002).	<b>26</b>
<b>11</b>	Propriétés et critères de sélection des probiotiques. Adapté de Salminen <i>et al.</i> (1998).	<b>35</b>
<b>12</b>	Principales souches probiotiques commercialisées en Europe. [Adapté de: Mombelli and Gismondo, 2000 ; Playne and Salminen, 2002]	<b>38</b>
<b>13</b>	Relations métaboliques du cholestérol.	<b>42</b>
<b>14</b>	Structure de cholestérol.	<b>42</b>
<b>15</b>	Vue d'ensemble du métabolisme du cholestérol.	<b>44</b>
<b>16</b>	La biosynthèse du cholestérol.	<b>46</b>
<b>17</b>	Rat Wistar.	<b>48</b>
<b>18</b>	Schéma de conservation courte durée des bactéries lactiques purifiées.	<b>55</b>
<b>19</b>	Conservation de longue durée des bactéries lactiques purifiées (Saidi <i>et al.</i> , 2002)	<b>56</b>
<b>20</b>	Instruments pour la mesure de l'acidité titrable.	<b>62</b>
<b>21</b>	Rats âgés dans leur habitat	<b>63</b>
<b>22</b>	Aspect de l'alimentation administrée aux rats	<b>64</b>
<b>23</b>	Matériel utiliser pour le dénombrement de la matière fécale	<b>67</b>

## *Liste des figures :*

<b>24</b>	Méthode d'anesthésie des rats par inhalation de chloroforme	<b>69</b>
<b>25</b>	Prélèvement sanguin effectué à partir d'une veine sinus orbitale et collecté des échantillons dans les tubes contenant de l'héparine.	<b>70</b>
<b>26</b>	Automate de comptage (DIALAB auto-analyseur).	<b>71</b>
<b>27</b>	Matériel utilisé pour le dénombrement des bactéries au niveau des organes	<b>72</b>
<b>28</b>	Aspect macroscopique des colonies des lactobacilles sur gélose MRS.	<b>73</b>
<b>29</b>	Observation microscopique de lactobacilles (GX100).	<b>73</b>
<b>30</b>	Test catalase des souches 45,19 et 24	<b>75</b>
<b>31</b>	Résultats de type fermentaire	<b>75</b>
<b>32</b>	Croissance des lactobacilles sur gélose au sang (Colombia).	<b>76</b>
<b>33</b>	Activité inhibitrice des souches de lactobacilles sur : <b>3</b> : <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <b>6</b> : <i>Staphylococcus aureus</i>	<b>78</b>
<b>34</b>	antibiogramme de la souche <b>Jum<sub>III4</sub></b> .	<b>79</b>
<b>35</b>	les colonies observées en présence des sels biliaires	<b>83</b>
<b>36</b>	Activité lipolytique de 6 souches lactiques dans un MRS tamponnée +huile d'olive par rapport au MRS sans tween(temoin)	<b>84</b>
<b>37</b>	mécanismes des effets hypolipidémiants de probiotiques	<b>87</b>
<b>38</b>	Les souches pures Jum <sub>III4</sub> et NSC <sub>5C</sub> .	<b>88</b>
<b>39</b>	Le laitensemencé par les souches Jum <sub>III4</sub> et NSC <sub>5C</sub> (6ml dans chaque tube).	<b>88</b>
<b>40</b>	Le lait fermenté prêt à être administré aux rats.	<b>88</b>
<b>41</b>	Evolution de l'acidité des souches	<b>89</b>
<b>42</b>	Consommation moyenne en nourriture	<b>90</b>
<b>43</b>	Evolution du gain de poids moyen au cours des semaines	<b>91</b>
<b>44</b>	Evolution de l'indice de consommation	<b>92</b>
<b>45</b>	Evolution du poids vif des animaux au cours des semaines	<b>93</b>
<b>46</b>	Evolution du taux de glycémie	<b>94</b>
<b>47</b>	Evolution du taux de cholestérol	<b>95</b>
<b>48</b>	Evolution du taux de triglycérides	<b>96</b>
<b>49</b>	Evolution de la flore mésophile totale. (UFC : unité formant une colonie)	<b>98</b>
<b>50</b>	Milieux utilisés pour le dénombrement de la flore fécale.	<b>98</b>
<b>51</b>	Aspect des rats de lot3( NSC5C +L+P).	<b>100</b>
<b>52</b>	Aspect des rats de lot 2(Témoin+L).	<b>100</b>
<b>53</b>	Aspect des foies des rats.	<b>101</b>
<b>54</b>	Aspect des cœurs des rats.	<b>101</b>
<b>55</b>	Photos des rats après autopsie.	<b>102</b>
<b>56</b>	La charge des bactéries lactiques sur milieu MRS (estomac, intestin, colon) lot (NSC 5C+I+P).	<b>102</b>
<b>57</b>	La charge des Staphylocoques sur milieu Chapman.	<b>103</b>
<b>58</b>	La charge de la flore totale sur milieu GN.	<b>103</b>

## Liste des tableaux :

### Liste des tableaux :

N°	Titres	Page
01	Quelques genres de bactéries lactiques (Bekhouche., 2006)	12
02	la nouvelle classification des lactobacilles selon Atlan (2000)	15
03	Principales caractéristiques des bactéries lactiques (Makhloufi, 2012).	16
04	Quelques souches probiotiques et leurs effets cliniques. Adapté de Mattila-Sandholm <i>et al.</i> (1999).	30
05	Distribution des différentes espèces de <i>Bifidobacterium</i> dans le tractus digestif de l'homme en fonction de l'âge (Ballongne, 1993).	31
06	Les prébiotiques et les candidats aux prébiotiques (Blaut, 2002).	40
07	Rôle des organes dans le métabolisme du cholestérol.	44
08	Souches lactiques utilisées et leurs origines.	50
09	Souches d'altération et leurs origines	50
10	les antibiotiques utilisés, leurs familles et leurs modes d'action.	53
11	les rations de l'alimentation des rats de chaque lot	65
13	Résumé du profil physiologique et biochimique des souches isolées.	74
14	Activité antibactérienne des souches lactiques vis-à-vis les bactéries d'altération	76
15	comportement des souches vis à vis de divers antibiotiques	80
16	Croissance des souches de lactobacilles dans la solution de simulation du suc gastrique.	81
17	Incubation après 24h (diamètre en mm)	83
18	La lipolyse des bactéries lactiques sur un MRS tamponnée additionné à différents sources lipidiques(naturels et artificiels)	85
19	Test de dégradation du cholestérol <i>in vitro</i>	86
20	Dénombrement de la charge bactérienne dans les selles des rats	97
21	Poids des organes (g).	99
22	Taux de mortalité des animaux à la fin de l'étude.	102
23	Dénombrement de la charge bactérienne des organes(estomac, intestin et colon).	103

# Glossaire

---

## Glossaire :

**Acides gras à chaînes courtes (AGCC) :** Composes regroupant principalement l'acétate, le propionate et le butyrate, produits de la fermentation des glucides par la flore.

**Allergie :** Réponse immunitaire déviée vis à vis d'un antigène alimentaire ou respiratoire (Allergène) responsable de la production anormale d'IgE spécifiques et conduisant à une réaction inflammatoire locale ou systémique liée à la dégranulation de mastocytes ayant fixé ces IgE, en réponse à un nouveau contact avec l'allergène.

**Acide gras :** il s'agit d'un acide carboxylique R-COOH dont le radical R est une chaîne d'hydrocarbure de longueur variable qui donne à la molécule son caractère hydrophobe. Un acide gras peut être saturé, mono-insaturé ou poly-insaturé.

**Acide gras mono-insaturé :** le radical comporte une seule double liaison. On retrouve ce type d'acide gras notamment dans l'huile d'olive.

**Acide gras poly-insaturés :** le radical comporte plusieurs doubles liaisons. On retrouve ce type d'acide gras par exemple dans les huiles de poissons.

**Acide gras saturé :** le radical ne comporte aucune double liaison. On retrouve ce type d'acide gras essentiellement dans les lipides d'origine animale.

**Acétate de p-nitrophénol :** p-NPA a pour formule brute C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>4</sub> et Poids moléculaire de 181.14788 g/mole.

**Bifidogène :** Se dit d'un produit entraînant une augmentation significative des populations et/ou des fonctions des bifidobactéries. On en reste habituellement en pratique à une augmentation du niveau de population de bifidobactéries au sein de la flore fécale.

**Bifidobactéries, *Bifidobacterium* :** Bactéries appartenant au genre *Bifidobacterium*. Ce sont des bactéries anaérobies présentes dans la flore dominante du nourrisson et inconstamment dans la flore dominante de l'adulte.

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

**Critères de similitude** s'appuient sur des paramètres choisis par l'expérimentateur, ce qui conduit à des redéfinitions occasionnelles lorsque des critères plus pertinents (c'est-à-dire

# Glossaire

---

plus discriminants) sont identifiées. L'accès à une information mesurable sur les génomes a conduit à définir une valeur seuil de *similarité globale entre deux génomes* pour que les souches correspondantes appartiennent à la même espèce. On considère ainsi que des souches dont les génomes ont moins de 70% de similarité appartiennent à des espèces différentes. A cette valeur correspond une similarité de séquences des gènes codant pour les ARN des ribosomes d'environ 98%.

**DLC** : Date Limite de Consommation

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

**Densité** : rapport de la masse volumique d'un corps sur la masse volumique d'un autre corps (généralement l'eau) pris comme référence.

**émulsifiant** : les émulsifiants, aussi appelés molécules tensio-actives, sont constitués d'ions ou d'atomes formant des chaînes allongées. Ils sont caractérisés par une tête hydrophile et une queue hydrophobe, mais qui est lipophile.

**émulsion** : il s'agit d'une dispersion d'un liquide dans un autre liquide au départ non miscible avec le premier.

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

**Graisse** : matières grasses sous forme solide à la température ambiante.

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

# Glossaire

---

**Huile** : matières grasses sous forme liquide à la température ambiante.

**Hydrophile** : c est exactement l inverse d hydrophobe.

**Hydrophobe** : se dit d une combinaison d atomes qui n a aucune affinité pour l eau. Molécules ou parties de molécules qui n aiment pas l eau, qui ne peuvent pas se lier à celle-ci par des liaisons hydrogènes.

**Immunité adaptative** : Réponse immunitaire spécifique d'un antigène exogène donne, faisant intervenir les lymphocytes B producteurs d'anticorps, les lymphocytes T qui participent a la différenciation des lymphocytes B et détruisent les cellules abritant des germes à l'aide de molécules solubles. Un avantage déterminant de l'immunité adaptative est l'établissement d'une mémoire immunitaire, permettant de développer des réponses plus intenses et plus précises vis a vis des agresseurs microbiens lorsque les contacts se répètent, réduisant morbidité et mortalité.

**Immunité innée** : Ensemble de réponses très rapides du système immunitaire visant a contrecarrer une infection (bactérie pathogène, virus, parasite). L'immunité innée n'est pas spécifique d'un antigène bactérien ou viral, ne fait pas intervenir d'anticorps, mais la reconnaissance d'éléments membranaires des microorganismes invasifs (LPS, acides lipoteichoïques) conduisent a l'activation des macrophages ou des lymphocytes Natural killer (NK).

**Interphase** : zone de contact entre deux liquides non miscibles, où se crée un film constitué des molécules tensio-actives de l huile.

**Lactobacilles** : genre bactérien comprenant plusieurs espèces telles que *L. acidophilus*, *johnsonii*, *casei*, *ramnosus*, *bulgaricus*.

**Lipides** : ce sont les matières grasses. Ils se trouvent dans l alimentation sous la forme de triglycérides, de cholestérol et de phospholipides.

**NOS** : oligosaccharides non digestibles (ex : les FOS).

**PBMC** (Peripheral Blood Mononuclear Cell) : cellule mononucléaire du sang périphérique.

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

**Prébiotique** : Les prébiotiques ont été définis comme des ingrédients alimentaires non digestibles qui stimulent de manière sélective au niveau du colon la multiplication ou

# Glossaire

---

l'activité d'un ou d'un nombre limite de groupes bactériens susceptibles d'améliorer la physiologie de l'hôte. (Gibson 1995 ; Schrezenmeir 2001).

**Souche bactérienne :** est l'ensemble des micro-organismes issus d'une seule cellule (Isolée). La souche est conservée en collection. Un ensemble des souches considérées comme étant *semblables* définit une espèce bactérienne.

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

**Tolérance orale :** La tolérance orale est le développement de réponses immunitaires de type "suppressif" ou. anergique . empêchant l'induction, aux niveaux intestinal et systémique, de réponses immunes spécifiques des protéines alimentaires et des bactéries résidentes. Cette importante fonction empêche ainsi le développement des allergies alimentaires, et les réactions inflammatoires du tube digestif vis a vis de la microflore résidente, comme dans la maladie de Crohn.

**Triglycérides :** se sont des (tri) esters naturels des acides gras et du glycérol. L'hydrolyse de ce triester fournit un glycérol et 3 acides gras (identiques ou différents).

**Tributyryne :** (tributyrate de glycérol) est trois l'un des isomérique glycerylique esters d'acide butyrique.

**Tween 80 :** polysorbate 80. Détergent non ionique couramment utilisé en laboratoire.

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

## **Les abréviations**

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**ARNr** : Acide Ribonucléique Ribosomique

**ADNr**: ADN ribosomal

**ADP**: Adénosine Diphosphate

**AFNOR**: Association Française de Normalisation

**ARN** : Acide RiboNucléique

**ARNt**: ARN de transfert

**ATP**: Adénosine Triphosphate

**ATCC**: American type culture collection.

**B.M.**: Bleu de méthylène

**BL**: bactéries lactiques.

**Carno**: Carnobacterium

**Cm**: centimètre

**Cys**: Cysteine

**CHOD**: cholestérol oxydase .

**°C** : Degré Celsius.

**CaCO<sub>3</sub>** : carbonate de calcium.

**CEP** : cell envelope proteinase.

**Cel.**: Cellobiose

**Cit**: citrate

**CO<sub>2</sub>** :Dioxyde de carbone.

**°D**: Degré Dornic

**dATP**:Désoxyadénosine Triphosphate

**dCTP**: Désoxycytidine Triphosphate

**DO**: Densité Optique

**DHA** : acide decosahexaenoique

**DHAP**: dihydroxyacétone-phosphate

**dTTP**: Désoxythimidine Triphosphate

**DHPS** :dihydroptéroatesynthétase.

**DO**: densité optique.

**EMP**: Embden- Meyerhof-Parnas

**EPS** : des exopolysaccharides.

**EMP** : Embden- Meyerhof-Parnas

**FAO/OMS**: Food and Agriculture Organization / Organisation Mondiale de la Santé

## *Liste des abréviations*

---

- FBP:** fructose-1, 6- bisphosphate
- FBA :** La fructose-1,6-bisphosphate aldolase.
- F.M.T. :** Flore mésophile totale
- Fru:** Fructose
- FAO:** Food and Agriculture Organization.
- g:** gramme.
- GN:** Gélose Nutritive.
- Gras:** Generally regarded as safe.
- GAP:** glycéraldéhyde- 3 –phosphate
- Gal:** Galactose
- Galac :** Galactose
- Glu :** Glucose
- GLK:** glucokinase
- GN:** gélose nutritif
- G+C:** Guanine +Cytosine.
- HDL :** Lipoprotéines de haute densité (High density lipoprotein).
- HTA:** Hypertension artérielle.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peroxyded'hydrogène.
- HO :** huile d'olive
- l :** litre.
- L :** lipides
- Lan:** lanthionine
- LBMB :** laboratoire de biologie des microorganismes et biotechnologie.
- LDL :** Lipoprotéines de faible densité ( low density lipoprotein).
- LPL :** lipoprotéine lipase.
- Melan:** methyllanthionine
- M.E.T.:** microscope électronique à transmission
- ml:** mililitre
- MRS:** Man Rogosa Sharpe
- M :** Molaire.
- µg:** microgramme.
- Mg<sup>2+</sup> :** magnésium.
- min :** minute
- mM:** milli-molaire

## *Liste des abréviations*

---

**ml** : millilitre

**mm** : Millimètre.

**MRS** : de Man-Rogosa et Sharp.

**NaCl**: Chlorure de sodium.

**NAD<sup>+</sup>/ NADH, H<sup>+</sup>** Coenzyme d'oxydoréduction nicotinamide adénine dinucléotide

**NaOH** : Hydroxyde de sodium

**nm** : nanomètre.

**OMS** : Organisation mondiale de la santé.

**PCR**: Polymerase Chain Reaction

**PEP** : Phospho-énolpyruvate

**pH**: potentiel Hydrogène

**Pi**: phosphate inorganique

**PMF**: force proton motrice

**PTS** : Phosphotransférase

**pH**: Potentiel d'hydrogène.

**p/v** : pois à volume.

**P** : prébiotique

**qsp**: quantité suffisante pour

**RFLP**: Restriction Fragment Length Polymorphism

**R** : résistant.

**rpm** : tour par minute

**SS** : salmonelle et Shigelle.

**S** : sensible.

**sp** : Espèce non précisée.

**ssp**: Sous espèce.

**Subsp.**: sub-species.

**SDS** : Sodium Dodecyl Sulfate

**sec**: seconde

**Ser**: serine

**Spp.** : plusieurs espèces non précisée

**T°**: Température

**Thr**: thréonine

**TG**: Triglycérides.

**TPI**: triose-phosphate

**TGI**: Tractus gastro intestinale.

## *Liste des abréviations*

---

**U** : unité

**UFC**: unité formant colonie

**VLDL**: Lipoprotéines de très faible densité (Very low density lipoprotein)

**µg**: microgramme.

**µl**: microlitre

**µM** : micromolaire

**WHO**: World Health Organization

**%** : pour cent.

### **Noms des genres bactériens :**

***Bf.*** : *Bifidobacterium*.

***En.*** : *Enterococcus*.

***Lb.***: *Lactobacillus*.

***Lc.***: *Lactococcus*.

***Ln.***: *Leuconostoc*.

***P.***: *Pediococcus*.

***S.***: *Staphylococcus*.

***St.***: *Streptococcus*.

***Sc.*** *Streptococcus*

***W.***: *Weissella*

***Pc.*** *Pediococcus*

# Introduction

---

Les micro-organismes sont étymologiquement des "petits organismes", donc des êtres vivants si petits qu'ils ne sont observables qu'au microscope. Ce terme englobe une variété d'espèces très différentes, qu'elles soient eucaryotes (levures, algues), ou procaryotes (bactéries). Ces dernières sont des organismes vivants unicellulaires parmi eux les bactéries lactiques (Mozzi *et al.*, 2010).

Il faudra attendre Pasteur et ses travaux sur la fermentation en 1857 pour établir un lien entre la fermentation lactique et les bactéries. La première culture bactérienne pure sera d'ailleurs une culture de *Lactococcus lactis* obtenue et décrite par Joseph Lister en 1873. Metchnikoff isole en 1904 le « bacille bulgare » (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) présent dans le yaourt. Il étudie les propriétés acidifiantes des bactéries du yaourt et il développera l'idée que les bactéries contenues dans les laits fermentés ont un effet bénéfique sur la santé. Il plaidera en faveur de l'introduction de produits laitiers fermentés dans le régime alimentaire et en 1905, les premières entreprises fabricant du yaourt à partir des souches de l'Institut Pasteur voient le jour (penaud, 2006).

Les bactéries lactiques sont depuis ce jour utilisées dans de nombreux produits laitiers dont les laits fermentés, les fromages et les yogourts. Elles contribuent à la texture, à la saveur des aliments ainsi qu'à la production de composés aromatiques. Les bactéries lactiques inhibent la prolifération de micro-organismes par la production de composés inhibiteurs telles les bactériocines (Piard et Desmazeaud, 1991, 1992) et en abaissant le pH par la production d'acide lactique (Gilliland, 1985b).

De nos jours Les bactéries lactiques représentent le deuxième plus grand marché de production de biomasse, après les levures. Principalement utilisées lors d'applications dans l'industrie alimentaire, comme la fabrication des fromages, des laits fermentés, de certains légumes et produits carnés fermentés et de certains vins, elles interviennent aussi dans l'industrie chimique pour la production d'acide lactique et de biopolymères et acquièrent, depuis quelques années, un rôle croissant en santé animale et humaine (Streit, 2008).

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, dont les vertus ne sont plus discutables, elles se trouvent aussi dans le système digestif de l'homme et des animaux où elles exercent ce pouvoir bénéfique, elles sont dites alors « probiotique ».

Ces bactéries probiotiques devraient être capables de survivre en grand nombre aux conditions acides de l'estomac et aux sels biliaires de l'intestin lors de la consommation du produit, puis d'adhérer aux cellules épithéliales de l'intestin afin de produire les effets désirés le plus longtemps possible (Tamime et al, 1995).

# *Introduction*

---

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons réalisé au cours de l'année des travaux traitant certains effets probiotiques des bactéries lactiques. Les souches utilisées ont été précédemment isolées à partir de lait de diverses origines. Nous avons également réalisé un screening des souches présentant les caractéristiques microbiologiques et physiologiques recherchées à cette issue.

Nous nous sommes penchés sur deux principaux volets :

Une partie *in vitro* traitant le potentiel probiotique d'un ensemble de souches lactiques, ce caractère est révélé par leur aptitude à résister aux diverses conditions hostiles rencontrées le long du tractus intestinal, à leur pouvoir lipolytique ainsi qu'à leur capacité à dégrader le cholestérol.

Une autre partie *in vivo*, au cours de laquelle nous avons examiné l'impact de la consommation des souches sélectionnées sur la flore intestinale, les paramètres de croissance ainsi que sur les paramètres biochimiques du rat Wistar recevant un régime hyperlipidique.

### **I. Les bactéries lactiques :**

#### **I--1-Historique :**

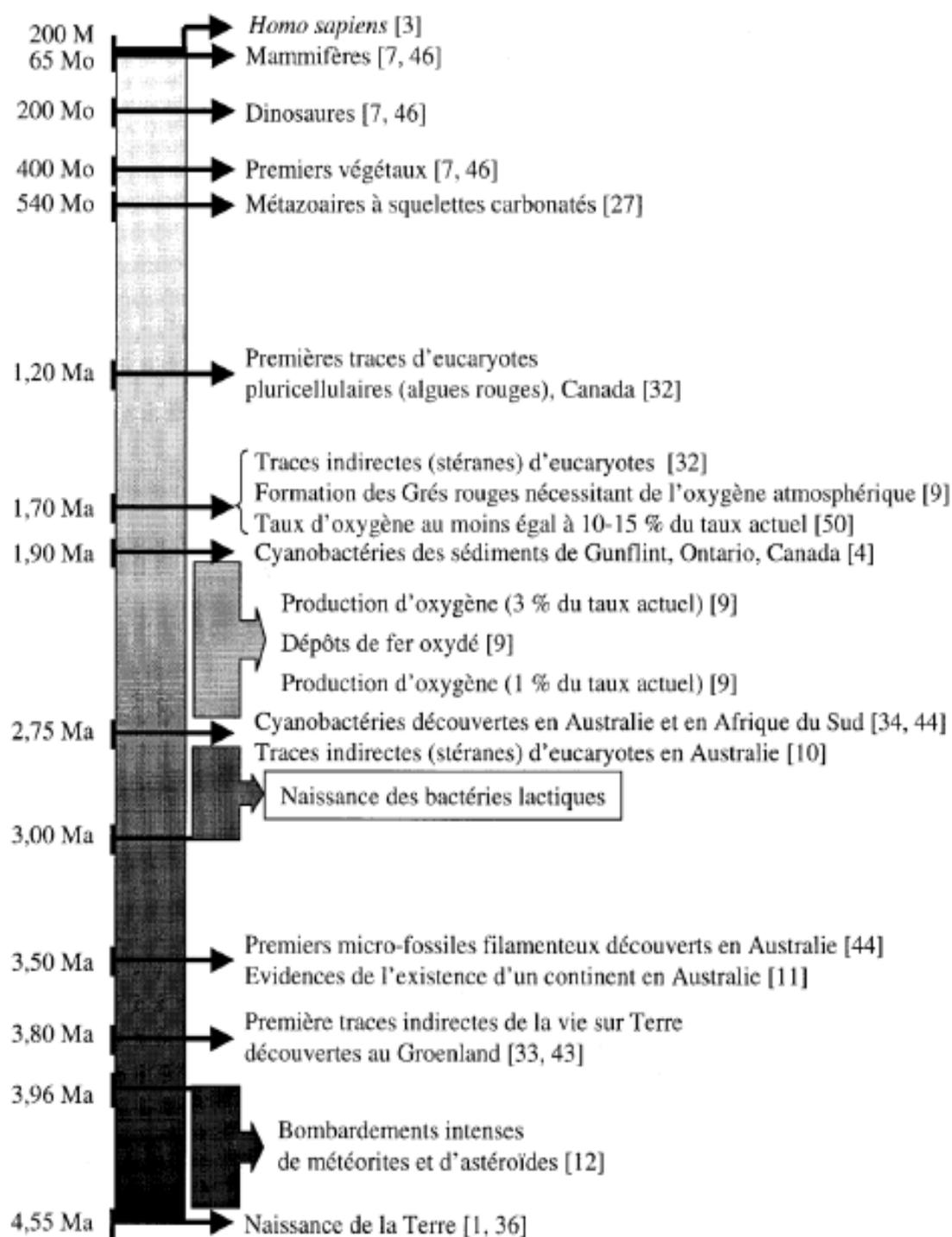
L'essor des bactéries lactiques a bénéficié de celui des grands mammifères, producteurs de lait, commencé il y a 65 millions d'années. Il s'est accentué lorsque l'homme est passé du statut de chasseur-cueilleur à celui d'éleveur, il y a environ 8000 ans avant J.-C. Les premiers vases perforés de petits trous, retrouvés sur les rives du lac de Neuf châtel, datent de 3 000 ans avant J-C (Tailliez, 2001) (**Figure 01**).

Il fallait attendre Pasteur et ses travaux sur la fermentation en 1857 pour établir un lien entre la fermentation lactique et les bactéries. La première culture bactérienne pure sera d'ailleurs une culture de *Lactococcus lactis* obtenue et décrite par Joseph Lister en 1873. Metchnikoff isole en 1904 « le Bacille bulgare » (*Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*) présent dans le yaourt. Il étudie les propriétés acidifiantes des bactéries du yaourt et il développera l'idée que les bactéries contenues dans les laits fermentés ont un effet bénéfique sur la santé (Penaud, 2006). Cependant, ce groupe bactérien n'a été défini qu'en 1919 par Orla Jensen (Leuveau et Bouix, 1993).

Avant le vingtième siècle, le terme bactéries lactiques (*Lactic acid bacteria*) a été utilisé pour désigner les organismes du lait acidifié (*Milk-souring organisms*). Significativement, la première culture pure de ces bactéries était celle de *Bacterium lactis* (probablement *Lactococcus lactis*), obtenu par Lister (1873). Des progrès importants dans la classification de ces bactéries ont été apparus quand les similarités entre les bactéries du lait acidifié et les autres bactéries productrices d'acide lactique étaient reconnues (Axelsson, 2004).

Les bactéries lactiques sont généralement associées aux habitats riches en nutriments, comme divers produits alimentaires (lait, viande, boisson, végétaux), mais d'autres sont aussi membres de la flore normale de la bouche, l'intestin et le vagin des mammifères (Salminen, 2004 et Carina Audisio *et al.*, 2010).

## Partie bibliographique



**Figure 01 :** Chronologie du développement de la vie sur Terre.

(Ma) : milliards d'années ;(Mo): Millions d'années ; (M) : milliers d'années (Tailliez, 2001).

## *Partie bibliographique*

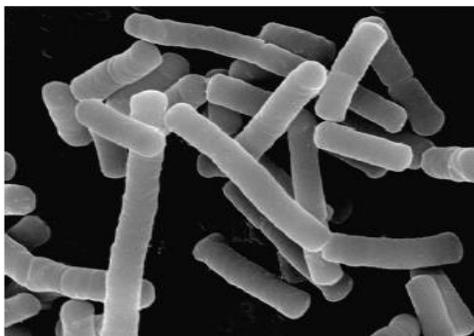
---

### **I-2-Définition :**

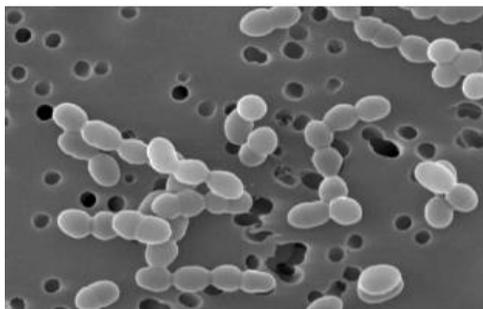
Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. Le groupe des bactéries lactiques, été défini pour la 1<sup>ère</sup> fois par Orla –Jensen en 1919, réunit plusieurs genres de différentes morphologies (Voir figures 02 et 03) ayant pour caractère commun leur capacité à fermenter le lactose en produisant de l'acide lactique (Novel., 1993).

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, gram-positives, hétérotrophes et chimioorganotrophes. Elles sont le plus souvent immobiles, jamais sporulées, catalase négative, oxydase négative, anaérobies facultatives, micro aérophiles (Tailliez, 2001).

Toutes les bactéries lactiques possèdent un métabolisme fermentaire leur permettant, en utilisant des sucres fermentescibles, de produire principalement de l'acide lactique mais aussi d'autres acides organiques (acide acétique, acide formique) (Raynaud., 2006).



**Figure 02:** *Lactobacillus* (Rosell-11) observé au microscope électronique à transmission (x10000) (Référence électronique 1).

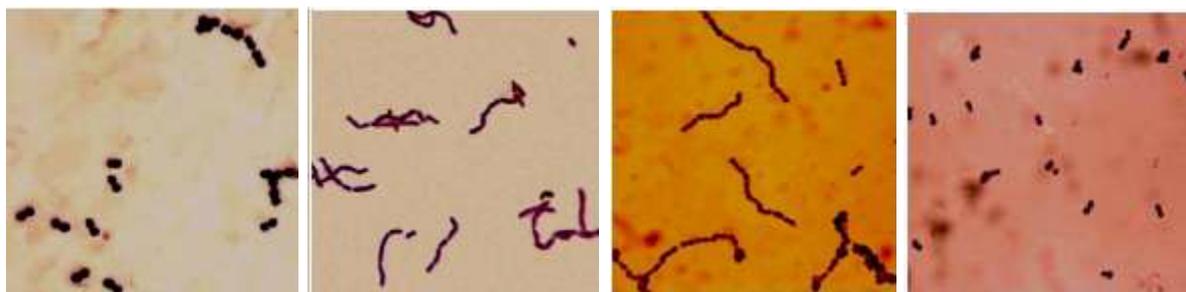


**Figure 03 :** *Leuconostoc lactis* observé au M.E.T. (x 10000) (Référence électronique 2).

### I-3- Caractéristiques des bactéries lactiques

✓ **Caractères morphologiques et structuraux :**

- La forme : des cellules microbiennes représentent souvent un caractère distinctif de l'espace et du genre bactérien (coques ou bâtonnets) (Prevost, 2009), **figure 04** illustre quelques exemples.



**Figure 04:** Différente forme microscopique de bactéries lactiques obtenues au laboratoire de microbiologie appliquée de l'université d'Oran par Saidi (2007).

De gauche – droite, Diplocoques (*Leuconostoc sp.*), (*Lactobacillus sp.*), streptocoques et diplocoques (*Lactococcus lactis sp.*) (Grossissement x 1000).

- Le diamètre cellulaire : est un caractère plus stable que la longueur cellulaire.
- La mobilité: est une caractéristique rare chez les bactéries lactiques qui sont généralement non mobiles, sauf dans certains cas où elles possèdent des flagelles péritriches.
- La sporulation: toutes les bactéries lactiques sont non sporulées.
- L'analyse de ces composés cellulaires est entrain de devenir un instrument essentiel non seulement pour la classification mais aussi pour l'identification des bactéries.
- Les recherches chimio taxonomiques réalisées sur les bactéries ont contribué de façon fondamentale à expliquer les relations génétiques intra et inter spécifiques.
- La présence d'inclusions cellulaires, corpuscules métachromatiques ou de volutine, est un caractère distinctif de certaines espèces du genre *Lactobacillus* homofermentaires strict (Renouf, 2006).

## *Partie bibliographique*

---

### ✓ **Caractères physiologiques et biochimiques :**

Regroupent la quantité et la configuration de l'acide lactique produit, la température de croissance minimale, optimale et maximale, la tolérance à l'oxygène et au chlorure de sodium, production de gaz et d'arôme, la production d'ammoniaque à partir de l'arginine, la capacité d'hydrolyser l'esculine ou de résister aux sels biliaires et à différentes valeurs de pH (Luquet et de Roissard, 1994).

### ✓ **Caractères immunologiques :**

La réaction immunologique se traduit par l'agglutination des cellules bactériennes ou par la précipitation à l'interface antigène-antisérum (de Roissard et Luquet 1985).

La sérologie a été utilisée pour la classification et l'identification des Streptocoques, depuis que Lancefield (1933), propose les premiers groupements. Les groupes sérologiques comme le cas des streptocoques lactiques qui sont rangés dans le groupe sérologique N.

### **I-4- Génétique des bactéries lactiques**

Le matériel génétique des bactéries lactiques est organisé en deux structures: le chromosome, long filament d'ADN très replié sur lui-même, et les plasmides, petites molécules circulaires d'ADN indépendantes du chromosome, pouvant se répliquer de façon autonome. Les plasmides peuvent être perdus spontanément par la bactérie dans les conditions de milieu défavorables (température élevée, privation nutritionnelles) ou éliminés par des traitements chimiques. Cette possibilité de perdre spontanément des plasmides explique l'instabilité des propriétés technologiques, due à l'apparition de variantes ayant perdu certains gènes et donc certaines fonctions métaboliques. Ainsi, la perte du plasmide codant pour la protéase de paroi rend les bactéries peu protéolytiques, et entraîne une croissance ralentie des germes et une acidification faible du lait.

D'autres caractères technologiques sont également codés par des gènes portés par des plasmides: la capacité à utiliser le lactose, le métabolisme de précurseurs d'arômes, la production de la nisine chez certaines souches, des résistances aux bactériophages (Stackebrandt et Teuber, 1988 et Kandler et Weiss, 1986).

### **I-5-Origine des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques ont été retrouvées dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années bien avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie (Quiberoni et *al.*, 2001). De plus, des études sur la phylogénie bactérienne mentionnent leur apparition avant celle des cyanobactéries (Quiberoni et *al.*, 2001). D'autres études montrent que certaines bactéries lactiques, comme *Lb. lactis*, sont en voie d'acquérir une chaîne respiratoire (Duwat et *al.*, 2001).

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

Selon Dasmazeaud (1992), les espèces du genre *Streptococcus* ; *Lactococcus* et *Leuconostoc* et se rencontrent plutôt chez les hommes ainsi que chez les animaux. Dans le domaine laitier. Elles existent en quantité considérable. Les espèces du genre *Lactobacillus* sont encore plus répandues dans la nature ; par exemple : on les trouve chez les végétaux ou elles assurent l'acidification de l'ensilage; on les trouve aussi dans l'intestin des animaux et de l'homme .elles sont également isolées des cavités naturelles d'organismes (cavités buccal et cavités vaginales) (De Roissard et Luquet 1985).

### **I-6- Habitat**

Les bactéries lactiques sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'Homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères (Klein et *al.*, 1998).

Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif (Douault et Corthier, 2000) et ont été également retrouvées dans le sol, les engrais, et les eaux d'égout (Holzapfel et *al.*, 1996. Cité par Givry, 2006).

## *Partie bibliographique*

---

Les bactéries lactiques ont pour habitat de nombreux milieux naturels, des végétaux (Plantes et fruits), des animaux et des humains (cavités buccales et vaginales, fèces et dans le lait). Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (De Roissart., 1986). Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des végétaux qui sont les réservoirs naturels de la plupart de ses espèces. L'espèce *Lactococcus lactis subsp. lactis* est isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par Lister en 1873 et reconnue comme agent primaire de l'acidification du lait caillé). (Bergey's manual., 2009) Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, *Streptococcus thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux.

