

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

PHA 06 / 10

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Jijel



جامعة جيجل

Faculté des Sciences Exactes et Sciences  
de la Nature et de La vie

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

Département de Biologie Moléculaire et  
Cellulaire

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire De Fin D'études Pour L'obtention Du Diplôme  
Master 2 en Biologie

Option : Pharmacologie Expérimentale

Intitulé



5/2

**PHARMACOCINETIQUE DES PROBIOTIQUES  
D'ORIGINE HUMAINE ET EFFET  
HYPOLIPEMIANT**

Membres de Jury :

Président : Dr. SIFOUR Mohamed  
Examineurs : Mr. BOUHOUS Mostefa

Présenté par :  
Melle. BOULKHEMAIR Mouna  
Melle . ZADI Amel

Encadreur : Dr. IDOUI Tayeb  
Invité : Dr. SDIRA Ali

Année Universitaire : 2009- 2010

## **Remerciements**

*Qu'il nous soit d'abord permis de remercier et d'exprimer notre gratitude envers le bon Dieu, qui nous a donné la patience et le courage pour que nous puissions continuer ce travail.*

*Pour ses précieux conseils et suggestions, nous voudrions exprimer notre gratitude à notre encadreur; **Dr. Idoui Tayeb**, pour son aide permanente et son encouragement qu'ils nous'ont prodigués, pour ses compétences et son esprit critique qui ont été pour nous un soutien pour la réalisation de ce travail.*

*Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements à :*

- Monsieur **Sifour Mohamed**, Professeur à l'université de Jijel, pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury.*
- Monsieur **Bouhous Mostafa**, Professeur à l'université de Jijel pour avoir accepté de participer à notre jury de soutenance.*
- Monsieur **Sdira Ali**, Docteur en Pédiatrie à l'hôpital de Jijel pour avoir accepté notre invitation pour assister notre soutenance.*

*Mes remerciements vont également à **M. Boujarda J.** et **M<sup>e</sup>. Bahri F.** qui nous ont vraiment aidé et soutenu tout au long de ce travail.*

*Que tous nos amis, l'expression de notre profonde gratitude pour leur soutien moral dont ils ont fait preuve à notre égard.*

*Enfin, que tous ceux, qui de près ou de loin, ont participé à l'élaboration de ce travail trouvent ici l'expression de nos meilleurs remerciements.*

***Amel et Mouna.***

# SOMMAIRE

<b>Introduction Générale</b> .....	01
------------------------------------	----

## I. Synthèse bibliographique

<b>CHAPITRE I : Microflore intestinale et probiotiques</b> .....	02
I.1. La microflore intestinale saine .....	02
I.1.1. Composition de la microflore intestinale humaine .....	02
I.1.2. Fonctions de la microflore colique .....	03
I.2. Les probiotiques .....	04
I.2.1 Définition des probiotiques.....	04
I.2.2. Propriétés et critères de sélection des probiotiques .....	04
I.2.3. Types de micro-organismes probiotiques .....	06
I.2.4. Pharmacologie des probiotiques .....	06
I.2.4.1. Principes actifs.....	07
I.2.4.2. Pharmacocinétique des probiotiques.....	08
I.2.4.3. Mécanismes d'action des probiotiques .....	10
<b>CHAPITRE II : Effets biologiques des probiotiques chez l'homme</b> .....	12
II.1. Vertus thérapeutiques des probiotiques en santé humaine .....	12
II.1.1. Gastroentérologie.....	12
II.1.1.1. Amélioration de la digestion du lactose.....	12
II.1.1.2. Prévention des diarrhées dues à certaines bactéries ou à certains virus ....	13
II.1.1.3. Infection par <i>Helicobacter pylori</i> et complications.....	14
II.1.1.4. Maladies inflammatoires et troubles intestinaux.....	14
II.1.2. Affections du tractus urogénital .....	15
II.1.2.1. Vaginose bactérienne.....	15
II.1.2.2. Candidose vaginale.....	16
II.1.2.3. Infections urinaires.....	16
II.1.3. Allergies .....	16
II.1.4. Maladies cardiovasculaires .....	17
II.1.5. Action anticancérogène .....	17

<b>CHAPITRE III : Hyperlipidémie et probiotiques.....</b>	<b>19</b>
III.1. Définition et caractéristiques d'hyperlipidémie .....	19
III.1.1. Hypercholestérolémie .....	19
III.1.2. Hypertriglycéridémie.....	20
III.2. Physiopathologie.....	21
III.2.1. Pathogénie des hyperlipidémies .....	21
III.2.2. Classification .....	21
III.2.2.1. Les hyperlipidémies primitives.....	21
III.2.2.2. Les hyperlipidémies secondaires.....	22
III.3. Stratégies thérapeutiques .....	22
III.3.1. Régime diététique .....	22
III.3.2. Traitement à base de probiotiques .....	23
III.3.3. Traitement médicamenteux .....	24

## II. Matériel et Méthodes

II.1. Matériel .....	25
II.2. Méthodes de travail .....	28
II.2.1. Isolement et purification des bactéries lactiques .....	28
II.2.2. Identification des bactéries lactiques .....	28
II.2.3. Etude de la pharmacocinétique des bactéries lactiques <i>in vitro</i> .....	31
II.2.3.1. Tolérance aux acides .....	31
II.2.3.2. Tolérance aux sels biliaires .....	32
II.2.3.3. Interactions bactériennes .....	32
II.2.3.4. Activité inhibitrice des surnageants .....	33
II.2.3.5. Résistance aux antibiotiques .....	33
II.2.3.6. Adhésion des bactéries lactiques aux cellules épithéliales.....	34
II.2.4. Evaluation <i>in vivo</i> de l'effet hypolipémiant des probiotiques lactiques comparativement à un médicament hypolipémiant .....	36
II.2.4.1. Répartition des animaux et régime alimentaire.....	36
II.2.4.2. Préparation du lait fermenté .....	37
II.2.4.3. Paramètres évalués .....	37
II.2.4.4. Traitement des échantillons destinés à l'histologie .....	42



## *Liste des abréviations*

<b>BSH</b>	: Enzyme de l'hydrolyse des sels biliaires (Bile Salt Hydrolase)
<b>°C</b>	: Degré Celsius
<b>CHE</b>	: Cholestérol oxydase
<b>CHOD</b>	: Cholestérol ester hydrolase
<b>CHT</b>	: Cholestérol total
<b>FAO</b>	: Food and Agriculture Organisation
<b>g</b>	: gramme
<b>GPO</b>	: Glycéro phosphate oxydase
<b>GK</b>	: Glycérokinase
<b>HDL</b>	: High density lipoprotein
<b>LDL</b>	: Low density lipoprotein
<b>mmol</b>	: millimole
<b>MRS</b>	: Man Rogosa Sharpe
<b>OMS</b>	: Organisation Mondiale de la Santé
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffer Saline
<b>POD</b>	: Peroxydase
<b>ssp.</b>	: Subspecies
<b>UFC</b>	: Unité formant colonie
<b>VLDL</b>	: Very low density lipoprotein

### III. Résultats et Discussion

III.1. Mise en place d'une collection de bactéries lactiques d'origine humaine.....	44
III.1.1. Isolement, purification des bactéries lactiques et examen macroscopique.....	44
III.1.2. Examen microscopique .....	44
III.1.3. Tests physiologiques et biochimiques .....	44
III.2. Etude pharmacocinétique des bactéries lactiques <i>in vitro</i> .....	48
III.3.1. Croissance sur milieu acide .....	48
III.3.2. Croissance en présence des sels biliaires .....	49
III.3.3. Interaction bactérienne .....	50
III.3.4. Activité inhibitrice des surnageants des bactéries lactiques .....	53
III.3.5. Résistance aux antibiotiques.....	55
III.3.6. Pouvoir d'adhésion aux cellules épithéliales .....	56
III.3. Evaluation <i>in vivo</i> de l'effet hypolipémiant des probiotiques lactiques comparativement à un médicament hypolipémiant .....	58
III.3.1. Préparation du lait fermenté .....	58
III.3.2. Effet des probiotiques sur les paramètres zootechniques .....	59
III.3.3. Effet des probiotiques sur les paramètres plasmatiques .....	61
III.3.4. Etude histologique.....	66
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>69</b>

#### Références Bibliographiques

#### Annexes

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Proposition de critères de sélection des probiotiques à application Intestinale .....	05
<b>Tableau 2</b> : Principales souches probiotiques commercialisées en Europe .....	06
<b>Tableau 3</b> : Pourcentage de récupération de probiotiques vivants dans les selles .....	08
<b>Tableau 4</b> : Les différents types de lipoprotéines .....	20
<b>Tableau 5</b> : Classification des hyperlipidémies primitives selon <i>De Genne</i> .....	21
<b>Tableau 6</b> : Les hyperlipidémies secondaires .....	22
<b>Tableau 7</b> : Les principaux classes d'hypolipémiants.....	24
<b>Tableau 8</b> : Préparation des échantillons pour le dosage du cholestérol total .....	39
<b>Tableau 9</b> : Préparation des échantillons pour le dosage des triglycérides.....	40
<b>Tableau 10</b> : Technique de préparation des échantillons .....	41
<b>Tableau 11</b> : Préparation des échantillons pour le dosage du HDL cholestérol .....	41
<b>Tableau 12</b> : profil biochimique des souches isolées.....	45
<b>Tableau 13</b> : Profil fermentaire des sucres.....	46
<b>Tableau 14</b> : Identification des souches lactiques.....	47
<b>Tableau 15</b> : Résultats des interactions entre les bactéries lactiques .....	51
<b>Tableau 16</b> : Interaction entre bactéries lactiques et entérobactéries.....	52
<b>Tableau 17</b> : Effet des surnageant natif et à pH 6 sur les entérobactéries .....	54
<b>Tableau 18</b> : Résistance des bactéries lactiques aux antibiotique.....	55



## Liste des illustrations

<b>Photo 1</b> : Segment d'iléum .....	35
<b>Photo 2</b> : Prélèvement sanguin .....	39
<b>Photo 3</b> : Sacrifice de l'animal et prélèvement des organes .....	43
<b>Photo 4</b> : Aspect fermentaire des souches <i>Lb.delbrueckii ssp lactis</i> et <i>Lb.delbrueckii ssp bulgaricus</i> .....	46
<b>Photo 5</b> : Résultats des interactions entre bactéries lactiques .....	51
<b>Photo 6</b> : Activité inhibitrice et symbiotique des souche S1,S2,S3,S4,S5 à l'égard d' <i>E.coli</i> ATCC 25921 (A) et <i>Proteus</i> sp (B) .....	53
<b>Photo7</b> : Aspect inhibiteur des surnageants sur <i>E. coli</i> ATCC 25921.....	55
<b>Photo 8</b> : Résistance et sensibilité <i>Lb. Delbrueckii ssp bulgaricus</i> aux antibiotiques.....	56
<b>Photo 9</b> : Aspect microscopique d'adhésion de la souche <i>Lb. Delbrueckii ssp bulgaricus</i> aux tissu épithéliale .....	58
<b>Photo 10</b> : Coagulation du lait fermenté par les souches lactiques .....	59
<b>Photo 12</b> : Coupes histologiques du foie .....	67
<b>Photo 13</b> : Coupes histologiques du cœur .....	68

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : L'appareil digestif de l'homme et leur microflore intestinale .....	03
<b>Figure 2</b> : Approche pharmacologique des effets des probiotiques dans le tractus Digestif .....	07
<b>Figure 3</b> : Structure d'une lipoprotéine .....	19
<b>Figure 4</b> : Technique de recherche du type fermentaire.....	30
<b>Figure 5</b> : Technique de diffusion sur gélose .....	34
<b>Figure 6</b> : Répartition des animaux et régime alimentaire .....	36
<b>Figure 7</b> : Traitement des animaux après une hyperlipémie .....	37
<b>Figure 8</b> : Technique de préparation du lait fermenté .....	37
<b>Figure 9</b> : Répartition des espèces de la collection lactiques .....	47
<b>Figure 10</b> : Variation de la croissance des bactéries lactiques dans un milieu acide .....	48
<b>Figure 11</b> : Croissance des bactéries lactiques en présence et en absence des sels bilaires .....	49
<b>Figure 12</b> : pourcentage d'adhésion des lactobacilles aux cellules épithélial .....	57
<b>Figure 13</b> : Evolution du poids des animaux durant 04 semaines .....	60
<b>Figure 14</b> : Evolution du l'indices de consommation des animaux .....	60
<b>Figure 15</b> : Evolution du cholestérol total .....	62
<b>Figure 16</b> : Evolution de taux des triglycérides .....	63
<b>Figure 17</b> : Evolution du cholestérol des HDL .....	64
<b>Figure 18</b> : Evolution du cholestérol des LDL .....	64

## INTRODUCTION GENERALE

S'alimenter est essentiel pour la croissance et la survie des êtres vivants. Cependant, il existe des nutriments qui, bien que contribuant comme source d'énergie ou apport de molécules de base, contiennent également des composants additionnels qui améliorent la résistance aux maladies et participent par leurs propriétés à l'état de la santé générale des individus (Cuibai, 2008).

L'idée d'administrer de nouveaux micro-organismes afin de moduler la flore endogène ou d'utiliser leurs propriétés métaboliques a conduit au concept de probiotiques. Ceci conduit au développement de nombreux médicaments probiotiques dans les années 1950-1960; néanmoins l'incertitude sur la capacité de tels micro-organismes de survivre à leur passage dans l'estomac, et l'absence de données rigoureuses sur l'efficacité clinique de beaucoup de produits, avaient conduit à leur disparition progressive grâce à de nombreux travaux rigoureux et une approche pharmacologique (Marteau et Rambaud, 1998).

L'objectif commun des études est de définir les propriétés des probiotiques, leur sécurité et leurs applications dans l'alimentation et dans le domaine clinique, ainsi, notre présente étude va répondre à quelques interrogations relatives aux performances probiotiques de nos souches locales et la vérification de leur efficacité dans l'une des manifestations pathologiques qui est l'hyperlipidémie. En d'autre terme dans quelle mesure les probiotiques, peuvent être utilisés comme des hypolipémiants chez l'animal ou l'être humain?

Ce travail a été accompli en deux parties, une synthèse bibliographique qui s'articule autour de trois principaux chapitres et une deuxième partie qui a été consacrée pour une étude expérimentale dont l'objectif est d'étudier les propriétés pharmacocinétique *in vitro* des souches probiotiques isolées à partir des selles d'enfant et pour en finir une étude *in vivo* qui va répondre à la problématique « hyperlipédémie et probiotique », en évaluant l'effet de nos souches probiotiques vis-à-vis d'une hyperlipémie expérimentale comparativement à un médicament hypolipémiant (Torvast®).

*I. Synthèse*  
*Bibliographique*

## CHAPITRE I :

*Microflore intestinale et probiotiques***I.1. La microflore intestinale saine :****I.1.1. Composition de la microflore intestinale humaine :**

L'existence d'une flore associée à l'intestin est connue depuis plus d'un siècle, elle est évaluée à près de  $10^{13}$  à  $10^{14}$  cellules, représentant 400 à 500 espèces et sous-espèces. C'est environ 10 fois le nombre total de cellules du corps humain. Le tube digestif du nouveau-né, stérile à la naissance, est colonisé en moins de 48 heures par des milliards de bactéries capables de le coloniser (Moreau, 2005).

La microflore normale est définie par la présence constante de certaines espèces dans l'intestin. Chez un individu donné, il existe également des variations quantitatives et qualitatives en fonction de la région intestinale. En effet, les populations bactériennes présentes dans la lumière du tube digestif augmentent progressivement de l'estomac jusqu'aux selles (figure 1) (Ait-Belgnaoui, 2006).

L'estomac contient toujours une flore plus faible lorsque le pH est acide chez l'homme, en fait, seuls les micro-organismes à Gram positif aérobies ou anaérobies facultatives acidotolérantes sont capables d'y survivre. Cependant, des bactéries anaérobies strictes résistantes à l'acidité gastrique peuvent s'y implanter, c'est notamment le cas d' *Helicobacter pylori* capable de se loger dans la sous-couche du mucus (Moreau, 2005).

A l'inverse, l'intestin grêle n'est pas un organe où les bactéries peuvent se multiplier chez un sujet sain. Il constitue une région de transit, mais il est possible de rencontrer des bactéries appartenants aux genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, et à quelques espèces de la famille des Enterobacteriaceae à des concentrations faibles jusqu'à l'iléon où elles apparaissent à côté des espèces anaérobies à Gram négatif appartenant au genre *Bacteroides* (Ait-Belgnaoui, 2006).

Cependant, dans le côlon, il faut distinguer 4 types de flores. La flore dominante qui est la plus nombreuse se localise essentiellement au niveau du côlon où le taux de colonisation de chacun des groupes bactériens qui la compose atteint  $10^9$  à  $10^{11}$  germes/ gr ou ml de contenu intraluminal avec très peu de variations inter-individuelles, elle est composée essentiellement

de genres anaérobies et les principales familles représentant cette flore sont celles des Bifidobactéries et des lactobacilles. Par contre, la flore sous dominante se localise au niveau du côlon à des taux inférieurs à ceux des germes de la flore dominante soit  $10^6$  à  $10^8$  germes / gr ou ml de contenu intraluminal, elle est composée de germes aéro-anaérobies facultatifs (Entérobactéries, Streptocoques). En outre, la flore fécale qui est facilement accessible pour l'analyse, elle renferme de nombreuses espèces mortes et n'est pas représentative des différentes niches écologiques de l'écosystème microbien digestif (Drasar et Barrow, 1985).

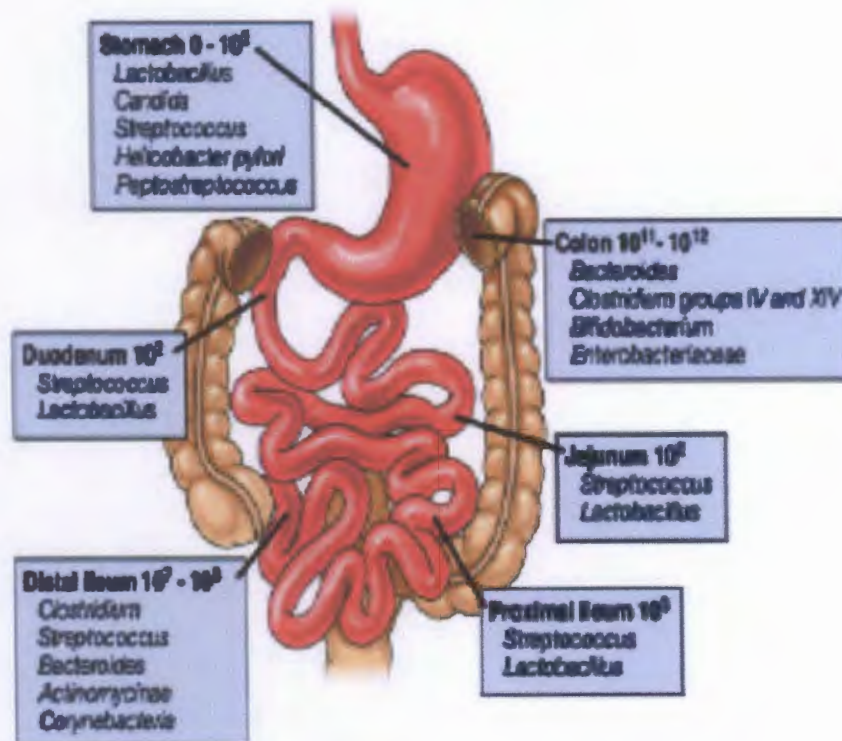


Figure 1. L'appareil digestif de l'homme et sa microflore intestinale (Balfour Sartor, 2008).

### L1.2. Fonctions de la microflore colique :

La relative stabilité de l'écosystème intestinal suggère la présence de mécanismes de régulation et de défense propres à l'hôte ou à la microflore résidente. Ainsi, il apparaît que l'utilisation de modèles animaux axéniques (animaux inoculés avec des souches bactériennes connues) a permis de réaliser des progrès considérables dans l'étude des fonctions de la flore intestinale (Raibaud *et al.*, 1980).

L'une des fonctions importantes exercées par la flore intestinale est la maturation et la stimulation du système immunitaire de l'hôte. Le système immunitaire local associé à la muqueuse digestive ainsi que le système immunitaire général sont fortement stimulés ou parfois inhibés, par certaines bactéries de la flore du tube digestif. En fait, plusieurs études ont montré que la flore intestinale stimule l'activité phagocytaire, la sécrétion des cytokines par les macrophages, et la stimulation des lymphocytes intraépithéliaux (Ait-Belgnaoui, 2006).

De même, il est connu qu'elle joue d'autres fonctions métaboliques citons la production d'acides gras à courte chaîne, vitamines (vitamine K, B12), ainsi la dégradation des hydrates de carbone non absorbés aboutissant à la production d'acides organiques assimilables par l'hôte et de gaz. De plus elle hydrolyse les lipides alimentaires non absorbés grâce aux lipases bactériennes (Drasar et Barrow, 1985).

## **I.2. Les probiotiques :**

### **I.2.1. Définition des probiotiques :**

Le terme "probiotique" est un mot relativement nouveau qui signifie "*en faveur de la vie*" et qui est actuellement utilisé pour désigner des bactéries associées à des effets bénéfiques chez l'homme et les animaux (FAO/OMS, 2001).

La Food and Agriculture Organization des nations unies (FAO) et l'organisation mondiale de la santé (OMS) ont établi récemment des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotique » dans les aliments (FAO/OMS 2002) et formulé la définition : « *micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère* » (Marteau et Seksik, 2005).

### **I.2.2. Propriétés et critères de sélection des probiotiques:**

Afin de satisfaire à la définition des probiotiques, les micro-organismes doivent survivre, persister temporairement dans le tractus digestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets positifs pour l'hôte. Or, toutes ces propriétés sont propres à chaque souche et ne peuvent être extrapolées à une autre souche de la même espèce. Les micro-organismes potentiellement probiotiques doivent donc être sélectionnés selon différents critères décrits dans le tableau 1 (Izquierdo, 2009).

**Tableau 1. Proposition de critères de sélection des probiotiques à application intestinale (Rousseau, 2004).**

<b>CRITERES DE SECURITE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ souche pour l'usage humain d'origine humaine (isolée du tractus intestinal d'un homme sain) ou alimentaire (utilisée dans les produits fermentés).</li> <li>▪ souche déposée dans une collection de cultures reconnue internationalement.</li> <li>▪ souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques.</li> <li>▪ historique de non pathogénicité.</li> <li>▪ pas de déconjugaison excessive des sels biliaires au risque d'induire des lyses cellulaires.</li> <li>▪ pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques.</li> <li>▪ pas de dégradation excessive du mucus.</li> </ul>
<b>CRITERES FONCTIONNELS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ tolérance à l'acidité et aux enzymes gastriques.</li> <li>▪ tolérance à la bile et aux enzymes digestives.</li> <li>▪ adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus gastrointestinal.</li> <li>▪ Immunostimulation.</li> <li>▪ production de substances antimicrobiennes et antagonisme vis-à-vis des pathogènes.</li> <li>▪ effets sur la santé documentés.</li> </ul>
<b>CRITERES TECHNOLOGIQUES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini.</li> <li>▪ conservation des propriétés probiotiques après production.</li> </ul>

Le nombre de cellules viables recommandée est de  $10^9$  à  $10^{10}$  bactéries afin d'avoir en général  $10^8$  à  $10^9$  bactéries vivantes accédant au duodénum et capables d'exercer leurs effets. L'apport de probiotiques doit être régulier, car des études ont montré qu'ils disparaissent du tractus au bout de 1 à 2 semaines après arrêt de l'administration. En effet, quand *Lactobacillus rhamnosus* GG a été donné à 76 volontaires sous différentes formes (poudre lyophilisée ou produit fermenté) à raison de  $5 \cdot 10^{10}$  à  $5 \cdot 10^{11}$  cellules par jour pendant 28 jours, la souche a été retrouvée dans les fécès dès les premiers jours. Mais après l'arrêt de l'administration, elle a disparu des fécès chez 10 % des patients au bout de 4 jours et chez 70 % au bout de 7 jours (Rousseau, 2004).



### I.2.3. Types de micro-organismes probiotiques :

Les principaux micro-organismes probiotiques connus à ce jour sont des bactéries (lactobacilles, bifidobactéries, propionibactéries, *Escherichia coli* et entérocoques) et des levures (*Saccharomyces boulardii*), présentes ou non dans la microflore intestinale résidente. Les bifidobactéries sont utilisées commercialement moins que les lactobacilles. La souche la plus étudiée est *Bifidobacterium animalis lactis* Bb12 (tableau 2) (Cuibai, 2008).

**Tableau 2. Principales souches probiotiques commercialisées en Europe (Izquierdo, 2009).**

Espèces de lactobacilles	Firme	Autres bactéries lactiques	Firme
<i>Lb. acidophilus</i> La5	Chr Hansen	<i>Streptococcus thermophilus</i> 1131	Meiji Milk
<i>Lb. acidophilus</i> NCFM	Rhodia	<i>Enterococcus faecium</i> SF68	Cernelle
<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		
Espèces de bifidobactéries	Firme	Autres microorganismes	Firme
<i>Bf. breve</i> Yakult	Yakult	<i>Sc. boulardii</i> Ultra-levure®	Biocodex
<i>Bf. lactis</i> Bb12	Chr Hansen		
<i>Bf. longum</i> BB536	Morinaga		
<i>Bf. animalis</i> N173010	Danone		

### I.2.4. Pharmacologie des probiotiques :

Le mode d'action des probiotiques est de mieux en mieux compris grâce à une approche pharmacologique (Marteau et Seksik, 2005). Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de véhiculer des principes actifs qu'ils contiennent jusqu'à leurs cibles d'action dans le tractus digestif (Marteau et Rambaud, 1998). Ils peuvent avoir des effets soit directs soit indirects en agissant via des modifications de l'immunité et de la flore. En effet ils agissent en particulier en inhibant les bactéries indésirables, en neutralisant les produits toxiques, en améliorant la digestibilité de la ration alimentaire et en stimulant l'immunité. Ils sont également une source de vitamines (essentiellement du groupe B) et des sels minéraux assimilables (Robin et Rouchy, 2001).

Leur étude pharmacologique a trois objectifs : identifier les constituants actifs des micro-organismes en transit, décrire leur pharmacocinétique jusqu'aux cibles (survie, capacité d'adhésion et de colonisation, devenir des principes actifs) et démontrer les effets spécifiques bénéfiques ou néfastes (figure 2) (Marteau et Rambaud, 1998).

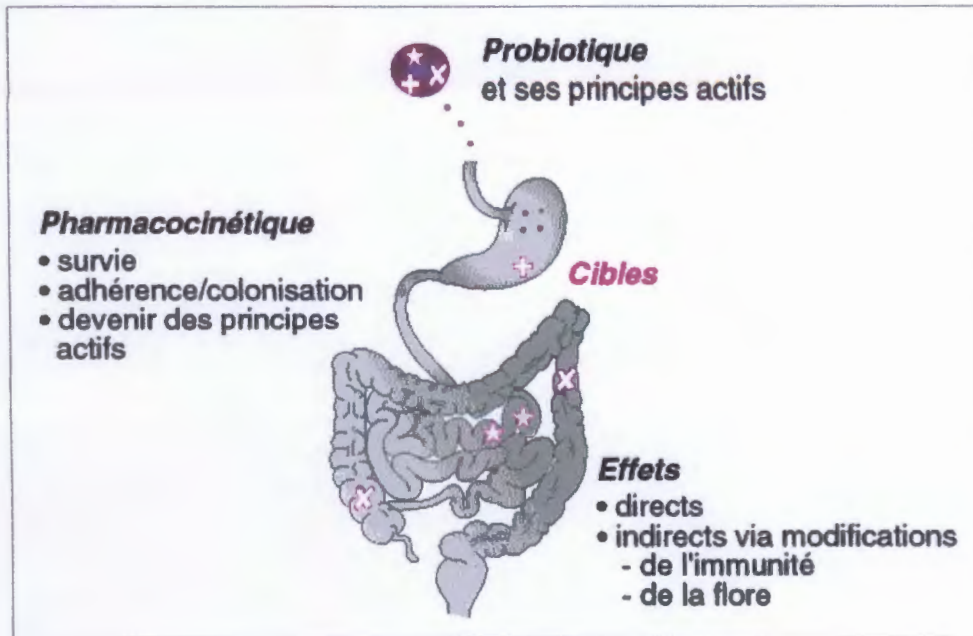


Figure 2. Approche pharmacologique des effets des probiotiques dans le tractus digestif (Marteau et Rambaud, 1998).

#### I.2.4.1. Principes actifs :

Les principes actifs des probiotiques ne sont pas les mêmes pour tous les effets. Certains sont bien établis, notamment des enzymes qui peuvent être actives dans l'intestin (ex. : la lactase des bactéries lactiques). Certains autres sont reconnus par le système immunitaire ; ils incluent des peptides formylés, des lipo-polysaccharides, des peptidoglycanes composants de la paroi cellulaire et des nucléotides, notamment l'ADN dinucléotide cytosine phosphoryl choline (CpG). Certains principes actifs peuvent être naturellement présents dans des probiotiques et d'autres peuvent y être introduits par des techniques de génie génétique (Marteau et Seksik, 2005).

### I.2.4.2. Pharmacocinétique des probiotiques :

#### a. Survie :

Dans la mesure où on ignore souvent la nature exacte des principes actifs, c'est le plus souvent la capacité du micro-organisme à survivre aux différents étages du tube digestif qui est étudiée (tableau 3) (Marteau et Rambaud, 1998).

Les concentrations de probiotiques parvenant vivants dans l'intestin dépendent de leur résistance intrinsèque, de facteurs liés à l'hôte et du vecteur alimentaire ou galénique dans ou avec lequel ils sont ingérés (Marteau et Seksik, 2005). Plusieurs études ont montré que certains probiotiques sont détruits dès leur passage dans l'estomac par l'acide gastrique et par la bile, alors que d'autres traversent l'intestin grêle et parfois le côlon à hautes concentrations (Roy, 2006).

La survie des probiotiques ingérée à différents niveaux du tractus gastro-intestinal diffère entre les souches, qui peut être mesurée *in vivo* en utilisant des techniques de collection fécale et d'intubation intestinale, ou identification de la souche sur des biopsies mucoales. En effet, tout les modèles *in vitro* peut aider à prédire le destin des souches ingérées (Marteau, 2001).

**Tableau 3. Pourcentage de récupération de probiotiques vivants dans les selles après leur ingestion (Marteau et Rambaud, 1998).**

Probiotiques	% de survie*	Référence
<i>Bifidobacterium</i> sp.	30	<i>Gastroenterology</i> 1992 ; 102 : 875-8
<i>Lb. plantarum</i> souche NCIB 8826	25	Résultat personnel
<i>Lb. acidophilus</i>	2-5	<i>J Dairy Sci</i> 1978 ; 61 :1-10
<i>Lb. rhamnosus</i> souche GG	1-5	<i>Dig Dis Sci</i> 1992 ; 37 : 121-8
- gastroprotégé	1	<i>MicrobEcol Health Dis</i> 1993 ; 6 : 119-22
- lait fermenté	1	<i>MicrobEcol Health Dis</i> 1993 ; 6 : 119-22
- capsules	2	<i>Int J Food Microb</i> 1995 ; 25 :199-203
<i>Lb. salivarius</i> souche UCC118	0,2	Résultat personnel
<i>Lactococcus lactis</i> TC 165.5	0,1-2	<i>Appl Environ Microbiol</i> 1995 ; 61 :2771-6
<i>Sc. boulardii</i>	0,36	<i>Biopharm Drug Disp</i> 1989 ; 10 : 353-64
<i>Lb. reuteri</i> capsules	0,01	<i>MicrobEcol Health Dis</i> 1995 ; 8 : 41-50

\* résultat calculé à partir d'un poids de selles théorique de 150 g/jour.

La récupération fécale des bactéries semble être directement proportionnelle à la dose administrée. La persistance dans les fèces semble dépendre du nombre de doses de bactéries administrées plutôt que du nombre de bactéries dans une dose. Des survies significatives bien que plus faibles atteignant des concentrations de  $10^6$  Unité Formant Colonies par gramme (UFC/g) ont été observées avec des *Lb. acidophilus*, *Lb. reuteri* et *Lb. rhamnosus* particulièrement la souche GG (Marteau et Seksik, 2005).

**b. Capacité d'adhésion :**

Aujourd'hui, la capacité des souches à adhérer à la muqueuse intestinale est l'un des principaux critères de sélection, ainsi, selon plusieurs études pharmacocinétiques cliniques, il semble que la culture probiotique doit être continuellement ingérée pour qu'un effet probiotique exogène continu soit obtenu (Izquierdo, 2009).

Certains probiotiques ont une capacité d'adhérence à l'épithélium digestif, ce qui peut être étudié *in vitro* avec des lignées cellulaires telles que CaCO<sub>2</sub> (une lignée cellulaire humaine d'origine intestinale), et/ou au mucus intestinal. Cette propriété pourrait constituer un avantage écologique favorisant les chances d'interrelations étroites avec l'épithélium entérocytaire et le système immunitaire local (Marteau et Rambaud, 1998). Par conséquent,

Les méthodes d'études *in vivo* sont difficiles à étudier, puisque cela nécessite des biopsies de l'intestin ou des méthodes de marquage des souches probiotiques permettant d'évaluer leur installation dans la muqueuse intestinale (Izquierdo, 2009).

**c. Colonisation :**

La colonisation est définie comme la possibilité du probiotique de persister dans une niche d'écosystème pour une période plus longue que celle qu'un marqueur inerte ingéré au même moment (Marteau et Seksik, 2005).

La possibilité d'une colonisation durable de l'écosystème digestif par un probiotique était jusqu'à peu considérée comme impossible en raison d'un grand déséquilibre de force en faveur de l'écosystème endogène. La majorité des travaux a confirmé ce concept. Néanmoins, deux études ont montré que des souches adhérentes de *Lb. plantarum* et *Lb. rhamnosus* pouvaient coloniser de manière prolongée la muqueuse jéjunale et/ou rectale chez quelques sujets (Marteau et Rambaud, 1998). Les probiotiques pourraient agir en limitant

l'implantation des germes pathogènes par compétition au niveau des sites de fixations pour la colonisation (Robin et Rouchy, 2001).

**d. Pouvoir d'inhibition :**

Les lactobacilles et les bifidobactéries ne sont pas connus pour produire des antibiotiques. La plupart, sinon toutes les bactéries, sont capables de produire des molécules qui peuvent être inhibitrices pour elles-mêmes et/ou pour d'autres bactéries. Les substances à effet bactéricide produites par les bactéries sont variées et comprennent le peroxyde d'hydrogène, l'acide lactique, les acides organiques et les bactériocines. Il serait le plus souhaitable, pour le futur, de mettre sur pied une fiche technique exhaustive énumérant les souches cibles de chaque bactériocine connue (Roy, 2006).

**L2.4.3. Mécanismes d'action des probiotiques :**

Les mécanismes d'action des probiotiques impliqués dans les effets bénéfiques exercés par ces bactéries sur l'hôte sont complexes, souvent multiples et dépendent de la souche bactérienne considérée. Les effets des probiotiques sont classiquement attribués à une modulation directe (du chyme, la flore, ou la muqueuse intestinale) ou indirecte de la flore endogène ou du système immunitaire local. Ceci suggère qu'un contact direct de ces probiotiques avec les différents constituants de la barrière intestinale, tels que la microflore endogène, le mucus intestinal, les cellules épithéliales, les immunocytes, est nécessaire (Ait-Belgnaoui, 2006).