Les espèces du genre *Leuconostoc* sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes (en particulier la betterave), des végétaux en fermentation (comme la choucroute), des produits de la panification et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries.

Les espèces du genre *Pediococcus* sont présentes surtout dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons alcoolisées, le lait, les différents fromages (Parmesan et autres fromages italiens) et les préparations culinaires (Saucisses, anchois salés ou sauce de soja). (Bekhouche., 2006).

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents : dans le lait et les fromages (*Lb. casei subsp. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* et *Lb. brevis*), dans les laits fermentés (*Lb. kefir*, *Lb. brevis* et *Lb. fermentum*), dans les produits végétaux fermentés, les marinades, l'ensilage, le vin et les viandes fraîches ou fermentées (*Lb. brevis*, *Lb. Curvatus*, *Lb. buchneri* et *Lb. san francisco*) (Demazeaud., 1996).

### **I-7- Classification des bactéries lactiques :**

Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques : la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (De Roissart et Luquet., 1994; Holzapfel et al., 2001). Cependant, les études basées sur la comparaison des séquences de l'ARN ribosomal 16S ont montré que

## *Partie bibliographique*

---

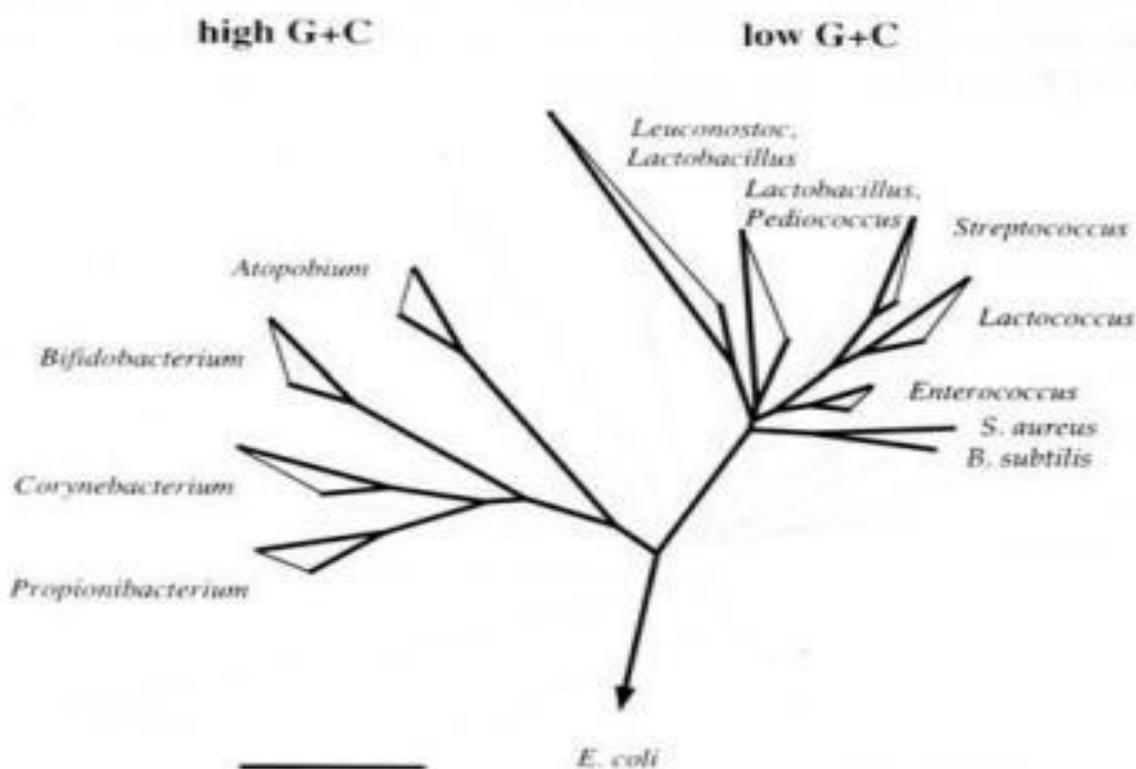
certaines taxons générés sur la base de la caractérisation phénotypique ne concordent pas avec les relations phylogénétiques suggérées. Ainsi, certaines espèces ne sont pas faciles à distinguer par des caractéristiques phénotypiques (Gevers., 2002). Par conséquent, Les méthodes de typage moléculaire telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), la réaction de polymérisation en chaîne utilisant des éléments répétés (rep-PCR), ainsi que la méthode de (RFLP) sont extrêmement précieux pour la caractérisation et la détection des bactéries lactiques (Holzapfel et *al.*, 2001).

Sur la base des données de séquençage de 16S et 23S de l'ADNr, les bactéries Gram positif forment deux embranchements (**figure 05**). Un embranchement composé de bactéries Gram positif avec un pourcentage G + C inférieur à 50% (*Clostridium*) et un autre formé de bactéries ayant une teneur en G + C supérieure à 50% (Actinomycètes) (Holzapfel et *al.*, 2001 ; Gevers., 2002).

Les bactéries lactiques typiques ont une teneur en G + C inférieure à 50% alors que le genre *Bifidobacterium* qui, d'un point de vue physiologique, fait partie des bactéries lactiques, appartient à la branche des Actinomycètes qui comprend aussi *Propionibacterium* et *Brevibacterium* (Vandamme et *al.*, 1996). Il y a peu de corrélation entre la classification traditionnelle et la parenté phylogénétique des bactéries lactiques.

Des genres morphologiquement distincts, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont phylogénétiquement entremêlés (Schleifer et Ludwig., 1995 ; Gevers., 2002).

## Partie bibliographique



**Figure 05:** Arbre phylogénétique des bactéries Gram positives basé sur la comparaison des séquences de l'ARNr 16S. La barre indique une divergence de séquence à 10%. (Schleifer et Ludwig., 1995)

Les bactéries lactiques sont définies comme des bactéries qui fermentent le glucose pour produire surtout l'acide lactique. Cependant cette définition couvre plus de taxa que ceux désignés par bactéries lactiques. C'est surtout leur importance dans la fermentation des aliments et produits alimentaires (viandes, végétaux, fruits, poissons, produits laitiers et ensilage) qui les délimite (Vandamme et *al.*, 1996). Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents ; *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*. (Carine et *al.*, 2009). Les principaux genres des bactéries lactiques décrits dans les paragraphes suivants sont classés dans le même phylum, classe et ordre : Phylum BXIII : *Firmicutes* Classe I : *Bacilli* Ordre II :

## Partie bibliographique

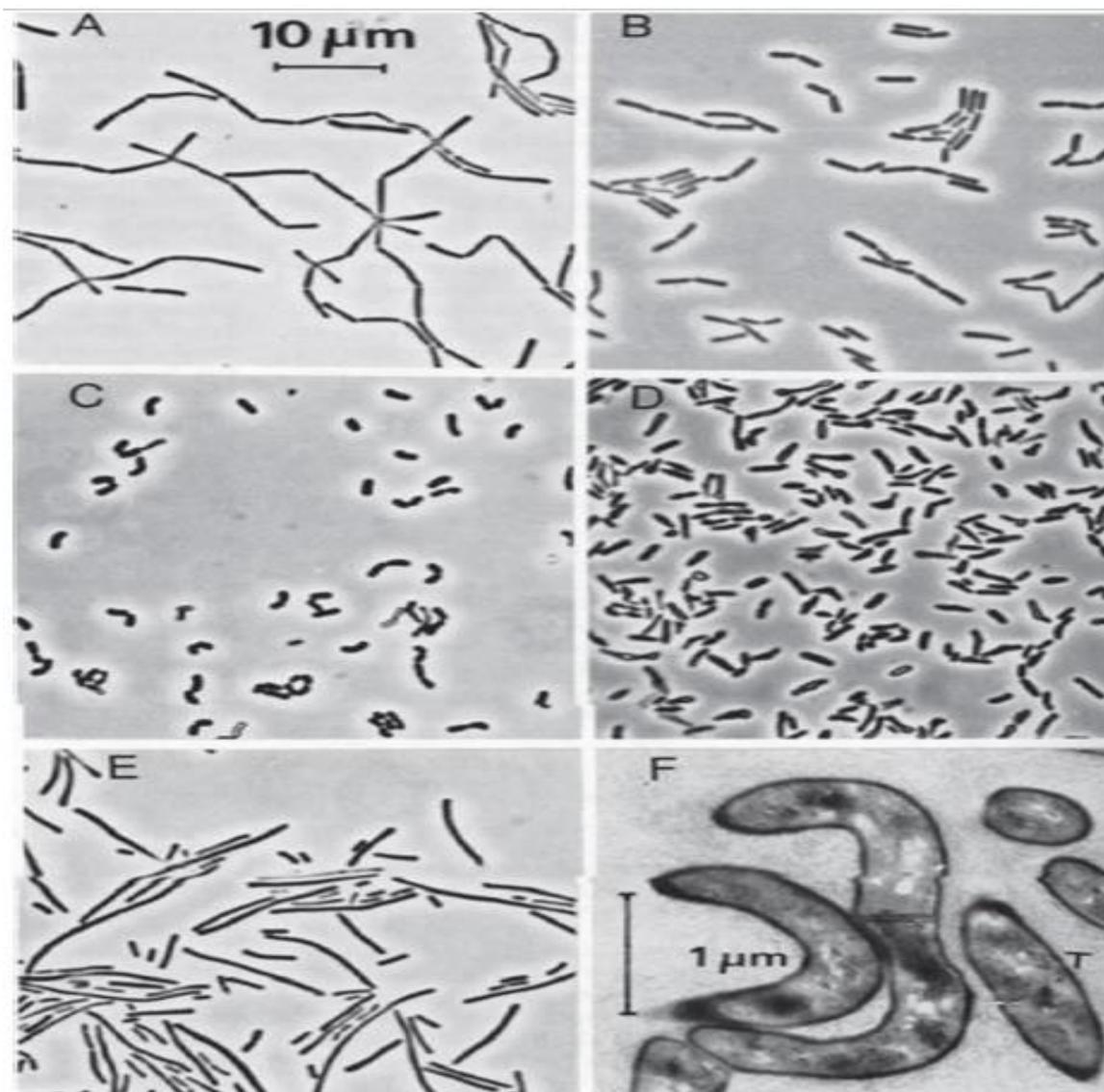
*Lactobacillales* Seuls varient les familles et les genres qui seront précisés dans chaque partie  
Le **tableau 1** représente les différents genres de bactérie lactique.

**Tableau 1.** Quelques genres de bactéries lactiques (Bekhouché., 2006)

Genres	cellules		fermentation	ADN G+C(%)	Références
	forme	Arrangements			
Streptococcus	Coques	Chaines	Homolactiques	34-46	SCHLEIFER, 1986
Leuconostoc	Coques	Chaines	hétérolactiques	36-43	FARROW et al, 1989
Pediococcus	Coques	Tétrades	Homolactiques	34-42	SCHLEIFER, 1986
Lactobacillus	Bacilles	Chaines	Homolactiques et hétérolactiques	32-53	KANDLER et WEISS 1986

### I-7-1. Les Lactobacilles

Ce genre regroupe plus de 70 espèces (dont plusieurs sont divisées en sous-espèces). Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Les souches de Lactobacilles sont constituées de bacilles long et fin (parfois incurvés) ou de coccobacilles dont la forme est proche à celle des corynébactéries. Voir (**figure 6**).



**Figure 06 :** Phase contraste (A–E) et électron (F) micrographes montre les différent morphologies cellulaire de *Lactobacillus*: A, *Lactobacillus gasseri*; B, *Lactobacillus agilis*; C, *Lactobacillus curvartus*; D, *Lactobacillus minor*; E, *Lactobacillus fermentum*; et F, involution de *lactobacillus* dans une section mince de grain du kéfir. (Bergey's manual., 2009).

Les cellules sont généralement immobiles (pour les souches mobiles, la ciliature est péritriche). La production d'acide lactique issue du métabolisme fermentaire représente au moins 50 % des produits de fermentation (Axelsson., 1993). Les Lactobacilles

## *Partie bibliographique*

---

homofermentaires stricts regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Thermobacterium*, qui dégrade les hexoses en acide lactique.

### ❖ **Les Lactobacilles hétérofermentaires stricts**

Regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Bêtabacterium*, fermentent les hexoses en acide lactique, en acide acétique ou en éthanol et CO<sub>2</sub> (voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase/phosphocétolase). Ils dégradent les pentoses en acide acétique et en acide lactique (voie hétérofermentative de la glycéraldéhyde-3-phosphate/pyruvate kinase/lactate déshydrogénase). Ces bactéries produisent du CO<sub>2</sub> lors de la fermentation du glucose et du gluconate.

### ❖ **Les Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs**

Regroupent les espèces de l'ancien sous genre *Streptobacterium*, métabolisent les hexoses en acide lactique par la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof-Parnas EMP et dégradent les pentoses par voie hétérofermentaire. Ils ne produisent pas de CO<sub>2</sub> lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la Fermentation du gluconate (Stiles et Holzappel., 1997). L'établissement d'un arbre phylogénique construit à partir des séquences d'ARN 16S a démontré que les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont très liés (malgré leurs caractères morphologiques et physiologiques très différentes) (Schleifer et Ludwig., 1995).

Selon Atlan (2000), ce critère physiologique a conduit à la classification des Lactobacilles en trois groupes qui diffèrent largement de celle déterminé précédemment par Orla-Jensen (1919).

- **Le groupe *Delbrueckii***

Comprend les espèces : *Lactobacillus delbrueckii*, *Lb. helvetis*, *Lb. crispatus*, d'autres lactobacilles homofermentaires et les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (*Lb. acetotolerans* et *Lb. hamsteri*).

- **Le groupe *Casei-Pediococcus***

Est le groupe le plus large car il regroupe de très nombreux *Lactobacillus* homofermentaires stricts (*Lb. avarius*, *Lb. salivarius*), hétérofermentaires facultatifs (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. sake*, *Lb. curvatus*) et des hétérofermentaires stricts (*Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb.*

## **Partie bibliographique**

*buchneri*, *Lb. reuteri*, *Lb. sanfrancisco*, *Lb. parakefir*). Ce groupe contient aussi la plupart des souches de *Pediococcus* (*Pc. damnosus*, *Pc. parvulus*, *Pc. acidilactici*, *Pc. pentosaceus*).

- **Le groupe *Leuconostoc***

Comprend les Lactobacilles hétérofermentaires stricts et les espèces du genre *Leuconostoc* (*Ln. amelibiosum*, *Ln. carnosum*, *Ln. gelidum*) ainsi que le genre *Weissella* dans lequel sont regroupés plusieurs Lactobacilles hétérofermentaires (*Lb. confusus*, *Lb. viridescence*, *Lb. halotolerans*) et *Ln. paramesenteroides*. La classification des lactobacilles selon Atlan (2000) est donnée dans le (tableau 2).

**Tableau 2** : la nouvelle classification des lactobacilles selon Atlan (2000)

<b>Groupe1 : <i>Delbrueckii</i></b>	<b>Groupe2 : <i>casei-Pediococcus</i></b>	<b>Groupe3 : <i>Leuconostoc</i></b>
<i>Lb. delbrueckii</i>	Homofermentaires stricts	Hétérofermentaires stricts
<i>Lb. Acidophilus</i>	<i>Lb. Avarius</i>	Genre <i>Leuconostoc</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Ln. amelibiosum</i>
<i>Lb. crispatus</i>	Hétérofermentaires facultatifs	<i>Ln. carnosum</i>
Autres Homofermentaires	<i>Lb. casei</i>	<i>Ln. gelidum</i>
Hétérofermentaires Facultatifs	<i>Lb. plantarum</i>	Genre <i>Weissella</i>
<i>Lb. Acetotolerans</i>	<i>Lb. sake</i>	<i>Ln. paramesen</i>
<i>Lb. hamster</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. confusus</i>
	Hétérofermentaires stricts.	<i>Lb. halotolerans</i>
	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. viridescens</i>
	<i>Lb. fermentum</i>	
	<i>Lb. buchneri</i>	
	<i>Lb. reuteri</i>	
	<i>Lb. sanfrancisco</i>	
	<i>Lb. parakefir</i>	
	Genres <i>Pediococcus</i>	
	<i>Pc. damnosus</i>	
	<i>Pc. parvulus</i>	
	<i>Pc. acidilactici</i>	
	<i>Pc. Pantosaceus</i>	

En synthèse, les principales caractéristiques des bactéries lactiques sont résumées sur le **tableau 3**.

## *Partie bibliographique*

**Tableau 3 :** Principales caractéristiques des bactéries lactiques (Makhloufi, 2012).

Bactérie lactique	Propriétés cellulaires			Propriétés biochimiques		Informations génétiques		références
	Aspect	habitat	T° Optimale (°C)	CO <sub>2</sub>	Configuration acide lactique	% GC	Taille génome (Mpb)	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> <b>ATCC15703</b>	Bacille	intestin	37	-	D ,L,(D+L)	59	2,1	(Suzuki et al., 2006)
<i>Bifidobacterium longum</i> <b>DJO10A</b>	Bacille	Intestin, tractus génital	37-41	-	D,L,(D+L)	60	2,3	(Lee et al., 2008)
<i>Carnobacterium</i> sp. <b>AT<sup>s</sup></b>	Bacille chaine	Viande, poisson	25-43	-	L	35	2,4	(Bartlett et al., 2007)
<i>Enterococcus faecalis</i> <b>AR01/DG</b>	Coque isolé	Intestin, Lait	37	-	L	37	2,8	(Feldgarden et al., 2009)
<i>Lactobacillus casei</i> <b>ATCC 334</b>	Bacille chaine	tractus Gastrointestinal et vaginal, lait	25-42	+/-	D,L,(D+L)	46	2,9	(Makarova et al., 2006)
<i>Lactobacillus fermentum</i> <b>IFO 3959</b>	Bacille	tractus Gastrointestinal et vaginal	25-41	+/-	D,L,(D+L)	51	2,1	(Morita et al., 2008)
<i>Lactobacillus helveticus</i> <b>DPCE4571</b>	Bacille	fromage	25-36	+/-	D,L,(D+L)	37	2,1	(Callanan et al., 2008)
<i>Lactobacillus plantarum</i> <b>WCFS1</b>	Bacille isolé	Plantes, tractus gastrointestinal , lait	25-35	+/-	D,L,(D+L)	44	3,3	(Kleerebezem et al., 2003)
<i>Lactobacillus reuteri</i> <b>DSM20016</b>	Bacille chaine	Tractus gastrointestinal et vaginal, lait	25-37	+/-	D, L,(D+L)	38	2	(Copeland et al., 2007)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <b>GG</b>	Bacille	Tractus gastrointestinal et vaginal, lait	25-38	+/-	D, L,(D+L)	46	3	(Kankainen et al., 2009)
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> <b>23K</b>	Bacille	Tractus gastrointestinal et vaginal, lait	25-39	+/-	D, L,(D+L)	41	1,9	(Chaillou et al., 2005)
<i>Lactobacillus salivarius</i> <b>UCC118</b>	Bacille	Tractus gastrointestinal et vaginal	25-40	-	D,L,(D+L)	32	1,8	(Claesson et al., 2006)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <b>SK11</b>	Coque, chaine, paire	Lait, fromage, yaourt	40	-	L	35	2,4	(Makarova et al., 2006)

## *Partie bibliographique*

<i>Leuconostoc citreum</i> <b>KM20</b>	Coque isolé,	Viande, plante	20-30	+	D	38	1,8	(Kim et al., 2008)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> <b>ATC C8293</b>	Coque isolé, chaîne, paire	Viande, plante	40	+	D	37	2	(Makarova et al., 2006)
<i>Oenococcus oeni</i> <b>PSU-1</b>	Coque isolé, chaîne	vin	17-25	+	D	37	1,8	(Makarova et al., 2006)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> <b>ATCC25745</b>	Tétrade *	Viande, plante, fromage	30	-	D,L	37	1,8	(Makarova et al., 2006)
<i>Streptococcus agalactiae</i> <b>A909</b>	Coque isolé	peau	37	-	L	35	2,1	(Tettelin et al., 2005)
<i>Weissella paramesenteroides</i> <b>ATCC33313</b>	Coque isolé	plante	30	+	D, (D+L)	37	1,9	(Qin et al., 2009)

### Notes :

+ : production de dioxyde de carbone(CO<sub>2</sub>).

- : absence de production de CO<sub>2</sub>.

D : l'isomère optique formé de l'acide lactique est de configuration D.

L : l'isomère optique formé de l'acide lactique est de configuration L.

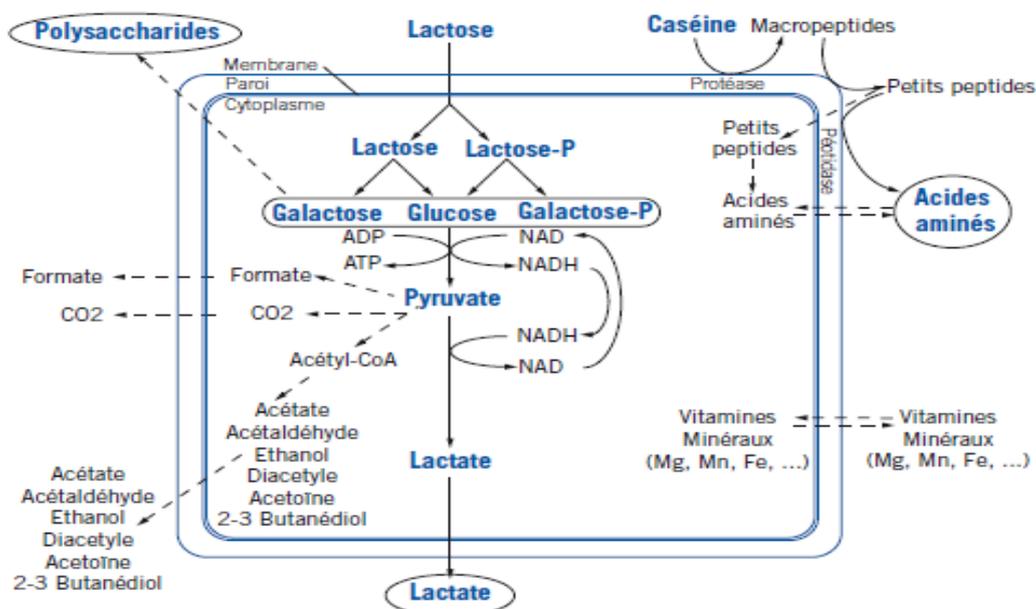
D+L : l'acide lactique est sous forme racémique.

\* : une tétrade est formée lorsque quatre bactéries sont associées entre elles.

### **I-8- Métabolisme des bactéries lactiques**

Le métabolisme d'une cellule vivante est l'ensemble des réactions de dégradations et d'échange avec le milieu environnement (**figure 7**) pour assurer sa croissance et sa reproduction. (Catabolisme) et de synthèses (anabolisme) permettant d'établir un cycle. Puisque la cellule vivante obéit au premier principe de thermodynamique (conservation de l'énergie), l'énergie produite par les réactions de dégradation du substrat compense l'énergie consommée par les réactions de synthèse des constituants cellulaires ; il y a donc couplage énergétique entre les réactions anaboliques et cataboliques.

En réalité ces réactions peuvent être encore plus étroitement liées : par exemple, des réactions cataboliques peuvent à la fois produire de l'énergie et être à l'origine de métabolites (sucre, nucléotides, acides aminés, acides gras) entrant dans les réactions anaboliques de biosynthèse (Thompson et Gentry –Weeks, 1994).

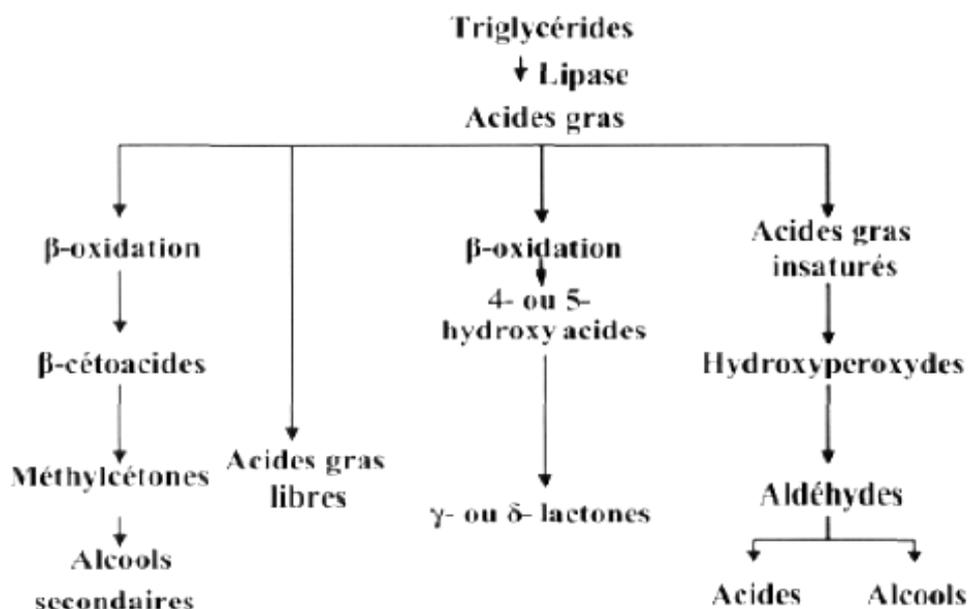


**Figure 07 :** les principales voies métaboliques des bactéries lactiques (Thompson et Gentry – Weeks, 1994).

### A- La lipolyse

Relativement faible chez les ferments lactiques, l'activité lipasique contribue à l'élaboration de la flaveur des fromages lors de la maturation (Stackebrandt *et al* 2002).

L'hydrolyse des triglycérides est la transformation biochimique principale du gras fromager pendant la maturation et conduit à la formation des acides gras libres, mono et diglycérides et probablement du glycérol (Siegumfeldt *et al.*, 2000). Les lipases bactériennes catalysent en partie la production des acides gras à longues chaînes à partir des mono et diglycérides, alors que les estérases permettent la libération des acides gras volatils. Les acides gras, dont la concentration augmente pendant l'affinage, seraient responsables en partie de la flaveur typique des fromages à pâte pressée cuite. Ils sont également des précurseurs pour la formation de méthylacétones, alcools, lactones et esters (Siegumfeldt *et al* 2000). **La Figure 8** présente les différentes voies conduisant à la formation de ces composés.



**Figure 8 :** Principales voies de la lipolyse (Siegumfeldt *et al.*, 2000) Tel que rapporte par Montel (1991), les estérases et lipases microbiennes sont des enzymes intracellulaires dont les activités sont maximales pendant la phase exponentielle de croissance et dépendent des milieux de culture.

Il a été observé que les milieux à base de lait stimulaient la production de ces enzymes chez les lactocoques et que l'addition de glutathion augmentait l'activité esterasique des sous espèces *lactis* et *cremoris*. Cette dernière démontrait une plus grande activité esterasique que la sous espèce *lactis*. Les estérases des bactéries lactiques hydrolysent préférentiellement les substrats estérifiés avec des acides gras a chaîne courte, mais avec des spécificités différentes, caractéristiques des souches.

### I-9-Principales voies fermentaires des bactéries lactiques

Toute croissance nécessite la production d'énergie et les bactéries lactiques ne font pas exception à la règle. Hétérotrophes, elles tirent leur énergie de la fermentation de substrats carbonés. Les carbohydrates fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccarides

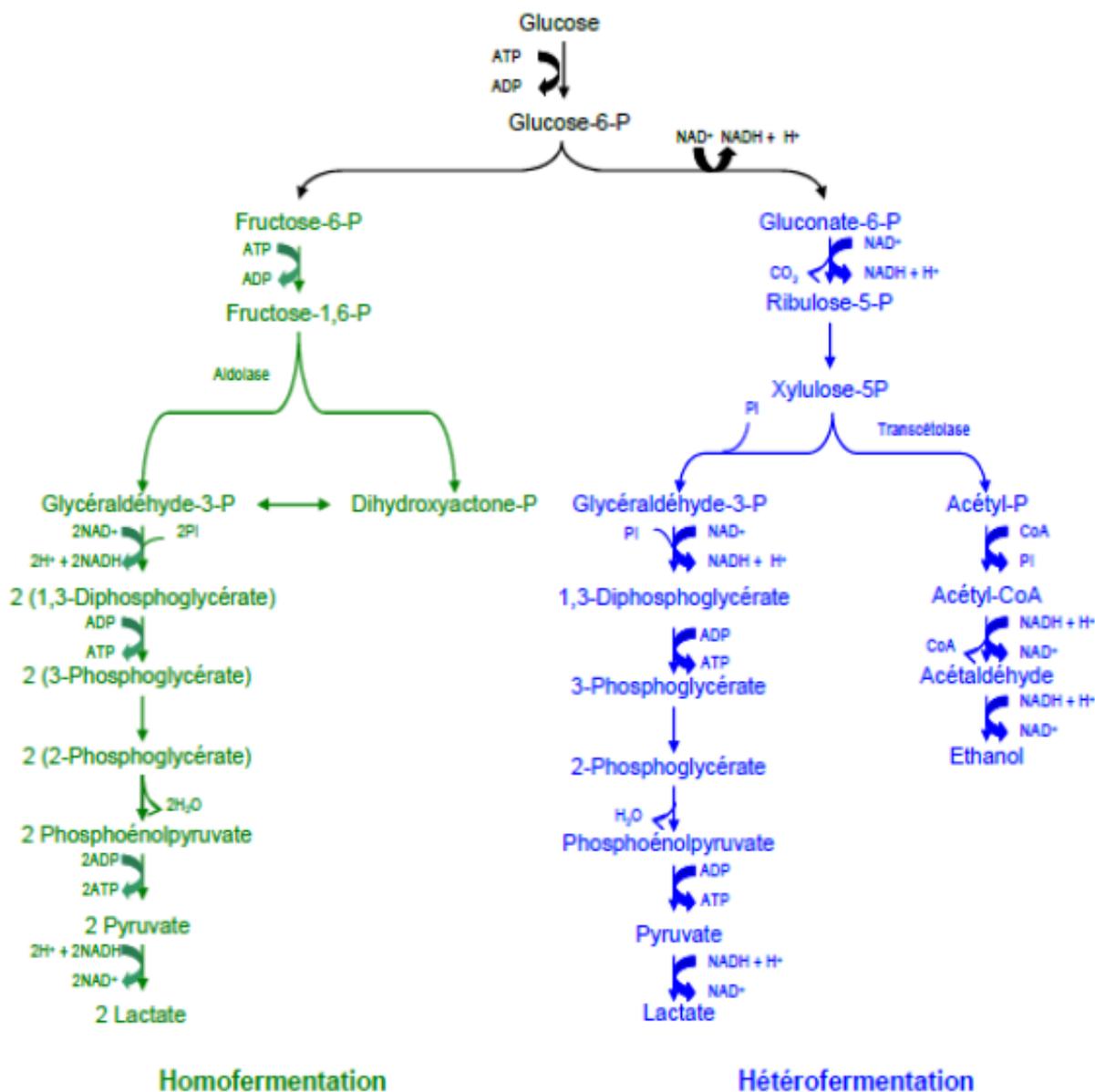
## *Partie bibliographique*

---

(lactose, saccharose, cellobiose, tréhalose). La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes (Atlan et *al.*, 2008) :

- Le transport du sucre à travers la membrane cellulaire.
- Le catabolisme intracellulaire du sucre.
- Formation et expulsion extracellulaire des métabolites terminaux.

Selon les genres ou espèces, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres (**figure 9**). Il s'agit des voies homofermentaire (Emden- Meyerhof-Parnas, EMP) et hétéro fermentaire (voie des pentoses-phosphate) (Atlan et *al.*, 2008).



**Figure 9 :** Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques.

ATP : adénosine triphosphate. / ADP : adénosine diphosphate.

NAD<sup>+</sup>/ NADH, H<sup>+</sup> : Couple oxydant/réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide.

Pi : phosphate inorganique. (Makhloufi., 2012).

## *Partie bibliographique*

---

### **1-9-1- Voie homofermentaire ou EMP**

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pediocoques, ainsi que certains lactobacilles. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la Production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. La fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

### **1-9-2- Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate**

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> sont dites hétérofermentaires. Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les leuconostocs et certains lactobacilles.

Ces microorganismes sont dépourvus d'une FBA et le système de transport PTS (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

## **I-10-Culture des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques demandent des milieux riches en différents nutriments pour croître (sucres, acides aminés, acides gras, sels, vitamines) et pauvres en oxygène (Hammes et Hertel, 2006).

Elles sont essentiellement cultivées dans :

- Le milieu Man Rogosa Sharpe (MRS). Ce milieu est très riche, permet un développement rapide de toutes les espèces de lactobacilles, qui offre aux bactéries à culture difficile différentes sources de carbone et d'azote, telles que les peptones, le glucose et le Tween 80 (Sakili et Issoual., 2003).
- Le milieu Chalmers. Ce milieu permet une meilleure reconnaissance de ces bactéries qui s'entourent d'une auréole transparente caractéristique de leur présence.
- Le milieu hypersaccharosé : Le Tween 80 était initialement utilisé comme émulsifiant dans la préparation des milieux de culture avant d'être considéré comme source de carbone pour les bactéries.
- Milieu MEVAG sans sucre.

- Milieu Lait écrémé tournesolé.
- M17 agar (Georgieva *et al*, 2009).

### **I-11- Interaction chez les bactéries lactiques :**

Les interactions entre les micro-organismes associés peuvent être bénéfiques pour l'un des micro-organismes ou pour les deux, c'est le cas d'une symbiose ou de coopération entre les deux micro-organismes. Si aucun effet n'apparaît, alors on considère que les deux micro-organismes se développent indépendamment l'un de l'autre. Si elles sont néfastes pour l'un des deux micro-organismes, on parle d'inhibition.

#### **I-11-1- Les interactions positives:**

L'interaction positive se traduit par une stimulation ou coopération due à la production de nutriments azotés et à une modification des conditions physiologiques. Ex: la proto-coopération entre *Sc. thermophilus* et *Lb. delbruekii* subsp. *bulgaricus*.

#### **I-11-2- Les interactions négatives:**

Elles se traduisent par une inhibition due à une production de divers composés bactéricides, telle que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacetyl et les bactériocines (Juillard *et al*, 1987).

### **I-12- rôle et intérêt des bactéries lactiques dans le domaine sanitaire :**

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du siècle, en 1907 par le Russe Metchnikoff, selon lui les *Lactobacillus sp* pouvaient réduire la putréfaction intestinale en modifiant la flore intestinale. Le rôle des bactéries lactiques sur la santé était dans le cadre des probiotiques. Les bienfaits des bactéries lactiques sont de plus en plus étudiés, certains sont bien établis d'autres restent encore controversés :

- \*Améliore la digestion de lactose.
- \*Le traitement de certaines infections ou diarrhées.
- \*Diminution du cholestérol sérique et déconjugaison des sels biliaires.
- \*Utilisation dans l'élaboration des vaccins (Calvez *et al.*, 2009).