**a. Effets directs :**

Les effets directs des probiotiques dans la lumière intestinale ou la paroi sont les plus faciles à étudier et prédire. L'utilisation des bactéries lactiques génétiquement modifiées contenant des épitopes vaccinaux afin de les libérer dans l'intestin, fait l'objet de plusieurs travaux par les chercheurs. En effet, Les auteurs ont montré que l'administration orale de *Lactococcus lactis* génétiquement modifié pour sécréter de l'interleukine 10 (IL-10), améliorait des colites expérimentales induites chez l'animal par le dextran-sulfate ou l'inactivation du gène de l'IL-10 ; une étude humaine est en cours aux Pays-Bas. Ainsi, plusieurs probiotiques et particulièrement *Sc. boulardii* ont des effets directs sur la muqueuse intestinale (Marteau et Seksik, 2005).

**b. Effets sur la flore endogène et indirects par son intermédiaire :**

Les effets des probiotiques sur la composition de la flore endogène sont paradoxalement assez mal connus si l'on excepte la survie du probiotique lui-même. Il a été montré que l'ingestion de certaines souches de lactobacilles ou de bifidobactéries pouvaient modifier de manière reproductible certaines activités enzymatiques bactériennes fécales, telles que la  $\beta$ -glucuronidase, l'azoréductase ou la nitroréductase. Les tentatives de modulation de la production d'acides gras à courte chaîne ou du pH intracolique par des probiotiques, sont en revanche jusqu'ici restées infructueuses (Marteau et Seksik, 2005).

**c. Effets sur la barrière muqueuse et immunologique et effets indirects par cet intermédiaire :**

De nombreuses études réalisées chez l'animal, ont montré que l'administration orale de divers probiotiques pouvait moduler la barrière immunitaire muqueuse et/ou systémique. Les travaux pionniers ont montré que l'ingestion de très fortes quantités de bactéries du yaourt augmentait la capacité des lymphocytes du sang circulant à sécréter diverses cytokines, notamment l'interféron- $\gamma$ . Les conséquences cliniques de cet effet biologique sont douteuses (Marteau et Seksik, 2005).

Plusieurs essais randomisés contrôlés ont montré que la souche de *Lb. rhamnosus* GG administrée à des enfants atteints de gastro-entérite à rotavirus, augmentait les cellules circulantes capables de sécréter des immunoglobulines. Au moment de la convalescence, 90% des nourrissons du groupe recevant le probiotique contre seulement 46% recevant le placebo avaient développé une réponse anticorps spécifique immunoglobulines A (IgA) contre les rotavirus. Les mêmes auteurs ont rapporté que l'immunogénicité d'un vaccin oral anti-rotavirus pouvait être très discrètement augmentée par l'administration simultanée de *Lb. rhamnosus* GG (Marteau et Rambaud, 1998).

De manière générale, l'hôte distingue les signaux émis par les micro-organismes grâce à des récepteurs dits *toll-like récepteurs* (TLR<sub>s</sub>) présents sur les cellules immunitaires et les cellules épithéliales intestinales. L'ADN bactérien et des oligo-nucléotides contenant des Cpg non méthylés stimulent les lymphocytes alors que l'ADN eucaryote et les oligo-nucléotides méthylés ne le font pas. La stimulation des cellules dendritiques par l'ADN Cpg est associée à la production de cytokines de type TH1 (Aït-Belgnaoui, 2006).

## CHAPITRE II :

### *Effets biologiques des probiotiques chez l'homme*

#### **II.1. Vertus thérapeutiques des probiotiques en santé humaine :**

L'évaluation des probiotiques n'échappe pas à la règle désormais générale dite de « l'evidence-based medicine » ou de « médecine fondée sur les preuves » qui exige que toute affirmation scientifique soit caractérisée par un niveau de preuves. Beaucoup des allégations concernant les probiotiques il y a une vingtaine d'années n'étaient pas fondées sur un haut niveau de preuve aussi ont-elles été rejetées. Elles ont même conduit à discréditer l'ensemble du sujet scientifique aux yeux de beaucoup. Néanmoins depuis cette époque et le développement de l'approche pharmacologique, les essais de bonne qualité méthodologique se sont multipliés. Ce sont ces derniers qui sont analysés dans les paragraphes ci-dessous (Marteau et Seksik, 2005).

#### **II.1.1. Gastroentérologie :**

##### **II.1.1.1. Amélioration de la digestion du lactose :**

Le premier effet démontré avec un haut niveau de preuve a été l'amélioration de l'intolérance au lactose et de sa malabsorption par des bactéries lactiques et tout particulièrement celle du yaourt (Marteau et Seksik, 2005).

Chez les personnes souffrant d'intolérance au lactose, un déclin de la production de la lactase est observé au-delà de la petite enfance. La deuxième cause d'intolérance (intolérance secondaire) est représentée par les maladies, dont la conséquence est une réduction de la surface de digestion absorption intestinale ou une accélération du transit jéjunal, comme les résections intestinales, les gastro-entérites, la maladie coeliaque ou les gastrectomies (Izquierdo, 2009).

Les premiers essais ont montré que les sujets intolérants au lactose toléraient le plus souvent le yaourt qui pourtant contient bien du lactose. En pratique clinique, le remplacement du lait par du yaourt conduit à une meilleure absorption et une meilleure tolérance chez les sujets présentant une intolérance primaire au lactose (due au déclin physiologique de la lactase avec l'âge), mais aussi en présence d'intolérance secondaire à des entéropathies comme au cours de diarrhées persistantes ou après résection intestinale étendue (Marteau et Rambaud, 1998).

Plusieurs travaux explicatifs ont montré que la lactase de bactéries lactiques participait à la digestion du lactose dans l'intestin. Un travail quantitatif a montré que les sujets déficients en lactase digéraient (et absorbaient) 90% du lactose contenu dans 400 g de yaourt et qu'environ un cinquième de la quantité de lactase présente dans le yaourt parvenait encore active jusqu'à la toute fin de l'intestin grêle après un repas (Marteau et Seksik, 2005).

De plus, de nombreuses études ont montré que la lactase véhiculée par certaines bactéries lactiques, notamment celle du yaourt dont la membrane est facilement lysée par les acides biliaires, participait dans l'intestin à la digestion du lactose, ce qui permet d'expliquer l'excellente digestion du lactose du yaourt (90 %) chez les sujets déficients en lactase (Marteau *et al.*, 1990).

#### **II.1.1.2. Prévention des diarrhées dues à certaines bactéries ou à certains virus pathogènes :**

La diarrhée d'origine infectieuse est un grave problème sanitaire mondial, responsable chaque année de la mort de plusieurs millions de personnes. Si la majorité des décès se produit parmi les enfants des pays en développement, on estime que jusqu'à 30% de la population même dans les pays développés souffre chaque année de diarrhée d'origine nutritionnelle. Les probiotiques pourraient constituer un important moyen de réduire ces problèmes (Azizpour, 2009).

L'effet bénéfique de probiotiques a parfaitement été démontré à l'aide de *Lb. rhamnosus* GG et *Bifidobacterium lactis* BB-12 pour la prévention et avec le traitement de la diarrhée aiguë causée principalement par des rotavirus chez les enfants. Cependant, il y a de bonnes preuves *in vitro* que certaines souches probiotiques peuvent inhiber la croissance et l'adhérence d'une gamme d'entéropathogènes, et des études sur les animaux ont indiqué des effets bénéfiques contre des agents pathogènes tels que *Salmonella*. Il ressort de certaines études de la diarrhée du voyageur, où l'on suppose que certains des agents pathogènes responsables sont de nature bactérienne, que les effets bénéfiques peuvent augmenter avec l'administration de probiotiques (Marteau et Rambaud, 1998).



Un problème grave associé au traitement antibiotique est l'apparition de la diarrhée, souvent causée par *Clostridium difficile* (*C. difficile*). La raison d'utiliser des probiotiques est donc que chez ces patients, l'administration de micro-organismes commensaux exogènes (c'est-à-dire de probiotiques) est nécessaire pour ramener la microflore à un état qui reflète le plus fidèlement la flore normale avant la thérapie antibiotique. Il faut reconnaître que la preuve d'effets thérapeutiques contre *C. difficile*, et d'autres troubles a été obtenue à l'aide de certaines souches probiotiques, telles que *Lb. rhamnosus* GG (FAO/OMS, 2001).

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

#### **II.1.1.3. Infection par *Helicobacter pylori* et complications :**

Concernant les applications des probiotiques, on a également découvert qu'ils sont actifs contre *Helicobacter pylori*, un agent pathogène responsable de la gastrite de type B, d'ulcères peptiques et du carcinoïde gastrique. Les données *in vitro* et sur les animaux indiquent que les bactéries lactiques peuvent inhiber la croissance des agents pathogènes et diminuer l'activité des uréases nécessaire pour que l'agent pathogène reste dans le milieu acide de l'estomac. Les données concernant l'homme sont limitées, mais il y a des preuves d'un effet induit par *Lb. johnsonii*La1 (Azizpour, 2009).

#### **II.1.1.4. Maladies inflammatoires et troubles intestinaux :**

Les maladies intestinales inflammatoires, telles que la pochite et la maladie de Crohn, ainsi que le syndrome du colon irritable, peuvent être causés ou aggravés par des altérations dans la flore intestinale incluant l'infection (Shanahan, 2000).

De nombreux travaux ont permis de découvrir que certains micro-organismes de la flore intestinale pouvaient jouer un rôle délétère pro-inflammatoire au cours des maladies inflammatoires du tube digestif. Dans une étude, l'ingestion de *Lactobacillus* GG entraîne une amélioration notable de l'état clinique chez des enfants souffrant de la maladie de Crohn. De même des effets cliniques bénéfiques ont été observés chez des patients affectés par une colite ulcéreuse après ingestion de produits fermentés contenant *Lactobacillus* GG à  $10^{10}$

bactéries/jour (Cuibai, 2008). Cependant plusieurs essais randomisés ont suggéré l'efficacité partielle de certaines souches probiotiques, d'autres ont été négatives (Marteau et Seksik, 2005).

### II.1.2. Affections du tractus urogénital :

A l'exception des maladies sexuellement transmissibles, la quasi-totalité des infections du vagin et de la vessie sont dues à des micro-organismes qui proviennent de l'intestin. Il y a une forte corrélation entre la présence de commensaux, particulièrement de lactobacilles dans le vagin, et la santé, et une absence de ces micro-organismes chez les patients souffrant d'infections génito-urinaires (Reid et Bruce, 2001).

Le bouleversement de la flore vaginale normale est dû à des antibiotiques à large spectre, à des spermicides, à des hormones, à des substances alimentaires et à des facteurs non encore complètement compris. Quelques éléments prouvent que les micro-organismes probiotiques ingérés comme aliments et les préparations topiques ont un rôle dans la prévention des troubles de l'appareil génito-urinaire (Azizpour, 2009).

#### II.1.2.1. Vaginose bactérienne :

La vaginose bactérienne est une maladie d'étiologie inconnue attribuable au développement excessif de diverses espèces de bactéries anaérobies et associée à la disparition des lactobacilles qui dominent normalement dans le vagin. De nombreuses femmes souffrant de vaginose bactérienne sont asymptomatiques mais risquent de plus graves complications telles que l'endométriose, les infections pelviennes et les complications de l'accouchement, y compris de l'accouchement prématuré (Reid *et al.*, 2001).

Certaines preuves cliniques laissent à penser que l'administration par voie orale ou vaginale de lactobacilles peut éradiquer la vaginose bactérienne asymptomatique et symptomatique. On a eu recours à l'administration orale de *Lb. acidophilus* et de yogourt dans la prévention et la thérapie de la candidose vaginale, bien qu'aucune donnée sur son efficacité n'ait encore été fournie. On a supposé que les lactobacilles devraient produire du peroxyde d'hydrogène, mais étant donné que ces micro-organismes sont plus sujets à être tués par les spermicides, l'association de deux souches ou plus, dont une produisant du peroxyde d'hydrogène et l'autre résistant aux spermicides, pourrait être plus thérapeutique (FAO/OMS, 2001).

### II.1.2.2. Candidose vaginale :

La candidose vaginale est une maladie très commune, souvent accélérée par l'utilisation d'antibiotiques, l'exposition à des spermicides ou à des changements hormonaux non encore complètement élucidés. Contrairement à la vaginose bactérienne et aux infections urinaires, la candidose vaginale n'est pas nécessairement due à la perte de lactobacilles (Azizpour, 2009).

Peu de souches de *Lactobacillus* sont capables d'inhiber la croissance et l'adhérence de *Candida albicans* ou d'autres espèces de *Candida*, et il n'y a pas de preuves solides indiquant que l'administration par voie vaginale de lactobacilles puisse éradiquer l'infection par les levures. Toutefois, il y a lieu de croire que l'ingestion de lactobacilles et l'emploi vaginal peuvent réduire le risque de rechutes et de nouvelles études sont justifiées compte tenu du fait que cette maladie est très répandue et débilitante (FAO/OMS, 2001).

### II.1.2.3. Infections urinaires :

Plusieurs centaines de millions de femmes sont touchées chaque année par des infections urinaires. L'uropathogène *Escherichia coli* qui se développe dans l'intestin est responsable jusqu'à 85% des cas. La bactériurie asymptomatique est également commune chez la femme et est parfois suivie d'infections urinaires symptomatiques (Azizpour, 2009).

Il y a des preuves, y compris des données randomisées et contrôlées, qui indiquent que des gélules vaginales de souches de *Lactobacillus* GR-1 et B-54 lyophilisées appliquées une fois par semaine préparées avec adjonction de lait écrémé (Reid *et al.*, 1995) et l'ingestion une fois par jour par voie orale d'une capsule de souches de *Lactobacillus* GR-1 et RC-14 peuvent restaurer une flore vaginale dominée par les lactobacilles et réduire le risque de réapparition des infections urinaires (Reid *et al.*, 2001).

### II.1.3. Allergies :

Dans un essai randomisé et contrôlé à double insu contre placebo, l'administration de *Lb. rhamnosus* GG à des femmes enceintes pendant quatre semaines avant l'accouchement, puis à des nourrissons à haut risque d'allergie pendant six mois, entraîne une réduction importante de la maladie atopique précoce. Cette étude illustre le potentiel des micro-organismes probiotiques de moduler la réponse immunitaire et d'empêcher l'apparition d'allergies (Kalliomaki *et al.*, 2001).

L'allergie alimentaire du nourrisson se traduit souvent par l'eczéma atopique. Lors d'une étude clinique sur 27 enfants nourris au sein et souffrant d'eczéma atopique, les enfants ont reçu au sevrage soit une formule infantile hypoallergénique soit la même formule supplémentée avec *Lb. rhamnosus* GG et *Bifidobacterium lactis* Bb-12. Après 2 mois de traitement, la supplémentation avec les bactéries lactiques a permis une amélioration plus rapide de l'état atopique dans ce groupe comparé au groupe placebo (Isolauri *et al.*, 2000).

Les mécanismes précis n'ont pas été élucidés, mais l'on s'appuie sur la capacité des lactobacilles de neutraliser l'augmentation de la perméabilité intestinale, de renforcer les réponses des IgA spécifiques de l'intestin, d'encourager la fonction de barrière des intestins par le rétablissement de microbes normaux, et de renforcer la transformation du facteur de croissance bêta et la production d'IL-10 ainsi que des cytokines qui favorisent la production d'anticorps IgE (FAO/OMS, 2001).

### II.1.4. Maladies cardiovasculaires :

Il a déjà été démontré que l'emploi de lactobacilles probiotiques et des sous-produits du métabolisme a des effets bénéfiques sur le cœur, y compris pour la prévention et la thérapie de diverses cardiopathies ischémiques et abaisse le cholestérol sérique. Bien que la consultation FAO/OMS estime que ces résultats sont importants, il est nécessaire de poursuivre les travaux de recherche et particulièrement les études sur l'homme avant de pouvoir affirmer que les probiotiques exercent des effets bénéfiques sur l'appareil cardiovasculaire (Azizpour, 2009).

### II.1.5. Action anticancérigène :

Il a déjà été démontré que les probiotiques peuvent prévenir ou retarder l'apparition de certains cancers. Cela vient de la connaissance que les membres de la microflore intestinale peuvent produire des cancérigènes tels que les nitrosamines. Par conséquent, l'administration de lactobacilles et de bifidobactéries pourrait théoriquement modifier la flore, réduisant les niveaux de  $\beta$ -glucuronidase et des carcinogènes (Hosoda *et al.*, 1996).

En outre, deux essais randomisés contrôlés ont montré que l'administration orale de *Lb. casei* diminuait de manière significative le risque de récurrence de tumeur superficielle de vessie chez l'homme (Marteau et Rambaud, 1998).

Des études *in vitro* avec *Lb. rhamnosus* GG et des bifidobactéries et une étude *in vivo* utilisant des souches de *Lb. rhamnosus* GG et LC-705 ainsi que *Propionibacterium* sp. ont montré une diminution dans la disponibilité d'aflatoxines cancérogènes dans la lumière intestinale (Oatley *et al.*, 2000).

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

## CHAPITRE III :

### *Hyperlipidémie et probiotiques*

#### III.1. Définition et caractéristiques d'hyperlipidémie :

La notion d'hyperlipidémie ou d'hyperlipémie désigne une augmentation anormalement élevée de lipides dans le sérum ou le plasma. L'hyperlipidémie postprandiale est l'augmentation temporaire des lipides dans le sérum ou le plasma après un repas.