### **II- Les probiotiques et les prébiotiques**

#### **II-1-Définitions**

##### **A. Les probiotiques**

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

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

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

- être un habitant naturel de l'intestin,
- être capable de coloniser le milieu intestinal, persister et se multiplier

## *Partie bibliographique*

---

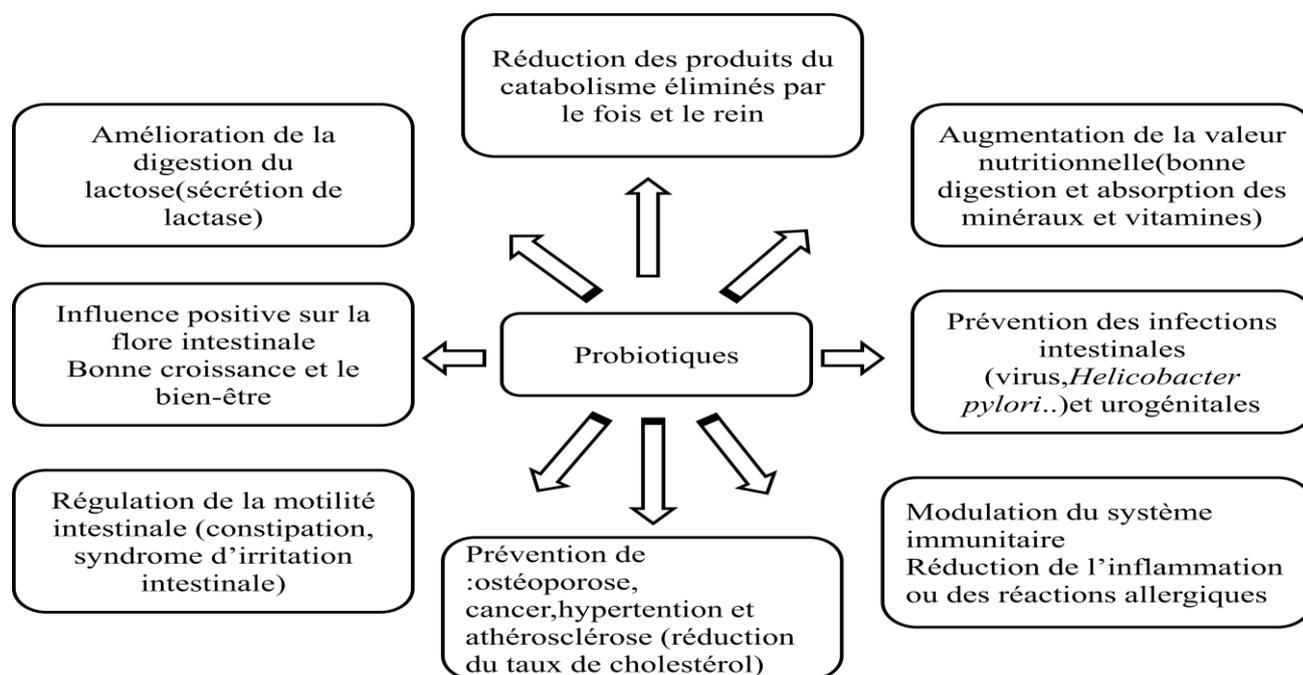
- Adhérer aux cellules intestinales et exclure ou réduit l'adhérence des pathogènes
- Avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (acides, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bactériocines...)
- Non invasif, non carcinogène et non pathogène
- Etre capable de co-agréger pour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

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

### **A-1-Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé :**

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation des probiotiques. La **Figure 10** illustre la diversité des effets bénéfiques sur la santé documentés et rapportés dans la littérature.

## Partie bibliographique



**Figure 10 :** Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques. Adapté de Mercenier *et al.* (2002).

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

a) Les probiotiques et les infections gastro-intestinales: des études cliniques ont démontré que des infections gastrointestinales causées par *Helicobacter pylori*, la diarrhée du voyageur, diarrhée due aux rotavirus, diarrhée associée aux antibiotiques comme celle causée par *Clostridium difficile*, peuvent être contrecarrées avec succès par l'utilisation de probiotiques (Mercenier *et al.*, 2002, Turchet *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Tursi *et al.*, 2004, Plummer *et al.* 2004). A titre d'exemple Wang *et al.* (2004) ont rapporté que la consommation régulière de yogourt additionné de *Lactobacillus acidophilus* La5 ou de *Bifidobacterium lactis* Bb12 induit une suppression effective de l'infection due à *H. pylori*. Tandis que Rosenfeldt *et al.*

## *Partie bibliographique*

---

(2002) ont mentionné que des souches de *L. rhamnosus* et *L. reuteri* ont permis de traiter des gastro-entérites à rotavirus chez des enfants hospitalisés.

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

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

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

**e)** Les probiotiques et les maladies inflammatoires de l'intestin: selon la littérature, les processus inflammatoires impliqués dans les pathologies de l'intestin de l'homme comme la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse et la pouchite sont contrôlés par les probiotiques. Une étude de Guandalini (2002) a montré que l'ingestion de *Lactobacillus GG* entraîne une amélioration notable de l'état clinique chez des enfants souffrant de la maladie de Crohn. De même Gosselink *et al.* (2004) ont observé des effets cliniques bénéfiques chez des patients affectés par une colite ulcéreuse après ingestion de produits fermentés contenant *Lactobacillus GG* (1-2x10<sup>10</sup> bactéries/jour).

**f)** Les probiotiques et la perméabilité intestinale : l'altération de la perméabilité intestinale (fonction-barrière) causée par une infection, toxines ou autre facteur favorise un transfert aberrant d'antigènes (y compris la microflore locale) à travers l'intestin en engendrant des

## *Partie bibliographique*

---

réponses immunitaires inappropriées (réactions inflammatoires ou auto-immunes) (Baumgart & Dignass, 2002 ; Gill, 2003). Des études récentes ont montré que la consommation de probiotiques stabilise la fonction barrière de l'épithélium intestinal. Par exemple, Isolauri *et al.* (1993) ont démontré que *Lactobacillus* GG normalise le processus de perméabilité intestinale chez le rat. En outre, une étude récente de Rosenfeldt *et al.* (2004) a démontré qu'une administration de probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus reuteri*) permet de stabiliser la fonction-barrière de l'intestin et de diminuer les symptômes gastro-intestinaux chez des enfants souffrant d'une dermatite atopique.

Cependant les mécanismes impliqués dans cette normalisation ne sont pas encore bien connus.

g) Les probiotiques et la motilité de l'intestin : la motilité intestinale joue un rôle important dans la réduction de la croissance des microorganismes pathogènes dans l'intestin. Les probiotiques pourraient avoir des effets positifs sur la motilité de l'intestin en réduisant le temps de transit des microorganismes pathogènes (Takiguchi *et al.*,1998). Une étude de Grimaud *et al.* (1993) a montré que l'ingestion de lait fermenté avec *Bifidobacterium animalis* entraîne une réduction significative du temps du transit du contenu gastro-intestinal chez des volontaires. Tandis que Verdu *et al.* (2004) ont rapporté que l'effet de *Lactobacillus paracasei* (probiotique) sur la motilité de l'intestin se traduit par une atténuation de l'hyper contractilité post-infection du muscle. Ils suggèrent que les probiotiques peuvent être utilisés dans le traitement du syndrome de l'intestin irritable.

Dans d'autres cas, les allégations-santé revendiquées demeurent purement hypothétiques et des études scientifiques plus approfondies sont nécessaires pour confirmer ou infirmer ces allégations. Cette situation est particulièrement vraie pour les effets des probiotiques sur le système immunitaire et pour lesquels très peu de preuves scientifiques et d'études cliniques ont été apportées pour valider ces allégations. Néanmoins, la stimulation du système immunitaire de l'hôte demeure un aspect très important dans le développement du concept « probiotiques », d'autant plus que certains travaux rapportés dans la littérature suggèrent que certaines souches à fort potentiel probiotique sont capables de stimuler certaines fonctions immunitaires notamment lors d'infections bactériennes ou virales.

## *Partie bibliographique*

---

### **A-2- Les principales souches microbiennes à potentiel probiotique**

#### **A-2-1- Les souches probiotiques utilisées en alimentation humaine et animale**

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

En général, les souches probiotiques sont sélectionnées prioritairement pour leurs effets bénéfiques et leur sécurité d'utilisation (innocuité). Le **Tableau 4** rapporte quelques souches probiotiques pour les quelles des effets bénéfiques sur la santé sont bien documentés. Cependant, l'aptitude des souches bactériennes à stimuler la fonction immunitaire est très variable, seulement certaines souches sont reconnues capables d'exercer des effets immunomodulateurs sur l'organisme-hôte (Gill *et al.*, 2000). Il faut noter que les bactéries du genre *Bifidobacterium* sont de plus en plus utilisées dans les produits probiotiques à causes des nombreux effets bénéfiques sur la santé associés à leur consommation. (Kimura *et al.*, 1998). Pour obtenir certains effets positifs sur la santé (réduction des infections intestinales, digestion du lactose, réduction du cholestérol...), une souche probiotique doit atteindre le gros intestin à une concentration d'environ  $1 \times 10^7$  cellules viables/gramme (Stanton *et al.*, 2001). De ce fait, la concentration d'un probiotique dans un aliment doit tenir compte de cette contrainte pour permettre d'atteindre les concentrations ciblées dans le colon. Cette concentration dépend évidemment de la nature de l'aliment utilisé et de la quantité journalière consommée.

## *Partie bibliographique*

**Tableau 04** : Quelques souches probiotiques et leurs effets cliniques. Adapté de Mattila-Sandholm *et al.* (1999).

<b>Souche probiotique</b>	<b>Effets cliniques sur l'Homme</b>
<i>Lactobacillus GG ATCC 53103</i>	Adhésion aux cellules intestinales humaines, réduction de l'activité des enzymes fécales, prévention des diarrhées associées aux antibiotiques, prévention et traitement des diarrhées à rotavirus et autres diarrhées, modulation de la réponse immunitaire
<i>Lactobacillus johnsonii Lj-1(LA-1)</i>	Prévention de la diarrhée du voyageur, modulation de la flore intestinale, réduction des symptômes de l'intolérance au lactose, traitement de la constipation, amélioration de l'immunité, adjuvant dans le traitement de <i>Helicobacter pylori</i>
<i>Bifidobacterium lactis (bifidum) Bb-12</i>	Prévention de la diarrhée du voyageur, traitement des diarrhées virales (rotavirus), modulation de la flore intestinale, traitement de la constipation, modulation de la réponse immunitaire.
<i>Lactobacillus reuteri ATCC 55730</i>	Colonisation du tractus intestinal, réduction de la durée des diarrhées aux rotavirus, traitement des diarrhées virales
<i>Lactobacillus casei Shirota</i>	Modulation de la flore intestinale, réduction de l'activité des enzymes fécales, effets positifs sur le cancer superficiel.
<i>Lactobacillus plantarum DSM 9843</i>	Adhésion aux cellules intestinales humaines, modulation de la flore intestinale
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Prévention et traitement des diarrhées associées aux antibiotiques (ex. <i>Clostridium difficile colitis</i> )

### **A-2-2- Les bifidobactéries**

Les bactéries appartenant au genre *Bifidobacterium*, ont été décrites pour la première fois par Tessier (1900) qui a isolé à partir de fèces d'un enfant allaité au sein, une bactérie anaérobie de morphologie bifide qu'il appela *Bacillus bifidus*. En général, les bifidobactéries montrent un polymorphisme cellulaire (bifide ou ramifié) dépendant des conditions de culture comme teneur du milieu en N-acetylglucosamine, alanine, acide glutamique ou ions Ca<sup>2+</sup> (Scardovi, 1984). Diverses espèces et souches de bifidobactéries de propriétés fonctionnelles différentes peuvent coloniser simultanément l'intestin de homme (Matto *et al.*, 2004).

## *Partie bibliographique*

Les bifidobactéries sont des bactéries Gram-positives, immobiles, non sporulées, non productrices de gaz, anaérobies (sauf quelques espèces pouvant tolérer l'oxygène), catalase négatives (excepté *B. indicum* et *B. asteroides*) et saccharolytiques. Leurs niches écologiques sont: l'intestin de l'homme, la cavité buccale, le tractus gastro-intestinal de l'animal, l'intestin de l'insecte et les eaux résiduaires (Ventura *et al.*, 2004). La température de croissance des bifidobactéries isolées de l'humain ou des animaux varie respectivement de 36° à 38 °C et de 41° C à 43 °C (Dong *et al.*, 2000).

Les souches de bifidobactérie identifiées chez l'humain sont entre autres : *B. catenulatum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, (Scardovi 1984; Lauer & Kandler, 1983). Tandis que le groupe de bifidobactéries d'origine animale comprend principalement: *B. suis*, *B. thermophilum*, *B. animalis*, *B. pseudolongum*, (Matteuzzi *et al.*, 1971; Mitsuoka, 1969; Scardovi & Trovatelli, 1974; Simpson *et al.*, 2003).

La variation de la distribution des bifidobactéries dans le tractus gastro-intestinal de l'homme selon l'âge est indiquée dans le **Tableau 05**.

**Tableau 05** : Distribution des différentes espèces de *Bifidobacterium* dans le tractus digestif de l'homme en fonction de l'âge (Ballongne, 1993).

Population	Espèces mineures	Espèces majeures
Jeunes enfants nourris au sein		<i>B. longum</i> <i>B. infantis</i> <i>B. breve</i>
Jeunes enfants nourris au biberon	<i>B. bifidum</i> biovar.b	<i>B. adolescentis</i>
Enfants et adolescents		<i>B. infantis</i> <i>B. breve</i> <i>B. bifidum</i> biovar.b <i>B. longum</i>
Adultes	<i>B. bifidum</i> biovar.a	<i>B. adolescentis</i> biovar.a et b
Personnes âgées		<i>B. adolescentis</i> biovar.b <i>B. longum</i>

## *Partie bibliographique*

---

Du point de vue physiologique, les bifidobactéries se caractérisent par leur activité enzymatique leur permettant d'utiliser de nombreux sucres, comme le lactose, le galactose, le raffinose, le sucrose, l'amylopectine, l'amylose, le xylan, etc (Scardovi, 1984) et de produire de l'acide lactique et de l'acide acétique (Gibson & Wang 1994; Yildirim & Johnson 1998). Les bifidobactéries se distinguent des lactobacilles principalement par la production d'une enzyme caractéristique: fructose 6-phosphate phosphocétolase impliquée dans la voie métabolique de D-fructose-6-phosphate (DeVries et Stouthamer, 1967). Cette enzyme caractérise essentiellement les bifidobactéries provenant de l'humain, alors que les bifidobactéries isolées des animaux se distinguent par le duo de substrat : xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphocétolase (Meile *et al.* 2001). Une autre enzyme clé intervenant dans la fermentation des sucres a été identifiée chez les bifidobactéries, il s'agit de la  $\beta$ -galactosidase qui catalyse les réactions d'hydrolyse et de transgalactosylation (Zarate *et al.*, 1990; Hughes & Hoover, 1995; Tannock *et al.*, 2004).

Les méthodes classiques d'identification des bifidobactéries basées sur les propriétés phénotypiques et biochimiques (morphologie cellulaire, fermentation des sucres...) n'ont pas permis d'établir une classification définitive de ces bactéries, à cause des ambiguïtés observées dans les résultats d'analyse. La mise au point de nouvelles techniques basées sur la biologie moléculaire a permis de déterminer une unité phylogénétique cohérente au sein des membres du genre *Bifidobacterium*. Par exemple, le séquençage du gène de l'ARN ribosomal (rRNA), principalement le gène de 16S rRNA, permet une identification précise de nombreuses espèces appartenant au genre *Bifidobacterium*. Ce séquençage indique une similitude (identité) de plus 93 % pour les séquences de 16S rDNA (Miyake *et al.* 1998; Ventura *et al.*, 2004, Masco *et al.*, 2004).

Cependant, en comparant le genre *Bifidobacterium* avec les autres genres bactériens sur la base de pourcentage de G+C (Guanine+Cytosine) indiquant le contenu en base de l'ADN bactérien, il est difficile de distinguer entre les genres *Gardnerella* et *Bifidobacterium* (Scardovi, 1984).

### **A-3-Propriétés et critères de sélection des probiotiques**

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Le choix des probiotiques dépend de ces propriétés et du type d'utilisation. Selon le rapport de la FAO/WHO (2002), pour qu'un produit soit reconnu comme étant probiotique, une évaluation du produit basée sur plusieurs critères doit être effectuée suivant les recommandations suivantes :

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

**b) Dépistage des probiotiques potentiels par des tests *in vitro* :** les tests *in vitro* sont réalisés afin de déterminer les mécanismes par lesquels les microorganismes probiotiques exercent leurs effets bénéfiques. Il est recommandé d'utiliser des tests spécifiques à la cible et appropriés pouvant corrélérer avec les résultats des essais *in vivo*. Les principaux tests *in vitro* réalisés pour étudier les probiotiques sont:

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

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

Cependant, l'innocuité de la souche microbienne doit être prouvée avant toute utilisation du probiotique dans l'aliment. Les bifidobactéries ne présentent aucun risque d'infection chez l'homme. En théorie, des effets secondaires peuvent être associés à la consommation de produits contenant certaines souches probiotiques. Ces effets secondaires se résument-en :

## *Partie bibliographique*

---

- Infections systémiques.
- Activités métaboliques délétères.
- Stimulation immunitaire excessive chez des personnes sensibles.
- Transfert de gènes entre les espèces bactériennes probiotiques et celles de la flore intestinale.

**d)** Études *in vivo* sur des animaux et humains : afin de confirmer ou valider les résultats des tests *in vitro*, il serait nécessaire de réaliser des essais *in vivo* sur des animaux de laboratoire ou, de préférence, sur des sujets humains dans des conditions expérimentales appropriées. En général, une méthode standard d'évaluation clinique des probiotiques comprend les phases suivantes:

- **Phase 1** : consistant à évaluer l'innocuité de la souche probiotique.
- **Phase 2** : permet d'étudier l'efficacité d'un probiotique par comparaison à un placebo.
- **Phase 3** : permet de comparer des probiotiques avec un traitement standard (condition spécifique).
- **Phase 4** : consisterait à surveiller l'utilisation du probiotique (effets produits).

**e)** Allégations-santé et marque du produit : la mention d'allégations-santé générales est actuellement autorisée sur les produits contenant des probiotiques dans certains pays comme les Etats-Unis, Angleterre, etc. Il est cependant recommandé de mentionner sur les produits les allégations spécifiques lorsque des données scientifiques sont disponibles. Par exemple, mentionner « réduit l'incidence et la sévérité des diarrhées à rotavirus chez les enfants » au lieu de « améliore la santé de l'intestin ». La marque (étiquette) doit porter: Genre/espèce/souche, nombre minimal de cellules viables, allégation santé, conditions de stockage, etc.

En plus de l'innocuité et des propriétés fonctionnelles, des critères technologiques sont également pris en considération dans la sélection des souches probiotiques. Selon Saarela *et al.* (2000), ces critères sont :

- Bonnes propriétés sensorielles.
- Résistance aux phages.
- Viabilité durant le traitement technologique.

## Partie bibliographique

---

- Stabilité dans le produit et durant le stockage.



**Figure 11 :** Propriétés et critères de sélection des probiotiques. Adapté de Salminen *et al.* (1998).

Toutefois, le critère de viabilité ou de survie demeure essentiel dans la sélection des probiotiques. La capacité de survie des probiotiques dans l'hôte après leur ingestion, dépend

## *Partie bibliographique*

---

de leur résistance intrinsèque, des facteurs de l'hôte et du véhicule par lequel ont été ingérés (Marteau *et al.*, 2003). Parmi les facteurs de l'hôte qui réduisent la survie des probiotiques, on cite principalement l'acide gastrique, l'oxygène, le potentiel redox, les sels biliaires, les autres sécrétions digestives (mucus, défensines) et l'interaction avec la flore endogène (Blehaut *et al.*, 1989 ; Marteau & Vesa, 1998; Godward *et al.*, 2000 ).

Compte tenu des tous ces facteurs, il est donc recommandé de consommer les probiotiques à des doses appropriées pour obtenir les effets bénéfiques escomptés.

Contrairement au *Lactobacillus acidophilus*, les souches de *Bifidobacterium* utilisées commercialement ne survivent pas au pH gastrique ni à l'acidité de l'aliment durant le stockage (Trindade, 2000). Pour augmenter leur taux de survie, les probiotiques doivent être ingérés pendant le repas, ou bien protégés dans des capsules ou par microencapsulation (Kailasapathy, 2002). Le choix des vecteurs dans lesquels ou par lesquels sont ingérés les probiotiques est aussi important. Par exemple, Saxelin *et al.* (1995) ont rapporté que le taux de survie de *Lactobacillus* strain GG est variable lorsqu'il est ingéré dans les tablettes, les capsules de gélatine, les laits fermentés ou les boissons à base de lactosérum.

### **A-4- 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 Danone telles que *Bifidobacterium lactis*.

#### ➤ **Traitement des diarrhées**

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) .

### ➤ **Traitements gastriques**

Des travaux prometteurs sur l'amélioration des traitements gastriques sont en cours sur la conjonction des probiotiques aux antibiotiques en vue de limiter les infections à *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), une bactérie impliquée dans la survenue et les récurrences des gastrites et ulcères gastro-duodénaux. Les études sur ce traitement se poursuivent car son efficacité reste à démontrer (Reid *et al.*, 2003).

Les applications des probiotiques se sont énormément étendues ces dernières années, tant dans le domaine agroalimentaire que médical.

### ➤ **Activité hypocholestérolémiant**

En 1985 Gilliland montre que certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité d'assimiler le cholestérol. Les probiotiques semblent également posséder une action anticholestérolémiant. En effet, certaines bactéries lactiques inhibent la conversion de l'acétate en cholestérol. (Savado et Traor; 2011). Les exopolysaccharides des bactéries lactiques incluent l'abaissement du cholestérol (Nakajima *et al.*, 1993 ; in : LaPointe, 2009).

### ➤ **Action anticarcinogène et action sur le système immunitaire**

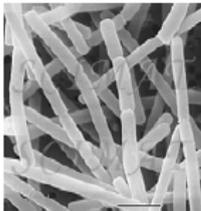
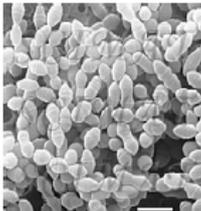
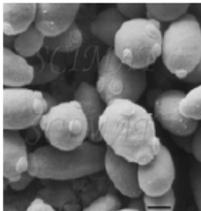
Les bactéries lactiques semblent provoquer des réactions immunitaires *in vivo*. Les probiotiques stimulent la production d'immunoglobuline (Production d'Ig G2 chez des souris) suite à l'ingestion de yaourt. Le yaourt a un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules cancéreuses en culture.

Plusieurs études ont démontré que les EPS ont une activité anti-cancérogène (Savado et Traor, 2011). Aussi les exopolysaccharides des bactéries lactiques ont des propriétés anti-ulcère (dextrane sulfate) (Shibata *et al.*, 2000), immunomodulante (Charbot *et al.*, 2001) ou anti-inflammatoire (Li *et al.*, 2005 ; LaPointe, 2009).

## **A-5-Principales souches commercialisées**

Les principales souches reconnues en tant que probiotiques, grâce à de nombreuses études décrites ci-dessous, et actuellement commercialisées appartiennent le plus souvent aux genres *Lactobacillus* sp. et *Bifidobacterium* sp.. Elles sont précisées dans la **Figure 12**.

## Partie bibliographique

ESPECES DE LACTOBACILLES	ESPECES DE BIFIDOBACTERIES	AUTRES BACTERIES LACTIQUES	AUTRES MICROORGANISMES
 <p style="text-align: center; font-size: small;"><i>Lactobacillus bulgaricus</i></p>	 <p style="text-align: center; font-size: small;"><i>Bifidobacterium breve</i></p>	 <p style="text-align: center; font-size: small;"><i>Streptococcus thermophilus</i></p>	 <p style="text-align: center; font-size: small;"><i>Saccharomyces</i> sp.</p>
<p><i>Lb. acidophilus</i> La5 (Chr Hansen)  <i>Lb. acidophilus</i> NCFM (Rhodia)  <i>Lb. bulgaricus</i> 2038 (Meiji Milk)  <i>Lb. casei</i> CRL431 (Chr Hansen)  <i>Lb. casei</i> DN114001 (Danone)  <i>Lb. casei</i> Shirota (Yakult)  <i>Lb. johnsonii</i> La1 (Nestlé)  <i>Lb. plantarum</i> 299v (ProViva)  <i>Lb. reuteri</i> (BioGaia)  <i>Lb. rhamnosus</i> GG (Valio)</p>	<p><i>Bf. breve</i> Yakult (Yakult)  <i>Bf. lactis</i> Bb12 (Chr Hansen)  <i>Bf. longum</i> BB536 (Morinaga)  <i>Bf. animalis</i> DNI73010 (Danone)</p>	<p><i>St. thermophilus</i> 1131 (Meiji Milk)  <i>En. faecium</i> SF68 (Cemelle)</p>	<p><i>Sc. boulardii</i> Ultra-levure® (Bioceodes)</p>

**Figure 12.** Principales souches probiotiques commercialisées en Europe.

[Adapté de: Mombelli and Gismondo, 2000 ; Playne and Salminen, 2002]

### **B. Les prébiotiques**

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

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

Les prébiotiques doivent être non digestibles pour servir de substrat aux bactéries spécifiques, principalement les bifidobactéries et les lactobacilles, qui sont actives et améliore la santé de l'hôte. Les fibres alimentaires comme les polysaccharides tels que l'amidon, l'inuline, la pectine, la gomme de guar, et les oligosaccharides non digestibles sont ainsi fermentées par les bactéries intestinales en produisant des acides gras à courte chaîne notamment les acides acétique, propionique et butyrique...qui sont alors utilisés par les différents tissus de l'hôte comme substrats énergétiques, ou comme facteurs de régulation cellulaire (Blaut, 2002). Par exemple, le butyrate est non seulement utilisé par les cellule épithéliales du colon à des fins énergétiques, mais aussi joue un rôle majeur dans la régulation de leur processus de prolifération et différenciation cellulaires (Mortensen *et al.*, 1996; Litvak *et al.*, 1998).

Pour être considéré comme prébiotique, un ingrédient alimentaire doit:

- a- Etre ni hydrolysé ni absorbé dans le tractus gastro-intestinal.
- b- Etre sélectif pour un nombre limité de bactéries endogènes.
- c- Modifier la microflore intestinale en améliorant sa composition.

## Partie bibliographique

d- Induire des effets intestinaux ou systémiques bénéfiques pour la santé de l'hôte (Gibson *et al.*, 1995). Le **Tableau 6** rapporte les principaux ingrédients alimentaires considérés comme prébiotiques.

**Tableau 06** : Les prébiotiques et les candidats aux prébiotiques (Blaut, 2002).

Composant prébiotique	Composition	Degré de polymérisation
Xylo-oligosaccharides	B (1→4) liés aux unités de xylose	2-4
Oligosaccharides de soja	Raffinose (F-Gal-G)+stachyose(F-Gal-Gal)	3-4
Oligosaccharides transgalactosylés	6' Galactosyllactose	2-8
Condensats de Palatinose	Molécules de sucrose réarrangées par voie enzymatique	2-7
Isomaltooligosaccharides	Transgalactosylation de maltose	2-8
Inuline	B(2→1)Fructans	2-65
Oligofructose	B(2→1)Fructans	2-8
Lactulose (Bifiteral®)	Galactosyl-β(4→1)fructose	3-5

### C. Les symbiotiques

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

Le terme symbiotique évoque la propriété de synergie et est réservé uniquement aux produits contenant les probiotiques et les prébiotiques au même temps. Dans ces produits, les prébiotiques stimulent sélectivement la croissance des probiotiques. Par exemple, un produit contenant l'oligofructose et une bifidobactérie probiotique est considéré comme un symbiotique. Cependant, lorsque un *Lactobacillus* probiotique est associé à l'oligofructose, la combinaison ne forme pas un symbiotique (Schrezenmeir & Vrese, 2001). Cette différence serait due au fait que les bifidobactéries produisent une grande quantité de β-fructosidases, enzymes capables de dégrader sélectivement la liaison entre les fructoses présents dans l'oligofructose.

## *Partie bibliographique*

---

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

### **III-Métabolisme du cholestérol :**

#### **III-1-Définition :**

Le cholestérol tire son nom du grec ancien *chole-* (bile) et de *stereos* (solide), car il fut découvert sous forme solide dans les calculs biliaires en 1758 par François Poulletier de La Salle. Mais ce n'est qu'en 1814 que le chimiste français Eugène Chevreul lui donna le nom de *cholestérine*.

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

Les voies métaboliques du cholestérol sont :

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

Le cholestérol, qu'il soit exogène (provenant de l'alimentation) ou endogène (issu de la biosynthèse *de novo*), est transporté dans l'organisme par les lipoprotéines plasmatiques. Sa synthèse et son utilisation doivent être étroitement régulées, afin d'éviter une accumulation et des dépôts dans l'organisme.

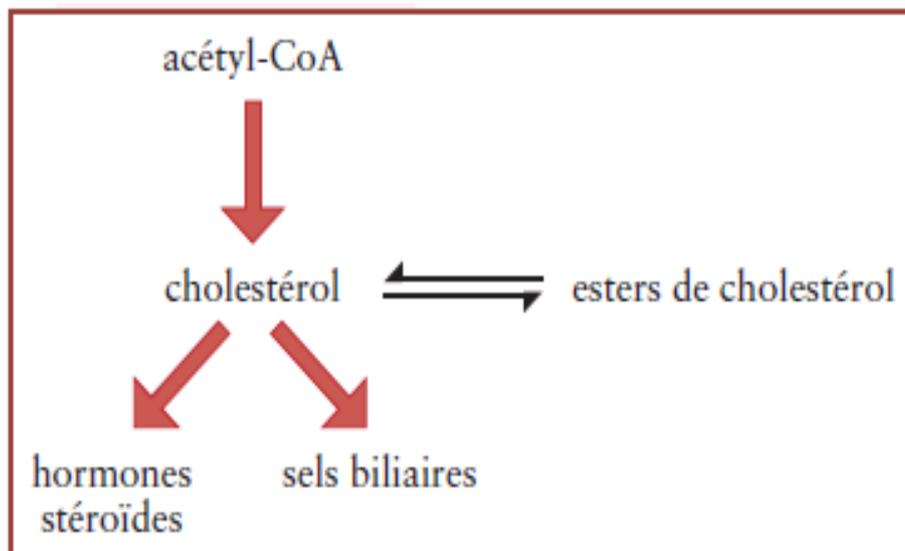


Figure 13 : Relations métaboliques du cholestérol.

### III-2-Structure :

La molécule de cholestérol comprend quatre cycles carbonés notés A, B, C et D (noyau cyclopentano-perhydro-phénanthrénique), 8 carbones asymétriques (les carbones 3, 8, 9, 10, 13, 14, 17 et 20), ce qui fait  $2^8$  soit 256 stéréo-isomères dont un seul existe : le  $3\beta$ -ol lévogyre. Le cholestérol possède un groupe hydroxyle -OH sur le carbone 3 (C3). Ce groupe constitue la tête polaire et donc la partie hydrophile du cholestérol. La fonction -OH du cholestérol peut être estérifiée par un acide gras qui rend la molécule totalement insoluble dans l'eau.

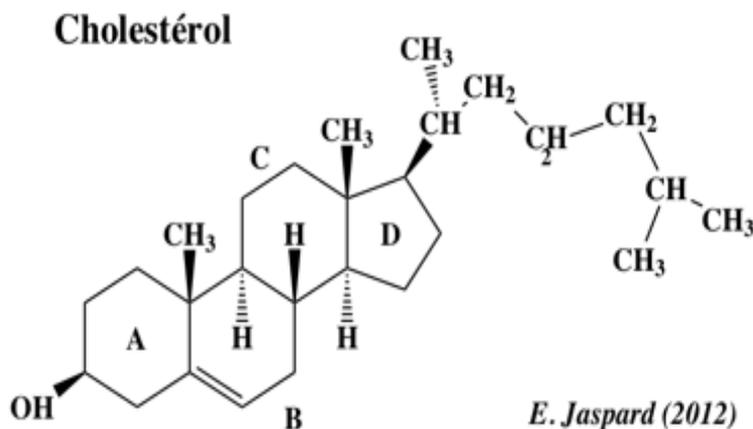


Figure 14 : Structure de cholestérol.

### **III-3-Localisation :**

Le cholestérol est présent sous forme de stérides (cholestérol estérifié) dans la plupart des tissus des vertébrés, et en particulier le foie, le cerveau, et la moelle épinière.

### **III-4- Les rôles biologiques du cholestérol :**

Le cholestérol est un constituant indispensable de nos cellules. Il assure un double rôle :

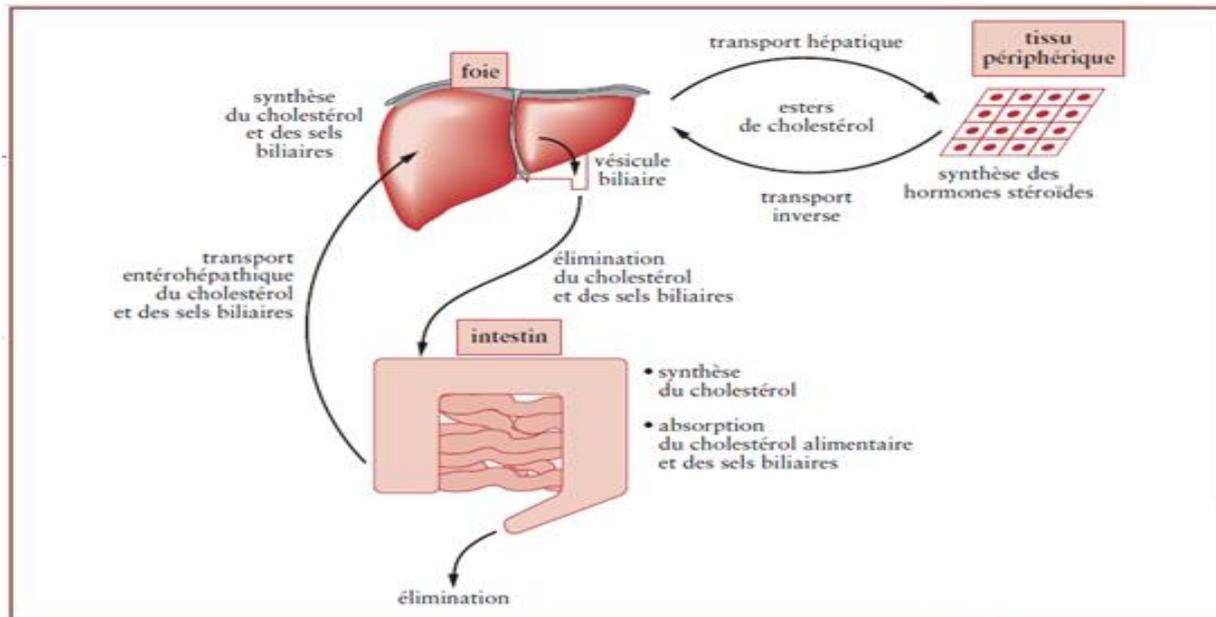
- ❖ *comme élément structural* : le cholestérol est l'un des constituants lipidiques des membranes cellulaires; de nature amphiphile, il s'intercale entre les phospholipides dans la bicouche lipidique, la tête polaire (groupement OH en C3) orientée vers le milieu externe aqueux, et la partie non polaire plongée dans la membrane;
- ❖ *comme précurseur de composés biologiques* : toutes les molécules de notre organisme comportant le noyau cyclopentanoperhydrophénantrénique sont synthétisées à partir du cholestérol; c'est le cas des acides biliaires, des hormones stéroïdes et du calcitriol. Enfin, c'est également un constituant de la bile.

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

## *Partie bibliographique*

**Tableau 07** : Rôle des organes dans le métabolisme du cholestérol.

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



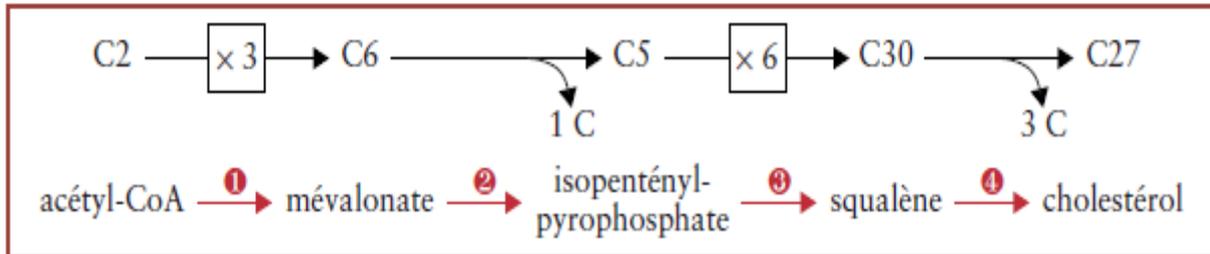
**Figure 15** : Vue d'ensemble du métabolisme du cholestérol.