## CHAPITRE III :

### *Hyperlipidémie et probiotiques*

#### III.1. Définition et caractéristiques d'hyperlipidémie :

Le terme d'hyperlipidémie ou d'hyperlipémie désigne une concentration anormalement élevée de lipides dans le sérum ou le plasma. L'hyperlipidémie postprandiale est physiologique, surtout après un repas riche en matières grasses mais une hyperlipidémie à jeun est en revanche une indication d'anomalie du métabolisme lipidique. Les lipides ne circulent pas libres dans le sang : ils sont associés à des phospholipides et des protéines, dans des complexes macromoléculaires : les lipoprotéines (figure 03) (Jeusette et *al.*, 2004).

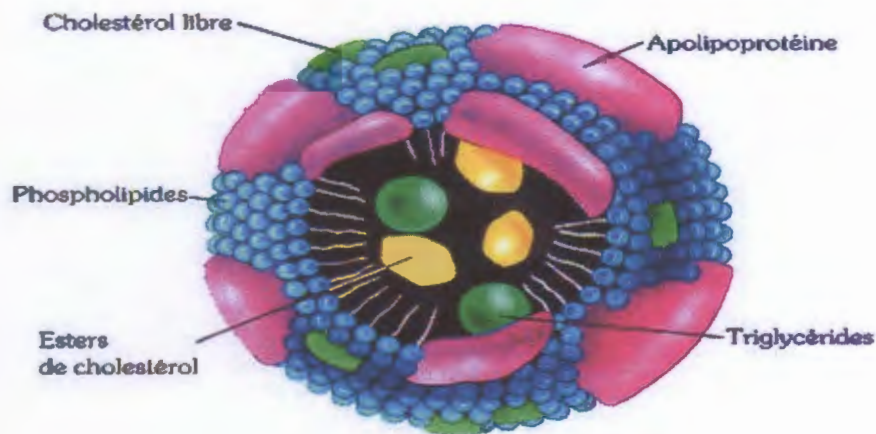


Figure 3. Structure d'une lipoprotéine (Saïle et Taki, 2007).

#### III.1.1. Hypercholestérolémie :

Tout comme les autres lipides sanguins, le cholestérol n'est pas soluble dans le sang. Pour y circuler et être acheminé aux cellules, il a besoin d'être transporté par des substances appelées lipoprotéines. Le tableau 4, illustre les deux principaux types de lipoprotéines.

\* Les HDL, on les associe au « bon cholestérol ». Elles entraînent le cholestérol vers le foie et ont un effet nettoyant dans les vaisseaux sanguins. La quantité de HDL-cholestérol ne doit pas être inférieure à environ 1mmole, soit 0,4 g/l pour les hommes ou 0,5 g/l pour les femmes. Cependant les LDL, on les associe au « mauvais cholestérol ». Si elles sont trop abondantes dans le sang, elles peuvent se déposer sur les parois des artères et y pénétrer. La quantité de LDL-cholestérol doit être inférieure à 4,1 mmol/l soit 1,6 g/l (Morin et *al.*, 2003).

Tableau 4. Les différents types de lipoprotéines (Lüllmann et Mohr, 2003).

	Site de formation	Densité	Durée de vie dans le plasma (h)	Diamètre nm
<b>Chylomicron</b>	Epithélium intestinal	< 0,95	0,2	500
<b>VLDL</b>	Fois	0,95-1,006	3	100-200
<b>LDL</b>	Sang	1,006-1,063	50	25
<b>HDL</b>	Fois	1,063-1,210	/	5-10

VLDL : very low density lipoprotein / LDL: low density lipoprotein / HDL: High density lipoprotein

\* On parle d'hypercholestérolémie à partir de 6,5mmol soit 2,5g/l, au dessus de ce taux, on estime le risque cardiovasculaire en fonction des facteurs de risques associés. Dans les cas limites, on dose séparément le HDL-cholestérol, qui protège contre le risque de maladies coronariennes, et le LDL-cholestérol qui, au contraire, l'accroît et dont le taux constitue, par conséquent, le meilleur indicateur d'un risque cardiovasculaire, et de la nécessité d'un traitement (Morin *et al.*, 2003).

### III.1.2. Hypertriglycéridémie :

On parle d'Hypertriglycéridémie lorsque la concentration plasmatique des triglycérides (TG) excède 2,3 mmol/L (200 mg/dL) chez l'adulte et 1,6 mmol/L (140 mg/dL) chez les sujets de moins de 20 ans (Delzenne, 2008). Elle est donc toujours associée à une augmentation soit du taux de chylomicrons, soit du taux de VLDL dans le sérum (Morin *et al.*, 2003).

Un nombre croissant d'études démontre que l'hypertriglycéridémie, particulièrement en période postprandiale, est un risque important de développement de maladies cardiovasculaires. Des études épidémiologiques prospectives, et des études cliniques de cas, révèlent que l'importance de la durée de l'hypertriglycéridémie postprandiale sont deux facteurs clés dans l'évolution de l'athérosclérose, tant chez la femme que chez l'homme. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette relation (Delzenne, 2008).

### III.2. Physiopathologie :

#### III.2.1. Pathogénie des hyperlipidémies :

L'excès de production des lipides sanguins peut résulter de plusieurs mécanismes : d'une augmentation de biosynthèse des TG par l'hépatocyte par augmentation du flux des substrats : hyperglycémie, acides gras (antigènes) circulant, oestrogènes à fortes doses, glucocorticoïdes, comme il peut être relatif à un excès de production de l'apoprotéine B après avoir une mutation génétique du récepteur des LDL qui conduit à une augmentation du cholestérol total (souvent très élevé, > 3 g/l) et du LDL-cholestérol également très élevé (> 2,20 g/l en moyenne). Cependant les anomalies du métabolisme intravasculaire des lipoprotéines est liée soit à un défaut d'activité de la lipoprotéine lipase par anomalie intrinsèque et ou extrinsèque, soit à un défaut d'activité d'autres enzymes LCAT (lécithine cholestérol anyl transférase), CETP (cholestérol transférase protéine) ou la lipase hépatique (El Gandaoui *et al.*, 2007).

#### III.2.2. Classification :

##### III.2.2.1. Les hyperlipidémies primitives :

Deux classifications sont reconnues au plan international, celle de **Frederickson** qui repose sur les données de l'électrophorèse et est définie par le type de lipoprotéine dont la concentration plasmatique est augmentée. La deuxième classification est la classification de **De Gennes** qui est plus simplifiée. Elle se base uniquement sur le taux du cholestérol total et des triglycérides (tableau 5) (El Gandaoui *et al.*, 2007).

**Tableau 5. Classification des hyperlipidémies primitives selon De Gennes**  
(El Gandaoui *et al.*, 2007).

<i>Classification de De Gennes</i>			
Groupe	Sérum à jeun	Rapport	Correspondance classification Frederickson
Hypercholestérolémie essentielle	Clair	CHT / TG >2.5g/l	II a
Hypertriglycéridémies majeures	Lactescent	TG / CHT >2.5g/l	I – IV - V
Hyperlipidémie mixte	Opalescent	CHT/TG ou TG/CHT 0.4 – 2.5 g/l	II b - III



**III.2.2.2. Les hyperlipidémies secondaires :**

Elle est secondaire à un état physiologique (grossesse), pathologique (rénale, hépatique, endocrinien ou maladies générale) ou à une prise médicamenteuse (El Gandaoui *et al.*, 2007). Elles sont résumées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 6. Les hyperlipidémies secondaires (Nuoffer, 2005).**

Hyperlipidémies	Etat pathologique
* Hypercholestérolémies	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hypothyroïdie</li> <li>- Anorexie mentale</li> <li>- Hépatopathies cholestatiques</li> <li>- Syndrome de Cushing</li> <li>- Syndrome néphrotique, insuffisance rénale, dialyse</li> </ul>
Hypertriglycéridémies	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Obésité</li> <li>- Diabète sucré</li> <li>- Glycogénoses du type I</li> <li>- Pancréatite</li> </ul>
Hyperlipidémies combinées	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Obésité</li> <li>- Diabète sucré</li> <li>- Glycogénoses du type I</li> <li>- Hépatite</li> <li>- Syndrome néphrotique, insuffisance rénale, dialyse</li> <li>- Médicaments: b-bloquants, corticoïdes, oestrogènes, thiazides</li> <li>- Lupus érythémateux disséminé</li> </ul>

**III.3. Stratégie thérapeutique :****III.3.1. Régime diététique :**

Dans tous les cas où il y a indication de traitement, la première mesure à proposer consiste à modifier l'alimentation des patients. Le traitement diététique repose sur la réduction globale de l'apport en graisses, l'augmentation du rapport des acides gras insaturés, la réduction de l'apport en cholestérol, un régime normolipidique, un régime hypocalorique en cas de surpoids, et la réduction de l'apport en certains sucres rapides et en alcools (Thissen, 1999).

Le plus souvent, une activité physique régulière et progressive est conseillée. Le traitement d'une maladie sous-jacente (diabète, etc.) doit également être entrepris. En dehors de certaines formes primitives qui doivent être traitées d'office, un traitement médicamenteux à base d'hypolipémiants ne doit être envisagé qu'après l'échec d'un régime correctement suivi (Morin *et al.*, 2003).

### III.3.2. Traitement à base de probiotiques :

Chez les gallinacés, des études ont montré l'effet positif de l'apport des probiotiques dans la ration sur le métabolisme des lipides sanguins. Le paramètre le plus étudié est le taux de cholestérol. Alors chez le lapin, peu d'études ont montré que l'ingestion du yaourt réduit la cholestérolémie des animaux. Par ailleurs, chez le rat, assez de travaux scientifiques ont montré une nette influence des probiotiques sur le métabolisme lipidique (**Idoui, 2008**).

Des tests *in vitro* ont montré une réduction du taux du cholestérol dans un milieu de culture avec certains *Lactobacillus*. Plusieurs hypothèses ont été mises pour expliquer ce fait, comme l'assimilation du cholestérol par les bactéries ou l'hydrolyse des sels biliaires conjugués (**Izquierdo, 2009**). Cependant **Taranto et al. en 1998** ont mis en évidence l'effet hypocholestérolémiant de *Lb. reuteri* CRL1098 consommé à  $10^4$  cellules par jour pendant 7 jours par des souris hypercholestérolémies dont la teneur totale en cholestérol a diminué de près de 40 % à la fin du traitement.

Dans une autre étude, les concentrations en acides biliaires et la proportion d'acides biliaires déconjugués dans des échantillons sanguins et de contenu digestif ont été comparées chez des souris gnotoxéniques sans lactobacilles et chez ces mêmes souris colonisées avec des souches de lactobacilles (*Lb. delbrueckii* et *Lb. fermentum*). La proportion de sels biliaires déconjugués et l'activité « bile salt hydrolase » (BSH) sont considérablement augmentées dans le contenu de l'intestin grêle des animaux hébergeant des lactobacilles (**Drouault et Corthier, 2001**).

Des études ont été réalisées sur des humains pour tester l'influence de la consommation des produits laitiers fermentés sur le taux de cholestérol sanguin, mais les résultats n'ont jamais été concluants (**Izquierdo, 2009**). Gilliland a montré que plusieurs bactéries, notamment *Lb. acidophilus* et *Bf. longum*, sont capables de limiter le taux de cholestérol sanguin chez des porcs nourris avec un régime riche en cholestérol. Ces mêmes bactéries sont capables d'assimiler le cholestérol *in vitro* en présence de taurocholate de sodium. Une partie de ce cholestérol assimilé (environ 20%) a notamment été retrouvée dans la membrane cellulaire de ces bactéries lactiques (**Drouault et Corthier, 2001**).



**III.3.3. Traitement médicamenteux :**

Il existe différents médicaments pour diminuer le taux de lipides plasmatiques, avec des mécanismes d'action et des effets différents sur les LDL et les VLDL (Lüllmann et Mohr, 2003). En fait les hypolipémiants peuvent être classés selon leurs différents modes d'action en 04 groupes de produits démontrés dans le tableau 7.

**Tableau 7. Les classes principales d'hypolipémiants (Lüllmann et Mohr, 2003 ; Morin *et al.*, 2003).**

Catégories	Médicaments	Mode d'action
<b>Fibrates</b>	Bézafibrates ciprofibrate finofibrates gemfibrozil	- Stimulent la destruction des lipides dans les vaisseaux sanguins et inhibent la synthèse du cholestérol par le foie. - augmentation de l'excrétion biliaire du cholestérol.
<b>Statines</b>	Atorvastatine Fluvastatine Pravastatine Rosuvastatine Simvastatine	- Empêchent l'action d'une enzyme (HMG-CoA réductase) intervenant dans la synthèse du cholestérol à partir d'une substance appelée acétyl-coenzyme A (ou acétyl-CoA). - Augmentation des récepteurs des LDL
<b>Les résines échangeuses d'ions</b>	Cholestyramine	- Bloquent le passage des acides biliaires dans le sang par la paroi intestinale. - Une réduction de la quantité de cholestérol.
<b>L'inhibiteur sélectif de l'absorption intestinale du cholestérol</b>	ézétimibe	- Se localise au niveau de la bordure en brosse de l'intestin grêle et inhibe l'absorption du cholestérol, entraînant une diminution des apports au foie du cholestérol intestinal.
<b>Tiadénol</b>	Fonlipol	-Baisse des lipides, des triglycérides et du cholestérol sanguins par le blocage de la synthèse endogène hépatique et intestinale et diminution de l'excrétion biliaire du cholestérol marqué exogène.

## *II. Matériel et Méthodes*

## II. Matériel et Méthodes

Notre travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de l'Université de Jijel. Il a pour objectif de recouvrir les points suivants :

- Isolement et purification de la microflore lactique des selles d'enfants ;
- Identification de la microflore lactique humaine par différents tests biochimiques ;
- Etude de la pharmacocinétique *in vitro* de la microflore lactique probiotique ;
- Evaluation *in vivo* de l'effet des probiotiques lactiques d'origine humaines vis-à-vis d'une hyperlipémie expérimentale comparativement à un médicament hypolipémiant.

### II.1. Matériel :

Pour la réalisation des différentes parties expérimentales ; *in vitro* aussi bien que *in vivo* ; on s'est servi du matériel suivant :

#### II.1.1. Matériel biologique :

##### II.1.1.1. Les selles d'enfant :

L'isolement d'un souchier lactique d'origine humaine a été mené sur un échantillon global représenté par les selles d'un enfant masculin sain âgé de 05 ans et récupérés au niveau de la Pédiatrie de l'hôpital de Jijel « Mohamed Sedik Ben Yahia ».

##### II.1.1.2. Les animaux :

L'étude *in vivo* est rapportée sur 12 rats mâles, de souche *wistar albinos*, de provenance Institut Pasteur d'Alger, pesant en moyenne 140g au début de l'expérimentation. Dès leur arrivée à l'âge de 06 semaines, ils sont maintenus en cage pendant une semaine d'adaptation.

##### II.1.1.3. Les souches bactériennes :

Mise à part de la microflore lactique humaine isolée, un autre souchier d'entérobactéries était effectivement utilisé afin d'étudier *in vitro* l'activité antibactérienne des souches lactiques isolées. Il s'agit de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ATCC 25921, *Escherichia coli*, *Proteus spp.* et *Klebsiella spp.*

##### II.1.1.4. Disques d'antibiotiques :

Pour montrer le comportement des bactéries lactiques humaines vis-à-vis des antibiotiques, cinq (05) disques d'antibiotiques ont été fournis pour réaliser un antibiogramme sur milieu solide qui sont : Erythromycine (15µg), Amoxicilline (25µg), Colystine (50µg), Pénicilline G (6µg) et Oxacilline (1µg).

#### II.1.1.5. Les sels biliaires :

Les sels biliaires de provenance Institut Pasteur d'Alger ont été utilisés pour l'étude du pouvoir des bactéries lactiques à résister à cet inhibiteur dans un milieu liquide.

#### II.1.1.6. Le tissu iléal :

Après le sacrifice d'un rat, la partie terminale de la cavité intestinale a été isolée afin d'étudier la capacité des bactéries lactiques isolées des selles d'enfants de s'adhérer *in vitro* au tissu iléal.

#### II.1.1.7. Le lait fermenté :

C'est du lait préparé au niveau du laboratoire, fermenté par les souches *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* et *Lb. casei* spp *casei*.

#### II.1.1.8. Le Médicament :

Pour l'étude comparative de l'effet hypolipémiant des souches probiotiques *in vivo*, un médicament (TORVAST®) de la famille des statines a été utilisé.

#### II.1.2. Milieux de cultures :

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés. Ils varient selon leur sélectivité ou non et leur emploi est dicté par la nature des germes recherchés.

- Milieu MRS (Man Rogosa Sharp) liquide et gélose : utilisés pour la culture des lactobacilles.
- Milieu GIBSON ABDEL-MALEK : pour la recherche de type fermentaire (préparé au laboratoire).
- Gélose Hecktoen : utilisée pour étudier l'activité antibactérienne;
- Gélose nutritive : afin d'établir les interactions bactériennes ;
- Milieu Moeller à ADH : pour la recherche de l'arginine dihydrolase.
- Milieu MEVAG sans sucre (milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides) : pour la réalisation des profils de fermentation des sucres.
- Les sucres : pour établir le profil des souches isolées (xylose, saccharose, lactose et ribose).
- Milieu PBS : pour la réalisation des dilutions.
- Lait écrémé : pour la culture des bactéries lactiques.

#### II.1.3. Produits chimiques et réactifs :

- Violet de gentiane, fushine, lugol, alcool : pour la coloration de Gram ;
- Cristal de violet : pour la coloration du tissu iléal ;

## **II.2. Méthodes :**

### **II.2.1. Isolement et purification des bactéries lactiques :**

#### **II.2.1.1. Préparation des dilutions :**

Après la récupération des selles d'enfant, on a procédé à la détermination du pH puis, 1g a été pesé aseptiquement et dilué dans 9 ml d'eau physiologique stérile pour obtenir une dilution de  $10^{-1}$  (solution mère). Cette dernière est homogénéisée par agitation électrique à l'aide d'un vortex et on a préparé les dilutions décimales jusqu'à  $10^{-7}$  dans le même diluant (Guiraud, 1998).

#### **II.2.1.2. Isolement :**

Une fois l'incubation est achevée, l'isolement des bactéries lactiques a été effectué par un ensemencement et étalement d'une goutte de chaque dilution à la surface du milieu MRS préalablement coulé et solidifié, suivi d'une incubation à 37°C pendant 24h dans des conditions d'anaérobiose en utilisant le ruban adhésif (Leveau *et al.*, 1991).

#### **II.2.1.3. Purification des souches :**

Cette étape consiste à effectuer un repiquage sur gélose MRS jusqu'à l'obtention des colonies de même taille, même forme qui renseignent sur la pureté des souches étudiées.

Le prélèvement et la remise en suspension se portera uniquement sur des colonies bien distinctes, homogènes et bien développées. Pour s'assurer de leur pureté, une coloration de Gram suivi d'une observation microscopique est effectuée pour chaque souche. Les souches purifiées sont par la suite conservées au réfrigérateur jusqu'à moment d'utilisation (Karam et Zadi- Karam, 1994).

### **II.2.2. Identification des bactéries lactiques :**

L'identification a été réalisée par les techniques de microbiologie classique :

#### **II.2.2.1. Examen macroscopique :**

Ce test vise à avoir une idée sur la taille des colonies, leurs couleurs et leurs formes sur les boîtes de Pétri après 24h d'incubation (Sharpe, 1979).

#### **II.2.2.2. Examen microscopique :**

On étale les bactéries sur une lame de verre, on les fixe par la chaleur, puis on les colore successivement avec une solution de violet de gentiane et un mordant qui est le Lugol .la préparation est ensuite traitée avec un solvant organique, tel que l'alcool. Certaines bactéries,

- Hématoxyline, éosine : pour la coloration des coupes histologiques ;
- La soude (NaOH) à 1N, NaOH (3N), acide acétique : pour l'ajustement du pH ;
- La soude dornic (N/9) et phénophtaléine 1% : pour la détermination de l'acidité ;
- Eau oxygénée, eau distillée ;
- Teinture de tournesol, Tween 80 ;
- Alcool 75%, 95% et 100% : utilisés dans la déshydratation et la réhydratation des tissus destinés à l'étude histologique ;
- Toluène : utilisé à la phase d'éclaircissement au cours d'étude histologique ;
- Paraffine : pour faire des blocs contenant des tissus destinés à l'étude histologique ;
- Eau gélatinée : sert au collage des coupes histologique ;
- L'huile à immersion pour l'observation microscopique ;
- Des galeries API 50 CHL (BioMérieux® Sa 50300) ;
- Coffret SPINREACT S.A, Spain : pour le dosage des lipides sanguins.

### II.1.4. Appareillages et autres:

Il s'agit des différents outils et appareils du laboratoire qui ont été utilisés, citons :

- Autoclave (SHI AVX electronic) ;
- Four Pasteur ;
- Réfrigérateur ;
- Spectrophotomètre ;
- Centrifugeuse (Bioblock Scientific centrifugeuse 55702) ;
- Bain marie (GERHRDT);
- Balance (DENYER instrument Xp-600) ;
- Agitateur magnétique (MEIDOL pH.MR 3001) ;
- Vortex électronique ;
- Etuve (WTB binder) ;
- Microscope optique (OLYMPUS) ;
- pH mètre ;
- Barres de Leukart ;
- Microtome ;
- Les disques de papier Wattman N°4 ;
- Membranes filtrantes 0.45µm ;
- Bec Bunsen, boîtes de pétries, tubes à essais, flacons et béchers, pipettes graduées, pipettes pasteur, micropipettes... etc.



dites à Gram positif, résistent à la décoloration par l'alcool. Les autres, appelées bactéries à Gram négatif, sont rapidement décolorées. Après cela, on procède à une recoloration avec un colorant rouge, comme la fuchsine diluée. Les bactéries à Gram positif apparaissent alors en violet, tandis que les bactéries à Gram négatif, qui acceptent la fuchsine, sont de couleur rose (Joffin et Leyral, 2006).

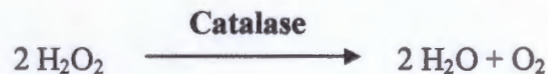
#### **II.2.2.3. Test de croissance à différentes températures :**

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Pour cela le bouillon MRS est inoculé en double avec les souches étudiées dans des tubes à essai. Ensuite une série sera incubée à 46°C et une autre à 15°C pendant 24h à 48h. Les bactéries mésophiles poussent à 15°C alors que les bactéries thermophiles ne le font pas. Le trouble du bouillon témoigne d'une croissance (Sharpe, 1979).

#### **II.2.2.4. Tests biochimiques :**

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

Pour mettre en évidence cette enzyme, nous avons émulsionné la culture bactérienne à tester dans l'eau oxygénée sur une lame en verre. La présence d'une catalase se manifeste par l'apparition des bulles d'oxygène selon la réaction suivante (Lambin, 1969) :



##### **b. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH) :**

La mise en évidence de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques, elle libère l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et la citruline à partir de l'arginine.

Pour réaliser ce test, on aensemencé chaque tube de milieu Moeller à l'arginine par une des souches à tester et on incube à 37°C pendant 24h. La dégradation de l'arginine et la libération d'ammoniac empêchent le virage de couleur au jaune (Joffin et Leyral, 2006).

##### **c. Recherche du type fermentaire :**

Ce test permet de distinguer les bactéries lactiques en homofermentaire et hétérofermentaire. Pour cela on a préparé le milieu de culture Gibson Abdel Malek (voire annexe I) préalablement fondu, refroidi et solidifié en position verticale dans lequel les souches à tester ont été ensemencées par piqûre centrale en profondeur. Ensuite, un bouchon de la gélose

blanche stérile est ajouté en surface de chaque tube. Après l'incubation à 37°C pendant 05 à 07 jours, la production de gaz se manifeste par une discontinuité entre le milieu et le bouchon de la gélose blanche (figure 4), (Gibson et Abd-El-Malek, 1945).

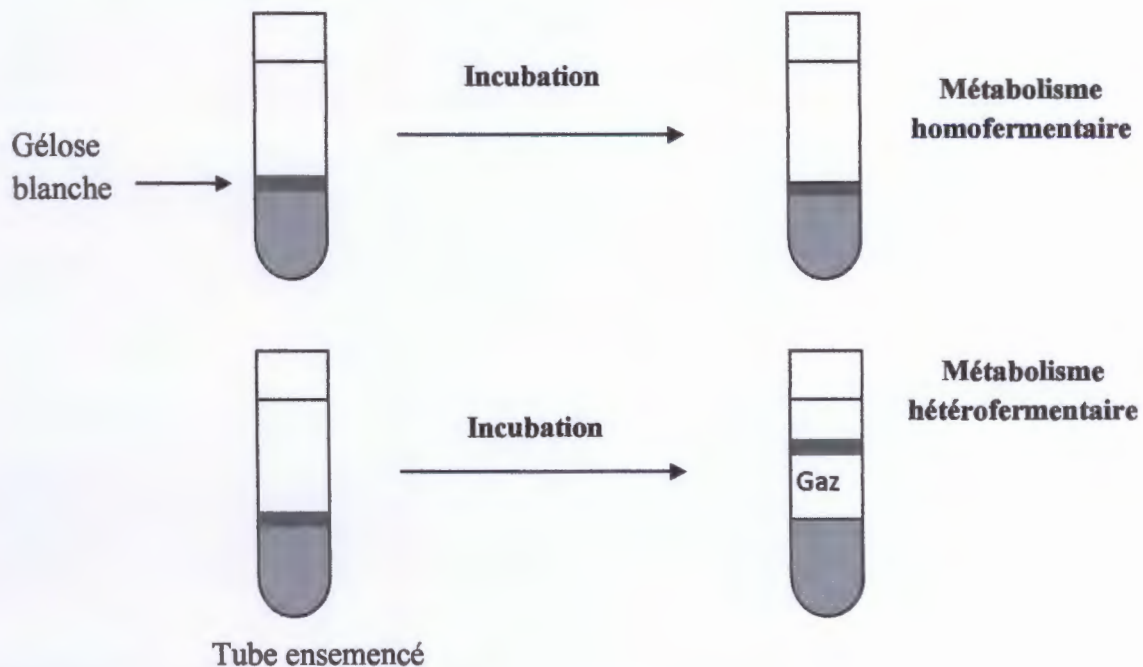


Figure 4. Technique de recherche du type fermentaire.

#### d. Profil fermentaire des sucres :

Ce test permet d'apprécier la capacité des souches étudiées à fermenter quelques sucres (Xylose, Saccharose, Lactose, Ribose). Pour cela on a ensemencé chaque souche dans un tube contenant le milieu MEVAG additionné du sucre en sujet. Pour favoriser l'anaérobiose, on verse une couche de l'huile de paraffine et les résultats sont lus après 24h d'incubation. Le virage de la couleur vers le jaune indique l'utilisation de sucre par la bactérie (Guiraud, 1998).

#### e. Identification par Galerie API 50 CHL et Logiciel API LAB :

La galerie API50 CH associée au milieu API 50CHL permet d'étudier le profil de la fermentation de 49 sucres par les souches étudiées. Dans une première étape, on s'est assuré de la pureté des souches, en prélevant une colonie bien isolée dans 0,3ml d'eau distillée stérile, après homogénéisation, on inonde une boîte de Pétri contenant la gélose MRS. La boîte est ensuite incubée à 37°C / 24h.

Après incubation, toute la culture est raclée et homogénéiser avec 2 ml d'eau distillée stérile. La standardisation de cet inoculum est faite à une  $DO_{620\text{ nm}} = 0,8$  à 1,0. Enfin l'inoculum est réparti dans les puits de la galerie et pour favoriser l'anaérobiose, on remplit la surface des cupules par de l'huile. Les résultats sont lus après une incubation à 37°C/ 24h, 48h et 7 jours (Le test est positif lorsque la couleur vire vers le jaune, sauf pour l'esculine qui vire vers le noir).

Le traitement informatique des profils des souches est réalisé par logiciel API LAB au niveau du Laboratoire de Biologie des Micro-organismes et Biotechnologie de l'université ES-SENIA ORAN.

### **II.2.3. Etude de la pharmacocinétique des bactéries lactiques *in vitro* :**

Avant d'entamer des essais *in vivo*, il faudrait conduire des études *in vitro* efficaces pour déterminer les aptitudes probiotiques des souches lactiques.

#### **II.2.3.1. Tolérance aux acides :**

A fin de déterminer l'aptitude des bactéries lactiques à pousser en présence du suc gastrique, la méthode décrite par Lin *et al* (2007) a été appliquée comme suit :

- a. **Préparation de la suspension du jus gastrique :** Après le sacrifice d'un rat, le contenu gastrique est prélevé à partir de son estomac. Ensuite nous avons préparé cette suspension par un mélange de 1V du contenu gastrique avec 2V d'eau physiologique stérile. Après homogénéisation et centrifugation de la suspension à 3000 tours/min pendant 30 min, on récupère le surnageant dans un tube stérile et on mesure son pH (pH : 6,19), puis ce dernier est filtré par une membrane de porosité 0,45  $\mu\text{m}$  et stocké à (-18°C) jusqu'à moment d'utilisation.
- b. **Préparation des cultures bactériennes :** Avant de réaliser ce test, des cultures bactériennes jeunes ont été préparées par ensemencement des souches âgées sur bouillon MRS et incubation à 37°C pendant 18h. Le culot bactérien a été récupéré après centrifugation à 6000 trs/min pendant 10 min.

- c. **Mesure de la densité optique (DO) et dénombrement :** Chaque tube contenant le culot bactérien reçoit 4ml du jus gastrique déjà préparé. La tolérance est estimée par mesure de la DO à 620 nm et le calcul du nombre de cellules avant et après incubation à 37°C pendant 3h.

#### **II.2.3.2. Tolérance aux sels biliaires :**

La croissance en présence des sels biliaires donne des renseignements précieux sur la survie des bactéries lactiques en présence de ce facteur hostile. Pour mettre en œuvre cette aptitude, 20 tubes contenant du bouillon MRS ont été préparés dont 10 tubes témoins seront ensemencés par les souches à tester, alors que les 10 tubes restants seront additionnés de 0.3% de sels biliaires et ensemencés par les mêmes souches. Ensuite l'ensemble des tubes est soumis à une incubation pendant 4h à 37°C. Enfin, les résultats de ce test seront exprimés par la mesure de la DO à 620 nm et le calcul du nombre de colonies avant et après l'incubation (Lin *et al.*, 2007).

#### **II.2.3.3. Interactions bactériennes :**

L'étude des interactions entre les bactéries peut se manifester par une symbiose où les souches peuvent vivre ensemble, une stimulation ou un effet antagonisme où une souche peut inhiber la croissance d'une autre souche. La méthode de Shillinger et Lucke(1989) a été appliquée :

##### **a. Interactions entre les bactéries lactiques :**

Pour étudier les interactions entre les bactéries lactiques, des souches jeunes de lactobacilles ont été utilisées. Les souches indicatrices sont ensemencées en masse sur gélose nutritive préalablement coulée et solidifiée et lorsque les boîtes de Pétri sont bien séchées, on dépose des disques imbibés par les mêmes souches en surface (souches en touche : 10µl/disque). Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24h (figure 5). L'effet antagoniste se manifeste par l'apparition des zones d'inhibitions autour des disques.

##### **b. Interactions entre les bactéries lactiques et les entérobactéries :**

Ce test consiste à étudier l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis à vis des entérobactéries habituellement pathogènes, qui est basé sur l'application de la méthode de diffusion sur disques (figure 5). En effet les entérobactéries sont ensemencées par inondation sur gélose Hecktoen déjà coulée et solidifiée et cela après standardisation de chaque inoculum

( $0,8 > DO_{620nm} > 1$ ), puis les disques imbibés par les souches de lactobacilles étudiées ( $10\mu\text{l}/\text{disque}$ ), sont déposés à la surface de la gélose. L'incubation est faite à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24h. L'effet antagoniste se manifeste par l'apparition des zones d'inhibitions autour des disques.

#### **II.2.3.4. Activité inhibitrice des surnageants :**

L'activité inhibitrice du surnageant natif et celui ajustée à pH 6 a été également évaluée par application de technique décrite par Tagg *et al.* (1976).

Des cultures bactériennes âgées de 18h ont été soumises à une centrifugation à 7000 tr/10min, ensuite, les surnageants étaient filtrés sur membrane une de  $0,22\mu\text{m}$ , puis, les filtrats obtenus étaient divisés en deux volumes dont le premier est dit natif, le deuxième était ajusté à pH 6 avec du NaOH (3N). Après incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24h, les résultats seront exprimés par la mesure de diamètre des zones d'inhibitions autour de chaque disque. La technique appliquée est élucidée par la figure 5.

#### **II.2.3.5. Résistance aux antibiotiques :**

Pour réaliser ce test, la méthode de l'antibiogramme en milieu solide a été appliquée. Chaque inoculum bactérien a été standardisé dont la DO varie entre 0,09 et 0,1, puis ensemencé par inondation de la gélose MRS déjà coulée et solidifiée, les boîtes sont par la suite séchées. Chaque boîte reçoit cinq (05) disques antibiotiques à savoir : Pénicilline-G (P), Amoxicilline (A), Erythromycine (E), Colystine (C), Oxacilline (O). Les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés après incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24h

Par convention, la souche est considérée résistante pour un diamètre d'inhibition inférieur à 15mm et pour un diamètre supérieur ou égal à 15mm la souche est sensible (Joffin et Leyral, 2006).

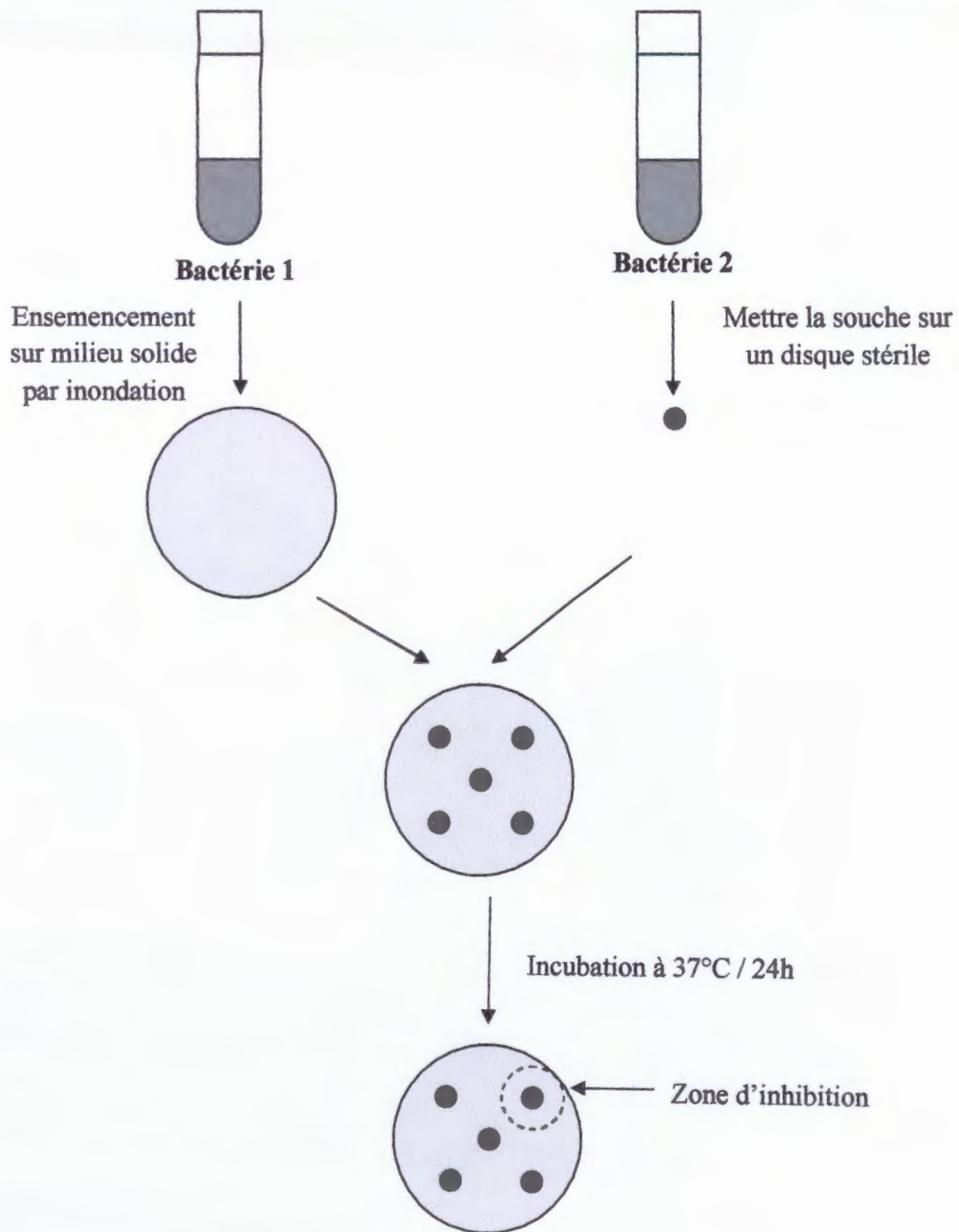


Figure 5. Technique de diffusion sur gélose.