## Partie bibliographique

### III-5-Synthèse :

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

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



- Synthèse du mévalonate en C6 à partir de trois acétyl-coenzymes A (notée ①);
- Transformation du mévalonate en isoprène actif, l'isopentényl pyrophosphate en C5 (notée ②);
- Polymérisation de six isoprènes actifs pour former le squalène, isoprénoïde en C30 (notée ③);
- Cyclisation du squalène et transformation en cholestérol par clivage de trois atomes de carbone (notée ④).

Les étapes initiales se déroulent dans le cytoplasme puis, ensuite, dans le réticulum endoplasmique lisse de la cellule.

## Partie bibliographique

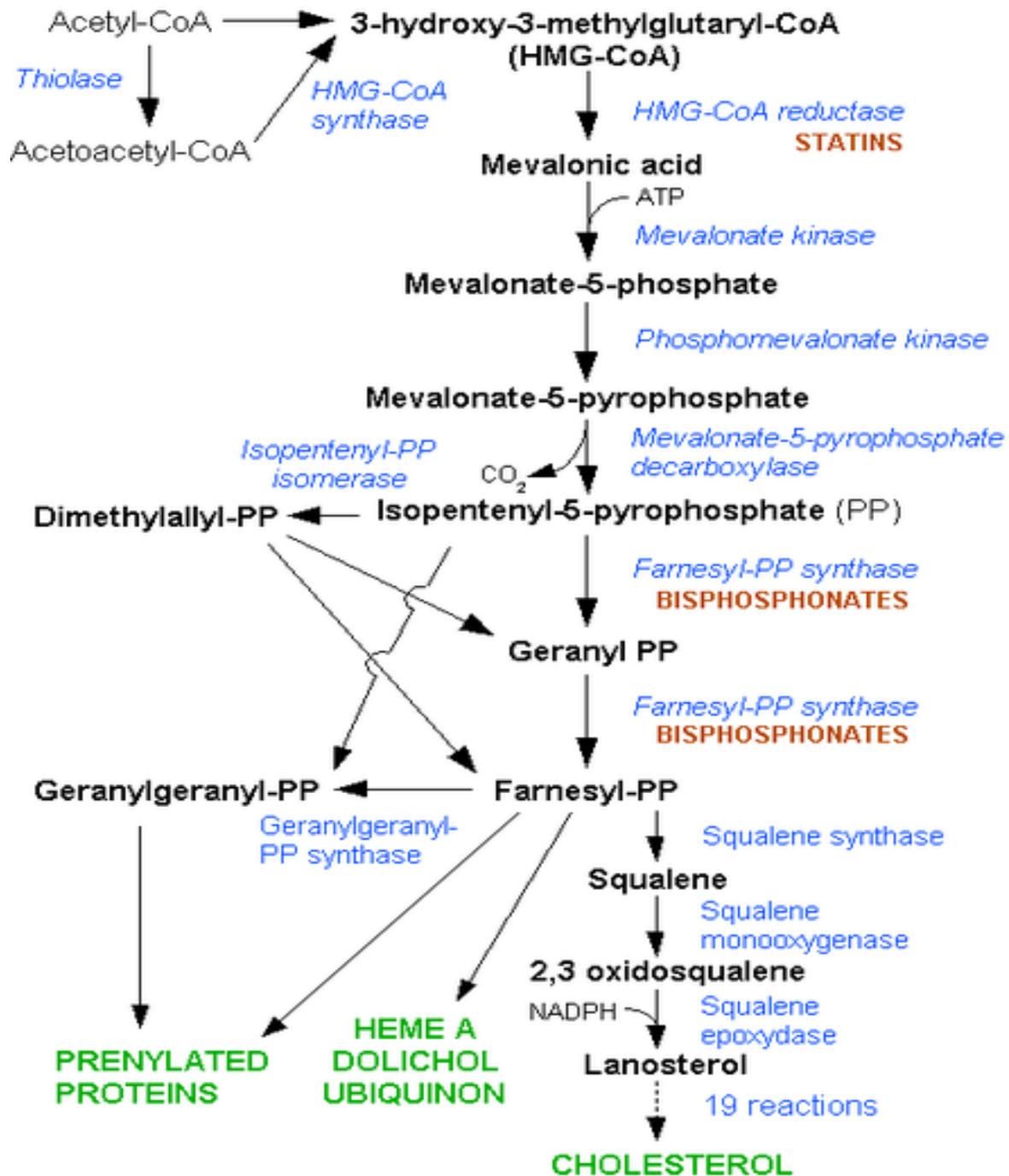


Figure 16 : La biosynthèse du cholestérol.

### **III-5-Dégradation :**

Le cholestérol est dégradé dans le foie en acides biliaires (dont l'acide chénodésoxycholique) par la 7- $\alpha$ -hydroxylase. La colestyramine, un médicament utilisé pour traiter l'hypercholestérolémie, diminue l'absorption intestinale des acides biliaires, et par conséquent leur concentration dans les cellules hépatiques. Ceci entraîne une activation de la 7- $\alpha$ -hydroxylase favorisant la dégradation du cholestérol.

### **III- 6-Régulation :**

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

#### **a) La régulation à court terme au niveau du foie**

Cette régulation se fait en deux étapes :

- + Régulation allostérique : la HMG-CoA réductase est inhibée par son produit direct, le mévalonate, et par le produit final, le cholestérol;
- + Régulation par interconversion. L'activité de l'HMG-CoA réductase est soumise à un contrôle par modification covalente, elle existe sous deux formes :
  - Une forme phosphorylée inactive : la kinase est activée par le glucagon;
  - Une forme déphosphorylée active : la phosphatase est activée par l'insuline.

L'insuline stimule donc la synthèse du cholestérol et, à l'opposé, le glucagon l'inhibe.

#### **b) La régulation à long terme au niveau périphérique**

Il s'agit d'une régulation transcriptionnelle. L'augmentation du cholestérol intracellulaire entraîne une diminution de l'expression de l'HMG-CoA réductase, une diminution de l'expression des récepteurs aux LDL, et une augmentation de l'expression de l'acyl-CoA-cholestérol acyltransférase. Il y a donc diminution de la synthèse, diminution de la capture

### **III-7- L'élimination du cholestérol**

À l'état normal, il existe un équilibre entre les apports (endogène et exogène) et l'élimination du cholestérol. Si notre organisme est capable de construire le noyau stérane, en revanche il est incapable d'assurer la dégradation. D'autre part, s'agissant d'une molécule peu soluble, la seule voie d'élimination envisageable est la voie intestinale. Le cholestérol est éliminé par les voies biliaires vers l'intestin, directement ou sous forme d'acides biliaires.

### **IV-Présentation de rat Wistar :**

La principale race de rat utilisée comme modèle animal est la Wistar. Cette race de rat a été développée en 1906 par l'institut Wistar. Ce sont des rats albinos, non consanguins, qui se caractérisent par plusieurs traits physiques distincts tels que de grandes oreilles, une tête large et la longueur de leur queue qui est inférieure à celle de leur corps. C'est actuellement la souche de rat la plus utilisée dans les laboratoires.

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



**Figure 17:** Rat Wistar.

### **IV-1-Caractéristiques du rat WISTAR :**

- **Taille :** 20 à 27 cm.
- **Poids:** de 250 à 800 gr.
- **Régime alimentaire :** omnivore.
- **Reproduction :** toute l'année.
- **Nombre de petits par portée :** 7 à 14.
- **Maturité sexuelle :** males : 75 jours/femelles : 60 jours.
- **Temps de gestation :** 20 à 22 jours.
- **Sevrage :** 6 semaines.
- **Longévité :** 3 à 5 ans pour les males, 2 ans pour les femelles.
- **Comportement :** intelligent et explorateur-diurne.
- **Maladies les plus fréquentes :** problèmes de peau, pneumonie, rhume chronique, tumeurs, perte de l'équilibre, coup de chaleur.
- **Diagnostics et symptômes :** perte de poils, grattage, éternuement, bruit de gorge, difficulté à respirer.

### **IV-2-Flore du rat :**

Le rat est un des animaux de laboratoire les plus utilisés. La microflore du rat est caractérisée par une grande dominance des bactéroïdes dans le caecum et le gros intestin (Schaedler et *al.*, 1976). La microflore autochtone des rats est constituée essentiellement de *lactobacillus* et *streptocoques* anaérobies (Duobos,Schaedler et *al.*,1963 ;Schaedler et *al.*,1965) qui apparaissent en premier après la naissance et persistent en plus grand nombre dans tout l'intestin et l'estomac (Duobos et *al.*,1968 ;Tannock 1997 ;Li et *al.*,2004).On trouve également des *streptocoques*, des *microcoques* et *Clostridium welchii*, et la présence de levures est souvent constatée (NB 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 parfois en quantité bien plus faible (Smith,1965). Enfin certaines espèces, par exemple les *Flavobacterium*, apparaissent très transitoirement et uniquement dans l'intestin grêle, puis disparaissent rapidement ensuite (Ducluzeau, 1969).

## Matériel et méthodes :

### Objectif du travail :

Notre étude a visé trois objectifs :

- Sélection des souches lactiques ayant un potentiel probiotique.
- Sélection des souches lactiques possédant une activité lipasique et hypocholestérolémiante.
- Tester les souches sélectionnées *in vivo* sur un model animal (les rats WISTAR).

### Lieu d'étude :

Ce travail a été effectué au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie de la faculté de science de l'université de Saida durant la période septembre 2015 – juillet 2016.

## II-1-Matériel

### II-1-1-Origin des bactéries utilisées :

Douze souches des bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus ssp* de la collection du laboratoire LBMB proviennent de différentes origines ont été étudiées.

L'origine, le nom de ces souches sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau 8 :** Souches lactiques utilisées et leurs origines.

souches	Origines	Pré-identification
NSC10	Lait de chamelle Naama	<i>Lactobacillus plantarum</i>
JUM II 3	Lait de jument Saida	<i>Lactobacille.sp</i>
MECH II 6	Lait de chamelle Mechriya	
MECH C6	Lait de chamelle Mechriya	
MECH C8	Lait de chamelle Mechriya	
NSC5C	Lait de chamelle Naama	
MECH C4	Lait de chamelle Mechriya	
JUM III4	Lait de jument Saida	
NSC9A	Lait de chamelle Naama	
MECH I1	Lait de chamelle Mechriya	
NSC62	Lait de chamelle Naama	
G HAR C2	Lait de chamelle Ghardaïa	

## Matériel et méthodes :

**Tableau 09:** Souches d'altération et leurs origines.

<i>Souches</i>	<i>Origine</i>
<i>Salmonella thyphimurium</i>	Laboratoire de biologie des microorganismes et de biotechnologie (Oran, Es-Sénia)
<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Citobacterssp</i>	
<i>Enterobactercloacea</i>	
<i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>	
<i>Acenitobacterbaumannii</i>	
<i>pseudomonasaeruginosa ATCC 27853</i>	
<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	
<i>Bacillus cereus</i>	
<i>Staphylococcus aureus (II2) ATCC 433005</i>	
<i>Enterobacteraerogenes (EL4)</i>	Isolée de lait cru (LBMB Oran)

### II-1-2-Prébiotiques :

Au cours de ce travail nous avons utilisé un mélange de sources de prébiotiques : des fructooligosaccharides purs(FOS) extraits de racine de chicoré de la firme BioCare ainsi que de l'orge et des oignons.

### II-1-3-Milieux de culture :

Nous avons utilisés des milieux sous forme de bouillon, gélose solide et gélose molle(semi solide).

- **Le milieu MRS (De Man *et al.*, 1960)** pour la culture et l'isolement des bactéries lactiques.(bouillon pour la préparation des précultures, inclinée pour la culture et la conservation des souches à court terme.
- **Le milieu LB (Lysogeny broth)** :il s'agit d'un milieu de croissance idéal pour les entérobactéries.

## ***Matériel et méthodes :***

---

- **Le milieu Chapman :** il est utilisé pour l'isolement des *Staphylococcus*.
- **Le milieu SS :** milieu sélectif permettant l'isolement d'entérobactéries pathogènes, très utilisé pour la recherche de *Salmonella* dans les selles et les denrées alimentaires peu pour les *Shigella* car trop sélectif.
- **Le milieu VRBG :** il est utilisée (gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre) est utilisée pour la recherche et le dénombrement des entérobactéries dans les produits laitiers, les viandes, les charcuteries et les autres produits alimentaires.
- **Le milieu GN (gélose nutritive) :** est un milieu gélosé qui permet la culture de micro-organismes en microbiologie. Ce milieu est dit non sélectif car il ne permet pas de sélectionner une souche bactérienne précise.
- **Le milieu Désoxycholate (gélose lactosée) :** est un milieu sélectif utilisé pour le dénombrement des bactéries coliformes dans les eaux, le lait, les produits laitiers et les autres produits alimentaires.
- **Le lait :** lors de cette étude on a utilisé le lait demi écrémé qui a été produit au sein de l'industrie Giplait de Saida, ce lait est vendu conditionné dans des sacs d'une contenance d'un litre.

Ces milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 min. Le lait est stérilisé quant à lui à 115°C pendant 10 min ou 110°C pendant 15 min.

Les compositions des milieux de cultures utilisés sont rassemblées dans l'annexe n°.

### **II-1-4-Les antibiotiques utilisés :**

Ces disques sont utilisés pour étudier le comportement des bactéries lactiques contre différents antibiotiques (antibiogramme) sur milieu solide.

Les antibiotiques utilisés sont montrés dans le tableau :

## *Matériel et méthodes :*

**Tableau 10** : les antibiotiques utilisés, leurs familles et leurs modes d'action.

Antibiotique	Famille	Quantité (µg ou U/disque)	Mode d'action
<b>Chloramphéni col (C)</b>	Phénicolés	30	limite la synthèse des protéines en inhibant l'activité peptidyltransférase du ribosome bactérien.
<b>Ampicilline (AMP)</b>	Béta-lactamines	10	Inhibition des activités de trans-peptidases impliquées dans la synthèse de la paroi bactérienne
<b>Oxacilline (OX)</b>		01	
<b>Clindamycine (DA)</b>	Lincosamides	02	Inhibe la synthèse protéique bactérienne par fixation au ribosome bactérien.
<b>Gentamycine (CN)</b>	Aminosides	10	se lie à la sous-unité 30S des ribosomes des bactéries et interfère avec la traduction des ARN messagers en protéines.
<b>Acide fusidique(FC)</b>	Fucidamines	10	inhibiteur de la biosynthèse des protéines chez les bactéries. Il bloque la traduction en se liant au facteur d'élongation EF-G. Ceci bloque la translocation des ARN de transfert sur le ribosome ainsi que la progression du ribosome sur l'ARN messager.
<b>Nitroxoline (NO)</b>	Quinoléines	30	effet oxydant sur les bactéries, mais leur effet principal est dû à la fixation de la molécule quinolone sur l'ADN lors de la phase de duplication de l'ADN au cours de la mitose (phase S)
<b>Imipénème (IPM)</b>	carbapénèmes	10	exerce une activité bactéricide en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne des bactéries à Gram positif et négatif par fixation

## ***Matériel et méthodes :***

---

			aux protéines de liaison aux pénicillines (PLP)
<b>Céfotaxime (CTX)</b>	Céphalosporines	30	inhibent l'élaboration de la paroi bactérienne, en interférant avec la synthèse du peptidoglycane ou muréine, par un mécanisme d'inhibition compétitif des transpeptidases extra-cytoplasmiques
<b>Amoxicilline (AMC)</b>	aminopénicilline s	10	tuent les bactéries contre lesquelles elles sont actives (les Gram +, et quelques Gram -)

### **II-1-5-La nourriture des rats :**

Un aliment complet standard sous forme de granulés. Il est composé de céréales, tourteaux de soja, issues de céréales, huile de soja, phosphate monocalcique, carbonate de calcium, lysine, méthionine, choline plus un complexe minéralovitaminiques (glucides 55%, protéines brutes 18%, matière grasse brute 2.5%, cellulose brute 3.9%, cendres brutes 4.9%, humidité 14%, vitamines 1.7%) (Granulés SARL ALF Ain Fezza Tlemcen).

### **II-1-6-Les lipides utilisés :**

Les matières lipidiques utilisées au cours des testes sont naturels ou artificiels : Huile d'olive (source naturel), le beurre de vache (source naturel) et le Tween (source artificiel).

Pour le gras présenté aux rats est prélevé du mouton (source naturelle animale).

### **II-2-Méthodes :**

#### **II-2-1-Confirmation de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique :**

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs par la méthode des stries sur gélose MRS, avec une incubation à 30 °C pendant 24h, jusqu'à l'obtention de colonies identiques témoignant de la pureté des souches (Idoui *et al.*, 2009). Les bactéries lactiques purifiées par sont soumises à une observation macroscopique qui consiste à décrire leurs taille, forme, contour, aspect..., ainsi qu'à une observation microscopique après une coloration de Gram pour préciser leur type aspect morphologique (taille, forme et le mode d'association) (Joffin et Leyral, 1996).

La recherche de la catalase est effectuée par émulsion d'une partie de la colonie dans une Goutte d'eau oxygénée à 10 volumes, une réaction positive est révélée par le dégagement d'oxygène, l'absence de bulles témoigne de l'absence de l'enzyme (catalase négative).

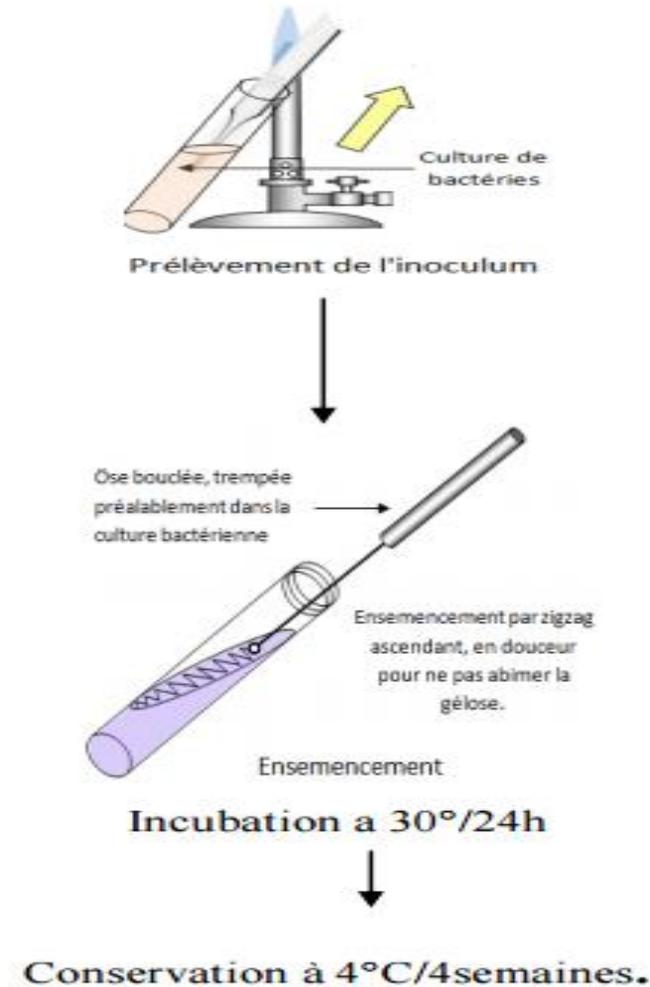
#### **II-2-2-Conservation des souches lactiques :**

Il existe deux types de conservation. Une à courte durée et l'autre à longue durée

- **Conservation courte durée :**

Les souches sont ensemencées sur gélose MRS incliné en tube. Ces cultures sont gardées à 4 C°. Les repiquages se font toutes les deux semaines (Saidi *et al.*, 2002).

## Matériel et méthodes :



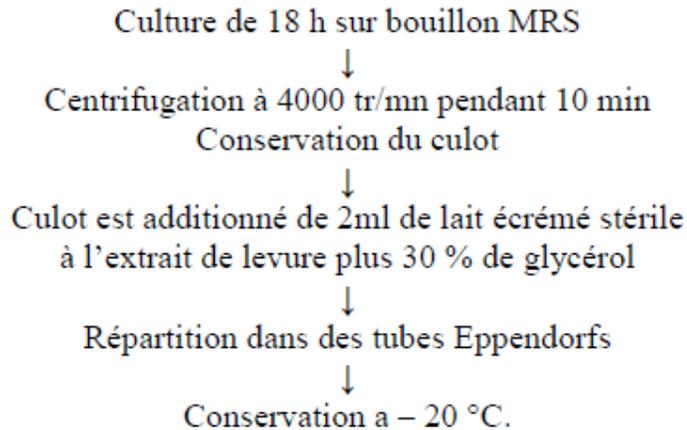
**Figure18:** Schéma de conservation courte durée des bactéries lactiques purifiées.

- **Conservation longue durée :**

A partir des cultures jeunes de 18h sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min. Une fois le surnageant est éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation sur le culot, qui contient 70% de lait écrémé (enrichi par 0.05 % d'extrait de levure) et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes Eppendorfs à  $-20^{\circ}\text{C}$ . En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans du lait écrémé à 0,5% d'extrait de levure, deux fois avant utilisation (Badis *et al.* 2005).

## **Matériel et méthodes :**

---



**Figure 19:** Conservation de longue durée des bactéries lactiques purifiées (Saidi *et al.*, 2002)

### **II-2-3-Tests physiologiques et biochimiques**

#### **II-2-3-1-Recherche de type fermentaire :**

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétéro fermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO<sub>2</sub>). Pour ce faire, Un tube contenant le bouillon MRS et une cloche de Durham est inoculé avec la souche à étudier. Après une incubation de 24h à 30°C, la présence du gaz dans la cloche indique un métabolisme hétérofermentaire (Hariri *et al.*, 2009).

#### **II-2-3-2-Caractère hémolytique :**

Le caractère hémolytique est étudié par la culture des lactobacilles sur gélose au sang. Une base gélosée est fondue, ramenée à 45 °C, additionnée de 5 % de sang défibriné et coulée en boîtes de pétri. Le milieu estensemencé par les souches isolées par stries, après incubation, l'aspect de la gélose autour des colonies est examiné :

- zone verdâtre : hémolyse  $\alpha$
- auréole claire : hémolyse  $\beta$
- pas de modification : pas d'hémolyse ou  $\gamma$

## ***Matériel et méthodes :***

---

### **II-2-3-3-Activité antibactérienne :**

Ce test consiste à étudier l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis des souches indicatrices. Il s'agit de douze souches : *Enterobacter cloacae*), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citobacter*ssp, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* (ATCC25922), *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* (ATCC 433005).

La méthode des disques décrite par (Tadesse *et al.*, 2004) a été appliquée : elle consiste à ensemencer en masse le milieu LB par la souche indicatrice (DO<sub>600</sub> varie entre 0.08 et 0.1). Après incubation pendant 30 min à 37°C, des disques stériles (de 5 mm de diamètre) ont été déposés à la surface de la gélose. Chaque disque reçoit 10µl d'une culture lactique jeune. Une fois les boîtes sont séchées à température ambiante, par la suite incubées à 37°C pendant 24h. L'inhibition de la souche indicatrice se traduit par la formation de zones claires autour des disques.

### **II-2-3-4-Résistance au suc digestif simulé:**

- Les sels biliaires, l'acidité et le NaCl sont l'une des barrières à franchir par les bactéries probiotiques pour gagner leur cible qui est le colon.
- Afin de déterminer la résistance de nos souches dans ces conditions hostiles, nous avons réalisé des cultures jeunes des souches lactiques dans un bouillon MRS après une incubation de 24h, la densité optique de chaque souche doit être comprise entre 0,6-0,8 à une longueur d'onde de 600nm. une solution saline stérile est ensuite préparée à pH 1,5 contenant 0,5% de NaCl additionnée 0,3% de bile de mouton filtrée à l'aide d'un filtre millipore (0.22µm). Des tubes à essai sont remplis de 9 ml de la solution et additionnés d'un ml de pré-culture lactique. Nous prélevant ensuite 0,1 ml de chaque tube à différents temps : T=0h, T=2h et T=4h pour effectuer un ensemencement par étalement sur MRS gélosé. Après une incubation à 30°C pendant 24h, nous procédons au dénombrement des colonies obtenues.

### **II-2-3-5-Résistance aux antibiotiques :**

Pour réaliser ce test, la méthode de l'antibiogramme en milieu solide a été employée, chaque inoculum bactérien a été standardisé dont la DO<sub>600</sub> varie entre 0.8 et 1 puis Les souches sont étalées sur milieu MRS à l'aide d'écouvillon.

Chaque boîte reçoit des disques d'antibiotiques différents (**Tableau 9**). Après incubation à 37°C pendant 24h, Les résultats ont été exprimé comme sensibles (S), et résistantes (R) selon les normes recommandées (Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, 2007) (Leroy *et al.* 2007).

### **II-2-3-6-Mise en évidence de l'activité lipolytique :**

L'activité lipolytique des souches est mise en évidence en milieu MRS supplémenté de différents substrats lipidiques (naturels et artificiels) à différentes concentrations.

- **Recherche de l'activité lipolytique sur milieu MRS non tamponnée additionne de substrats lipidiques naturel(Beurre naturelle et Huile d'olive )et artificielle (Tween) :**

L'activité lipolytique est détectée sur milieu MRS solide non tamponné .Le milieu est supplémenté en huile d'olive ou en beurre naturel ou en Tween comme unique source lipidique. L'ajout de substrats lipidiques est réalisé à différentes concentrations (1%, 2% et 3%) et le milieu est opacifié par le carbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub>) à 0.5% afin de bien

## ***Matériel et méthodes :***

---

visualiser l'éventuelle présence d'une activité lipasique. Les différents milieux ainsi préparés seront ensemencés en surface par puits à partir de précultures de 18h des lactobacilles à tester. Après incubation à 30°C Pendant 48h, l'activité lipolytique est détectée par l'apparition d'une clarification autour des puits.

- **Recherche de l'activité lipasique sur milieu MRS tamponnée additionne de substrats lipidiques naturels :**

L'activité lipolytique est détectée sur milieu MRS solide tamponné à pH 7 (tampon phosphate  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.1M). Le milieu est privé de Tween 80 et supplémenté en huile d'olive ou en beurre naturel comme unique source lipidique. L'ajout de substrats lipidiques est réalisé à différentes concentrations (1%, 2% et 3%) et le milieu est opacifié par le carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) à 0.5% afin de bien visualiser l'éventuelle présence d'une activité lipasique. Les différents milieux ainsi préparés seront ensemencés en surface par puits à partir de précultures de 18h des lactobacilles à tester. Après incubation à 30°C Pendant 48h, l'activité lipolytique est détectée par l'apparition d'une clarification autour des puits.

- **Recherche de l'activité lipasique sur milieu MRS tamponnée additionne de substrats Lipidiques artificiels :**

L'activité est recherchée sur milieu MRS solide tamponné à pH 7 (tampon phosphate  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.1M) contenant des concentrations de 1%, 2% et 3% de Tween 80. Le milieu est opacifié par le carbonate De calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) à 0.5% afin de bien visualiser l'éventuelle présence d'une activité lipasique.

Les souches lactiques sont ensemencées comme précédemment dans des puits à partir de cultures de 18h. Apres incubation à 37°C pendant 7 à 10 jours l'activité lipolytique se traduit par l'apparition d'un halo opaque autour des puits (Guiraud et Galzy, 1980).

### **II-2-3-7-Méthode des puits :**

Cette méthode est réalisée sur les bactéries lactiques lipolytiques possédant les plus grandes zones de lipolyse dans le test précédant il consiste à déterminer si la lipolyse est intracellulaire ou bien si elle est due à une enzyme extracellulaire, ces substances peuvent diffuser dans un milieu de culture semi-solide. Les bactéries lactiques sont repiquées dans du milieu MRS et incubées pendant une période de 18h à 30°C. Après incubation une centrifugation réfrigérée (4°C) est réalisée à 4000 tr/min pendant 15 min. Des puits de 5 mm de diamètre sont

## ***Matériel et méthodes :***

---

creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce (cloche de Durham) dans la gélose molle MRS tamponnée à pH 7 (tampon phosphate  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.1M) additionnée de 3% de substrat lipidique (beurre, huile d'olive, ou tween 80), ces puits seront remplis avec 100  $\mu\text{L}$  du surnageant de culture. Les boîtes de Pétri sont mises à une température de  $+4^\circ\text{C}/4\text{h}$  pour permettre la bonne diffusion de la substance lipolytique (Doumandji *et al.*, 2010). Les boîtes sont incubées à  $37^\circ\text{C}$  et la présence de zones claires formées autour des puits est examinée après plus de 48h d'incubation (Dellali, 2012).

### **II-2-3-8-Recherche de l'activité hypocholestérolémiant chez les lactobacilles *in vitro*.**

- Après la réalisation du test de lipolyse, nous avons sélectionné les souches présentant les meilleures activités pour la recherche d'un éventuel pouvoir hypocholestérolémiant.
- Ce test est réalisé en utilisant un bouillon MRS supplémenté avec 0,3% (v/v) de bile, le cholestérol a été stérilisé par filtration (0,22  $\mu\text{m}$ ) et ajouté au bouillon à une concentration de 200 mg / ml, 500 $\mu\text{l}$  de cette solution sont déposés dans un eppendorf et additionné d'un volume identique d'une pré-culture de lactobacille, la concentration finale de cholestérol est alors de 100mg/ml, cette opération est réalisée pour l'ensemble des lactobacilles à tester, le tout est incubé à  $37^\circ\text{C}/24$ .
- Les cellules ont été enlevées du bouillon de culture après 24h d'incubation par centrifugation à 12 000 g et  $4^\circ\text{C}/10$  min, les surnageants ont été récupérés, et les culots sont lavés trois fois avec un volume de bouillon MRS contenant 0,3% de bile, identique au bouillon d'origine.
- Après chaque lavage, la suspension a été centrifugée à 12 000 g et  $4^\circ\text{C}$  pendant 10 min et les trois surnageants ont été combinés et appelés solution de lavage.
- Les cellules des culots finaux ont été remis en suspension dans un bouillon MRS contenant 0,3% de bile, plus du lysozyme à une concentration finale de 4 mg / ml, et placé dans un bain marie à  $37^\circ\text{C}$  pendant 1h, puis additionné d'une solution de lyse contenant 10% de SDS à pH 12 à raison de 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$  de suspension cellulaire, le SDS (sodium dodecyl sulfate) est un détergeant permettant la lyse cellulaire, le pH est élevé à 12 pour la dénaturation de l'ADN et éviter ainsi l'apparition d'une viscosité causée par la libération de la molécule d'ADN dans le milieu externe.

## ***Matériel et méthodes :***

---

- La solution de cellules fragmentées a été centrifugée à 12 000 g et 4 ° C pendant 10 minutes, pour récupérer le surnageant et doser le cholestérol emprisonné dans les cellules.
- Dans toutes les fractions la concentration en cholestérol a été dosée en utilisant une méthode colorimétrique légèrement modifiée de celle décrite par Rudel et Morris (1973), en prenant le bouillon MRS avec 0,3% de bile, pour la lecture comme étalon de comparaison.

L'élimination du cholestérol (**CR**) a été calculée suivant l'équation suivante:

$$RC = (C - C') / C$$

Où **C** et **C'** sont les concentrations de cholestérol présent dans les surnageants non-inoculés et inoculés respectivement.

Le rapport de dégradation du cholestérol rapport (**CDR**) a été calculé d'après l'équation:

$$CDR = [C - (C1 + C2 + C3)] / C$$

Où **C** est la concentration du cholestérol initial, et **C1**, **C2** et **C3** sont les concentrations de cholestérol dans le surnageant, la solution de lavage, et la solution de cellules fragmentées, respectivement.

### **II-2-3-9-Acidité titrable :**

L'acidité est une notion très importante pour l'industrie laitière, car elle permet de juger l'état de conservation du lait, en intervenant comme agent coagulant ou antimicrobien (Boudier, 1985). Elle est quantifiée par la mesure du pH ou par titration.

De ce fait, la caractérisation de nos souches est suivie par la mesure de l'acidité Dornic, en cultures pures à différents intervalles de temps (0, 2, 4, 6, 8, 17, 19 et 21h) à 30°C. Les vitesses d'acidification mesurées pour chaque culture pure aux différents intervalles serviront à l'analyse statistique de nos données (tableau).

Le dosage de l'acidité au cours de la croissance des souches dans le lait est effectué selon la méthode décrite par Accols et *al.*, (1977) en utilisant un statif avec noix et pince, une solution de NaOH/9, une burette de 25 ml, une pipette de 10 ml et une solution de phénolphthaléine à 1% dans l'éthanol. On remplit la burette de la solution de NaOH/9, on la fixe au statif et on règle le niveau du liquide à zéro (**Figure20**).

Nous avons réalisé préalablement des cultures de bactéries lactiques dans des tubes de 6ml de lait, après coagulation, ces derniers ont servi d'inoculum à des flacons de lait demi-écrémé stérile de 200ml pour la réalisation de la cinétique d'acidification, 10ml de laitensemencé par une souche lactique sont versés dans un bêcher dans lequel sont ajoutées 4 gouttes de

## *Matériel et méthodes :*

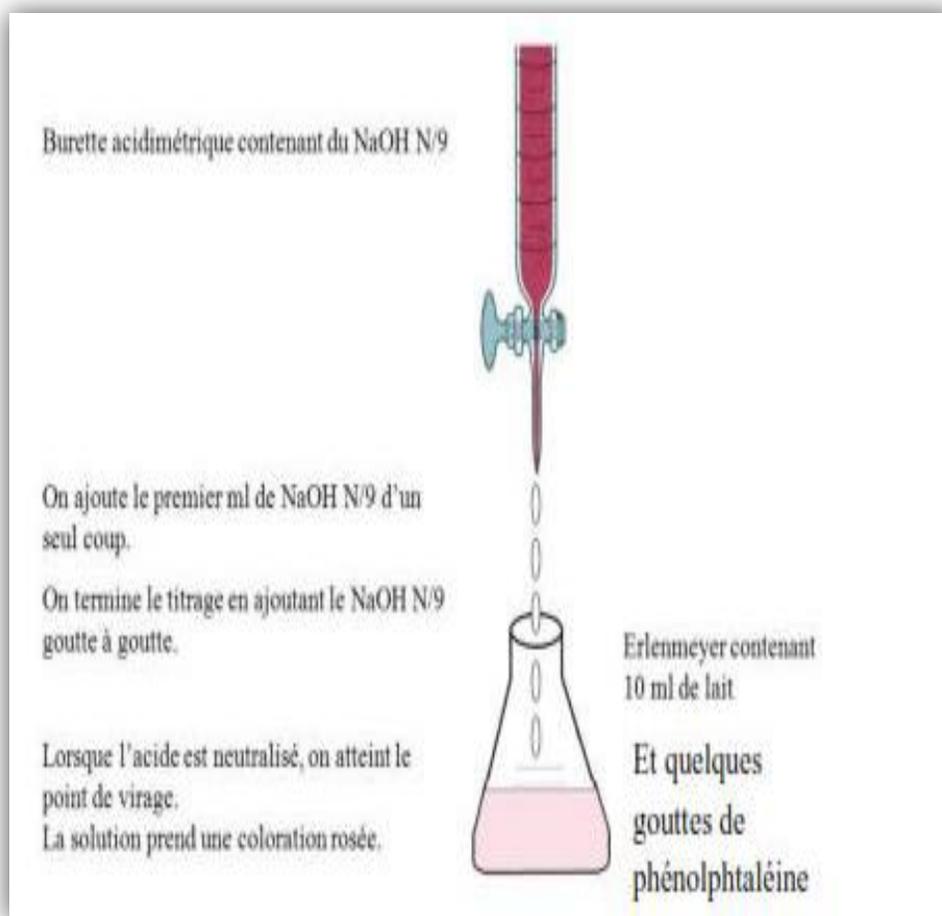
phénolphtaléine. Le titrage s'effectue sous agitation cette opération est réalisée toutes les deux heures. On considère que le virage est atteint, quand la couleur blanche du lait vire au rose pâle et persiste pendant une dizaine de secondes. Les résultats sont exprimés en degrés Dornic selon la formule suivante :

$$\text{Acidité (°D)} = V \text{ NaOH} \times 10$$

Où :

**V NaOH:** Volume de **NaOH** utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait.

**1 degré dornic = 1°D = 0,1 g** d'acide lactique dans un **1 L** de lait.



**Figure 20 :** Technique pour la mesure de l'acidité titrable.

### **II-2-4-Expérimentation *in vivo***

#### **II-2-4-1 Conditions d'élevage des rats**

##### **✚ Habitat et nourriture**

Nous avons utilisé dans le cadre de cette étude des rats mâles et femelles albinos de la souche Wistar ayant un poids variant entre 150 et 300 g et provenant de l'animalerie de l'université de Saida Docteur Moulay Tahar. Ils sont hébergés dans des cages en plastique transparentes d'une longueur de 40 cm, d'une largeur de 25 cm et d'une hauteur de 22 cm. Chaque lot est composé de 10 rats disposés dans deux différentes cages pour la séparation des mâles et des femelles et prévenir ainsi l'accouplement pendant la période expérimentale, les cages sont marquées du numéro de lot qui leur correspond. Les animaux ont disposé d'une alimentation standard (granulés SARL ALF Ain Fezza Tlemcen) et soumis à des conditions de température et d'éclairage .



**Figure 21** : Rats adultes dans leur habitat.

Les biberons étaient nettoyés soigneusement à l'eau savonneuse avec l'ajout de l'eau de javel avant chaque repas pour garantir une bonne hygiène. Les rations alimentaires étaient ajustées selon l'âge et la demande des rats.

Les cages étaient nettoyées 2 fois par semaine pour assurer un bon état hygiénique des animaux, la litière utilisée est de la sciure disposée dans chaque cage en couche épaisse pour absorber l'humidité provenant des déjections et de l'eau renversée durant l'abreuvement des animaux.

## *Matériel et méthodes :*

### **Nourriture :**

Les animaux étaient nourris 1 fois par jour, à 09 h du matin. Ces animaux sont nourris avec un aliment complet standard sous forme de granulés. Il est composé de céréales, tourteaux de soja, issues de céréales, huile de soja, phosphate monocalcique, carbonate de calcium, lysine, méthionine, choline plus un complexe minéralovitaminiques (glucides 55%, protéines brutes 18%, matière grasse brute 2.5%, cellulose brute 3.9%, cendres brutes 4.9%, humidité 14%, vitamines 1.7%).



**Figure 22 :** Aspect de l'alimentation administrée aux rats.

**Tableau 11 :** les rations de l'alimentation des rats de chaque lot

Lots	Lot 01 « témoin - »	Lot 02 « témoin + »	Lot 03 « NSC <sub>5C</sub> +L+ Pré »	Lot 04 « Jum <sub>III4</sub> +L+ Pré»
Régime	100 g de granulé + 100ml d'eau bouillie et refroidit	80 g de granulé +20 g de gras + 100ml d'eau bouillie et refroidit	80g de granulé + 20 g de gras + 10 ml de lait fermenté (NCS <sub>5C</sub> ) additionné à 90ml d'eau bouillie et refroidit + une source de prébiotiques	80g de granulé+ 20g de gras +10ml de lait fermenté (Jum <sub>III4</sub> ) additionné à 90ml d'eau bouillie et refroidit + une source de prébiotiques

## ***Matériel et méthodes :***

---

**Source de prébiotique :** Un oignon de 80 g bouilli dans l'eau puis mixé /L'orge /Les FOS.

**NB :** Ces quantités sont administrées pour chaque cage (5 rats/cage).

### **II-2-4-2- Techniques d'administration des différentes souches lactiques**

Les bactéries probiotiques sont administrées aux animaux 1fois par jour à heure et quantités fixes à raison de 10ml pour chaque cage sous forme de lait fermenté dilué dans l'eau d'abreuvement (90ml).

#### **✚ Préparation du lait fermenté**

Des tubes contenant chacun 6 ml de lait demi écrémé stérile sontensemencés avec une des souches Jum<sub>III4</sub> ou NSC<sub>5C</sub> et incubés à 30°C jusqu'à coagulation. Ce lait coagulé sert d'inoculum pour ensemencer 200 ml de lait écrémé stérile. Les cultures sont incubées et le coagulât obtenu est ensuite conservé à 4°C jusqu'à ce qu'il soit présenté aux animaux.

### **II-2-5-Paramètre zootechniques**

#### **II-2-5-1-Consommation**

- **Nourriture consommée**

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

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

- **Pesée des animaux**

Les animaux sont pesés une fois par semaine, jusqu'à la fin des 8 semaines, en respectant le jour et l'heure de la pesée.

## ***Matériel et méthodes :***

---

### **II-2-5-2-Paramètres de croissances**

- **Gain de poids moyen par semaine**

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

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

- **L'indice de consommation**

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

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

- **Le poids vif moyen**

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

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

### **II-2-6-Paramètres microbiologiques**

La qualité microbiologique des selles de chaque lot d'animaux était examinée à la dernière semaine d'expérimentation, afin de déterminer les genres bactériens qui colonisent l'intestin des rats au terme de l'expérience.

Pour cela 5g de matières fécales étaient prélevés à partir de plusieurs endroits de chaque cage et broyés dans 45ml d'eau physiologique stérile (10%). Une série de dilutions décimales ( $10^{-1}$  à  $10^{-7}$ ) de cette préparation est réalisée et un volume de 0,1 ml est prélevé de chaque dilution pour ensemercer différents milieux de culture afin de rechercher et dénombrer les genres bactériens selon la méthode de Zacconi *et al.* (1999) :

## ***Matériel et méthodes :***

---



**Figure 23 :** Matériel utiliser pour le dénombrement de la matière fécale.

- **Dénombrement de la flore lactiques dans la matière fécale**

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

- **Dénombrement de la flore totale**

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

- **Dénombrement des coliformes fécaux**

Nous avons recherché les coliformes sur milieu désoxycholate. La gélose lactosée au désoxycholate à 0,1% est un milieu sélectif utilisé pour le dénombrement des coliformes dans le lait, les produits laitiers et les autres produits alimentaires. Ce milieu est également recommandé pour la culture et l'isolement des *Shigella*. Les boîtes, en double, sont incubées à 37°C pendant 24h.

L'inhibition des microorganismes à Gram positif est principalement due à l'action du désoxycholate de sodium, bien que le citrate de sodium et le citrate ferrique soient également des inhibiteurs efficaces. La différenciation des entérobactéries (**Tableau 12**) est fondée sur la capacité des germes à fermenter le lactose. Les microorganismes lactose-positif produisent une

## **Matériel et méthodes :**

---

acidification qui, en présence de rouge neutre se manifeste par l'apparition de colonies rouges. Les germes lactose-négatif donnent des colonies non colorées (*Salmonella et Shigella*).

**Tableau 12 :** Microorganismes isolées sur le milieu désoxycholate et leur aspect macroscopique.

Microorganismes	Couleur des colonies
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	rouge violacé
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	rouge violacé
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	beige rosé

- **Dénombrement des salmonelles et shigelles :**

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

- **Dénombrement des entérobactéries :**

Pour cela nous avonsensemencé des boites Pétri contenant La gélose VRBG (gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre) est utilisée pour la recherche et le dénombrement des entérobactéries dans les produits laitiers, les viandes, les charcuteries et les autres produits alimentaires. Ce milieu peut être utilisé dans le cadre de la Pharmacopée pour la recherche des bactéries Gram négatives résistantes aux sels biliaries lors du contrôle microbiologique des produits non stériles. En incubant également à 37°C pendant 24h.

- **Dénombrement des Staphylocoques :**

Pour cela nous avonsensemencé des boites Pétri contenant le milieu Chapman. Et en incubant également à 37°C pendant 24h.

### **II-2-7-Dosage de quelques paramètres biochimiques**

#### **II-2-7-1- Prélèvement sanguin :**

Tous les 15 jours le prélèvement du sang est effectué à l'aide d'une pipette Pasteur à travers le sinus rétro-orbital au niveau de la veine orbitale des rats anesthésiés au départ par le chloroforme par inhalation. Nous recueillons le sang dans des tubes héparinés pour le bilan lipidique.

## *Matériel et méthodes :*

---



**Figure 24:** Méthode d'anesthésie des rats par inhalation de chloroforme.

### **II-2-7-2-Paramètres biochimiques :**

Les prélèvements sanguins étaient récoltés dans des tubes héparinés (**Figure**) pour l'ensemble des lots d'animaux afin de suivre l'évolution du taux des paramètres sanguins suivants: glycémie, Triglycéridémie et cholestérolémie.

Nous centrifugeons les tubes héparinés à 4000 g/min pendant 10 min. Les analyses biochimiques sont effectuées le même jour.



## ***Matériel et méthodes :***

---

**Figure 25:** Prélèvement sanguin effectué à partir d'une veine sinus orbitale et collecte des échantillons dans des tubes contenant de l'héparine.

**A. Glycémie (Kit Biomaghreb) :**

Le glucose est dosé par une méthode colorimétrique enzymatique (voir Annexe).

**B. Cholestérolémie (Kit Biomaghreb) :**

Le cholestérol est dosé par une méthode colorimétrique enzymatique (voir annexe).

**C. Triglycéridémie (Kit Spinreact) :**

Les triglycérides sont hydrolysés en glycérol et acide gras sous l'action de la lipoprotéine lipase (voir annexe).



**Figure 26 :** Automate de comptage (DIALAB auto-analyseur).

### **II-2-7-3-Le sacrifice des rats :**

A la fin de période expérimentale (8 semaines), les rats sont anesthésiés au chloroforme et sont sacrifiés (3 rats de l'effectif de chaque lot) après 12h de jeûne. Le sang prélevé est récupéré dans des tubes héparinés. Ce dernier est centrifugé à 4000trs/min pendant 10 min ; le plasma est obtenu en vue du dosage des différents paramètres biochimiques. Le dosage se fait sur du plasma frais, le jour même du prélèvement.

Le foie, le cœur, l'estomac et l'intestin sont soigneusement prélevés, rincés avec de l'eau physiologique (NaCl à 9‰), ensuite pesés.

## *Matériel et méthodes :*

---

### **II-2-7-4-Le taux de mortalité**

Il se calcule par le rapport entre le nombre de sujets morts par lot, sur leur nombre initiale multiplié par 100.

$$\text{Taux de mortalité} = \frac{\text{Nombre de sujets mort}}{\text{Nombre initial}} \times 100$$

### **II-2-7-5-Dénombrement des bactéries dans l'intestin l'estomac et le colon des rats:**

- **Broyage des organes :**

Après la pesée, les organes sont broyés à l'aide d'un mortier dans l'eau physiologique (NaCl 9g/l) devant un bec benzène.

À partir des broyas obtenus. Une série de dilutions décimales ( $10^{-1}$  à  $10^{-7}$ ) de cette préparation est réalisée et un volume de 0,1 ml est prélevé de chaque dilution pour ensemercer différents milieux de culture afin de rechercher et dénombrer les genres bactériens comme réalisé précédemment pour le test de dénombrement de la flore fécale (**voir page...** ):



**Figure 27:** Matériel utilisé pour le dénombrement des bactéries au niveau des organes.

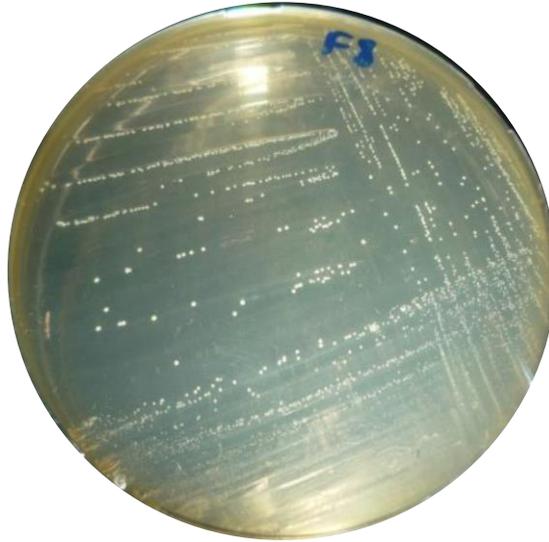
## *Résultats et discussions*

---

### **III-1-Confirmation de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique :**

#### **III-1-1-Observation macroscopique :**

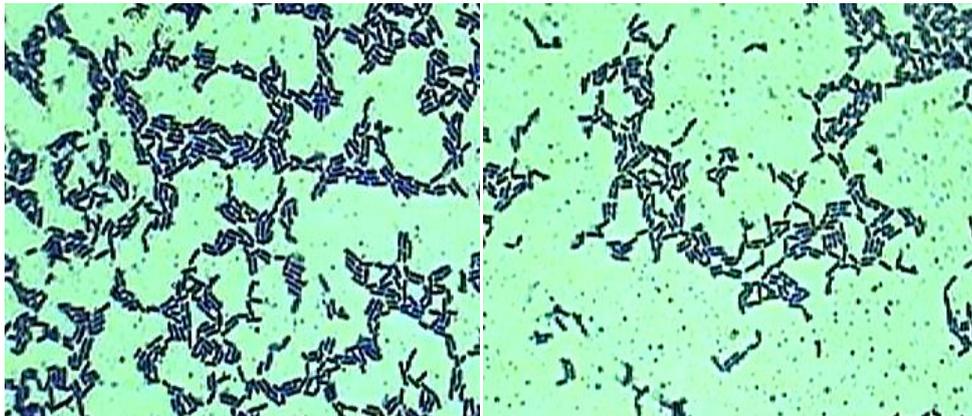
L'observation macroscopique sur milieu MRS solide nous a montré que les bactéries forment des petites colonies blanchâtres de diamètre variable et de contour régulier ou irrégulier.



**Figure28** : Aspect macroscopique des colonies des lactobacilles sur gélose MRS.

#### **III-1-2-Observation microscopique :**

L'observation microscopique nous a révélé que toutes les bactéries sont à Gram positif, Disposées en paires, chainettes, isolées ou en amas, leur forme diffère selon les souches.



**Figure 29** : Observation microscopique de lactobacilles (GX100).

## ***Résultats et discussions***

---

### **III-1-3-Tests physiologiques et biochimiques :**

L'analyse de ces résultats a montré que tous les isolats se sont avérés à Gram positif et catalase négative ce qui est caractéristique des bactéries lactiques.

En plus de ces tests basés sur la morphologie des bactéries nous avons utilisé des tests physiologiques et biochimiques. Les résultats de ces tests sont résumés dans le (**Tableau13**)

**Tableau 13:**Résumé du profil physiologique et biochimique des souches isolées.

<b>Souches</b>	<b>Gram</b>	<b>Catalase</b>	<b>Type fermentaire</b>	<b>Hémolyse</b>
MEHC4	Bacilles G +	-	-	γ
MECH C6	Bacilles G +	-	-	γ
NSC9A	Bacilles G +	-	-	γ
MECH C8	Bacilles G +	-	+/-	γ
JUMIII4	Bacilles G +	-	-	γ
MECHII6	Bacilles G +	-	-	γ
MECHI1	Bacilles G +	-	-	γ
JUM II3	Bacilles G +	-	-	γ
GHARC2	Bacilles G +	-	-	γ
NSC62	Bacilles G +	-	-	γ
NSC5c	Bacilles G +	-	-	γ
NSC10	Bacilles G+	-	-	γ

- : Homofermentaire , +/- : Hétérofermentaire facultatif , γ :gamma.

Toutes les bactéries lactiques sont des bâtonnets à Gram positif, de différentes tailles, souvent associés en chaînette ou par deux.

Parmi l'ensemble des souches examinées aucune d'entre elles ne présentait d'activité catalasique.

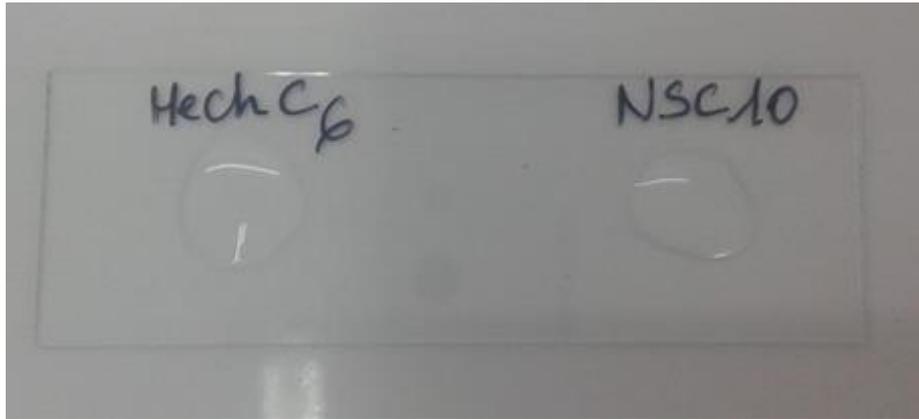
Les souches étudiées sont pourvues d'un caractère homofermentaire car elles n'ont présenté aucune capacité de production de gaz.

Toutes les souches des lactobacilles sont homofermentaire ces résultats sont similaire à ceux présente dans les travaux de Montel *et al.*, 1991.

Les colonies ne montrent ni alpha typique ni hémolyse bêta, elles sont toutes non hémolytiques.

## *Résultats et discussions*

---



**Figure 30:** Test catalase des souches Mech C6 et NSC10



**Figure 31:** Résultats de type fermentaire.

A : (témoin) hétérofermentaire, B : homofermentaire

## Résultats et discussions



**Figure 32:** Croissance des lactobacilles sur gélose au sang (Colombia).

### III-2-Etude de l'activité antibactérienne des souches :

La lecture des boîtes s'effectue après 24h d'incubation à 37°C en aérobiose, les souches présentant une zone transparente sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes. La taille des zones d'inhibition produites a été mesurée en mm.

Les résultats de l'interaction entre les souches lactiques et les bactéries pathogènes sont mentionnés dans le tableau suivant :

**Tableau 14:** Activité antibactérienne des souches lactiques vis-à-vis les bactéries d'altération.

Souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NSC 10	09	06	10	08	12	0	08	09	06	07	13	09
MECHC4	6	0	14	0	11	0	11	0	11	14	0	0
NSC9A	14	13	0	15	12	13	15	0	0	12	0	0
MECH C6	14	15	0	12	15	15	14	15	0	12	15	0
MECH C8	0	11	9	0	0	2	0	0	5	9	13	0
JUMIII4	7	13	0	12	14	5	9	0	0	13	0	0
MECHII6	0	0	0	0	0	10	9	0	0	0	9	0
MECHI1	0	0	0	10	0	11	12	14	0	0	0	0
JUM II 3	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GHARC2	8	0	0	0	0	0	0	10	0	10	12	0
NSC62	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0
NSC5c	0	0	16	13	0	0	15	14	0	0	10	0

**1** : *Proteus mirabilis*, **2** : *Salmonella thyphimurium*, **3** : *Klebsiella pneumoniae*, **4** : *Citobacterssp*, **5** : *Enterobactercloacea*, **6** : *Staphylococcus aureus*, **7** : *Enterobacteraerogenes (EL4)*, **8** : *Pseudomonas aeruginosa ATCC*, **9** : *Escherichia coli 25922*, **10** : *Bacillus cereus*, **11** : *SaII2*, **12** : *Acenitobacterbaumannii*.

## *Résultats et discussions*

---

D'après ces résultats, la souche **NSC9A** présente une activité inhibitrice, plus ou moins prononcée, sur la majorité des bactéries d'altération avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 12 à 15 mm. Sauf contre les souches : *klebsiellapneumonie*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 433005 et *acenetobacterbaumannii*. Où aucune inhibition n'a été observée.

L'effet inhibiteur des souches : **JUM II3**, **GHARC2**, **NSC62** et **MECHII6** est faible contre la majorité des souches indicatrices. Les autres souches présentent une activité antagoniste variable contre les souches d'altération, par l'obtention des zones d'inhibition oscillant entre 8 et 14 mm de diamètre.

Des études pionnières effectuées par Bernet *et al.* (1993) ont démontré que des souches de bifidobactéries humaines adhérant fortement aux cellules intestinales Caco-2 inhibent l'adhésion de microorganismes pathogènes comme *E. coli* entéro-pathogénique et *Salmonella typhimurium* à ces mêmes cellules lorsqu'elles sont placées en compétition. Mack *et al.* (1999) ont rapporté une inhibition complète de l'adhésion d'*E. coli* O157:H7 par l'ajout préalable de la souche *Lb. plantarum* 299v sur des cellules HT-29. Ces auteurs ont proposé, entre autres, que l'adhésion préalable des probiotiques aux cellules intestinales contribue 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.

Le troisième mécanisme d'action des probiotiques concerne l'inhibition de la croissance des pathogènes grâce à des composés antimicrobiens. Les bactéries appartenant au genre *Lactobacillus* d'origine humaine peuvent produire des substances antimicrobiennes, telles que les acides organiques, qui sont actives *in vitro* et *in vivo* contre les microorganismes entérovirus impliqués dans les cas de diarrhées (Servin, 2004). Les acides lactiques et acétiques sont produits via la fermentation des hexoses par les Lactobacilles.

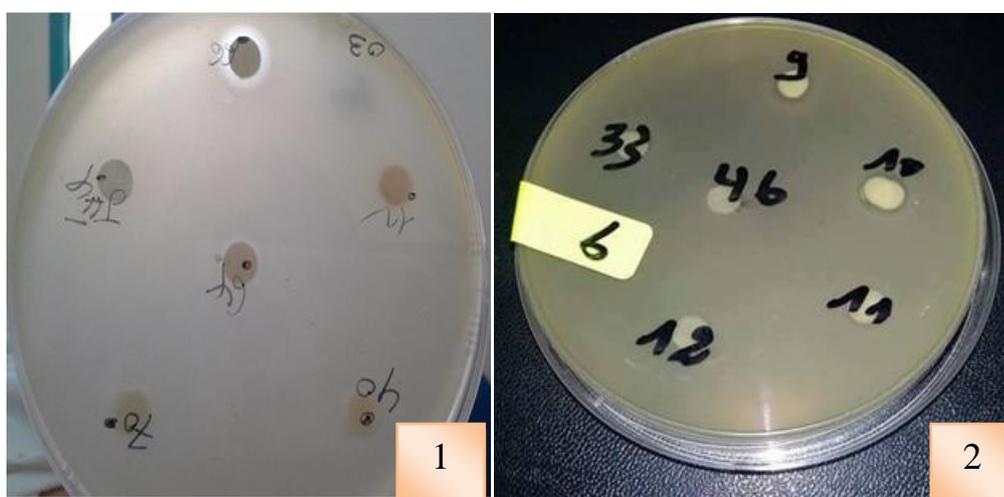
Ces acides organiques peuvent diffuser passivement à travers la membrane bactérienne sous leur forme non dissociée. Ils acidifient le cytoplasme après dissociation et inhibent l'activité enzymatique cellulaire des pathogènes acido-sensibles (Deng *et al.*, 1999). Cette diminution du pH peut donc affecter la viabilité des pathogènes bactériens (Bruno et Shah, 2002 ; Servin, 2004).

L'inhibition de la croissance des pathogènes peut être causée par la production de bactériocines par les bactéries lactiques, les pathogènes peuvent également être inhibés par un processus de restriction des nutriments. Il est évident que la capacité des microorganismes à entrer en compétition pour limiter les nutriments disponibles est un facteur non négligeable

## Résultats et discussions

qui détermine la composition du microbiote. Ainsi, une augmentation du nombre de lactobacilles obtenue lors d'un traitement probiotique permettrait de diminuer les substrats disponibles pour l'implantation de microorganismes pathogènes (Fooks et Gibson, 2002).

De toute façon, les effets inhibiteurs des acides organiques tels que l'acide lactique, acétique et propionique continueront à compliquer des études sur des effets antimicrobiens des BL, à moins que d'autre purification et caractérisation rigoureuses des substances soit appliquée (Magnusson et Schnürer, 2001; Magnusson *et al.*, 2003; Schnürer et Magnusson, 2005).



**Figure 33:** Activité inhibitrice des souches de lactobacilles sur : **3** : *Klebsiella pneumoniae*,  
**6** : *Staphylococcus aureus*

### III-3-L'antibiorésistance:

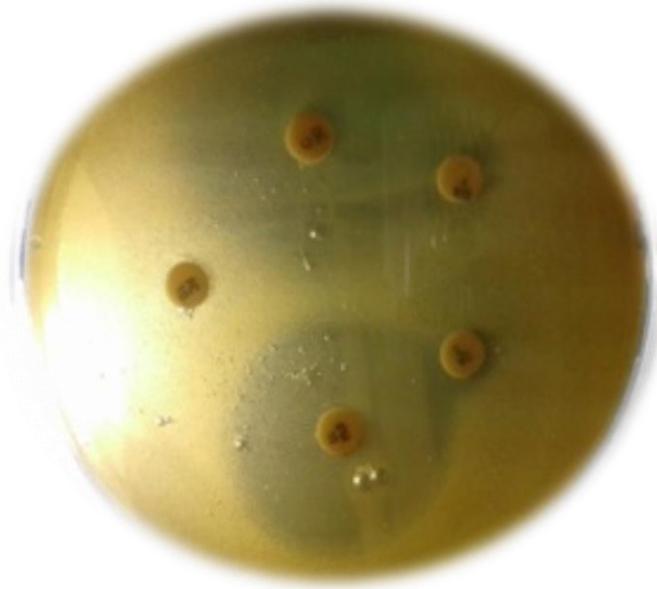
Le test d'antibiogramme des souches nous a permis de déterminer la sensibilité ou la résistance de ces souches vis à vis de quelques antibiotiques, si le diamètre est inférieure ou égale à 15mm les bactéries sont considérées comme résistantes à l'antibiotique, si en revanche ce diamètre est supérieur à 15mm elles sont considérées comme sensible (Karam, 1994).

- Globalement les souches sont toutes sensibles à AMC, la NO, la CTX et à l'AMP excepté les souches JUM II3 et MECH II6, en revanche la totalité des souches sont résistantes à la DA.
- L'FC, gentamycine et OX n'ont aucun effet sur les lactobacilles sauf la souche MECHc<sub>6</sub>
- La JUM II3 présente une résistance à l'ensemble des antibiotiques sauf à l'IPM et C.

## Résultats et discussions

---

- La plus part des souches sont sensibles aux C et IPM.



**Figure 34:** antibiogramme de la souche **Jum<sub>III4</sub>**.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de (Ana Belén et *al.*, 2005) qui ont étudié la sensibilité des bactéries lactiques isolées du fromage traditionnel aux antibiotiques, ces travaux ont montré la résistance de *Lactococcus lactis*, *Entérocooccus* spp et *lactobacillus* spp à quelques antibiotiques tels que : Chloramphenicol, Tétracycline, Clindamycine, Erythromycine.

Plusieurs études ont montré la résistance naturelle d'une gamme importante de bactéries lactiques aux antibiotiques (Botes et *al.*, 2008). La résistance de souches de *Leuconostoc* sp à la Vanomycine, Gentamycine et la Chloramphénicol a été bien élucidée (Ogier et *al.*, 2008).

De même que pour des espèces de *Lactococcus lactis* qui ont présenté une résistance à l'Ampicilline et la Vanomycine (Donohue, 2004). L'utilisation de différentes souches lactiques en tant que probiotiques doit faire l'objet de travaux extrêmement attentifs (Marteau et *al.*, 2004) et sur une gamme très large qui touche toutes les familles d'antibiotiques. De même l'autorité Européenne de Sécurité Alimentaire, suggère que les probiotiques ne doivent pas avoir une résistance acquise aux antibiotiques (Zago et *al.*, 2011).

Notre étude a montré une bonne aptitude technologique et probiotique des souches sélectionnées, reste à approfondir ces travaux par l'exploitation *in vivo*.

## *Résultats et discussions*

**Tableau 15:** Résistance des souches de lactobacilles vis-à-vis de divers antibiotiques.

Souches	Antibiotiques									
	AMC 10 µg	DA 2 µg	FC 10 µg	CN 10 µg	NO <sup>30</sup>	IPM10 µg	C 30 µg	OX 1 µg	CTX 30 µg	AMP10 µg
JUMIII4	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S
NSC5C	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S
MECH C6	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
MECH C8	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S
JUM II3	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
MECH I1	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S
NSC9A	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S
NSC10	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S
MECH C4	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S
NSC62	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S
MECH II6	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S
GHAR C2	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S

**R** : résistante,      **S** : sensible

**AMX** : amoxicilline + acide clavulanique, **DA** : clindamycine, **FC** : acide fucidique.

**CN** : gentamycine, **NO** : nitroxoloine, **IPM** : imipineme, **C** : chloramphénicol.

**OX** : oxacilline, **CTX** : céphotaxime, **AMP** : ampicilline.

## Résultats et discussions

### III-4-Test de résistance au suc digestif simulé:

Les résultats obtenus après dénombrement des colonies sur boîte de Pétri sont résumés sur le tableau ci-dessous :

**Tableau 16** : Croissance des souches de lactobacilles dans la solution de simulation du suc digestif.

Les souches	T0= 0h	T1= 2h	T <sub>2</sub> =4h
MechC4	1400	600	260
NSC9A	Tapis	800	520
MechC1	520	224	200
JumIII4	Tapis	Tapis	Tapis
MECHIII6	Tapis	1040	496
MechI1	Tapis	Tapis	Tapis
Jum II3	Tapis	560	428
GharC2	Tapis	Tapis	584
NSC62	560	448	380
NSC5c	Tapis	Tapis	720
NSC 10	Tapis++	Tapis+	Tapis

L'ensemble des bactéries ont poussé de façon remarquable en présence des 3 facteurs de stress combinés (sels biliaries (0.5%), pH acide (1.5) et NaCl (0.5%)). On remarque néanmoins que la charge des lactobacilles et le temps d'incubation ont une proportionnalité inverse, c.-à-d. que le nombre des colonies de la plupart des souches diminue progressivement en fonction du temps passé au contact du simulât gastrique.

La souche **MechC4** est la plus sensible aux stress croisés, le nombre des colonies décroît fortement passant de 1400 UFC à T0 jusqu'à 260 UFC après 4h au contact du suc gastrique simulé. Contrairement aux souches : **Jum<sub>III4</sub>**, **NSC<sub>5C</sub>** et **Mech<sub>I1</sub>** qui persistent de

## *Résultats et discussions*

---

façon important avec la formation d'un tapis indénombrable à la surface de la gélose MRS même après 4h d'incubation en présence des facteurs de stress.

Cette capacité des lactobacilles à croître dans des concentrations élevées en sels biliaires est due à une activité exo-hydrolasique, qui leur permet de résister à l'action détergente des sels biliaires en les transformant en dérivés inoffensifs (Roy, 2006). La «Bile Salt Hydrolase» (**BSH, EC 3.5.1.24**), aussi appelée cholyglycine hydrolase, est responsable de la déconjugaison des sels biliaires. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des sels biliaires conjugués avec la glycine ou la taurine en résidus d'acides aminés et en sels biliaires libres.

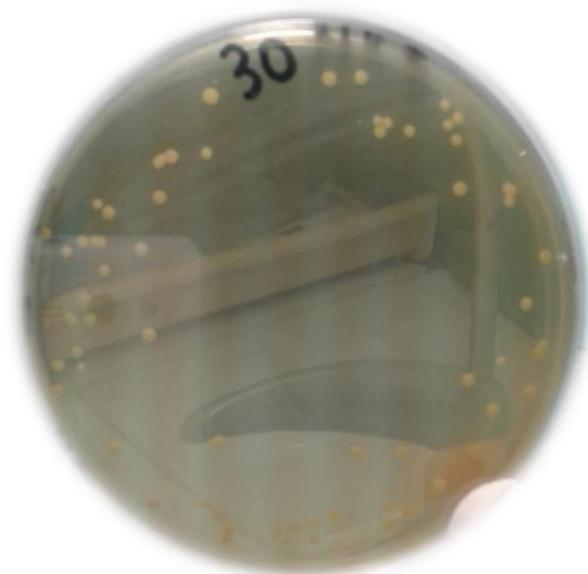
Cette activité a été notamment observée chez des souches isolées à partir du tube digestif ou des fèces de certains mammifères. Elle est très élevée chez les bifidobactéries.

La déconjugaison des sels biliaires par des bactéries possédant une activité BSH permet la détoxification de ceux-ci et augmente leur chance de survie dans l'intestin. L'activité BSH d'un probiotique sera donc désirable puisqu'elle maximise ses chances de survie dans le tractus gastro-intestinal. Il a été proposé que la déconjugaison des sels biliaires possède des effets bénéfiques sur l'hôte comme la diminution des niveaux de cholestérol (Zhang, 2008).

Marteau *et al.* ont clairement démontré, *in vitro*, que les sels biliaires avaient un effet bactéricide. De la même manière que pour l'acidité gastrique, cette étude démontre une différence dans la sensibilité aux sels biliaires entre les espèces bactériennes. *Lb.bulgaricus* et *S. thermophilus* ont un pourcentage de survie très faible comparé à *Lb.acidophilus* et *B.bifidum*. Les sels biliaires auraient un effet détergeant sur les membranes cellulaires résultant d'une augmentation de la perméabilité cellulaire.

La **Figure 35** montre l'aspect des colonies observées en présence des 3 facteurs de stress gastrique.

## *Résultats et discussions*



**Figure 35:** les colonies observées en présence des sels biliaries

### III-5-Test lipolytique :

L'activité lipolytique est révélée par l'apparition d'halos clairs autour des colonies de bactéries lactiques, les diamètres de ces zones de lipolyse sont regroupés sur le tableau ci-dessous.

**Tableau 17 :** Incubation après 24h (diamètre en mm) :

souche	Beurre 1 %	Beurre 2%	Beurre 3%	H.O 1%	H.O 2%	H.O 3%	Tween 1%	Tween 2%	Tween 3%
NSC62	13	12	14	10	12	09	13	10	07
Jum III4	12	12	14	14	10	11	15	12	10
Mech C8	13	13	13	12	10	12	14	10	08
Mech II6	15	15	13	13	12	11	16	11	07
NSC5C	09	06	09	0	08	0	10	09	06
Mech C4	13	10	15	07	0	09	12	09	08
NSC9A	13	12	13	09	11	10	12	10	11
Mech C6	17	14	15	11	14	13	10	11	13
Ghar C2	13	11	12	10	10	09	08	10	11
Mech I1	15	11	13	12	09	13	11	10	12
Jum II3	12	13	15	12	13	11	09	11	13
NSC10	12	12	12	09	09	10	10	14	11

## Résultats et discussions

Les remarques suivantes peuvent être faites :

Les résultats obtenus pour les souches testées varient d'un substrat à un autre et d'une concentration à une autre.

La souche Mech<sub>C8</sub> a une activité lipolytique atteignant 13mm pour les concentrations 1, 2 et 3 % on présence du beurre. Par contre on constate que la souche NSC<sub>5C</sub> à une faible activité avec un diamètre de 9mm pour les concentrations 1 et 3 % et un diamètre de 6 mm pour le beurre 2% .

Pour la souche Mech<sub>II</sub> on constate que l'activité est maximale en présence de 1% du beurre avec un diamètre de 15 mm, pour ce qui est de la souche Mech<sub>C6</sub> la dégradation est maximale atteignant 17 mm on présence 1% de beurre.

Concernant l'huile d'olive pour la souche Mech<sub>C4</sub> elle est faiblement lipolytique en présence de 1 % H.O à un diamètre de 7 mm et 9 mm en présence de 3% H.O mais pour la concentration de 2% H.O la souche n'a aucun effet lipolytique.