#### II.2.3.6. Adhésion des bactéries lactiques aux cellules épithéliales :

Ce test consiste à étudier la capacité des bactéries lactiques à effet probiotique de s'adhérer à l'épithélium intestinal. Pour se faire, la méthode comportant trois étapes, décrite par Lin *et al.* (2007) a été appliquée :

- a. **Préparation des cellules épithéliales** : avant de mettre en œuvre le test d'adhésion, un segment de l'iléum d'un rat (photo 1) a été ouvert et lavé avec le tampon phosphate salin stérile (PBS, pH7, 2), puis tenu dans le PBS à 4°C pendant 30min, pour être lavé par la suite trois fois avec le PBS stérile. La suspension cellulaire a été examinée par microscope pour assurer qu'elle n'était pas contaminée et que la concentration des cellules épithéliales était approximativement  $5 \times 10^4$  cellules/ml.
- b. **Préparation de cultures jeunes de bactéries lactiques** : les cultures bactériennes jeunes ont été préparées par ensemencement des cultures âgées dans le bouillon MRS et incubation à 37 °C pendant 18h. Ensuite ces cultures sont centrifugées à 7000 trs/min pendant 10min et le culot de chaque souche a été récupéré.
- c. **Réalisation du test** : le culot de chaque souche bactérienne est soumis à une dilution sur PBS jusqu'à  $10^{-8}$  afin d'obtenir une concentration cellulaire de  $1 \times 10^8$  cellules/ml. Ensuite 1ml de la dilution  $10^{-1}$  de chaque culture est mélangé avec 1ml de la suspension des cellules épithéliales déjà préparée. Après incubation à 37°C pendant 40min, une préparation de frottis et une coloration au cristal violet ont été réalisées pour observer l'adhésion au microscope optique. Le test est considéré comme positif si le nombre de bactéries adhérees est supérieur à 15.



**Photo 1. Segment d'iléum.**

## II.2.4. Evaluation *in vivo* de l'effet hypolipémiant des probiotiques lactiques comparativement à un médicament hypolipémiant :

### II.2.4.1 : Répartition des animaux et régime alimentaire :

Les 12 rats ont été répartis sur trois lots ( $n = 4$ ). Après une période d'adaptation de 7 jours, les animaux du lot témoin reçoivent un régime standard composé d'un aliment de base, c'est du granulé et de l'eau à volonté, en revanche et dans l'objectif de provoquer une hyperlipémie expérimentale, les rats des lots 2 et 3 étaient soumis pendant deux semaines au même régime alimentaire mais l'aliment est à 19% de matière grasse d'origine animale et l'eau à 1% de sels biliaires (figure 6). En effet, l'utilisation de granules incorporés du gras permet d'augmenter le taux de cholestérol sanguin bien que l'eau additionnée de sels biliaires facilite l'absorbance du gras ingéré.

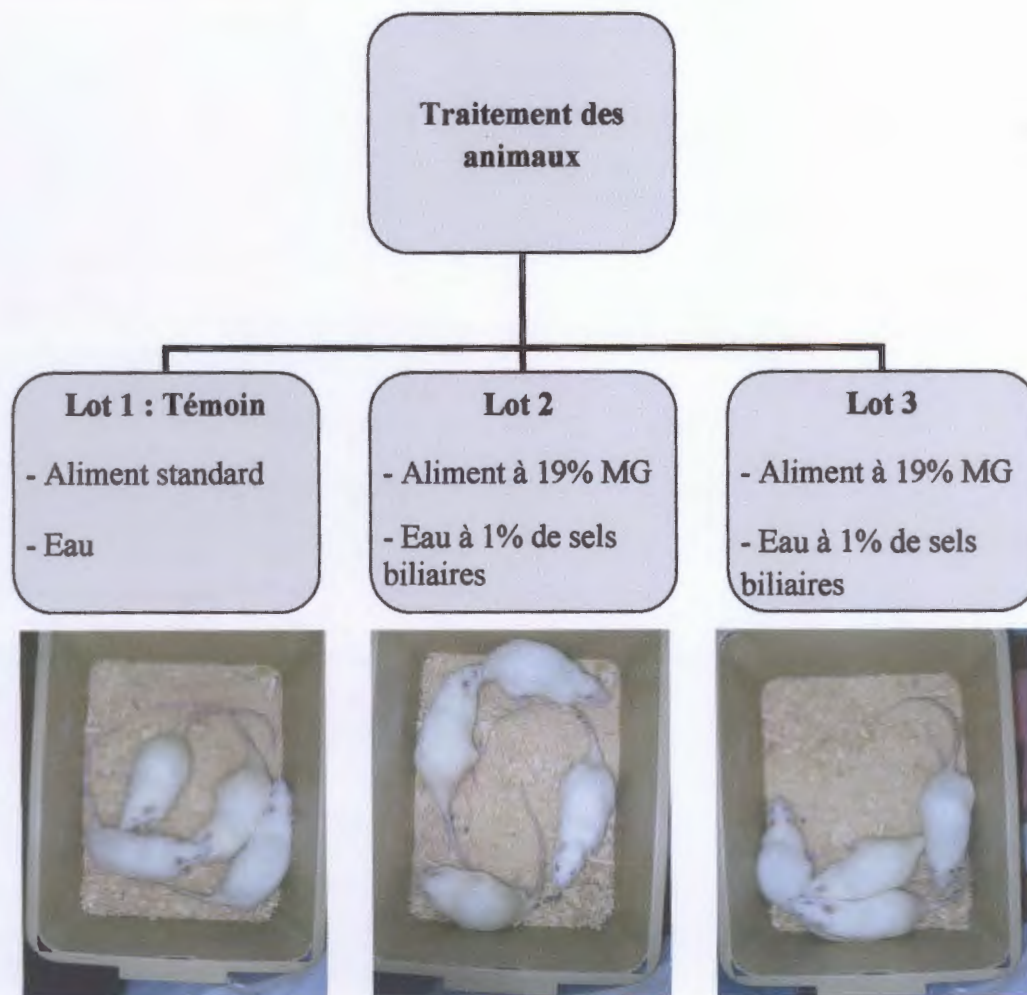


Figure 6. Répartition des animaux et régime alimentaire.



Après apparition des signes d'une hyperlipémie, un traitement à base de lait fermenté par des souches lactiques et un autre à base du médicament TORVAST® a été appliqué aux animaux du lot 2 et 3 respectivement. La figure 7 ci-dessous illustre les différences entre le traitement des lots :

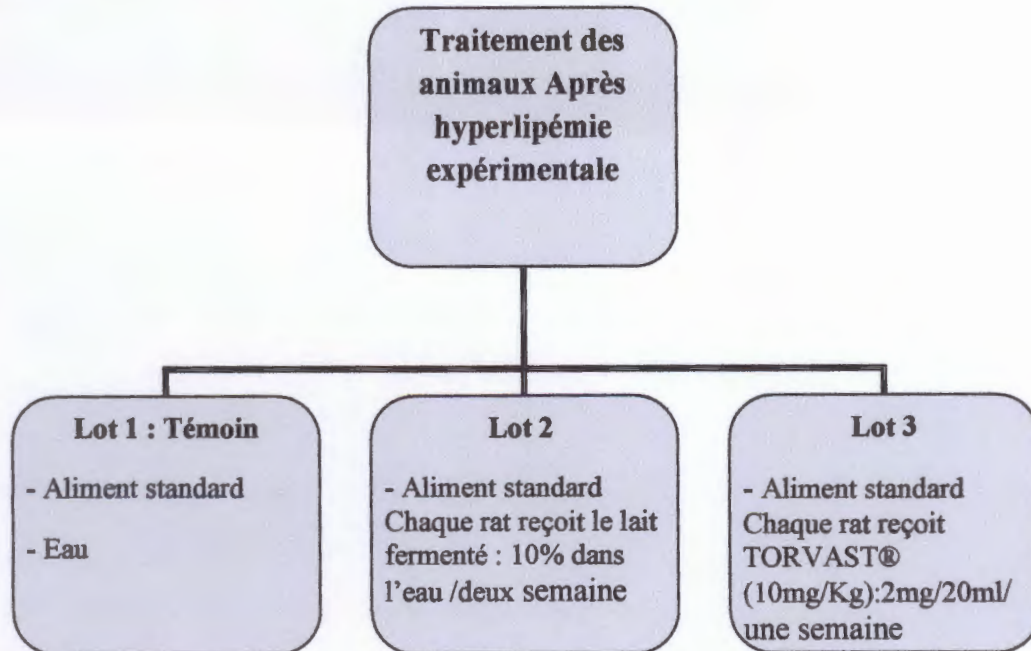


Figure 7. Traitement des animaux après une hyperlipémie.

**II.2.4.2. Préparation du lait fermenté :**

Deux espèces de bactéries probiotiques *Lb. delbruckii ssp bulgaricus* (S3) et *Lb. casei ssp casei* (S9) ont été sélectionnées pour la préparation d'un lait fermenté qui servira pour le traitement des rats du lot 2. Le diagramme de la préparation du lait fermenté est illustré par la figure 8 ci -dessous:

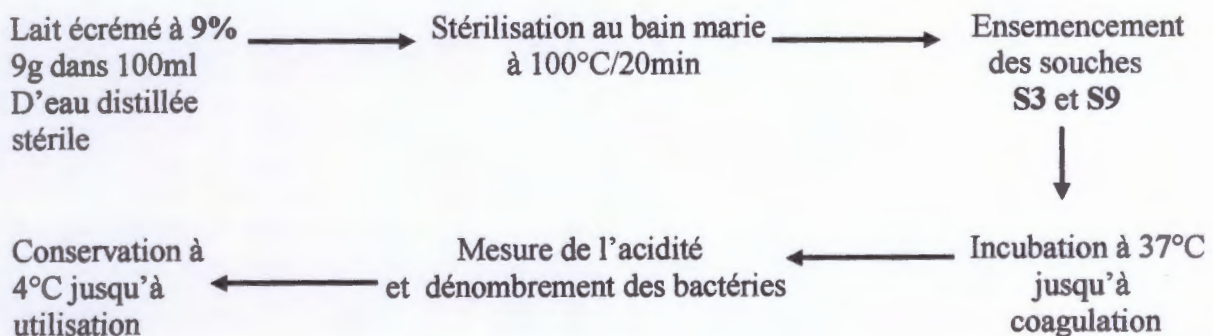


Figure 8. Technique de préparation du lait fermenté.

**a. Mesure du pH :**

Le pH est déterminé sur un volume de 10 ml de lait sous agitation, pour se faire l'électrode du pH mètre est prolongé dans le bêcher contenant l'échantillon. La valeur du pH est enregistrée sur l'écran (Hariri *et al.*, 2009).

**b. Mesure de l'acidité :**

La détermination de l'acidité du lait permet d'apprécier la quantité d'acide lactique produite par les bactéries lactiques. En effet 10 ml du lait sont mis dans un bêcher puis on a ajouté 5 gouttes de phénophtaléine 1%. Ensuite, il sera titré avec la soude dornic (N/9) jusqu'au virage au rose palle qui doit persister au moins 10 secondes (Hariri *et al.*, 2009). L'acidité en degré dornic est donnée par la formule suivante :

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

$V_{\text{NaOH}}$  : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acidité de l'échantillon.

**II.2.4.3. Paramètres évalués :**

Après l'arrêt du régime alimentaire, les animaux de l'expérimentation ont été soumis à un traitement qui est démontré dans la figure ci-dessous :

**a. Poids des animaux et d'aliment consommé:**

Les animaux sont pesés individuellement chaque semaine pendant un mois. Au cours de cette période, la consommation d'aliment est mesurée afin de calculer l'indice de consommation moyen (IC) des animaux selon la formule suivante :

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

**b. Dosage des lipides sanguins :**

La méthode de dosage de différents paramètres plasmatiques (Cholestérol total, Triglycérides, HDL cholestérol et LDL cholestérol) est effectuée par une méthode colorimétrique à l'aide du Kit SPINREACT, S.A. Spain. Le principe de cette méthode repose sur la technique de la spectrophotométrie.

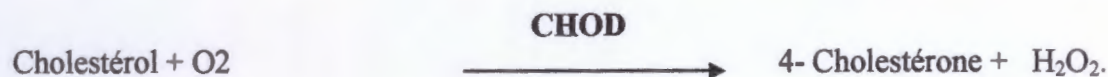
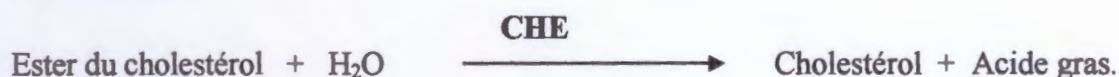
Pour réaliser ce dosage, le sang des rats a été prélevé à la fin de chaque semaine par ponction rétroorbitale dans des tubes héparinés (photo 2) puis centrifugés à une vitesse de 3000 trs/min pendant 10 min pour récupérer le sérum.



Photo 2. Prélèvement sanguin.

• **Dosage du cholestérol total (CHT) :**

Le cholestérol total est dosé par une méthode colorimétrique enzymatique, qui produit un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie selon les réactions suivantes (Richmond, 1973) :



La concentration de quinonimine est proportionnelle à la concentration du cholestérol. Les échantillons du sérum des rats et l'étalon sont mis en présence du réactif de travail pour le cholestérol total (Coffret SPINREACT 1001090) suivant les volumes indiqués ci-dessous (tableau 8).

Tableau 8. Préparation des échantillons pour le dosage du cholestérol total.

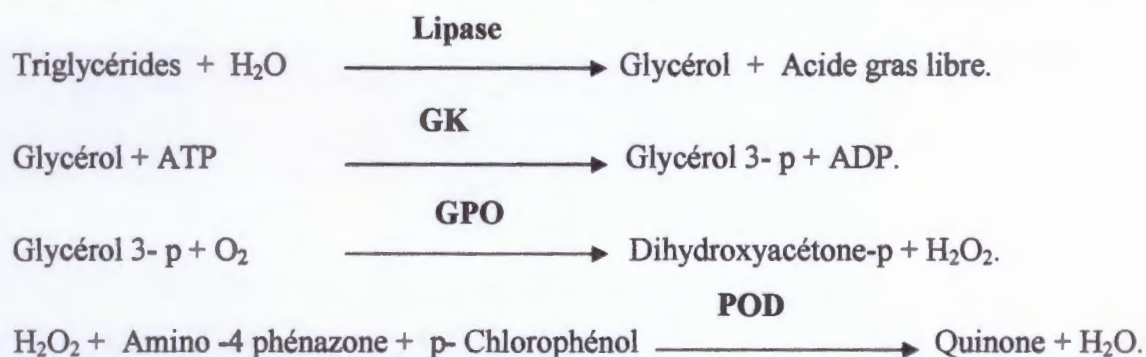
	Blanc	Etalon	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Réactif de travail	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Eau distillée	10 µl	/	/	/	/
Etalon	/	10 µl	/	/	/
Sérum	/	/	10 µl	10 µl	10 µl

Après une incubation des tubes pendant 10 min à température ambiante, la densité optique (DO) est mesurée à 505 nm puis la concentration du cholestérol (CHT) est calculée selon la formule suivante :

$$\text{CHT (g/l)} = \frac{\text{DO}_{\text{Echantillon}}}{\text{DO}_{\text{Etalon}}} \times 2$$

• **Dosage des triglycérides (TG) :**

Les triglycérides sont dosés selon la méthode de **Bucolo et David (1973)** à l'aide du test combinaison GPO/POD (Coffret SPINREACT 1001310) selon le principe suivant :



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration des triglycérides présents dans l'échantillon. Les échantillons du sérum des rats et l'étalon sont mis en présence du réactif de travail pour les triglycérides selon le tableau suivant (tableau 9):

**Tableau 9. Préparation des échantillons pour le dosage des triglycérides.**

	Blanc	Etalon	Lot 1	Lot 2	Lot 3
<b>Réactif de travail</b>	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
<b>Eau distillée</b>	10 µl	/	/	/	/
<b>Etalon</b>	/	10 µl	/	/	/
<b>Sérum</b>	/	/	10 µl	10 µl	10 µl