Pour la souche JUM<sub>III4</sub> l'activité est optimale en présence de 1% d'H.O atteignant un halo de 14mm de diamètre et seulement de 10 mm et 11 mm à des concentrations de 2 et 3% respectivement.

D'une façon générale toutes les souches ont montré une activité vis-à-vis du tween 80 avec des diamètres variant de 6 mm à 16 mm .on remarque que les résultats varient selon la concentration de substrat additionné au milieu MRS est qu'un maximum d'activité est révélé à 1% de Tween80.

Une faible lipolyse a été observée pour les souches JUM<sub>III4</sub>, MECH<sub>C8</sub>, NSC<sub>5C</sub>, MECH<sub>C6</sub>, MECH<sub>II1</sub>et JUM<sub>II3</sub> avec un diamètre de 9 mm mis à part les deux souches MECH<sub>II6</sub> et NSC<sub>10</sub> qui ont des diamètres légèrement supérieur de 11mm et 12 mm respectivement, en revanche la souche GHAR<sub>C2</sub> n'a montré aucun effet lipolytique

### Test lipolytique sur milieu MRS tamponné :

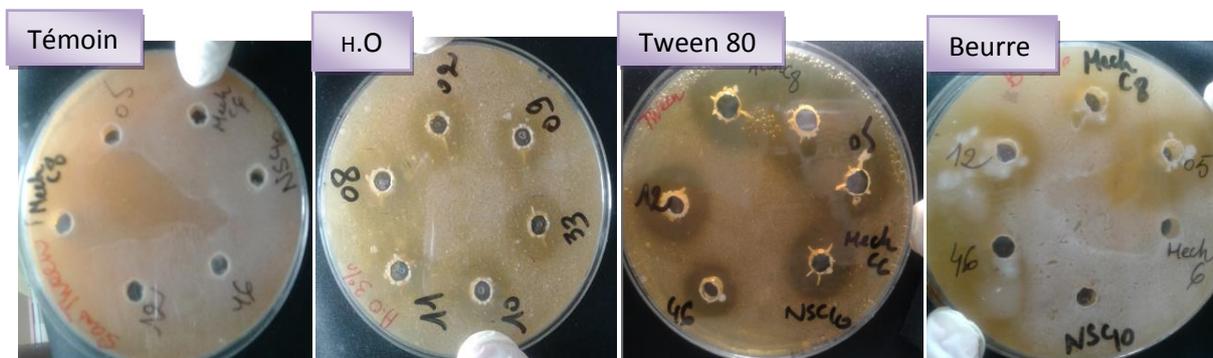


Figure 36:Activité lipolytique de 6 souches lactiques dans un MRS tamponné +huile d'olive par rapport au MRS sans tween(temoin)

## Résultats et discussions

Le But de ce test est de cibler la source de lipolyse, en effet, outre les lipases l'acidité produite lors de la croissance bactérienne peut également contribuer à éliminer les lipides, le tampon utilisé dans ce cas contribue à neutraliser l'acide lactique présent dans le surnageant, en cas d'apparition d'halos clairs l'activité est attribuée à l'action seul des lipases synthétisées par les microorganismes testés, les résultats obtenus sont illustrés sur la **figure 36** et le **tableau 17**.

La souche NSC<sub>5C</sub> a montré une faible activité en présence de 3% de beurre avec un diamètre de 8 mm et une dégradation maximale atteignant 28 mm en présence de 3% d'huile d'olive, une activité moyenne pour le Tween et le beurre à 3% avec des diamètres de 15 mm et 13 mm respectivement ,par contre la souche NSC<sub>10</sub> ne présente une activité avec uniquement 3% d'huile d'olive avec un diamètre de 18 mm.

**Tableau 18** :La lipolyse des bactéries lactiques sur un MRS tamponnée additionné à différents sources lipidiques(naturels et artificiels)

souche	Beurre 3%	H.O 3%	Tween 3%
NSC 62	19	25	0
JUM III4	25	27	0
MECH C8	0	14	0
MECH II6	27	19	0
NSC5C	08	28	15
MECH C4	08	22	18
NSC9A	20	20	0
MECH C6	0	22	0
GHAR C2	28	20	0
MECH I1	0	25	0
JUM II3	10	19	0
NS C10	0	18	0

Les lactobacilles testés montrent une meilleure activité en présence des substrats naturels en comparaison au tween 80 qui n'a été dégradé que par les souches NSC<sub>5C</sub> et Mech C<sub>4</sub>, les lipases ont dégradé préférentiellement l'huile d'olive par rapport au beurre, ces résultats concordent avec ceux obtenus par Dellali en 2012.

Les lipases ont un large spectre d'action sur les substrats en émulsion, tel que les substrats naturels : beurre, huile d'olive , tandis que les bactéries lactiques hydrolysent préférentiellement les triglycérides estérifiés avec des substrats à courte chaîne. L'activité est optimale avec la tributyrine, et souvent faible avec les lipides naturels (Fryer et *al.*, 1967;

## *Résultats et discussions*

Oterholm et *al.*, 1968 ;Umemoto et Sato, 1975; Angeles et Marth,1971 ;De Moraes et Chandan, 1982; Kamaly et *al.*, 1988; Papon et Talon, 1989).

Le développement des enzymes industriels résulte d'une grande part de l'évolution rapide de la biotechnologie, actuellement la production industrielle des enzymes résulte essentiellement à partir des micro-organismes préalablement sélectionnés ; ainsi les lipases microbiennes sont perçues comme une des plus importantes et plus intéressantes classe d'enzyme pour le monde industriel (**Fickers et *al.*, 2008**). Les applications industrielles des lipases sont nombreuses notamment dans la fabrication de lessives et dans le domaine alimentaire pour la production d'aliment avec meilleure qualité nutritionnelle, ou la synthèse d'esters aromatiques améliorant les qualités gustatives du produit.

**Tableau 19** : Test de dégradation du cholestérol *in vitro*

Souches	Lavage 1+2+3	Lyse	Taux de cholestérol	CDR (Non inoculé)	CR (inoculé)
MECH II6	0,015	0,018	0.44 g /l	0,98	0,55
NSC5C	0,030	0.000	0.63 g /l	0,96	0,34
MECH C4	0,022	0,011	0.43 g /l	0,97	0,54
NSC5A	0,10	0,011	0.65 g /l	0,89	0,26
GHAR C2	0,003	0,034	0.56 g /l	0,99	0,43
JUM III4	0,007	0,015	0.47 g /l	0,99	0,52
NSC10	0,003	0,026	0.49 g /l	0,99	0,50
NSC9A	0,011	0.000	0.47 g /l	0,98	0,52

Les résultats présentés sur le tableau indiquent que l'ensemble des lactobacilles testés ont dégradé efficacement le cholestérol présent dans le milieu de culture (1g/l initialement) en présence de sels biliaires , ce dernier a été réduit à plus de 60% pour les souches NSC<sub>5C</sub>, NSC<sub>5A</sub> et GHAR<sub>C2</sub>, avec une concentration de cholestérol résiduel de 0,34, 0,26 et 0,43g/l respectivement, les autres souches ont également dégradé entre 50 et 40% du cholestérol initial présent dans le milieu de culture.

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

Les probiotiques possèdent une activité anticholestérolémiante. Selon (Novel, 1993) les acides organiques sont vraiment des agents hypocholestérolémiants et les acides

## Résultats et discussions

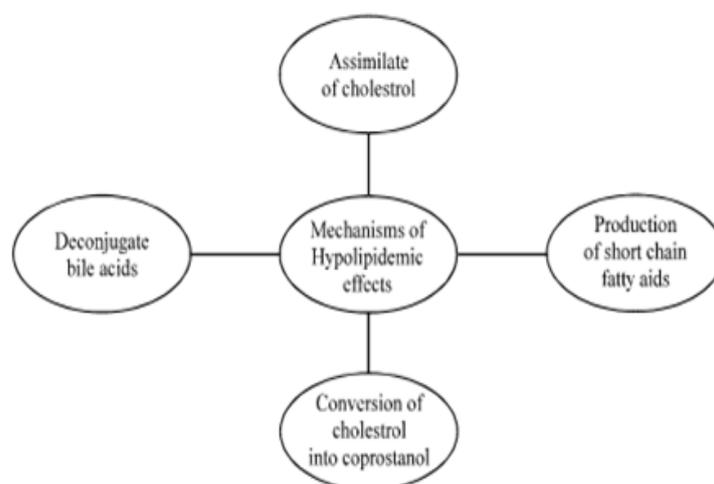
hydroxyméthyl et oratique abaissent le cholestérol sérique; par contre l'acide urique inhibe la synthèse du cholestérol. (Desmazeaud, 1996)

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

Les acides biliaires, synthétisés par le foie à partir du cholestérol, sont "recyclés" et utilisés en moyenne trois fois pendant un même repas ou rajouté dans le milieu de culture comme dans notre cas. L'hydrolyse des sels biliaires conjugués (les acides biliaires doivent être conjugués à la taurine et à la glycine pour être solubles) rend nécessaire la synthèse de sels biliaires supplémentaires, ce qui conduirait à une réduction du cholestérol (Liong et Shah, 2005). Bien que la déconjugaison des sels biliaires puisse avoir des effets bénéfiques sur l'hôte, comme la diminution des niveaux de cholestérol, une déconjugaison excessive ou une déshydroxylation des acides biliaires par certains microorganismes semble avoir plusieurs effets néfastes sur l'hôte. Les bactéries les plus fréquemment désignées comme probiotiques, telles que les souches des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, sont incapables de déshydroxyler les sels biliaires déconjugés.

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 bactéries lactiques.

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



**Figure 37** : mécanismes des effets hypolipémiants de probiotiques.

## Résultats et discussions

### III-6-Préparation de lait fermenté :



Figure38 : Les souches pures Jum<sub>III4</sub> et NSC<sub>5C</sub>.

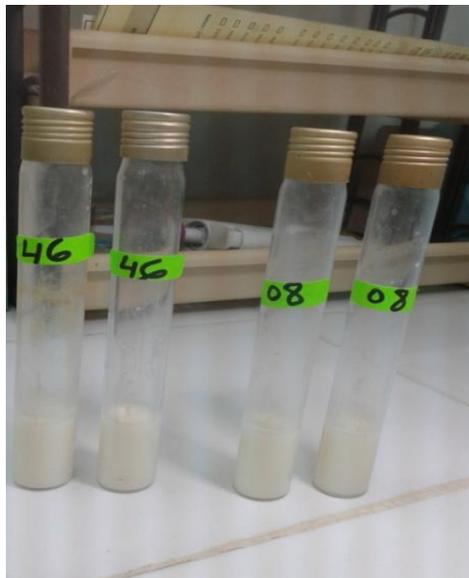


Figure39 : Le laitensemencé par les souches Jum<sub>III4</sub>et NSC<sub>5C</sub> (6ml dans chaque tube).



Figure 40 : Le lait fermenté prêt à être administré aux rats.

## Résultats et discussions

### III-7-Acidité titrable :

Les mesures effectuées sur les souches montrent qu'il existe une diversité d'activité acidifiante. Cette diversité offre un choix pour satisfaire les différentes exigences technologiques recherchées (Chamba et Prost, 1989). Une acidification trop lente ou trop faible est également à l'origine des défauts de qualités de certains produits fermentés. Elles provoquent notamment pour les fromages un égouttage insuffisant

En revanche les valeurs enregistrées dans l'échantillon  $NSC_{5C}$  sont de 22 et 46 ( $^{\circ}D$ ), il est important de préciser que le lait camelin est caractérisé par un effet tampon plus élevé par rapport au lait de jument (Kamoun et Ramet, 1989 ; Abutarbousch, 1996), c'est-à-dire que le pH arrive à se maintenir approximativement au même niveau malgré l'élévation de l'acidité dornic, ce qui explique l'absence de relation directe entre le pH et l'acidité dornic (Kamoun, 1994). La cinétique d'acidification des souches lactiques est illustrée sur la **figure 41**.

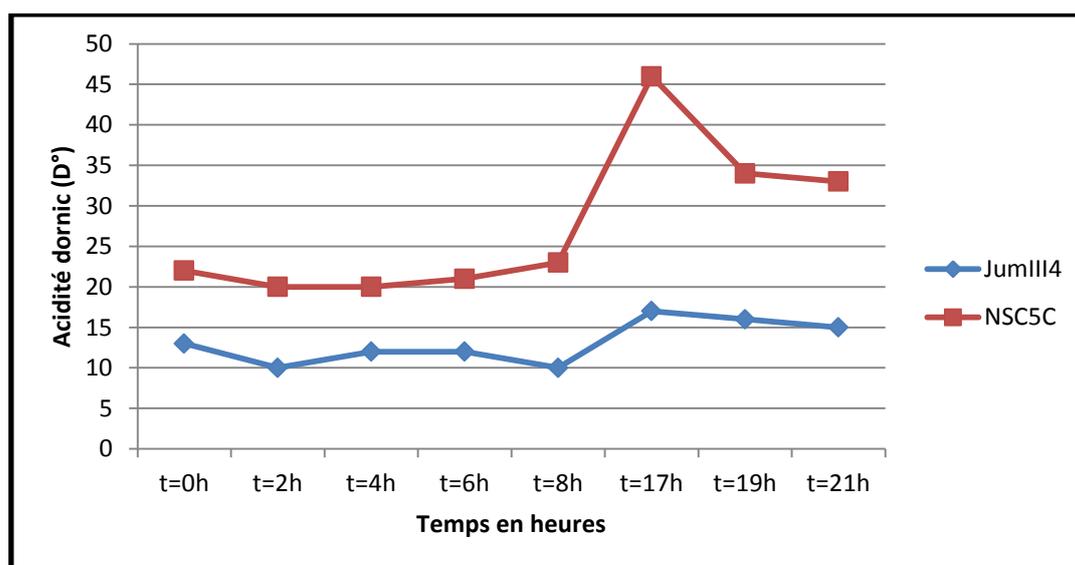


Figure 41: Evolution de l'acidité des souches

Les deux souches ont progressées parallèlement à partir de jusqu'à T8 pour atteindre une valeur d'acidité de 17  $D^{\circ}$  puis se stabilise à ce niveau pour la souche JumIII4 ce qui correspond à l'acidité d'un lait frais. Tandis que la souche  $NSC_{5C}$  prend une progression aigue de 23 $D^{\circ}$  à T17 à la valeur 46  $D^{\circ}$ .

Le pouvoir acidifiant des souches peut être lié soit aux capacités glycolytiques intrinsèques des souches (activité des transporteurs et des enzymes glycolytiques), soit à leurs capacités anaboliques associées à un rétrocontrôle du catabolisme, soit aux deux à la fois. Ces

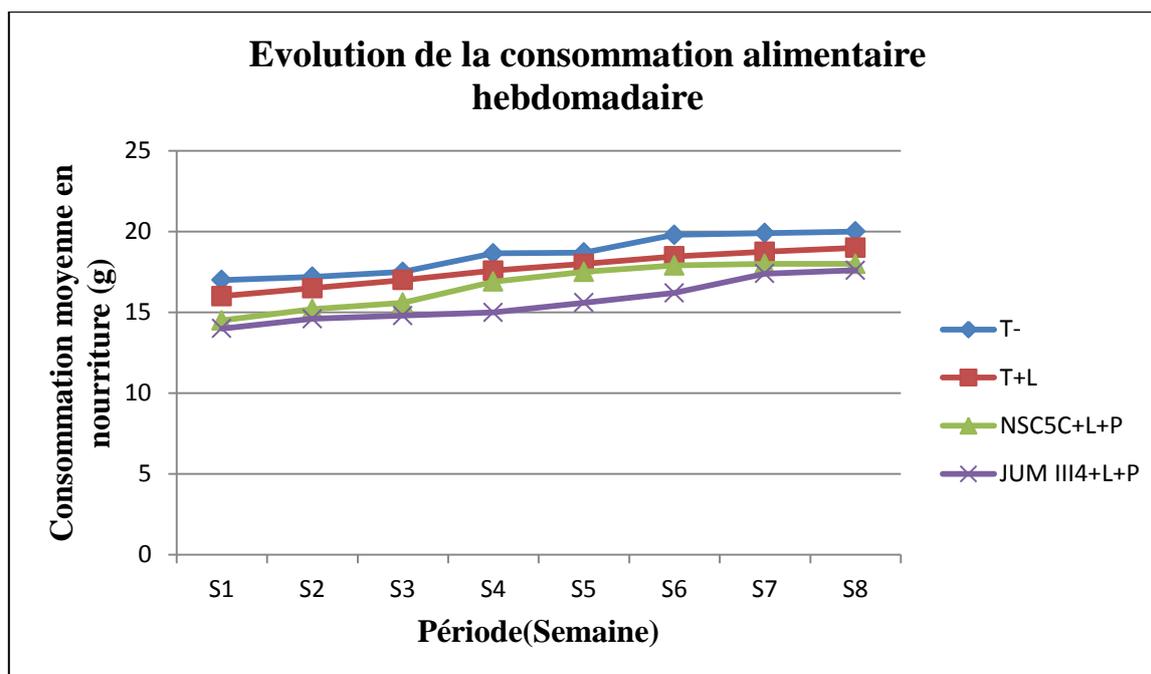
## Résultats et discussions

différences de production sont également dues à la présence ou à l'absence de systèmes de transport des éléments nutritifs (Albenzio *et al.*, 2001).

### III-8-Partie *in vivo*

#### III-8-1-Nourriture consommée :

La **Figure 12** montre l'évolution de la consommation hebdomadaire moyenne en nourriture pour les différents lots de rats.



**Figure 42 :** Consommation moyenne en nourriture.

**T-** : témoin négatif / **T+L** : témoin +lipide / **S46+L+P** : NSC5C+lipides+prébiotiques  
/ **S8+L+P** : JUM III4+lipides +prébiotiques

Nos résultats montrent que les quantités moyennes consommées sont marquées par des valeurs croissantes durant les 8 semaines d'élevage pour l'ensemble des lots.

En suivant l'évolution de la consommation d'aliment par semaine on constate que l'incorporation de *Lactobacillus.sp* dans l'aliment des rats Wistar a une influence sur leur appétibilité. Ces résultats indiquent également une bonne valorisation des diètes par les animaux recevant le régime hyperlipidique.

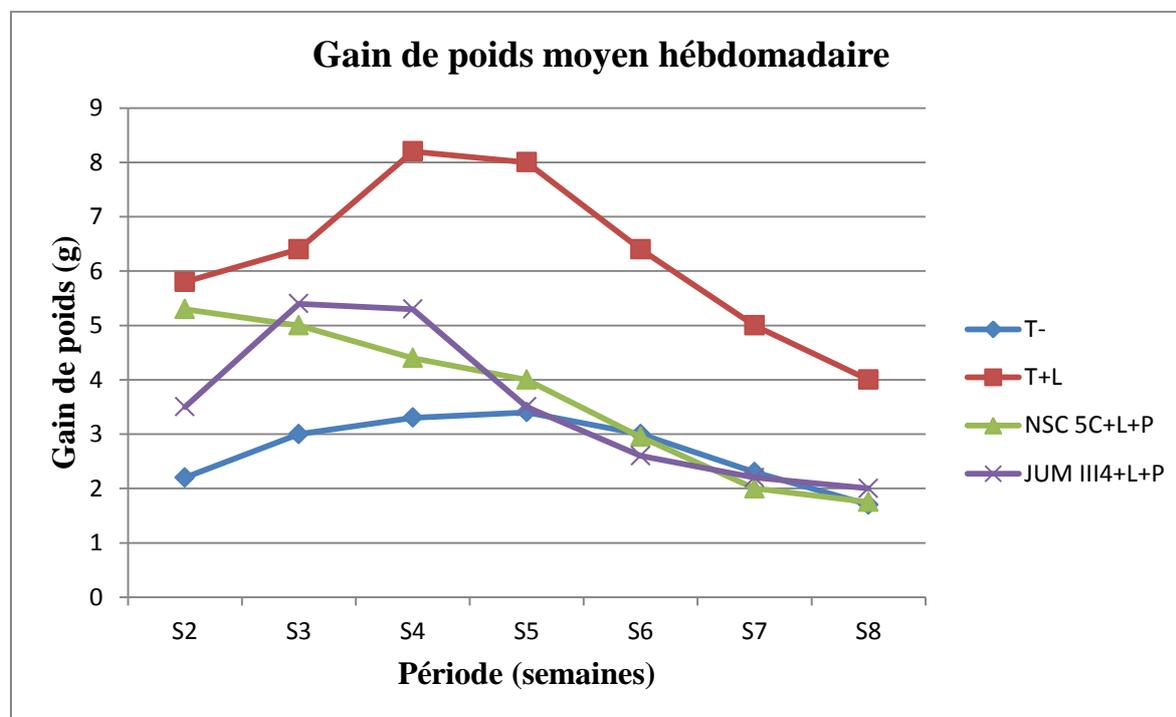
Les travaux de Milagro *et al.* (2006) qui ont indiqué qu'un régime hyperlipidique chez le rat Wistar induit une augmentation de la prise alimentaire et du poids corporel avec une accumulation des lipides dans les tissus adipeux.

L'évolution des quantités d'aliments consommées au cours des différentes phases d'élevage pour les quatre lots est représentée dans l'annexe n°03 tableau 01.

## Résultats et discussions

### III-8-2-Gain de poids moyen

Les résultats observés pour le gain de poids moyen des animaux (**Figure 43**) sont en corrélation avec les indices de consommation.



**Figure 43:** Evolution du gain de poids moyen au cours des semaines

Les résultats illustrés dans la **figure 43** révèlent une forte augmentation de poids chez le lot témoin +lipide par rapport aux 3 autres lots malgré un régime identique pour les lots jumIII4, NSC<sub>5C</sub> et T+L, cela indique que le supplément (pro/prébiotique) contribue significativement dans la stabilisation du poids des animaux avec un gain de poids minimum malgré un apport quotidien de lipide (20%) dans la ration alimentaire, leur gain de poids moyen se rapproche d'autant plus au GPM du lot T- ne recevant aucun supplément (Régime standard sans supplément lipidique ni symbiotique).

La Baisse du GPM observée à partir de la 5<sup>ème</sup> semaine pour l'ensemble des lots, est probablement due à une forte augmentation de la température à cette période ( du 15 juin au 7 juillet) la consommation alimentaire est négligée au dépend d'une augmentation du volume d'eau consommé.

Le gain de poids moyen à la fin de l'expérimentation sont respectivement de 1.7 g pour les rats du lot T- , 4g pour le lot T+L, 1.75g pour le lot NSC<sub>5C</sub> +L+P et 2 g pour le lot S8+L+P.

## Résultats et discussions

Les résultats sont en accord avec ceux de Mahrous *et al.*(2011) qui rapport des effets de l'apport de symbiotiques sur le gain de poids chez le rat Wistar comparé aux groupes témoins.

### III-8-3-Indice de consommation

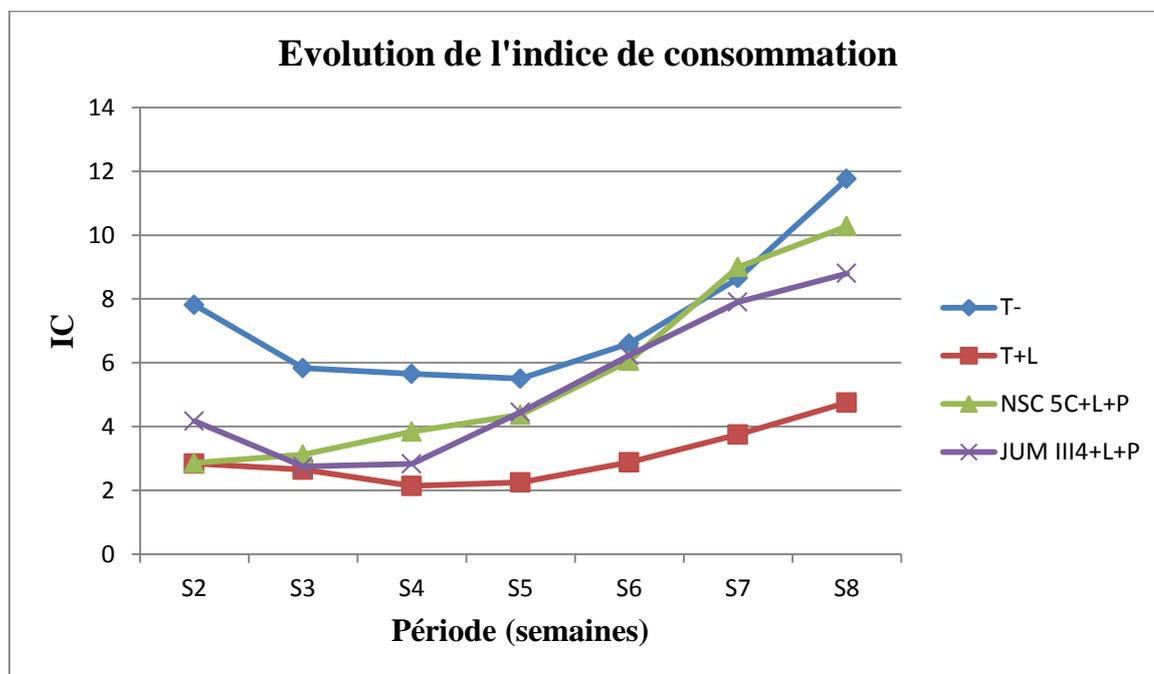


Figure 44: Evolution de l'indice de consommation

Les indices de consommations (IC) des 4 lots sont exprimés dans le tableau n° (annexe 03 tableau 04) et illustré par la figure données ci- dessus

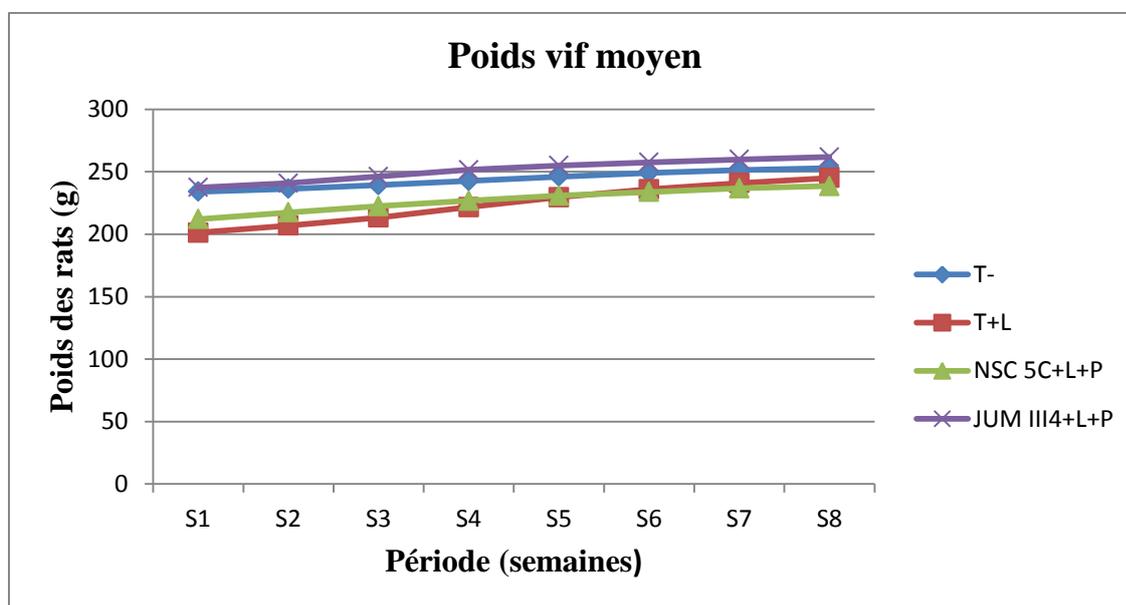
Le lot témoin a un indice de consommation plus élevé que les lots expérimentaux (NSC<sub>5C</sub> +l+p) (S8+l+p) (7versus 2.86et4.17) respectivement. Il faut noter que les sujets des lots expérimentaux recevant un régime supplémenté en probiotique, présentent au cours des différentes phases d'élevage des indices de consommation inférieurs au témoin négatif et T+L.

Le gain de poids moyen (GPM) est inversement proportionnel à l'indice de consommation(IC), on note un gain de poids plus important pour les individus de lot2 (Témoin+L), ceci est à relier à la quantité de gras perçue quotidiennement par ces animaux. Ayant une valeur nutritionnelle plus élevée le gras contribue fortement à l'augmentation du poids des animaux réduisant l'indice de consommation au minimum, l'IC de consommation est supérieur chez les animaux supplémentés en probiotique par l'activité lipolytique des lactobacilles sur le gras apporté par l'alimentation.

## Résultats et discussions

### III-8-4-Poids vif moyen

L'évolution du poids vif moyen (PVM) des animaux au cours des semaines d'élevage est exprimée sur la **Figure 45**.



**Figure 45:** Evolution du poids vif des animaux au cours des semaines

Le poids des animaux a augmenté progressivement et simultanément pour les 4 lots du début jusqu'à la fin de l'expérimentation, cette augmentation est principalement due à la croissance des animaux, en effet, le poids des animaux augmente jusqu'à atteindre l'âge adulte.

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

Le poids corporel accru est influencé par les facteurs diététiques, les régimes avec le contenu à haute teneur en graisse entraînant une augmentation de poids corporel sans compter l'existence des anomalies dans le métabolisme peut également affecter le poids corporel. Nos résultats sont appuyés par les travaux de Lanjar et *al*, (2011).

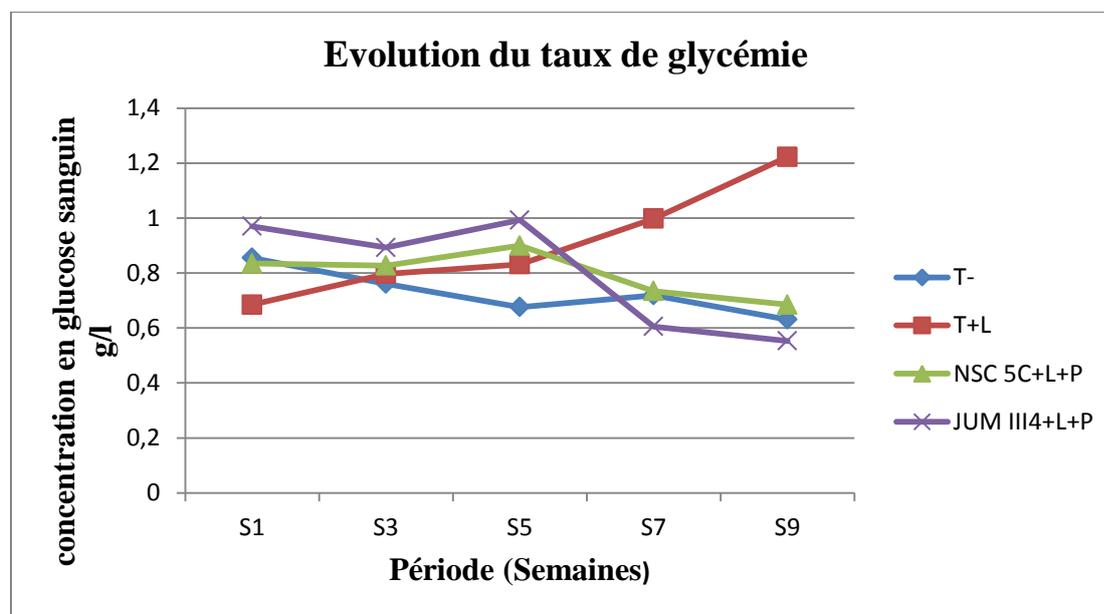
## Résultats et discussions

### III-9-Paramètre biochimiques :

L'analyse des échantillons sanguins prélevés chaque quinzaine nous a permis d'obtenir les résultats suivants pour les paramètres de :

#### A. Glycémie

L'évolution de ce taux au cours de la période d'étude pour l'ensemble des animaux est montrée dans la **Figure 46**.



**Figure 46:** Evolution du taux de glycémie.

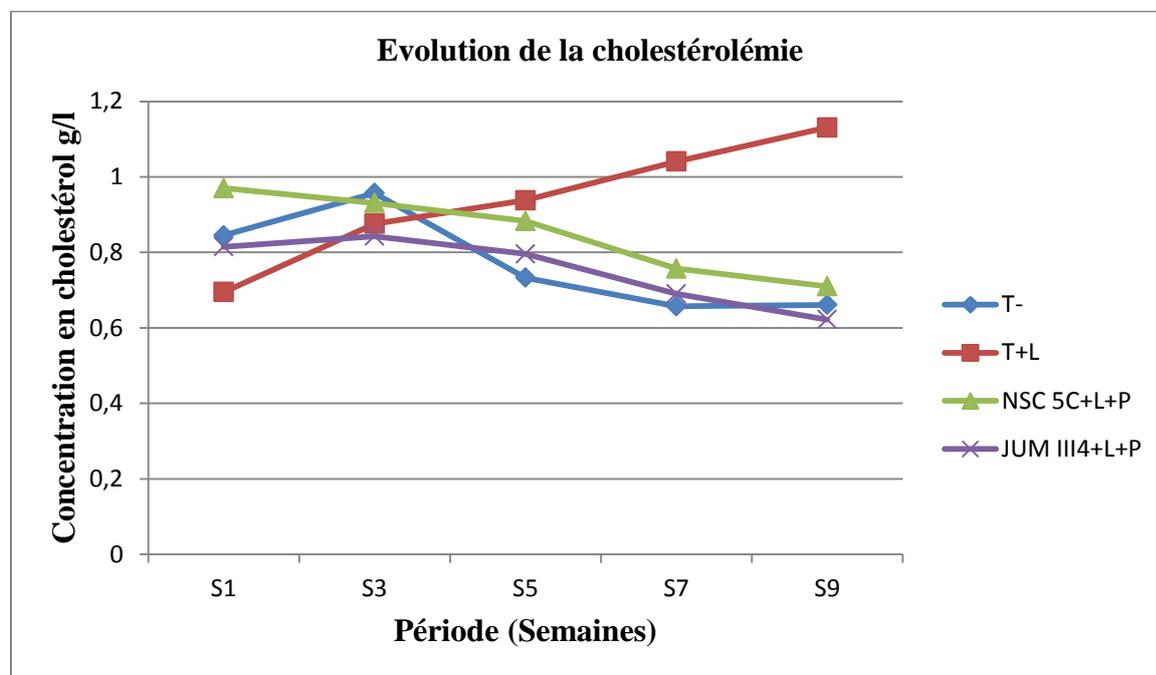
Une faible diminution de la glycémie a été observée pour l'ensemble des lots de la première à la dernière semaine d'étude mis à part le lot T+L pour lequel la glycémie a doublé à la fin de l'expérience passant de 0,68g/l à 1,22g/l, ce phénomène peut être expliqué par la perception d'un régime hyperlipidique, qui a contribué à modifier le métabolisme glucidique et le taux de glucose sanguin. Les lots Jum<sub>III4</sub> et NSC<sub>5C</sub> reçoivent une ration alimentaire identique à celle du lot T+L, néanmoins l'apport en pro et prébiotiques a contribué au maintien d'un métabolisme proche des témoins, ce qui conforte l'idée que les probiotiques, les prébiotique ou la combinaison des deux, influenceraient la stabilisation du taux de glucose sanguin.

Il est reconnu que les prébiotiques ont un effet régulateur sur le métabolisme glucidique selon Hata *et al.* (1985), Hidaka *et al.* (1986), Drevon et Bonet (1992 et 1994).

## Résultats et discussions

### B. Cholestérol :

L'évolution du taux lipidique chez les animaux des différents lots durant la période d'élevage est montrée dans la **Figure 47**.



**Figure 47:** Evolution du taux de cholestérol.

Les lots (NSC<sub>5C</sub> +L+P et JUM<sub>III4</sub> +L+P) montrent une baisse qui est accentué à partir de la 3<sup>ème</sup> semaines jusqu'à la fin de l'expérience de même que pour le lot (T-) pour lequel on a observé une réduction du taux de cholestérol jusqu'à la 7<sup>ème</sup> semaine se stabilisant à une concentration de 0,66g/l.