Les tubes sont bien agités et incubés pendant 10 min à température ambiante puis la DO est mesurée au spectrophotomètre à 505 nm. La concentration des triglycérides est déterminée par la formule suivante :

$$\text{TG (g/l)} = \frac{\text{DO}_{\text{Echantillon}}}{\text{DO}_{\text{Etalon}}} \times 2$$

• **Dosage du cholestérol des HDL :**

Le cholestérol des HDL est déterminé après précipitation des chylomicrons, les VLDL et les LDL par addition d'acide phosphotungstique et d'ion  $Mg^{2+}$  à l'échantillon (Coffret SPINREACT 1001095) selon le tableau ci-dessous (tableau 10) (Grove, 1979) :

**Tableau 10. Technique de préparation des échantillons.**

	Lot 1	Lot 2	Lot 3
<b>Réactif de travail</b>	50 µl	50 µl	50 µl
<b>Sérum</b>	500 µl	500 µl	500 µl

Après centrifugation des tubes des échantillons avec une vitesse de 4000 trs/min pendant 20 min, la concentration des HDL cholestérol qui reste dans le surnageant est déterminée par la même méthode colorimétrique enzymatique du cholestérol total qui est démontrée dans le tableau 11

**Tableau 11. Préparation des échantillons pour le dosage du HDL cholestérol.**

	Blanc	Etalon	Lot 1	Lot 2	Lot 3
<b>Réactif de travail</b>	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
<b>Eau distillée</b>	10 µl	/	/	/	/
<b>Etalon</b>	/	10 µl	/	/	/
<b>Surnageant</b>	/	/	10 µl	10 µl	10 µl

**Réactif de travail :** réactif pour cholestérol total.

**Etalon :** étalon pour cholestérol total.

**Surnageant :** surnageant du tube d'échantillon après centrifugation.

Après une incubation pendant 10 min à température ambiante, la lecture de l'absorbance contre le blanc est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à 505 nm puis la concentration en cholestérol des HDL est donnée par la formule ci-dessous :

$$\text{HDL (g/l)} = \frac{\text{DO Echantillon}}{\text{DO Etalon}} \times 2$$

- **Cholestérol des LDL :**

Le cholestérol des LDL est déterminé en utilisant la formule de **Friedewald *et al* (1972)** :

$$\text{LDL (g/l)} = \text{Cholestérol total} - \text{Triglycérides} / 5 - \text{Cholestérol des HDL}$$

#### **II.2.4.4. Traitement des échantillons destinés à l'histologie :**

L'étude histologique est basée sur la réalisation des coupes de tissus organiques suffisamment fines pour la coloration des couches cellulaires soit visible et transparente au microscope optique. Pour cela chaque étude histologique nécessite une série de traitements par différents produits chimiques appelés circulation afin de les rendre assez dures et non cassable à la coupe. Un autre traitement appelé coloration permet d'obtenir un contraste suffisant afin que les tissus soient bien visibles à l'exploration microscopique.

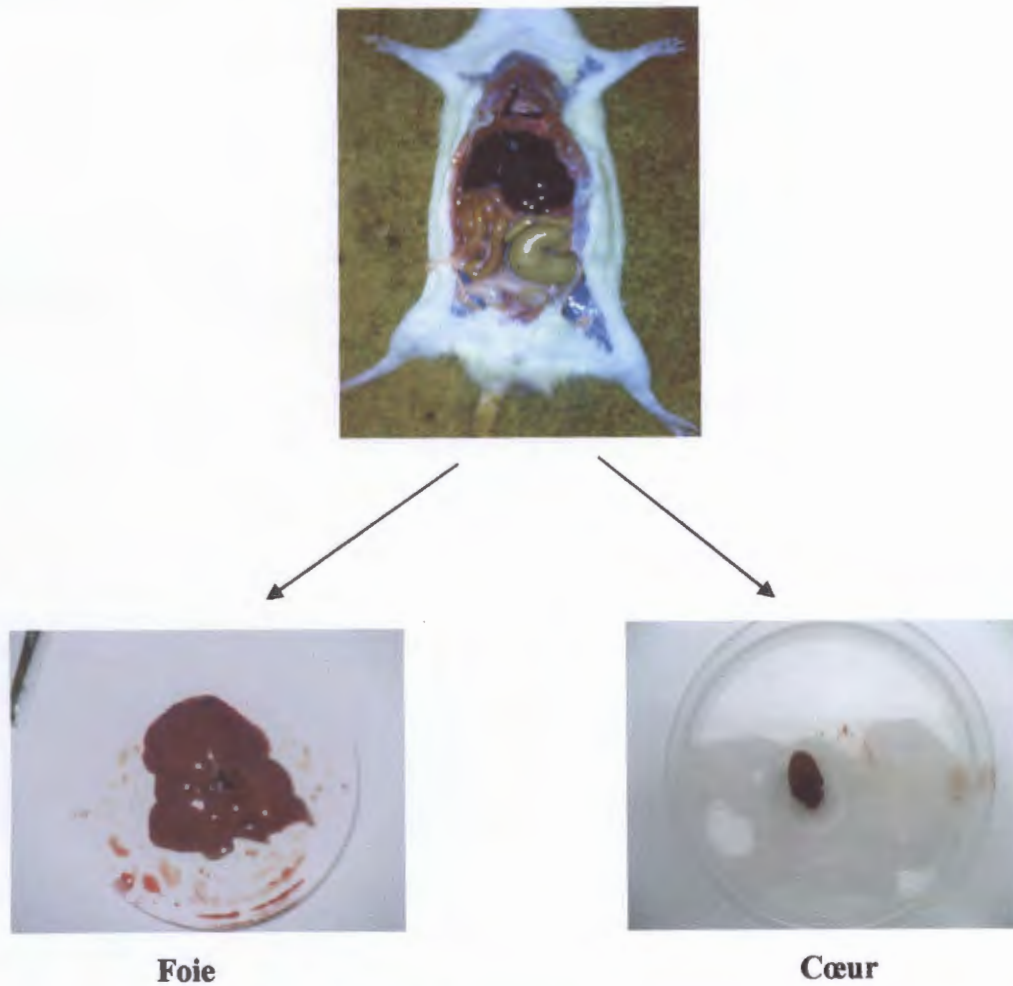
Les coupes histologiques ont été réalisées selon la technique rapportée par **Geraldine (2008)**. En effet, les animaux choisis de chaque lots sont sacrifiés dont l'abdomen est ensuite ouvert et exploré afin de voir l'aspect des organes (foie et cœur) (photo 3). Les organes en sujet recueillis ont été placés dans 20ml de Bouin fixateur pendant 4 jours afin d'immobiliser les constituants cellulaires et tissulaires. Les fragments ensuite ont été déshydratés par passages successifs dans 3 bains d'alcool à différente concentration pendant 2 heures pour chaque bain qui sont de l'alcool à 75%, 95% et 100%.

Après cette étape, les fragments des organes sont imprégnés dans 3 bains de toluène pendant 2 heures. L'inclusion à la paraffine a ensuite été réalisée par passage des échantillons déshydratés dans 3 bains de paraffine chauffée à 56°C pendant 3 heures pour chaque bain. Les échantillons ont enfin été moulés dans la paraffine à l'aide de barres de **Leukart**, et conservés à température ambiante jusqu'à la réalisation des coupes.

Puis, les échantillons ont été coupés à l'aide d'un microtome (épaisseur : 3µm) et les coupes ont été placées sur des lames gélatinées, séchées à l'air libre pendant quelques minutes puis chauffées sur une plaque à 40°C. Les lames ont ensuite été déparaffinées par un traitement au toluène (3 bains successifs de 10 minutes), puis réhydratées dans des bains d'alcool à teneur décroissante (alcool absolu : 15 min ; alcool 95° : 10 min ; alcool 80° : 10 min ; eau distillée : 10 min).

Par la suite, les lames ont été colorées à l'éosine hématoxyline de **Harris**, dont le but étant de renforcer le contraste entre les constituants cellulaires et tissulaires. Les lames ont d'abord été placées dans un bain d'hématoxyline durant 2 minutes, puis rincées à l'eau courante avant d'être trempées dans un bain d'éosine. Après cette seconde coloration, les lames ont été rincées à l'eau courante, puis à l'alcool 70°, et enfin avec du toluène.

Finalement, les coupes ont enfin été montées entre lame et lamelle à l'aide de baume de canada, puis séchées pendant une heure suivies d'une lecture microscopique.



**Photo 3. Sacrifice de l'animal et prélèvement d'organes.**

### *III. Résultats et Discussion*



### III. Résultats et Discussion

#### III.1. Mise en place d'une collection de bactéries lactiques d'origine humaine :

##### III.1.1. Isolement, purification des bactéries lactiques et examen macroscopique:

A travers cette étude, on a contribué à la mise en place d'une collection de souches de bactéries lactiques locales, isolées à partir d'une niche écologique humaine, en l'occurrence les selles d'enfants. En effet, la purification de ces souches isolées, nous a permis l'obtention de 20 souches pures.

Sur le milieu MRS, les colonies obtenues sont examinées à l'œil nu, ce sont des colonies de différentes tailles, bien isolées, de couleur blanchâtre, de taille très fines variable, de surface lisse plus ou moins bombées et de contour régulier. On a noté également que les colonies de chaque boîte sont de même taille et même couleur témoignant de la pureté des souches.

##### III.1.2. Examen microscopique :

L'examen microscopique après coloration de Gram a révélé que toutes les souches bactériennes retiennent la couleur bleue violacée de violet de gentiane, ce qui indique que ce sont des Gram positifs. En ce qui concerne la forme et la disposition des cellules, l'examen microscopique révèle que ces dernières sont des bâtonnets isolés ou disposés en chaînettes.

##### III.1.3. Tests physiologiques et biochimiques :

Après étude des caractères biochimiques et physiologiques, quinze (15) souches seulement présentées dans le tableau 12, ont été retenues sur les vingt isolées et purifiées, parce que les profils des souches non retenues ne correspondaient pas à ceux des bactéries lactiques, elles ont été éliminées au fur et à mesure de l'étude.

Tableau 12. Profils biochimiques des souches isolées.

Souches	Gram	Forme	Catalase	Croissance à différentes températures		ADH	Type fermentaire
				15 °C	46 °C		
S1	+	Bacille	-	-	+	-	Homo
S2	+	Bacille	-	-	+	-	Hétéro
S3	+	Bacille	-	-	+	+	Homo
S4	+	Bacille	-	-	+	-	Homo
S5	+	Bacille	-	-	+	+	Homo
S6	+	Bacille	-	-	+	+/-	Homo
S7	+	Bacille	-	-	+	-	Hétéro
S8	+	Bacille	-	-	+	+	Homo
S9	+	Bacille	-	+	-	+	Homo
S10	+	Bacille	-	-	+	+	Homo
S13	+	Bacille	-	-	+	+	Homo
S14	+	Bacille	-	+	-	+	Homo
S16	+	Bacille	-	+	-	+/-	Homo
S17	+	Bacille	-	+	-	+/-	Homo
S18	+	Bacille	-	+	-	+/-	Homo

+ : Résultat positif, - : Résultat négatif, +/- : Résultat variable, **Homo** : Homofermentaire, **Hétéro** : Hétérofermentaire.

Les résultats des tests physiologiques et biochimiques des 15 souches étudiées révèlent que : Toutes les souches testées sont catalase négative, ce qui indique que ces souches ne possèdent pas cette enzyme, donc elles appartiennent au groupe de bactéries lactiques.

Pour le test de croissance à différentes températures, il se trouve que parmi les souches isolées, il y a 10 souches seulement qui sont capables de croître à 46°C soit un pourcentage de 66,66 % par rapport à un effectif de 15 souches ; ce sont des thermophiles. Alors que les 05 souches restantes sont des mésophiles soit un pourcentage de 33,34 %.

Cependant, il est bien établi que l'hydrolyse de l'arginine est une source supplémentaire d'énergie chez les lactobacilles (Hariri *et al.*, 2009). Il a été constaté que seules sept souches présentent une réaction positive soit un pourcentage de 46,66% vis-à-vis de la dégradation de l'arginine par la libération d'ammoniac (couleur violette) par contre le reste des souches (26,67%) est dépourvu de cette caractéristique.

Par ailleurs, d'après les résultats de la recherche du type fermentaire sur milieu Gibson Abdel Malek, on a constaté que la majorité des souches sont homofermentaire avec un pourcentage de 86,66 % car il n'y a pas de déplacement du bouchon de la gélose blanche.

Les résultats des profils biochimiques des 15 souches sont résumés dans le tableau 13 :

Tableau 14 : Identification des souches lactiques

Codes	Espèce identifiée
S1	<i>Lb. delbrueckii ssp bulgaricus</i>
S2	<i>Lb. delbrueckii ssp bulgaricus</i>
S3	<i>Lb. delbrueckii ssp bulgaricus</i>
S4	<i>Lb. delbrueckii ssp bulgaricus</i>
S5	<i>Lb. delbrueckii ssp lactis</i>
S6	<i>Lb. delbrueckii ssp lactis</i>
S8	<i>Lb. delbrueckii ssp lactis</i>
S9	<i>Lb. casei ssp casei</i>
S10	<i>Lb. delbrueckii ssp lactis</i>
S13	<i>Lb. delbrueckii ssp lactis</i>
S14	<i>Lb. casei ssp casei</i>
S16	<i>Lb. casei ssp casei</i>
S17	<i>Lb. casei ssp casei</i>
S18	<i>Lb. casei ssp casei</i>

D'après la figure 9 ci dessous, l'espèce *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* représente **28.57%** de l'ensemble de la collection alors que *Lb. delbrueckii ssp lactis* et *Lb. casei ssp casei* ont le même pourcentage équitable de l'ordre de **35.71%**.

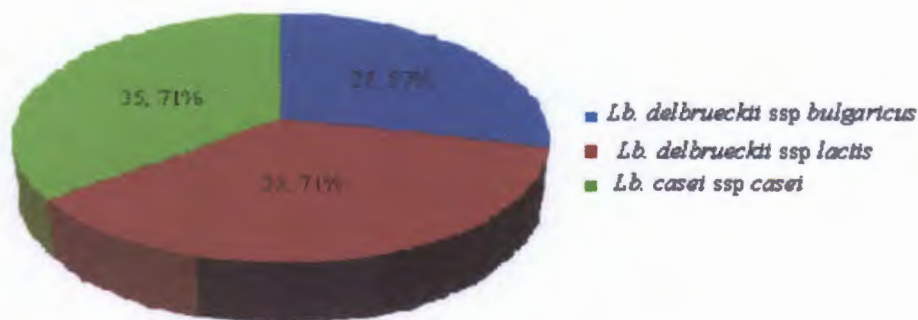


Figure 9. Répartition des espèces de la collection lactique

Les résultats illustrés dans la figure 9, montrent une dominance de la flore thermophile appartenant à l'espèce *delbrueckii* avec des sous espèces commerciales à savoir *lactis*, cela dit, il se peut que ces souches ne soient pas partie prenante de la microflore endogène mais apportées par l'alimentation.

D'une manière générale, les analyses morphologiques et biochimiques ont montré une diversité d'espèces isolées à partir des selles d'enfants. Bien que selon les données apportées par Guiraud (2003), nos souches appartiennent bien au groupe des lactobacilles qui deviennent dominantes dans le tractus digestif de l'enfant une semaine après la naissance.

### III.2. Pharmacocinétique des bactéries lactiques *in vitro* :

#### III.2.1. Croissance sur milieu acide :

Le but de cette étude est de sélectionner des souches lactiques pouvant résister à la première barrière physiologique du tube digestif qui est l'acidité gastrique dont le pH stomacal est très bas. Les résultats de la résistance des souches testées via le milieu acide, exprimés en nombre de cellules par ml du milieu sont illustrés par la figure 10 :

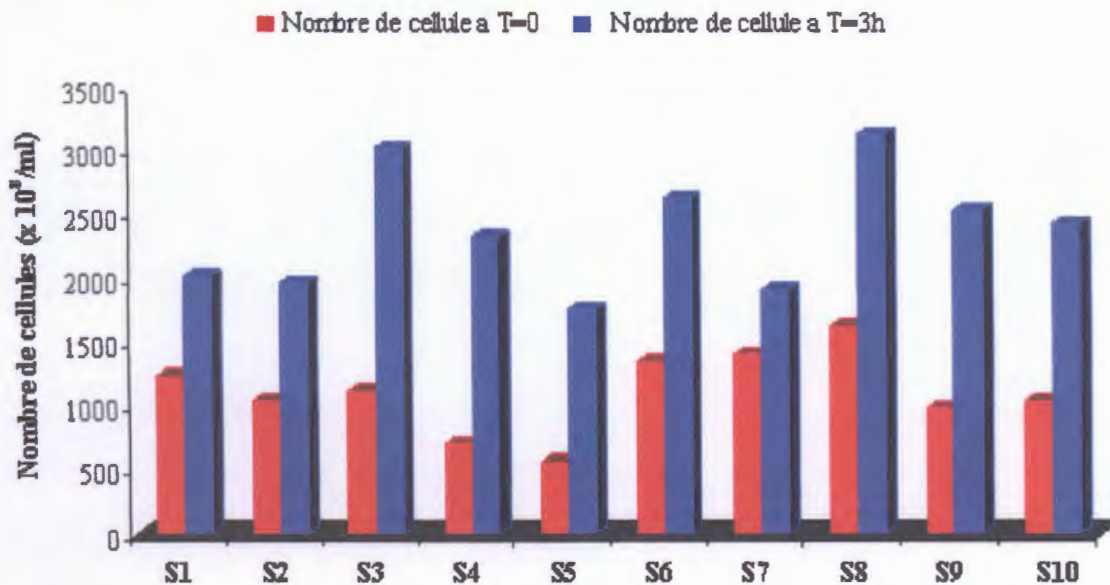


Figure10. Variation de la croissance des bactéries lactiques dans un milieu acide

D'après les résultats obtenus, il apparaît que l'ensemble des souches lactiques isolées possèdent une tolérance considérable aux acides qui est exprimée par une augmentation dans les valeurs des DO et celles du nombre des cellules dans un intervalle du temps déterminé (voire annexe II). Cette augmentation est significative d'une croissance bactérienne sur un milieu hostile. En effet, les souches *Lb. delbruekii* ssp *bulgaricus* (S3) et *Lb. delbruekii* ssp *lactis* (S8) sont les plus résistantes de la collection mise au test du fait que le nombre de cellules est plus élevé.