Toutes les lots montrent une diminution du taux initial de cholestérol sauf le lot 2(T+L) qui lui à l'inverse double, cette hausse est expliquée par l'apport en source lipidique dans leur alimentation.

Malgré leur régime hyperlipidique les lots recevant les souches JUM<sub>III4</sub> et NSC<sub>5C</sub> (*Lactobacillus. sp*) ont montré une réduction très importante du taux de cholestérol sanguin par rapport au lot T+L, avec des concentrations sanguines passant de 0.81 à 0.62 g/l pour le lot JUM<sub>III4</sub> et de 0.97 à 0.71g/l pour les animaux du lot NSC<sub>5C</sub>, contrairement au lot T+L avec un taux évoluant de 0,69 à 1,13g/l à l fin des 8semaines.

## Résultats et discussions

On constate que la consommation de lait fermenté contenant des probiotiques entraînent une diminution du taux de cholestérol sanguin confirmant les résultats obtenus dans la partie *in vitro*.

Par ailleurs, chez les animaux, de nombreux travaux scientifiques ont montré une nette influence des probiotiques sur le métabolisme lipidique (Idoui, 2008 ; Amara, 2009 et 2012). Dans d'autre expérience, Ngyeur a démontré que *lactobacillus plantarum* PHO4 a réduit le taux de cholestérol chez les souris hypercholestérolémique.

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

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

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

### C. Triglycérides :

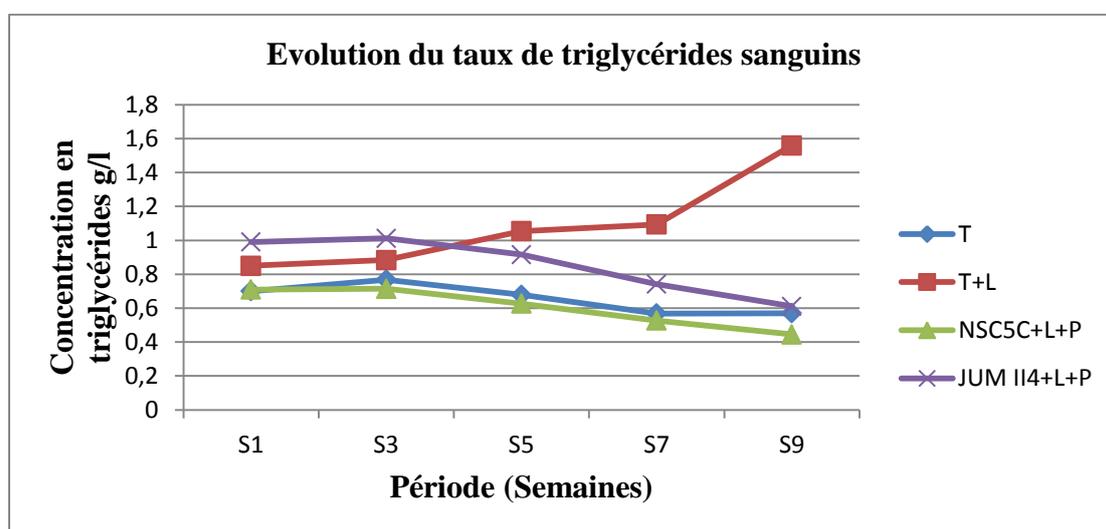


Figure 48 : Evolution du taux de triglycérides.

Même tendance à la baisse du taux de triglycérides pour les 3lots (JUM III4 +L+P), (NSC5C +L+P) et (T-), contrairement au lot T+L pour lequel le taux de triglycérides a doublé allant d'une concentration initiale de 0,85 g/l jusqu'à atteindre 1,56 g/l à la dernière semaine.

L'ingestion de prébiotiques a un effet sur le métabolisme des lipides en diminuant la

## ***Résultats et discussions***

cholestérolémie et la triglycéridémie (Fiordaliso et *al.*, 1995 ; Delzenne et *al.*, 2002).

Ces diminutions sont provoquées par une réduction du taux des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) sériques suite à la réduction de l'activité des enzymes lipogéniques hépatiques (telles que l'acides gras synthase, l'ATP citrate lyase et l'acetyl-coA carboxylase) (Delzenne et *al.*, 2008). Il a été suggéré que les prébiotiques pourraient modifier l'expression de gènes codant pour les enzymes lipogéniques (Samanta et *al.*, 2013).

La teneur en lipides sanguins représentés par les triglycérides et le cholestérol est réduite chez les lots recevant un probiotique dans leur régime alimentaire. Ceci s'explique par le fait que les bactéries lactiques posséderaient une propriété hypocholestérolémiante qui pourrait être dues (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):

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

### **Remarque :**

L'évolution des triglycérides est directement liée à l'ingestion du sucre rapide (nutriments).

### **III-10-Paramètres microbiologiques :**

La flore mésophile totale a été dénombrée (**Figure 49**). On observe une augmentation graduelle de la flore totale pour l'ensemble des lots au cours des 8 semaines.

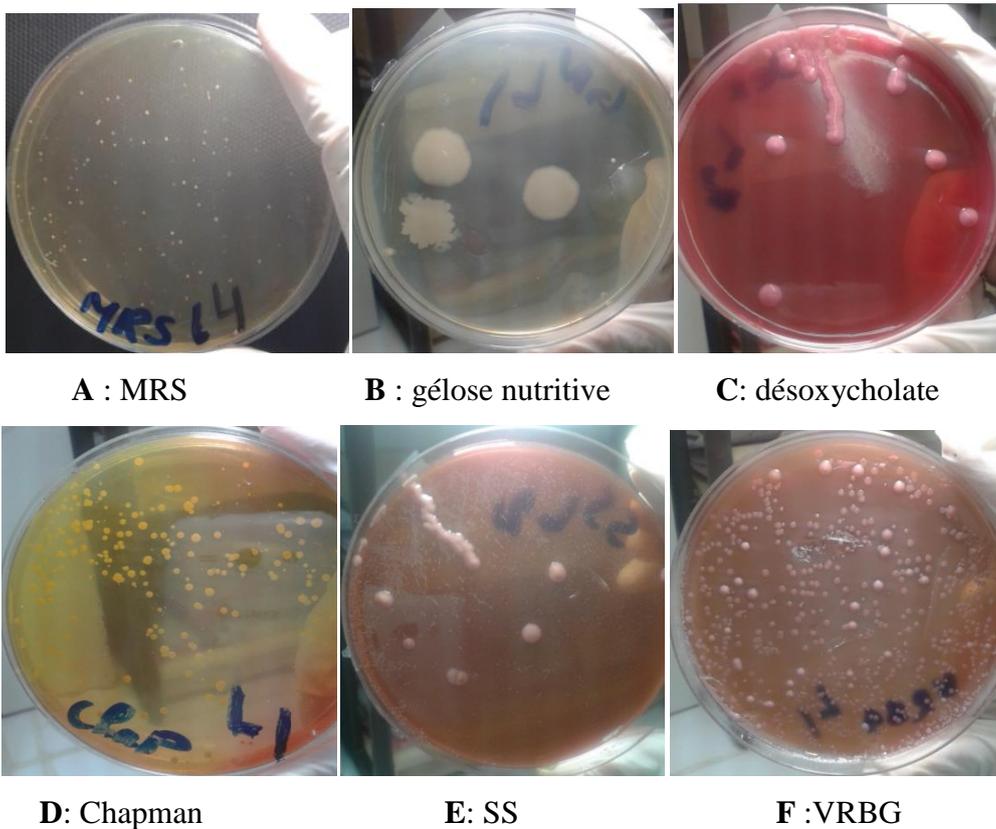
**Tableau 20:** Dénombrement de la charge bactérienne dans les selles des rats.

LOT	SOUCHES	Flore totale	Bactéries lactiques	Salmonelle et Shigelle	coliforme	Entérocoque	Staphylocoque
T-		$3 \times 10^6$ Ufc/ml	$10 \times 10^4$ Ufc/ml	$320 \times 10^4$ Ufc/ml	$224 \times 10^4$ Ufc/ml	$400 \times 10^4$ Ufc/ml	$128 \times 10^4$ Ufc/ml
T+L		$9 \times 10^6$ Ufc/ml	$50 \times 10^4$ Ufc/ml	$27 \times 10^4$ Ufc/ml	$12 \times 10^4$ Ufc/ml	$12 \times 10^4$ Ufc/ml	$600 \times 10^4$ Ufc/ml
N5C5C+L+P		$24 \times 10^6$ Ufc/ml	$65 \times 10^4$ Ufc/ml	$10 \times 10^4$ Ufc/ml	$90 \times 10^4$ Ufc/ml	$5 \times 10^4$ Ufc/ml	$320 \times 10^4$ Ufc/ml
JUM III4+L+P		$37 \times 10^6$ Ufc/ml	$40 \times 10^4$ Ufc/ml	$344 \times 10^4$ Ufc/ml	$264 \times 10^4$ Ufc/ml	$252 \times 10^4$ Ufc/ml	$76 \times 10^4$ Ufc/ml

## Résultats et discussions



**Figure 49 :** Evolution de la flore mésophile totale. (UFC : unité formant une colonie)  
La flore fécale se compose de différents genres microbiens que nous avons recherchés sur 6 milieux différents.



**Figure 50:** Milieux utilisés pour le dénombrement de la flore fécale.

Les composés antimicrobiens produits par les BL peuvent empêcher la croissance des bactéries pathogènes; contaminants possibles des produits fermentés (Smith et Palumbo 1983; Andersson, 1986; Adams et Hall, 1988; Raccach *et al.*, 1989; Berry et al., 1995; Cintas *et al.*, 1998; Gill et Halley, 2003; Guessas *et al.*, 2006).

## *Résultats et discussions*

**Tableau 21:** Poids des organes (g).

<b>Organes</b>	<b>Témoin -</b>	<b>Témoin +L</b>	<b>NSC5C+L +P</b>	<b>JUM III4+L +P</b>
<b>Foie</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>Intestin et Estomac</b>	<b>17.66</b>	<b>21.33</b>	<b>13.66</b>	<b>17</b>
<b>Cœur</b>	<b>1</b>	<b>1.05</b>	<b>1</b>	<b>0.68</b>

Le poids des organes et des intestins est supérieur chez le lot 2(T+L), la consommation des probiotiques pour les deux lots recevant une alimentation riche en lipide a contribué à maintenir un poids des organes inférieur au lot (T+L) malgré une alimentation identique.

Le régime hyperlipidique induit une augmentation très significative du poids des foies et des intestins chez les rats du lot (T+L) par rapport aux autres lots. (Tableau)

L'observation sur l'ensemble des organes des différents lots ne nous a permis de déceler aucune anomalie morphologique visible, ils ne présentent aucune malformation ni atrophie comme le montre la Figure 53 et 54 .

Après la dissection des rats des 4 lots on a remarqué que les animaux sous régime hyperlipidique (sans supplément symbiotique) présentent une grande quantité de gras recouvrant la partie intérieure de la cavité abdominale des rats (Figure 52), contrairement au lot témoin négatif et les autres lots qui consomment les symbiotiques pour lesquels nous avons remarqué l'absence de gras stocké. (Figure 51).

## *Résultats et discussions*

---



**Figure 51:** Aspect des rats de lot3( NSC5C +L+P).



**Figure 52:** Aspect des rats de lot 2(Témoin+L).

## Résultats et discussions

---



Figure 53: Aspect des foies des rats.



Figure 54: Aspect des cœurs des rats.

### III-11-Taux de mortalité :

Dans nos conditions d'étude, les résultats indiquent que l'apport en probiotiques ne semble pas avoir un effet sur le taux de mortalité, quelle que soit la souche probiotique, comme montré dans le **Tableau 22** .

## Résultats et discussions

**Tableau 22:** Taux de mortalité des animaux à la fin de l'étude.

Lot	T	T+L	NSC5C+L+P	JUM III4+L+P
Taux de mortalité	0%	0%	60%	30%

Après une autopsie des rats nous avons pu déceler que les décès sont survenus suite à une occlusion intestinale. Cette dernière est due à des morceaux de graisse combinés à de l'orge qui ont conduit l'obstruction du transit intestinal induisant une mort certaine en quelques heures.



**Figure 55:** Photos des rats après autopsie.

### III-12-Dénombrement des bactéries de l'intestin l'estomac et le colon :

Les aspects des boîtes ensemencées par les dilutions d'extrait de l'intestin, estomac et le colon des rats des 4 lots sont montrés dans les figures suivantes:



**Figure 56:** La charge des bactéries lactiques sur milieu MRS (estomac, intestin, colon) lot (NSC 5C+I+P).

## Résultats et discussions



Figure 57: La charge des Staphylocoques sur milieu Chapman.



Figure 58: La charge de la flore totale sur milieu GN.

Tableau 23 : Dénombrement de la charge bactérienne des organes(estomac, intestin et colon).

Lot	Flore totale			Bactéries lactiques			coliformes			Staphylocoques			Salmonelle et Shigelle		
	E	I	C	E	I	C	E	I	C	E	I	C	E	I	C
T-	Tapis	Tapis	Tapis	17× 10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	82× 10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	4× 10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	Tapis	474 ×10 <sup>3</sup> Ufc/ ml	Tapis	70 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	64 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	20×1 0 <sup>4</sup> Ufc/ ml	Tapis	Tapis	Tapis
T+ L	Tapis	Tapis	Tapis	896 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	40 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	112 ×10 <sup>5</sup> Ufc/ ml	21 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	Tapis	Tapis	62 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	Tapis	Tapis	336 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	Tapis	Tapis
NS C5 C+ L+P	76× 10 <sup>6</sup> Ufc/ ml	Tapis	Tapis	1 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	4×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	30 ×10 <sup>5</sup> Ufc/ ml	116 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	20 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	34×1 0 <sup>5</sup> Ufc/ ml	400 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	Tapis	Tapis	Tapis	Tapis	56 ×10 <sup>5</sup> Ufc/ ml
JU M III4 +L+ P	Tapis	Tapis	Tapis	13 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	9 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	12 ×10 <sup>5</sup> Ufc/ ml	240 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	77 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	56 ×10 <sup>5</sup> Ufc/ ml	68 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	10× 10 <sup>3</sup> Ufc/ ml	57 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	144 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	83 ×10 <sup>4</sup> Ufc/ ml	Tapis

## *Résultats et discussions*

---

La prolifération de ces genres bactériens dans une région de l'intestin est favorisée par les conditions physicochimiques qui s'y trouvent, ces conditions peuvent-être une source de stress pour les bactéries bénéfiques telles que les bactéries lactiques, l'apport de probiotiques résistants aux stress dans l'alimentation des rats modifie considérément la flore intestinale. Contrairement aux deux lots témoins pour lesquelles on observe une forte diminution du nombre de bactéries lactiques en fonction de la progression dans le tube digestif (estomac, intestins grêles et colon), les deux lots (NSC5C et JUM III4) montrent une augmentation ou un maintien de cette population à un nombre stable quelque soit les conditions rencontrées, cette prolifération induit une forte chute du nombre de coliformes, de staphylocoques, de salmonelle et shigelles chez les lots traités notamment chez les animaux recevant la souche Jum<sub>III4</sub> pour laquelle l'antagonisme a été le plus appréciable dans l'ensemble des segments analysés.

L'équilibre entre les bactéries probiotiques et les pathogènes dans le tube digestif n'est pas du seulement à la production de substances inhibitrices par les probiotiques, le phénomène de compétition d'adhésion sur la muqueuse intestinale est également pris en compte, Les deux premiers mécanismes possibles pour l'action des probiotiques concernent leur capacité à adhérer à la muqueuse intestinale. Étant donné que la majorité des infections intestinales sont initiées par l'adhésion des pathogènes aux cellules entérocytaires de l'hôte certaines bifidobactéries et lactobacilles probiotiques auraient la capacité de bloquer physiquement l'accès aux entérocytes (Gill, 2003; Servin et Coconnier, 2003; Servin, 2004; Picard et al., 2005). Ce mécanisme d'action serait similaire à celui exercé par le microbiote intestinal résident face aux infections microbiennes (Liévin-Le Moal et Servin, 2006).

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

# *Conclusion & perspectives*

---

## **Conclusion & perspectives**

Les bactéries lactiques occupent une place très importante dans notre vie douées de plusieurs activités, elles sont considérées comme additifs alimentaires ou elles sont trouvées naturellement dans le produit. Un intérêt industriel tout particulier a été porté pour les bactéries lactiques, avec les nouvelles techniques de conservation des produits alimentaires plus particulièrement les produits de Pêche qui constituent un substrat bactériologique potentiellement dangereux, et aussi de pouvoir bénéficier des produits frais prêt à l'emploi incuit et une longue durée de conservation comparant avec la conservation chimique, elles sont utilisées aussi pour améliorer des caractères organoleptiques de produit (le gout, la saveur, la texture, l'arome de produits par exemple le lait fermenté, le yaourt, le fromage, le pain et les produits carnée...etc).

D'après les résultats obtenus, nous avons pu déduire qu'au sein d'une même espèce, il existe des variations entre les souches autant au niveau de l'activité acidifiante, et antimicrobienne que l'activité lipolytique et texturant. L'ensemble des souches avaient néanmoins de bonnes fonctionnalités technologiques. Toute fois les lactobacilles, qui ont rempli la totalité de ces conditions sont : **NSC<sub>5c</sub>**, **JUM<sub>III4</sub>**.

Nous avons recherché des souches probiotiques parmi les souches du LBMB. La première phase a consisté à soumettre ces bactéries à une série de tests physiologiques et biochimiques; ce qui nous a conduit à sélectionner parmi un ensemble de 12 souches de bactéries lactiques, les deux souches **JUM III4** et **NSC5C** de *Lactobacillus* sp qui présentent les caractéristiques requises d'un probiotique de choix. Les deux bactéries ont de bonnes aptitudes pour résister aux conditions hostiles du tractus digestif (acidité, concentrations élevées en sels biliaires, pouvoir antagoniste vis-à-vis des bactéries d'altérations et la résistance à un panel de 10 antibiotiques).

La recherche de la capacité des bactéries lactiques à absorber le cholestérol a été concluante dans nos conditions d'étude *in vitro*. Ce volet mérite d'être repris après avoir mis au point des conditions de solubilisation de ce lipide.

Ces deux souches (*Lactobacillus* sp **JUM III4** et **NSC<sub>5c</sub>**) ont été retenues pour la réalisation des tests *in vivo* chez le rat Wistar.

L'expérimentation, indique un effet bénéfique de nos souches pour la santé globale des animaux en comparaison au témoin positif et au témoin négatif se caractérisant par:

- Une amélioration de l'état sanitaire des animaux,

## *Conclusion & perspectives*

---

- Une meilleure résistance aux infections, indice de consommation inférieur,
- Un gain de poids réduit par rapport aux témoins recevant un régime hyperlipidique.

L'adjonction de prébiotiques avec le probiotique dans le régime alimentaire des animaux conduit à une stabilité et une amélioration de l'ensemble des paramètres plasmatiques. Les analyses sanguines chez les animaux traités ont révélé une réduction des composants plasmatiques notamment la concentration en cholestérol, en glucose et en triglycérides, traduisant un effet hypocholestérolémiant, hypoglycémiant et hypotriglycéridémiant des probiotiques.

Il sera intéressant de poursuivre cette étude sur des humains (volontaires), et sur une durée prolongée afin de pouvoir mieux préciser les effets des prébiotiques (F.O.S) comme des probiotiques (JUM III4 et NSC5C). Les différentes questions qui restent pendantes concernent l'implantation éventuelle des lactobacilles dans l'intestin, leur action sur les cellules intestinales, leurs interactions positives/négatives sur la flore locale lactique ou non lactique, ...

L'intérêt de l'application de bactéries probiotiques dans le domaine alimentaire a considérablement augmenté ces dernières années et continuera certainement à l'avenir.

L'obtention de souches probiotiques autochtones reste un objectif important sur le plan de la recherche comme sur le plan des applications en santé humaine et animale.

Les résultats obtenus au cours de ce travail permettent d'envisager plusieurs perspectives :

- Tester l'activité lipolytique avec d'autres substrats lipidiques tels que des acides gras à différentes longueur de chaîne (chaîne longue, courtes et des acides gras à chaîne aliphatique moyenne).
- Adapter une autre méthode de dosage permettant d'avoir plus de précision sur le nombre d'acides gras libres par ml d'échantillon.
- Identifier les acides gras libres par chromatographie.
- Purifier les enzymes lipolytiques libères dans le surnageant de culture par différentes méthodes.
- Identifier les enzymes impliquées dans le phénomène de dégradation du cholestérol et des triglycérides.

## Références bibliographiques

---

### A

**Axelsson, L.T., 2004.** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In Lactic Acid Bacteria -Microbiology and functional aspects. Edited by S. Salminen, A.v. Wright et A. Ouwehand. Marcel Dekker, Inc. 1-66.

**Axelsson. L. (1993).** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. Salminen S. and von Wright A., pp: 1-63. Marcel Dekker Inc. New York.

**Accolas J. P., Bloquel R., et Regnier J. (1977).** Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yaourt ; *Lait*. 67 : 1-23.

**Abu-Tarboush H. M., 1996.** Comparision of growth and proteolytic activity of yogourt starters in whole milk from camels and cows. *J. Dairy Sci.*, 79, 366-371.

**Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., Coccagn- nBousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillouard I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet V., Rul F., Tourdot-Maréchal R. et Yvon M., (2008).** Métabolisme et ingénierie métabolique. In :Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*.Paris. 271-447.

**Atlan D. 1996.** Les connaissances acquises chez les lactocoques sont-elles transposables aux autres bactéries lactiques ?. *Lait*. 76 : 129-137.

**ATLAN, D., AUBEL, D. et GILBERT, C. (2000).** La biodiversité des bactéries lactiques et les conséquences sur leurs protéinases. *Science des aliments*, 20, (01), pp: 5-17.

### B

**Blehaut, H., J. Massot, G. W. Elmer, and R. H. Levy. 1989.** Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat. *Biopharmaceutics & drug disposition* 10: 353-364.

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

**Blaut M.,( 2002).**Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European journal of Nutrition*,41,11-16.

**Boudier, F., and Nicolas, A., 1985,** Harzburgite and lherzolite subtypes in ophiolitic and oceanic environments: *Earth and Planetary Science Letters*, v. 76, p. 84-92

**Boudier, F., and Nicolas, A., 1985,** Harzburgite and lherzolite subtypes in ophiolitic and oceanic environments: *Earth and Planetary Science Letters*, v. 76, p. 84-92.

## *Références bibliographiques*

---

- Bartosch, B., Verney, G., Dreux, M., Donot, P., Morice, Y., Penin, F., Pawlotsky, J.-M., Lavillette, D. & Cosset, F.-L. (2005).** An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *J Virol* **79**, 8217–8229.
- Baumgart D. C., & Dignass A. U., 2002.** Intestinal barrier function. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, *5*, 685-94
- Bukowska H., Pieczul-Mroz J., Jastrzebska M., Chelstowski K., & Naruszewicz M., 1998.** Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. *Atherosclerosis*. 137, 437-438. 128
- Bekhouche Farida. (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 d'état en microbiologie et enzymologie option : génie alimentaire. Université De Mentouri Constantine Institut De La Nutrition De L'alimentation Et Des Technologies.
- Bergey's manual. (2009).** Systematic of bacteriology. Second Edition. Volume three the firmicutes. Edition springer
- Ballongue j., Grill J.P. et Baratte-euloge P., (1993).** Action sur la flore intestinale de laits fermentés au *Bifidobacterium*. *Lait* *73* : 249-256.
- Badis A., Laouabdia S.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 "arabie et kabyle". *Sci & Tech*. *23* : 30-37
- Bourgeois C.M., et Larpent J.P., 1996.** Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 432-704..
- Bernet, M F., Brassar, D., Neeser, J. R. and Servina., 1993.** Adhesion of human bifidobactériales strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Applied and Environmental microbiology* *59*, 4121-4128.
- Barefoot S.F. et Klaenhammer, T.R. (1983).** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* *45* : 1808- 1815

## *Références bibliographiques*

---

### C

**Calvez. S ; Belguesmia. Y ; Kergourley. G.(2009).** in bactériocines : de la synthèse aux applications in bacteries lactiques :physiologique , metabolisme,genomique et applications industrielles edition : Economica .2009. p 100-122.

**Coconnier M. H., Bernet M. F., Kerneis S., Chauviere G., Fourniat J., Servin A.L. (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: 299-306.

**Chapman, H.R. and Sharpe, M.E. (1981).** Microbiology of cheese. In: Dairy Microbiology, Robinson R.K., Eds., Vol. 2, The microbiology of milk products, Applied Sciences Publishers LTD, London, pp: 157-243.

**Chabot S., Yu H. L., De Lseleuc L., Cloutier D., Van Calstern M.R., Lessard M., Roy D., 2001.**9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- $\gamma$  in mouse splenocytes. *Lait*, 81, 683-697.

**Carina Audisio M. et Maria C.A. 2010.** Bactiocin-like substance produced by *Lactobacillus salivarius* subsp. *Salivarius* CRL 1384 with anti- *Listeria* and anti- *salmonella* effect. *Res. J. Microbio.* 5 (7): 667-675.

### D

**Duwat P., Sourice S., Cesselin B., Lamberet G., Vido K., Gaudu P., LE Loir Y., Violet F., Loubiere P. et Gruss A., (2001).** Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *Journal of Bacteriology*, 183(15): 4509-4516.

**De Roissart, H. et Luquet, F.M. (1994).** Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol. 1. pp. 1-286

**Desmazeaud M.J., (1992) :** Les bactéries lactiques. INRA station de recherche laitière 78350 Jouy en Joas.

**De Roissard et Luquet 1985.** Les bactéries lactiques édition Lorisa, volume 1, Luquet F. M, lait et produits laitiers, Tec et Doc, édition Lavoisier, Paris, p362-400-402.

**De Roissart., 1986 -** Bacteries Lactique dans le lait et produits laitiers. Ed. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris : 445 p.

## *Références bibliographiques*

---

- Drouault .S et Corthier.G, (2000).**Effets des bactéries lactiques ingérées avec les laits fermentés sur la santé.INRA ,EDP Sciences .Pp 102-104.
- Doumandji A.,Hellal A. ,Saidi N. , 2010.** Purification de la bactériocine à partir de *Lactobacillus acidophilus* 11. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn., 4(2): 25-47
- Desmazeaud, M. (1996).** Les bactéries lactiques dans : L'alimentation humaines : utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures*, **5**, pp: 331-343.
- Ducluzeau R., 1969.** influence de l'espèce zoologique sur la microflore du tractus gastro-intestinal. Rev. Immunoi., 33, 345-384.
- DE Man J.C., Rogosa, M. and Sharpe M.E. (1960):** A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, pp: 130-135.
- Duobos .R., R.W.Schaedler et al., (1963) ;** « Composition, Alteration, and Effects of the Intestinal Flora. »Fed Proc 22 :1322-9.
- De Vries, W., and Stouthamer, A. H. (1967).** Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. *J. Bacteriol.*93, 574–576.
- Dong X.,Xin Y.,Jian W .,Liu X and Ling D,( 2000)**Bifidobacterium thermacidophilium sp nov, isolated from anaerobic digester.Int.J.Syst.Evol.Microbiol.50 :119-125.
- Dunne C .,O'Mahony I . ,Murphy L.,Thornton G.,Morrissey D.,O'Halloran S.,Feeney M.,Flynn S.,Fitzgerald G.,Daly C.,Kiely B.,O'Sullivan G.C.,Shanahan F.,&Collins J.K, 2001.** In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin :correlation with in vivo findings.American Journal of Clinical Nutrition,73,386-392.
- DE ROISSART H. et LUQUET F.M. (1994).** Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol. 1. Pp. 1-286.
- De ROISSARD ET LUQUET. 1985.** Les bactéries lactiques édition Lorisa, volume 1, Luquet F. M, lait et produits laitiers, Tec et Doc, édition Lavoisier, Paris, p362-400-402.

## **E**

- Jaspard, Macherel & Hunault (2012)** "Computational and statistical analyses of amino acid usage and physico-chemical properties of the twelve late embryogenesis abundant protein classes" *PLoS One* 7, e36968
- Ellouze S. et Kamoun M., 1989.** Evolution de la composition du lait de dromadaire en fonction du stade de lactation. *Options Méd.*, 6, 307-323.

## Références bibliographiques

---

### F

**FAO WHO. (2001).** Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, 1-34.

**FAO. 1998.,** le lait produits laitiers dans la nutrition humaine, Collection FAO : Alimentation et nutrition N° 28, ISBN 92-5-20534-6. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et le Réseau d'information sur les opérations après récolte (INPHO).

**Fuller R., (1989):** Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 365-378

**Fleming H.P., Erchells J.L. et Caslilow R.N. 1975.** Microbiol inhibition on isolate *Pediococcus* from cucumber bune. *Appl. Environ. Microbiol.* 30: 1040-1042.

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

### G

**Gevers. D. (2002).** Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.

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

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

**Goldin BR, and SL. Gorbach (1992).** Probiotics for humans. In: Fuller, R. (Ed.), Probiotics, the Scientific Basis. Chapman & Hall, London, pp. 355-376.

**Gournier-château N., Larpent J. P., Castillanos M. I., & Larpent J. L., 1994.** Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Édition Technologie et documentation Lavoisier pp. 1-192, Paris, France.

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

**Gill H.S.,Rutherford K.J.,Prasad J.,&Gopal P.K ., 2000.**Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001),*Lactobacillus acidophilus*(HN017)and *Bifidobacterium lactis*(HN019).*British Journal of Nutrition*,83,167-76.

## *Références bibliographiques*

---

**Gibson GR, Wang X.** Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol* **1994** ; 77 : 412-20.

**Gevers. D. (2002).** Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium

**Godward G., Sultana K., Kailasapathy K., Peiris P., Arumugaswamy R., & Reynolds N., 2000.** The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 55, 441- 445.

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

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

**Gill A.O. et Halley R.A. 2003.** Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *Int. J. Food Microbiol*. 80: 251-259.

**Guiraud J.Y. et Galzy P. (1980).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Edition de l'usine : p 39

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

**Guiraud J.P.,( 2003).** Microbiologie Alimentaire. *Tec &Doc, Dunod*. Paris. 90-292.

## **H**

**Holzappel W.H., Haberer P., SNEL J., Schillinger U. et Huis IN'T VE LD J.H. 1998.** Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol*. 41: 85-101.

**Huang, Z. H., Gu, D., Lange, Y. & Mazzone, T. ( 2003 ).** Expression of scavenger receptor BI facilitates sterol movement between the plasma membrane and the endoplasmic reticulum in macrophages. *Biochemistry* **42**, 3949–3955.

**Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. et Schillinger U. 2001.** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr*. 73 (Suppl): 365-373.

**Hammes W.P. et Hertel.C. 2006.**The Genera *Lactbacillus* and *Carnobacterium*. *Prokaryotes*.4 :320-403

## *Références bibliographiques*

---

**Huges, D.B & Hoover, D.G. (1995).** Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk. *Journal of Dairy Science.* 78 (2): 268-276  
Ishibashi N., & Shimamura S., 1978. Bifidobacteria: research and development in Japon. *Food Technology*, 126-134.

**Hariri A., Ouis N., Sahnouni F., et Bouhadi D., 2009.** Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* P : 37-55.

### **I**

**Isolauri, E., Kaila, M., Arvola, T., Majamaa, H., Rantala, I., Virtanen, E., and Arvilommi, H. 1993.** Diet during rotavirus enteritis affects jejunal permeability to macromolecules in suckling rats. *Pediatr. Res.* 33: 548-553.

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

**Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E. et Karam N.E., 2009.** Lactic acid bacteria from “Sheep’s Dhan”, a traditional butter from sheep’s milk: Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites.* 60 (2): 177-183.

**Idouit. Et Karam N.E., 2008.** Lactic acid bacteria from Jijel’s butter: isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites.* 59(4) : 361-367.

### **J**

**Juillard V., Spinnler M., Desmazeaud M.J. et Bouquien C.Y. 1987.** Phénomène de coopération et d’inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Lait* 67: 149-172.

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

**Joffin.J.N et Leyral.G, (1996) :**Microbiologie technique Center régional de documentation pédagogique d’ Aquitaine bordeaux,p :219-223.

## Références bibliographiques

---

### K

**Klein G., Pack A., Bonaparte C. et Reuter G. 1998.** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 103-125.

**Kamoun M., et Ramet J. P., 1989.** Conservation et transformation du lait de dromadaire. CIHEAM-IAMM. Options méditerranéennes. Séries séminaires n° 6, p. 229-231.

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

**Kaplan H., & Hutkins R., 2000.** Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2682-2684.

**Kailasapathy K., (2002).** Microencapsulation of probiotic bacteria : technology and potential applications. *Curr. Issues. Intest. Microbiol.* 3 : 39-48.

**Kandler O. et Weiss N. 1986.** Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901. In *Bergey's manual of systematic bacteriology* pp. 1209-1234. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe et J. G. Holt. Baltimore: Williams et Wilkins.

**Kailasapathy K., & Chin J., 2000.** Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*, 78, 80-88.

### L

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

**Leveau J.Y., Bouix M., 1993.** Les levures. Dans : Microbiologie industrielle. Les Micro-organismes d'intérêt industriel. Tec & doc Lavoisier Paris. 169-330 p.

**Lister J. 1873.** A further contribution to the natural history of bacteria and the germ theory of fermentative changes. *Quart. J. Microbiol. Sci.* 13:380-408.

**Lilly D.M. et Stillwell R.H. 1965.** Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science.* 147: 747-748.

## Références bibliographiques

---

**LANCEFIELD R.C. 1933.** A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 57: 571–595.

**Li, Z., Shroff, P. K., Venkataraman, R. (2005).** Goodwill Impairment Loss: Causes and Consequences. Cahier de recherche, Université du Minnesota.

**La Pointe, G., 2009.** La production d'exopolysaccharides in : Drider D et Prévost H. Bactéries lactiques Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles 75p. Ed ECONOMICA .Paris.

**Liévin-Le Moal V. and Servin A.L. (2006).** The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: Mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev.* 19: 315-337.

**Litvak D. A, Evers B. M., Hwang K. O., Hellmich M. R., Ko T. C., Townsend C. M., Jr., 1998.** Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21Waf1/Cip1 and p27Kip1. *Surgery*, 124, 161-169. 140

**Lauer E., & Kandler O., 1983.** DNA-DNA homology, murein types and enzyme patterns in the type strains of the genus *Bifidobacterium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 4,42-64.

## M

**Miyake T., Watanabe K., Watanabe T., & Oyaizu H., 1998.** Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rDNA sequences. *Microbiology and Immunology*, 42, 661-667.

**Marteau P., & Vesa T., 1998.** Pharmacokinetics of probiotics and biotherapeutic agents in humans. *Bioscience Microflora*, 17, 1-6.

**Masco L., Ventura M., Zink R., Huys G., & Swings J., 2004 .** Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54,1137-1143.

## *Références bibliographiques*

---

- Marteau P., & Shanahan F., 2003.** Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side effects. *Best Practices & Research Clinical Gastroenterology*, 17, 725-740.141
- Mcdonald L.C., Fleming H.P. et Hassan H.M., 1990.** Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *App. Env. Microbiol.* 56 (7): 2120-2124.
- Metlef S. et Dilmi-Bouras A., 2009.** Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. *Rev. Nat. Tec.* 1 : 33-44.
- Mortensen P. B., & Clausen M. R., 1996.** Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 216, 132-148.
- Meile L., Rohr L. M., Geissmann T. A., Herensperger M., & Teuber M., 2001.** Characterization of the D- xylulose 5 phosphate/ D-fructose 6-phosphate phosphoketolase 75 gene (xpf) from *Bifidobacterium lactis*. *Journal of Bacteriology*, 183, 2929-2936.
- Mattila-Sandholm T., Matto J., & Saarela M., 1999.** Lactic acid bacteria with health claimsinteraction and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal*, 9, 25-35
- Matto J., Malinen E., Suihko M. L., Alander M., Palva A., & Saarela1 M., 2004.** Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 459-470.
- Mitsuoka T., 1969.** Comparative studies on bifidobacteria isolated from the alimentary tract of man and animals including descriptions of *Bifidobacterium thermophilum* nov. spec. And *Bifidobacterium pseudolongum* nov. spec. *Zentralblatt fur Bakteriologie*, 210, 52-64.
- Mercenier A., Pavan S., & Pot B., 2002.** Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 8, 99-110.
- Matsumoto M., & Benno Y., 2004.** Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM512 yogurt reduces gut mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. *Mutation Research*, 568, 147-153.
- Matsumoto M., Ohishi H, and Hand Benno Y, (2004).** H<sup>+</sup>-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *Int. J. Food. Microbiol.* 93: 109-113

## *Références bibliographiques*

---

**Makhloufi .K. M. (2012)** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. Spécialité : microbiologie, biochimie (école doctorale iviv)

**Meyers S.A., Cuppett S.L. and Hutkins R.W. (1996).** Lipase production by lactic acid bacteria and activity on butter oil. *Food Microbiol.* 13 : 383–389.

**Mack, D. R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., and Hollingsworth, M. A. (1999).** Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am.J Physiol* 276, G941-G950.

**Matteuzzi D., Crociani F., Zani G. & Trovatelli L. D., 1971.** *Bifidobacterium suis* n. sp.: a new species of the genus *Bifidobacterium* isolated from pig feces. *Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie*, 11, 387-395.

**Mombelli B. and Gismondo M. (2000)** The use of probiotics in medical practice. *International Journal of Antimicrobial Agents* 16(4):531-536

**Mozzi et Valdez G F., 2010** - Identification of exopolysaccharidesproducing lactic acid bacteria. *Methods in biotechnology. Food. Microbiol. Protocols. Humana. Press. Totowa.* Vol: 1: pp 183-190.

### N

**Novel, G. (1993).** Les bactéries lactiques. Dans : *Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel.* Leveau, J.Y, Bouix, M., Tech. et Doc. Lavoisier Paris, pp: 170-374.

**Nakajima, Y., Noda, Y. and Burke, R. D. (1993).** The structure and development of the apical ganglion in the sea urchin pluteus larvae of *Strongylocentrotus droebachiensis* and *Mespilia globules*. *Dev. Growth Differ.* **35**,531 -538.

### O

**Orla-Jensen S. 1919.** The lactic acid bacteria. A.F. Host and Son, Koenighichen H of Boghamdel, Copenhagen

**Ouwehand A. C., Kirjavainen P. V., Gronlund M. M., Isolauri S. J., & Salminen S., 1999.** Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal*, 9, 623-630.

## Références bibliographiques

---

### P

**Penaud S. (2006).** Analyse de la séquence génomique et étude de l'adaptation à l'acidité de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATTC11842. Thèse de doctorat d'état. Institut National Agronomique De-Paris-Grignon ,France. pp267.

**Parker R. B., 1974.** Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*, 29, 4-8.

**Plummer S., Weaver M. A., Harris J. C., Dee P., & Hunter J., 2004.** Clostridium difficile pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of C. difficile diarrhoea. *International Microbiology*, 7, 59-62.

**Playne M. and Salminen S. (2002)** Health benefits of probiotics : human studies and clinical trials. *Nutrafoods* 1(1):5-11.

**Prevost .H, DRIDER J. (2009).** Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles. Ed . Economica., paris. P 99 - 120.

### Q

**Quiberoni A., Rezaiki L., EL Karoui M., Biswas I., Tailliez P., Gruss A. (2001).** Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism , *Lactococcus lactis*. *Res Microbiol*. Vol. 152. p 131-139.

### R

**Raynaud. S. (2006).** Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse de Doctorat, Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries Toulouse N° d'ordre : 826 pages : 309

**Ried et al (2003).** Potential uses of probiotics in clinical practice. In Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat 2012.

## *Références bibliographiques*

---

**Rosenfeldt V., Benfeldt E., Valerius N. H., Paerregaard A., & Michaelsen K. F., 2004.** Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *Journal of Pediatrics*, 145, 612-616.

**Rosenfeldt V., Michaelsen K. F., Jakobsen M., Larsen C.N., Moller P. L., Pedersen P., Tvede M., Weyrehter H., Valerius N. H., Paerregaard A., 2002.** Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in young children hospitalized with acute diarrhea. *Pediatrics and Infectious Diseases Journal*, 21, 411-416.

### S

**Servin AL, and Coconnier MH. 2003.** Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 17: 741-754.

**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.

**Siboukeur O .K., 2007.** Etude du lait camelin collecté localement: caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques; aptitudes à la coagulation. Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques université INA ELHarrach-Alger.

**Shah D.S. et Russell R.R. (2004).** A novel Glucan-Binding Protein with lipase activity from the oral pathogen *Streptococcus mutans*. *Microbiology*. 150 : 1947-56.

**Salminen S., Wright A V., Ouwehand A., 2004 -** Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel. Dekker. Inc., U.S.A.

**Saidi.N.(2007).**La microflore lactique du lait cru de chèvre local :étude microbiologique, biochimique et génétique des bactéries lactiques d'intérêt biopréservateur. Thèse doctorat Université d'Oran.

**Stiles, M. and Holzapfel, W. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, **36**, pp: 1-29.

**Schleifer .K.Het Ludwig.W.( 1995 ).**Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera .*System Appl Microbiol* 18,461-467.

**Salminen S., Isolauri E and Salminen E ., (1996).** Clinical uses of probiotics for stabilization the gut mucosal barrier: Successful strains and future challenges. *Antonie van Leewenhoek*, 70: 347-358.

## *Références bibliographiques*

---

**Salminen, S.; Laine, M.; von Wright, A.; VuopioVarkila, J.; Korhonen, T. and Mattila-Sandholm, T. (1996)**, Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: a Nordic and European approach. *Bioscience Microflora*, 15, 61-67.

**Salminen S., von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., de Vos WM., Fonden R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S.E., Mattila-Sandholm T. (1998)**: Demonstration of safety of probiotics - a review. *Int J Food Microbiol.* 44(1-2):93-106.

**Stanton C., Gardiner G., Meehan H., Collins K., Fitzgerald G., Lynch P. B., & Ross R. P., 2001.** Market potential for probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 476-483.

**Stackebrandt E ,and Teuber,M . (1988).** Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, pp: 317-324

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

**Smith,1965** « observation on the Flora of the Alimentary Tract of Animals and Factors Affecting its Composition ». *J Pathol Bacterio* 89 :95-122.

**Scardovi V., 1984.** Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen, 1924, 472, p. 1418-1434. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Krieg N.R. and Holt J.G. (eds), , Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, Md, USA.

**Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Matto J., & Mattila-Sandholm T., 2000.** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, 197-215.

**Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni J.E., Prevost H. et Kihal M. 2002.** Caractérisation des Bactéries Lactiques Isolées du Lait Cru de Chèvre des Régions Arides d'Algérie. *J Alg des Rég Ar* .1:1112-3273.

**Saidi Noureddine., 1997.** Caractérisation des Bactéries Lactiques Isolées du Lait Cru de Chèvre des Régions Arides d'Algérie. Thèse de Magister. Université d'Oran. .

**Scardovi V., 1984.** Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen, 1924, 472, p. 1418-1434. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Krieg N.R. and Holt J.G. (eds), , Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, Md, USA.

**Schrezenmeir J., & de Vrese M., 2001.** Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 361- 364.

## *Références bibliographiques*

---

**Savadogo, A. Traore, A.S.(2011).**La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 5(5): 2057-2075, October 2011 .ISSN 1991-8631 p 2063-2064

**Saxelin M., Pessi T., & Salminen S., 1995.** Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. *International Journal of Food Microbiology*, 25, 199-203.

**Scardovi V., & Trovati L. D., 1974.** *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka) comb. nov. and the 'minimum' and 'subtile' groups of new bifidobacteria found in sewage. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 24, 21-28.

**Simpson P. J., Stanton C., Fitzgerald G. F. & Ross R. P., 2003.** Genomic diversity and relatedness of bifidobacteria isolated from a porcine cecum. *Journal of Bacteriology*, 185,2571-2581.

**Sakili et Issoual., 2003** Les bactéries lactiques dans l'élaboration du Smen Marocain.

**Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV (2000)** Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 106:1489–1499.

## T

**Tailliez.P (2001).** les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait* 81 1–11 1. INRA, EDP Sciences. France.

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

**Tannock, 1999a,b;** Identification of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* *Current Issues Molec.Biol.*1(1) :53-64

**Tissier M. H., 1900.** Recherche sur la flore intestinale des nourrissons (état normale et pathologique). Thèse. Paris.

## *Références bibliographiques*

---

**Tanaka-Takiguchi, Y., Kinoshita, M. and Takiguchi, K.(2009).** Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. *Curr. Biol.* **19**, 140-145.

**Tadesse G., Ephraim E. et Ashenafi M., (2004).**Assessment of the antimicrobiol activity of lactic acid bacteria isolated from borde of Shamita, traditional Ethiopian fermented beverage, on some food borne pathogens and effect of growth medium in the inhibitory activity .*Food Safety*, 5: 13-20.

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

**Thompson J., Gentry-Weeks C.R. (1994)** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Dans : *Bactéries lactiques*, Vol. I, p 239-290 (Editeurs : De Roissart H., Luquet

**Tursi A., Brandimarte G., Giorgetti G. M., & Modeo M. E., 2004.** Effect of *Lactobacillus casei* supplementation on the effectiveness and tolerability of a new second-line 10-day quadruple therapy after failure of a first attempt to cure *Helicobacter pylori* infection. *Medical Science Monitor*, 10, 662-666.

**Tannock G. W., Munro K., Bibiloni R., Simon M. A., Hargreaves P., Gopal P., Harmsen H., & Welling G., 2004.** Impact of consumption of oligosaccharide-containing biscuits on the fecal microbiota of humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2129-2136.

## V

**Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., DeVos, P., Kersters, K. and Swings, J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**: 407.

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

**Ventura M., Van-Sendiren D., Fitzgerald GF, and Zink R. (2004a).** Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antony Van Leevenhook*. 86: 205-223.

## Références bibliographiques

---

### W

**Wang J. L., Kang L., & Jia H. L., 2004.** Generation and characterization of monoclonal antibodies against Botulinum neurotoxin type A (BoNT/A). *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue* 80 Za Zhi. 20, 83-85.

**Wang M. F., Lin H. C., Wang Y. Y., & Hsu C. H., 2004.** Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatric Allergy and Immunology*, 15, 152-158.154

### Y

**Yildirim Z., & Johnson M. G., 1998.** Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Food Protection*, 61, 47-51.

### Z

**Zarate S., & Lopez-Leiva M. H., 1990.** Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: a literature review. *Journal of Food Protection*, 53, 262-268.

**Zacconi, C., Svolari, Fraioli, G.D., Sarra, P.G., 1999.** Colonisation of chicken intestinal tract by lactobacillus salivarius A23 strain. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia.*, 49: 103-115.

#### Sites électroniques :

<http://www.oocities.com/cheezyfr/photos/Leuconostoc.jpg>

[http://www.institut-rosell lallemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus-R52\\_big.jpg](http://www.institut-rosell lallemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus-R52_big.jpg)

# Annexes

---

## Annexes 01 : listes des milieux de culture.

### 1. Composition du milieu MRS(De Man; Rogosa et Sharpe, 1960) :

Pour un litre de milieu

- Peptone.....10,0g
- Extrait de viande..... 8,0 g
- Extrait de levure.....4,0 g
- Glucose.....20,0 g
- Acétate de sodium trihydraté.....5,0 g
- Citrate d'ammonium .....2,0 g
- Tween 80.....1,0 ml
- Hydrogénophosphate de potassium( $K_2HPO_4$ ).....2,0 g
- Sulfate de magnésium ( $MgSO_4$ ).....0,2 g
- Sulfate de manganèse ( $MnSO_4$ ).....0,05 g
- Agar-Agar (géluse)..... 18 g
- Eau distillée .....1000 ml
- pH = 6,2

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

### 2. MRS tamponnée à pH 6,1 :

- Milieu MRS (Man, Rogosa et Sharpe, 1960) + Tampon phosphate
  - Phosphate monopotassique 54 g/l
  - Phosphate disodique 17,8 g/l
- Autoclaver 20min à 120°C

### 3. Composition milieu LB :

Pour un litre de milieu

- Peptone.....10 g
- Extrait de levures.....5 g
- NaCl.....10 g

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

-autoclavage à 120°C / 20 min.

## *Annexes*

---

### **4. Milieu gélose au sang (Colombia) :**

Pour 1 litre de milieu

- Peptone.....23g
- Amidon .....1g
- NaCl.....5g
- Agar.....10g
- Sang humain. ....50mL
- pH final = 7,3.

L'ajout du sang après autoclavage devant un bec benzène.

### **5. Milieu Chapman**

Pour un litre de milieu

- Peptone..... 10g
- Extrait de viande .....1g
- Chlorure de sodium .....75g
- Mannitol .....10g.
- Rouge de phénol..... 0.025g
- Agar .....15g
- pH 7.4

Autoclave 120° C, 20min

### **6. Gélose nutritif (GN)**

Pour un litre de milieu

- Extrait de viande : .....1,0g/L
- Extrait de levure : .....2,5g/L
- Peptone .....5,0g/L
- Chlorure de sodium ..... 5,0 g/L
- Agar .....15,0 g/L
- pH : 7,0

Préparation 28 g par litre (stérilisation à l'autoclave).

## *Annexes*

---

### 7. Milieu Salmonella-Shigella (Gélose SS) :

Pour un litre de milieu

- peptone:.....5,0 g
- extrait de viande:.....5,0 g
- lactose:.....10,0 g
- citrate de sodium:.....10,0 g
- citrate de fer III:.....1,0 g
- sels biliaires:.....8,5 g
- vert brillant:.....3,3 mg
- rouge neutre:.....25 mg
- thiosulfate de sodium:.....8,5 g
- Agar:.....12,0 g
- pH = 7,3 .

**Lac -** : colonies incolores / **Lac +** : colonies rouges

Centre noir : **H<sub>2</sub>S +** /Pas de centre noir : **H<sub>2</sub>S -**

### 8. Milieu VRBG :

Pour un litre de milieu

- Extrait de levure .....3,0g
- Peptone .....7,0g
- Chlorure de sodium .....5,0g
- Sels biliaires .....1,5g
- Glucose .....10,0g
- Rouge neutre .....0,03g
- Cristal violet..... 0,002g
- Agar..... 12,0g
- pH 7,4 ± 0,2

## *Annexes*

---

### 9. Gélose au Désoxycholate :

Pour un litre de milieu

- Peptone..... 10,0 g
- Citrate de sodium .....1,0 g
- Lactose..... 10,0 g
- Rouge neutre .....0,03 g
- Désoxycholate de sodium .....1,0 g
- Chlorure de sodium..... 5,0 g
- Hydrogénophosphate de potassium .....2,0 g
- Agar .....13,0 g
- pH = 7,3

### 10. La préparation des tampons:

- **Tampon K/Na<sub>2</sub> à 0,2M, pH7, pour 600ml de tampon :**

- ✓ La solution **A** : la solution de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 0,2 M. Dissoudre 5,44g (136,96g/mole) dans 200ml d'eau distillée.
- ✓ La solution **B**: La solution de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 0,2 M. Dissoudre 11,35g (141,96g/mole), ou 28,65g (358,14g/mole) dans 400ml d'eau distillée.

Mélanger les deux solutions A et B en vérifiant le pH du mélange.

- **Tampon Na<sub>2</sub>/Na à 0,1M, pH7 :**

- ✓ Solution (a): 27,8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans 100ml d'eau distillée
- ✓ Solution (b): 53,65g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O dans 100ml d'eau distillée

Tampon 0,1 M: 39ml (a) + 61 ml (b) + eau distillée

Stérilisation à 110° pendant 20mn

### 11. Sels biliaires (Fernandez *et al.*,2002) :

- MRS 1000 ml
- Sels biliaires 50g
- pH 6,8

Bain marie 100°C PENDANT 10 minutes

# Annexes

## 12. Eau physiologique

- Chlorure de sodium 8,5 g
- Peptone 0,5 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH =7

Autoclavage :120°C pendant 20 min.

Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20mn sauf ceux contenant le lait (110° C pendant 10 min).

## Annexe 02 : Evolution de l'acidité titrable.

### 1) Préparation du NaOH 0,111 M :

- NaOH.....4.44 g.
- Eau distillé.....1 L.

### 2) Préparation de la Phénolphtaléine :

- Dissoudre 1 g de phénolphtaléine dans 100 ml d'alcool éthylique à 95°.
- A employer à la dose de 2 à 3 gouttes en l'ajoutant à la solution acide que l'on désire titrer, la solution alcaline connue étant dans la burette.

Les valeurs portées sur le **tableau** représentent l'acide lactique produit par les souches lactiques pendant 24h.

**Tableau** : l'acidité titrable

Souche	t=0h	t=2h	t=4h	t=6h	t=8h	t=17h	t=19h	t=21h
Jum <sub>III4</sub>	13	10	12	12	10	17	16	15
NSC <sub>5C</sub>	22	20	20	21	23	46	34	33

## Annexes

### Annexe 03: Aptitude des probiotiques sur les rats Wistar

**Tableau 1:** Consommation alimentaire hebdomadaire.

	<b>T-</b>	<b>T+L</b>	<b>NSC<sub>5C</sub> +L+P</b>	<b>Jum<sub>III4</sub>+L+P</b>
<b>S1</b>	17	16	14,5	14
<b>S2</b>	17,2	16,5	15,2	14,6
<b>S3</b>	17,5	17	15,6	14,8
<b>S4</b>	18,65	17,58	16,9	15
<b>S5</b>	18,7	18	17,5	15,6
<b>S6</b>	19,8	18,46	17,9	16,2
<b>S7</b>	19,9	18,75	18	17,4
<b>S8</b>	20	19	18	17,6

**Tableau 2 :** Evolution du poids vif moyen.

	<b>T-</b>	<b>T+L</b>	<b>NSC<sub>5C</sub> +L+P</b>	<b>Jum<sub>III4</sub>+L+P</b>
<b>S1</b>	234,1	201,2	212,1	237,3
<b>S2</b>	236,3	207	217,4	240,8
<b>S3</b>	239,3	213,4	222,4	246,2
<b>S4</b>	242,6	221,6	226,8	251,5
<b>S5</b>	246	229,6	230,8	255
<b>S6</b>	249	236	233,75	257,6
<b>S7</b>	251,3	241	236,75	259,8
<b>S8</b>	253	245	238,5	261,8

**Tableau 3 :** Gain de poids moyen

	<b>T-</b>	<b>T+L</b>	<b>NSC<sub>5C</sub> +L+P</b>	<b>Jum<sub>III4</sub>+L+P</b>
<b>S2</b>	2,2	5,8	5,3	3,5
<b>S3</b>	3	6,4	5	5,4
<b>S4</b>	3,3	8,2	4,4	5,3
<b>S5</b>	3,4	8	4	3,5
<b>S6</b>	3	6,4	2,95	2,6
<b>S7</b>	2,3	5	2	2,2
<b>S8</b>	1,7	4	1,75	2

**Tableau4 :** indices de consommation

	<b>T-</b>	<b>T+L</b>	<b>NSC<sub>5C</sub> +L+P</b>	<b>Jum<sub>III4</sub>+L+P</b>
<b>S2</b>	7,81	2,84	2,86	4,17
<b>S3</b>	5,83	2,65	3,12	2,75
<b>S4</b>	5,65	2,14	3,84	2,83
<b>S5</b>	5,5	2,25	4,37	4,45
<b>S6</b>	6,6	2,88	6,06	6,23
<b>S7</b>	8,65	3,75	9	7,9
<b>S8</b>	11,76	4,75	10,28	8,8

## Annexes

---

**Tableau 5 :** Glycémie.

	<b>T-</b>	<b>T+L</b>	<b>NSC<sub>5C</sub> +L+P</b>	<b>Jum<sub>III4</sub>+L+P</b>
<b>S1</b>	0,855	0,685	0,835	0,97
<b>S3</b>	0,761	0,797	0,827	0,893
<b>S5</b>	0,676	0,832	0,9	0,993
<b>S7</b>	0,719	0,998	0,734	0,605
<b>S9</b>	0,631	1,223	0,685	0,553

**Tableau 6:** Cholestérolémie.

	<b>T-</b>	<b>T+L</b>	<b>NSC<sub>5C</sub> +L+P</b>	<b>Jum<sub>III4</sub>+L+P</b>
<b>S1</b>	0,845	0,695	0,97	0,815
<b>S3</b>	0,957	0,876	0,931	0,843
<b>S5</b>	0,733	0,938	0,883	0,796
<b>S7</b>	0,657	1,041	0,757	0,69
<b>S9</b>	0,661	1,131	0,71	0,622

**Tableau 6:** Triglycéridémie.

	<b>T</b>	<b>T+L</b>	<b>NSC<sub>5C</sub> +L+P</b>	<b>Jum<sub>III4</sub>+L+P</b>
<b>S1</b>	0,7	0,85	0,71	0,99
<b>S3</b>	0,768	0,884	0,714	1,012
<b>S5</b>	0,679	1,054	0,627	0,916
<b>S7</b>	0,568	1,094	0,527	0,742
<b>S9</b>	0,57	1,56	0,445	0,611

# Annexes

---

## Annexe 04: les colorations de Gram des organes des 4 lots(Estomac, intestin et colon)

### 1. Coloration de gram :

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne .
- Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute .
- Ajouter du lugol pendant 30 secondes .
- Décolorer avec de l'alcool 95°.
- puis rincer à l'eau .
- Faire une contre coloration en utilisant la Fuchsine et laisser agir 20 à 30 secondes .
- Laver à l'eau .
- Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

### Coloration de gram des 4 Lots (Colon) :

**Lot T:** cocci gram positive.

**Lot T+L :** cocci gram positive.

**Lot NSC<sub>5C</sub> +L+P:** cocci gram positive..

**Lot Jum<sub>III4</sub>+L+P :** bacilles gram positive.

**Lot Jum<sub>III4</sub> +L+P :** cocci gram positive.

### Coloration de gram des 4 LOTS (Estomac ) :

**Lot T :** bacilles en chainettes gram positive .

**Lot T+L :** *lactobacillus*,sp .

**Lot T+L :** cocci gram positive .

**Lot NSC<sub>5C</sub> +L+P:** bacilles en chainettes gram positive .

**Lot NSC<sub>5C</sub> +L+P:** cocci en chainettes gram positive .

**Lot Jum<sub>III4</sub> +L+P Lot 4 :** bacilles en chainettes gram positive .

**Lot Jum<sub>III4</sub>+L+P Lot 4 :** cocci gram positive.

## *Annexes*

---

### **Coloration de gram des 4 LOTS (Intestin ) :**

**Lot T:** aspect de levures ou pseudo filamentation et rares cocci gram positive .

**Lot T+L :** cocci gram positive .

**Lot NSC<sub>5C</sub> +L+P :** cocci gram positive .

**Lot Jum<sub>III4</sub>+L+P :** bacilles en chainettes gram positive .

### **Annexe 05 :** Coloration de Gram des selles des 4 lots

### **Coloration de gram des 4 lots (selles) :**

**Lot T :** Coccobacille en chainette G+

**Lot T+L:** Cocci G+

**Lot NSC<sub>5C</sub> +L+P:** Cocci en chainettes G+

**Lot Jum<sub>III4</sub>+L+P:** Cocci en chainettes G+

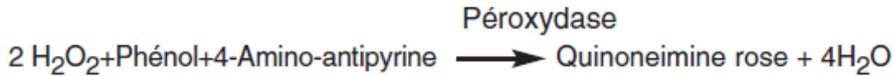
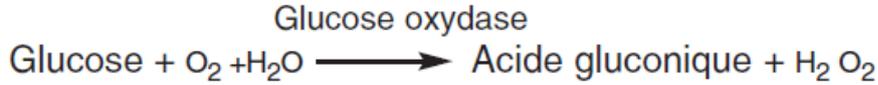
# Annexes

## Annexe 6 : Techniques de dosage

### 1. Dosage du glucose

- Principe**

Détermination enzymatique du glucose selon les réactions suivantes :



La solution de travail est obtenue en mélangeant le réactif 1 avec le réactif 2 (**Tableau 1**)

**Tableau 1:** Composition des réactifs pour la glycémie.

<b>Réactif 1</b>	Tampon Tris pH= 7	100 mmol/l
Solution tampon	Phénol	0,3 mmol/l
<b>Réactif 2</b>	Glucose oxydase	10 000 U/l
Enzymes	Péroxydase	1000 U/l
	Amino 4 -Antipyrine	2,6 mmol/l
<b>Réactif 3</b>	Glucose	100 mg/dl
Standard		1g/l
		5,56 mmol/l

Les différents tubes du dosage (**Tableau 2**) sont bien mélangés puis placés à 37°C dans un bain marie pendant 10mn. L'absorbance est mesurée à 500nm ; la coloration finale est stable pendant 2h environ. La concentration est obtenue soit automatiquement ou par l'établissement d'une courbe étalon.

**Tableau 2:** Composition des mélanges pour la glycémie.

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	--	10 µl	--
Echantillon	--	--	10 µl
Réactif de travail	1 ml	1 ml	1 ml
Mélanger, lire les DO après une incubation de 10 minutes à 37 °C ou 30 mn à 20-25 °C. La coloration est stable 30 minutes.			

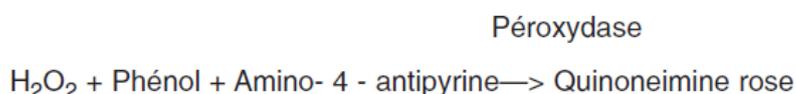
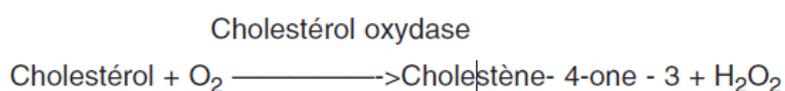
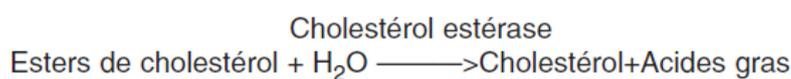
## Annexes

### 2. Dosage du cholestérol

- Principe**

Le cholestérol est mesuré après hydrolyse enzymatique puis oxydation. L'indicateur quinoneimine est formé à partir du peroxyde d'hydrogène et du amino 4 antipyrine en présence de phénol et de peroxydase.

Détermination enzymatique selon les réactions suivantes :



La quantité de quinoneimine formée est proportionnelle à la concentration de cholestérol.

La solution de travail est obtenue en mélangeant le réactif 1 avec le réactif 2 (**Tableau 3**).

**Tableau 3** : Réactifs pour la cholestérolémie.

<b>Réactif 1</b>	Pipes pH 6.9	90 mmol/l
Solution tampon	Phenol	26 mmol/l
<b>Réactif 2</b>	Cholesterol oxydase	300 U/l
	Peroxydase	1250 U/l
	Cholesterol esterase	300 U/l
	Amino-4-antipyrine	0.4 mmol/l
<b>Réactif 3</b>		200 mg/dl
Standard		2 g/l
		5.17 mmol/l

Pour le dosage, 1ml de solution de travail est additionné de 10µl de chaque surnageant puis le mélange est incubé dans un bain marie pendant 10min. Parallèlement un blanc et un étalon sont réalisés de la même manière en utilisant de l'eau distillée ou du réactif R3 (cholestérol) respectivement (**Tableau 4**).

**Tableau 4**: Composition des mélanges pour la cholestérolémie.

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	--	10 µl	--
Echantillon	--	--	10 µl
Réactif de travail	1 ml	1 ml	1 ml
Mélanger, lire les densités optiques après une incubation de 5 min. à 37° C. La coloration est stable 30 minutes.			

## Annexes

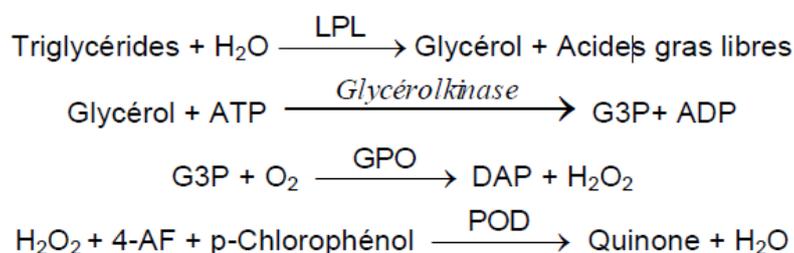
Les mesures spectrophotométriques sont faites à une longueur d'onde de 500nm. La coloration est stable plus d'une heure.

### 3. Dosage des triglycérides

#### ✓ Principe de la méthode :

Les triglycérides incubés avec de la lipoprotéinlipase (LPL) libèrent du glycérol et des acides gras libres. Le glycérol est phosphorylé par du glycérophosphate déshydrogénase (GPO) et de l'ATP en présence de glycérol kinase (GK) pour produire du glycérol-3-phosphate (G3P) et de l'adénosine-5-di phosphate (ADP). Le G3P est alors transformé en dihydroxiacétone phosphate (DAP) et en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par le GPO.

Au final, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) réagit avec du 4-aminophénazone (4- AF) et du p-chlorophénol, réaction catalysée par la peroxydase (POD), ce qui donne une couleur rouge:



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de triglycérides présents dans l'échantillon testé

Les réactifs utilisés sont portés sur le tableau 5.

**Tableau 5:** Réactifs pour la triglycéridémie

<b>R 1</b>	GOOD pH 7,5	50 mmol/L
Tampon	p-Chlorophénol	2 mmol/L
<b>R 2</b>	Lipoprotéine lipase (LPL)	150000 U/L
Enzymes	Glycérol kinase (GK)	500 U/L
	Glycérol-3-oxydase (GPO)	2500 U/L
	Peroxydase(POD)	440 U/L
	4 – Aminophénazone (4-AF)	0,1 mmol/L
	ATP	0,1 mmol/L
<b>TRIGLYCERIDES CAL</b>	Patron primaire de détection de triglycérides	200 mg/dL

La solution de travail est obtenue en mélangeant les réactifs 1 ou 2. L'échantillon et l'étalon sont mis en présence de la solution de travail suivant les volumes indiqués dans le tableau 6. Bien agiter et incuber les tubes pendant 1mn à la température de 16 à 25°C. Faire la lecture de la DO<sub>546nm</sub> de l'étalon et de l'échantillon en comparaison avec le blanc ; la coloration au moins 30minutes.

## *Annexes*

---

**Tableau 6:** Composition des mélanges pour la triglycéridémie.

	Blanc	Modèle	Echantillon
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Modèle <sup>(Remarque 1, 2)</sup> (µL)	--	10	--
Echantillon (µL)	--	--	10

- Mélanger et incuber 5 minutes a 37°C ou 10 min. à température ambiante.
- Lire l'absorbation (A) du patron et l'échantillon, en comparaison avec le blanc du réactif.  
La couleur reste stable pendant au moins 30 minutes.



## Cholesterol

Enzymatic-colorimetric test (CHOD-POD).

Code HB006 2 x 125 ml

**CYPRESS  
DIAGNOSTICS**

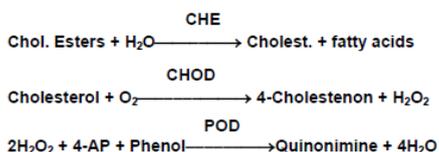
Store at 2-8°C. Standard Included.

### Clinical significance

Cholesterol is fatty substance found in blood, bile and brain tissue; it serves as a precursor to bile acids, steroids and vitamin D. The determination of serum cholesterol is a major aid in the diagnosis and classification of lipemias. Other conditions such as hepatic thyroid diseases influence cholesterol levels.

### Principle

Cholesterol and its esters are released from lipoproteins by detergents. Cholesterol esterase hydrolyses the esters and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is formed in the subsequent enzymatic oxidation of cholesterol by cholesterol-oxidase according to the following equation. In the last reaction a red dye quinonimine dye is formed of which the intensity is proportional to the cholesterol concentration.



### Reagents

Reagent 1	Pipes pH 6,9 .....90 mmol/l.
Buffer	Phenol .....26 mmol/l.
Reagent 2	Peroxidase .....1250 U/l.
Enzymes	Cholesterol esterase .....300 U/l.
	Cholesterol oxidase .....300 U/l.
	4-Aminophenazone.....0,4 mmol/l
Standard	Cholesterol aqueous.....200 mg/dl

For *in vitro* diagnostic use only.

### Preparation

Dissolve the contents of one bottle R.2 Enzymes into the contents of one bottle R.1 Buffer. This working reagent is stable 4 months at 2-8°C. or 40 days at room temperature when stored in a dark bottle.

### Storage and stability

All the components of the kit are stable at 2-8°C up to the date of expiration as specified, when stored tightly closed, protected from light and contaminations prevented during their use. Handle standard very carefully to prevent contamination. The reagent should be a clear solution. If turbidity or precipitation has occurred or if blank absorbance at 505 nm  $\geq$  0,1, the reagent should be discarded.

### Additional equipment

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 505 nm
- Matched cuvettes 1,0 cm light path
- General laboratory equipment

### Samples

Serum or plasma: Stability of the sample for 7 days at 2-8°C or freezing at -20°C will keep samples stable for a few months.

### Procedure

1. Wavelength 505 nm (500-550); Temperature 37°C/15-25°C; Cuvette 1 cm light path.
2. Adjust the instrument to zero with distilled water.
3. Pipette into a cuvette:

	Blank	Standard	Sample
Standard <sup>note1</sup>	---	10 µl	---
Sample	---	---	10 µl
Working reagent <sup>note2</sup>	1 ml	1 ml	1 ml

Mix, incubate 5 min at 37°C or 10 min at 15-25°C. Measure the absorbance (Abs) of standard and sample against blank. The colour is stable for at least 60 min.

### Calculation

Cholesterol conc. (mg/dl)  
= (Abs Sample / Abs Stand.) x 200 (stand. conc.)

Conversion factor: mg/dl x 0,0258 = mmol/l.

### Quality control

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures. If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and calibrator for problems. Each laboratory should establish its own QC scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

Normal and pathological human (HBC01, HBC02) or bovine (HBC03, HBC04) sera are available.

### Reference values

Risk evaluation:  
Less than 200 mg/dl Normal  
200-239 mg/dl Borderline  
240 mg/dl and above High

These values are for orientation purpose. Each laboratory should establish its own reference range.

### Performance characteristics

**Measuring range:** from 0,6 mg/dl (detection limit) to 600 mg/dl (linearity limit). If the obtained results are greater than 600 mg/dl, dilute the sample 1:2 with saline solution, repeat the determination, and multiply the result by factor 2.

#### Precision:

Mean (mg/dl)	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
	90,1	305	90,4	301
SD	0,64	3,30	1,12	2,30
CV (%)	0,71	1,08	1,24	0,76

**Sensitivity:** 1 mg/dl = 0,002 A

**Accuracy:** Results obtained using CYPRESS DIAGNOSTICS reagents did not show systematic differences when compared with other commercial reagents.

### Interferences

Hemoglobin up to 5 g/l and bilirubin up to 10 mg/dl do not interfere. A list of drugs and other interfering substances with cholesterol determination has been reported by Young et al.

### Notes

1. Calibration with the aqueous standard may cause a systematic error in automatic procedures. In this case, it is recommended to use a serum calibrator (HBC03).
2. LCF (Lipid clearing factor) is integrated in the reagent.

### Bibliography

Naito H.K.C. Cholesterol. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto, Princeton 1984; 1194-1206 and 437.  
Meitattini F. et al. The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone Chromogenic System. Clin Chem 1978; 24(12): 2161-2165.  
Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4<sup>th</sup> ed AACC Press 1995  
Young DS. Effects of diseases on Clinical Lab. Tests, 4<sup>th</sup> ed AACC 2001  
Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999  
Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory tests, 3rd ed AACC 1995.

Langdorp, 11. 2007.