Effectivement, il a été suggéré que la sensibilité au pH est caractéristique à la souche et non à l'espèce. Selon nos résultats, les souches montrent des profils de résistances à l'acidité différents. Cependant, le pH du milieu influence fortement la croissance des bactéries lactiques dont les valeurs de pH optimal de croissance sont généralement comprises entre 5,5 et 6 pour les lactobacilles (Corrieu et Luquet, 2008).

Des résultats similaires ont été trouvés par **Idoui et al. (2007)** qui montrent que la souche *Lb. plantarum* BJ0021 présentait une tolérance aux milieux acides, également **Klarin et al. (2007)** montrent que la souche *Lb. plantarum* 299V peut survivre dans le tractus gastro-intestinal et coloniser la muqueuse intestinale de l'homme.

Enfin nous constatons que les lactobacilles étudiés ont la capacité de se développer à des pH bas, donc ils peuvent résister ultérieurement aux conditions d'acidité de l'estomac pour regagner leurs sites d'action.

### III.2.2. Croissance en présence des sels biliaires :

Les résultats indiqués dans la figure 11 ci-dessous affirment une sensibilité des bactéries lactiques vis-à-vis des sels biliaires qui est considéré comme un agent inhibiteur. Cela est exprimé par une réduction importante de la densité optique mesurée en absence et en présence des sels biliaires, bien que l'abaissement dans le nombre cellulaire témoigne clairement cette sensibilité (voire annexe II).

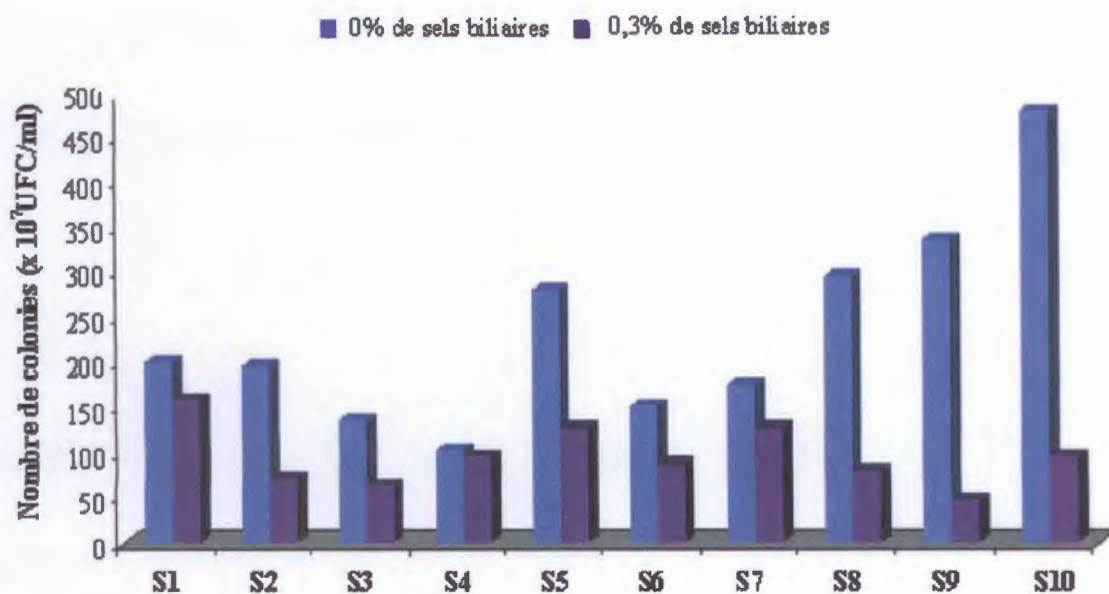


Figure 11. Croissance des bactéries lactiques en présence et en absence des sels biliaires.

Cependant la lecture des résultats nous laisse constater que la souche *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* (S4) est la plus résistante de la collection qui manifeste une croissance sur le milieu à 0,3 % des sels biliaires avec un nombre approximatif de  $96 \times 10^8$  UFC/ml après une durée d'incubation de 4h, contrairement à la souche *Lb. casei* ssp *casei* (S9) qui est la plus sensible de la collection.

Plusieurs études confirment nos résultats. Comme il a été démontré par **Idoui et al. (2007)** que les souches de *Lb. plantarum* isolées du beurre traditionnel de la région de Jijel, avaient l'aptitude à résister à 2% de sels biliaries.

En revanche, une étude dans ce sens a indiqué que la concentration des sels biliaries dans le contenu intestinale d'animaux dépend de l'âge et de l'alimentation. C'est le cas notamment de la souche *Lb. fermentum* qui possède une tolérance à différentes concentrations de sels biliaries (**Lin et al., 2007**).

### III.2.3. Interaction bactérienne :

#### III.2.3.1. Interaction entre les bactéries lactiques :

Ce test va mettre en évidence les caractéristiques que possèdent, certaines souches de bactéries lactiques à stimuler ou inhiber d'autres souches de la même espèce une fois mises en contact. Les résultats relatifs à ce test sont présentés dans le tableau 15.

Il est clair d'après les résultats que les souches de bactéries lactiques étudiées manifestent un antagonisme prononcé de 14% vis-à-vis des souches de la même espèce, dont on a pu distinguer deux cas

- Une souche lactique ensemencée en masse inhibe l'autre en touche mais dans le croisement inverse il y a une symbiose, c'est le cas de *Lb. delbrueckii ssp bulgarigus* (S1) ensemencée en masse inhibe la croissance de *Lb. delbrueckii ssp lactis* (S6) avec un diamètre de 50 mm mais dans le croisement inverse a montré une symbiose.
- Une souche ensemencée en masse n'a aucun effet sur l'autre en touche, mais le croisement inverse reflète la présence d'une zone d'inhibition, c'est le cas de *Lb. delbrueckii ssp lactis* (S6) ensemencée en masse croit en symbiose avec *Lb. delbrueckii ssp bulgarigus* (S4), contrairement dans le croisement inverse qui manifeste un antagonisme avec un diamètre d'inhibition de 40 mm.

Cependant la photo 5 illustre le caractère de souche lactique à stimuler ou inhiber des souches de même espèce ou d'espèces différentes.

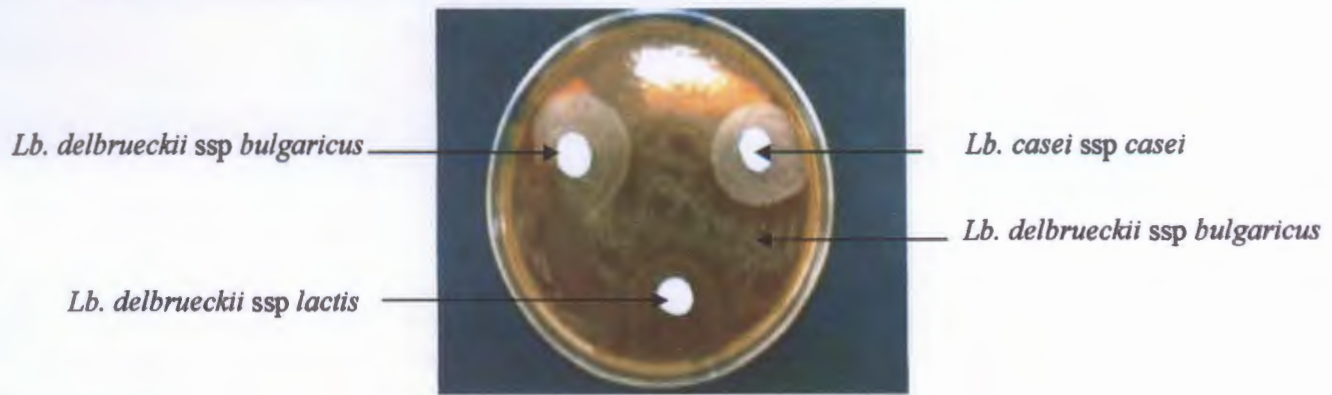


Photo 5. Résultats des interactions entre bactéries lactiques.

Tableau 15. Résultats des interactions entre les bactéries lactiques (cm).

SM \ ST	S1	S3	S4	S5	S6	S8	S9	S10
S1	0	3,5	3,5	0	0	0	3,3	3,3
S3	0	0	0	0	0	0	0	0
S4	3,3	0	0	0	0	0	0	0
S5	0	3,6	0	0	0	0	0	0
S6	5	0	4	0	0	0	0	0
S8	0	0	0	0	0	0	0	0
S9	3,4	0	0	0	0	0	0	0
S10	0	0	0	0	0	0	0	0

SM : Souches en masse (Inondation)/ ST : Souches en touches (Disques)/  $\Phi$  : cm

Ces résultats sont confirmés par **Idoui et Karam (2008)**, qui ont montré dans une étude que les bactéries lactiques isolées du beurre traditionnel avaient une activité antagonistique très marquée à l'encontre d'une autre collection lactique.

Par ailleurs, **Todorov et al. (2005)** montrent l'effet antibactérien de deux types de bactériocines, ST194BZ (a) et ST194BZ (b) obtenus à partir de *Lb. plantarum* ST194BZ contre les bactéries lactiques (*Lb. casei*, *Lb. sakei*, *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus*).

### III.2.3.2. Interaction entre les bactéries lactiques et les bactéries à Gram<sup>-</sup> et à Gram<sup>+</sup> :

D'après les résultats montrés dans le tableau 16, les souches étudiées manifestent un antagonisme très marqué sur 80% de la collection des entérobactéries, dont on a pu distinguer deux types d'interactions :

- Une symbiose qui se traduit par l'absence de zones d'inhibitions qui est le résultat d'une interaction positif qui s'exprime par la stimulation de la croissance des souches mises en contact et cela est observé chez la souche *Lb. casei* ssp *casei* (S9) vis-à-vis de *Proteus* spp. et *E. coli* ATCC 25921 respectivement (photo 6).
- Un antagonisme qui se traduit par la présence de zones d'inhibitions qui s'exprime par une inhibition de la croissance des entérobactéries par les bactéries lactiques mises au test dont les souches *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* (S1) et *Lb. delbrueckii* ssp *lactis* (S10) présentent des zones d'inhibitions plus assez larges (photo 6).

Tableau 16. Interactions entre bactéries lactiques et entérobactéries (cm).

Souches	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25921	<i>Proteus</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i>
S1	1,3	2,5	2	0,6	1,9
S2	2	1,5	2,3	1	2,6
S3	1,3	1	2,1	0,6	2,1
S4	1,2	0,8	1,5	0,9	1,5
S5	1,8	1	2,1	1	1,4
S6	1,2	2,5	1	1	1,2
S7	0,8	0	0	1,8	1,2
S8	1,8	1,3	0	1	1,4
S9	0	1,7	0	1	1,5
S10	0,8	3,7	0	1,2	2,3

Ces résultats nous permettent de dire que nos souches ont la capacité de produire des composés antibactériens. En effet nos justifications sont en accord avec Savadogo *et al.* (2004); qui ont isolé des bactéries lactiques à partir du lait fermenté et qui sont *Lb. fermentum*, *Pediococcus* sp., *Lactococcus mesenteroides* ssp *mesenteroides* et *Lactococcus* sp., ces bactéries ont une activité antibactérienne contre les bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et Gram négatif (*E. coli*).

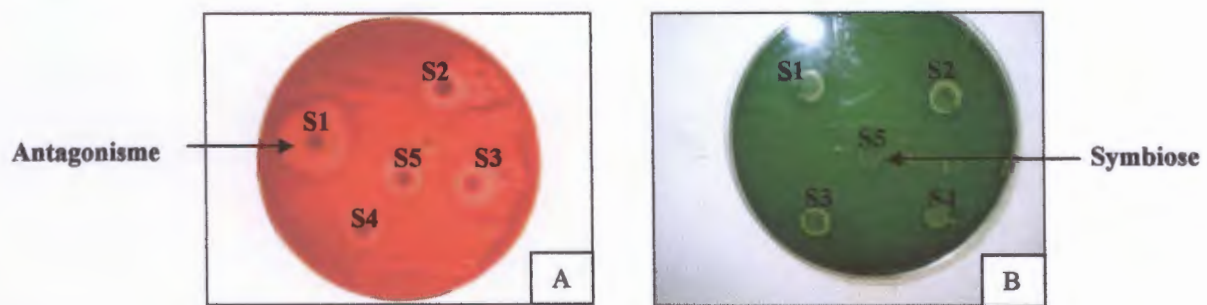
Des résultats similaires ont été trouvés par Idoui *et al.* (2007), qui ont rapporté qu'une souche de *Lb. plantarum* BJ0021 avait un large spectre d'inhibition vis-à-vis d'une microflore d'entérobactéries originaire du tube digestif du lapin. Par ailleurs, Obadina *et al.* (2006) ont pu établir une activité antibactérienne d'une souche de *Lb. plantarum* contre *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* et *E. coli*.



Le mécanisme par lequel les bactéries lactiques inhibent le développement des autres bactéries est la production des molécules inhibitrices. D'après **Savadogo et al. (2006)**, les bactéries lactiques peuvent produire des différents types de bactériocines comme la nisine produite par *Lc. lactis* ssp *lactis*, la pédiocine A produite par *Pc. pentosaceus* FBB61 et L-7230... etc. Ces molécules ont la capacité d'inhiber le développement des autres germes.

Par ailleurs les bactéries lactiques sont connues par la production de composés toxiques et autres métabolites tel que l'acide lactique, les acides organiques, les diacétyl et le peroxyde d'hydrogène. Ces composés se manifestent par une inhibition de différents micro-organismes indésirables et en particulier les Gram négatives (**Leveau et al., 1991**).

La photo suivante illustre des effets d'antagonisme et de symbiose entre les bactéries lactiques et les entérobactéries.



**Photo 6. Activité inhibitrice et symbiotique des souches S1, S2, S3, S4, S5 à l'égard d'*E.coli* ATCC 25921(A) et *Proteus* sp. (B).**

#### III.2.4. Activité inhibitrice des surnageants des bactéries lactiques :

Les résultats illustrant la résistance et la sensibilité de souches testées vis-à-vis du contenu des bactéries lactiques sont présentés dans le tableau 17 ci dessous :

Tableau 17. Effet des surnageants natif et à pH 6 sur les entérobactéries (C m).

Souches	Surnageant natif									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
<i>E. coli</i> ATCC 25921	1.3	0	1.3	1.6	1.4	1.3	1.8	1.8	1.9	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella</i> spp.	0	0	0	0	0	0	1.2	1	1.5	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Surnageant à pH=6										
<i>E. coli</i> ATCC 25921	0	0	0	2.2	2.5	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	0	2.2	1.7	0	0	2.1	0	0	2.1	0
<i>Klebsiella</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

D'après ces résultats, il apparaît clairement qu'il y a une persistance de l'activité des deux types de surnageants sur les entérobactéries mais avec une différence de résistance de ces derniers très remarquable vis-à-vis des composantes de ces surnageants.

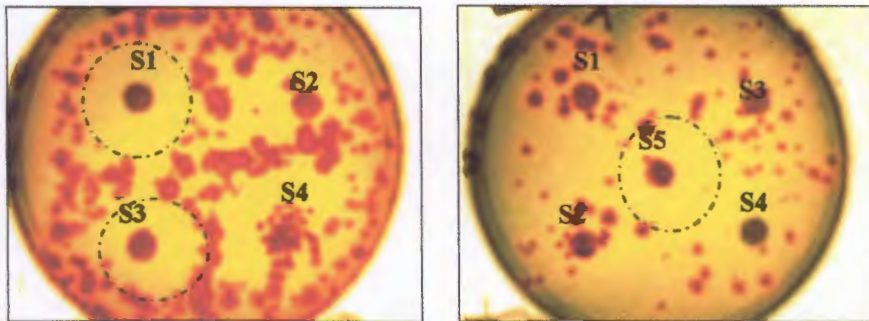
En effet les surnageants natifs inhibent 27,5% de la collection des entérobactéries mises au test avec des zones d'inhibitions variant entre 10mm et 19mm, contrairement aux surnageants ajustés à pH 6 qui inhibe 15% de cette collection avec des diamètres qui varient entre 17mm et 25mm. Ces résultats sont démontrés par **Idoui et al. (2007)** qui ont rapporté que le surnageant neutre de *Lb. plantarum* BJ0021 avait un spectre d'inhibition vis-à-vis d'une microflore d'entérobactéries originaire du tube digestif du lapin moins important que celui du surnageant natif.

La technique utilisée pour l'obtention des surnageants natifs nous a permis de récupérer tous les métabolites cellulaires des bactéries lactiques notamment les acides (acide lactique), les bactériocines et les antibiotiques, et c'est l'effet combiné de ces substances qui est à l'origine de cette activité inhibitrice.

Des résultats similaires ont été justifiés par **Bourgeois et Larpent (1996)**, qui ont rapporté que l'activité inhibitrice peut être liée à de nombreux agents à savoir : les acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl, éthanol, CO<sub>2</sub>, antibiotiques, bactériocine. Cependant, **Reinheimerj (1990)** a montré que la production d'acide organique tel que l'acide lactique limite, en abaissant le pH, le développement d'*Escherichia* sp.

De même, **Klaehnammer (1988)** et **Schillinger (1990)** ont montré que la production de substances inhibitrices de type bactériocine est capable d'inhiber les germes fréquemment responsables d'infections en élevage.

Par ailleurs, la neutralisation des acides organiques et particulièrement l'acide lactique nous laisse constater une disparition presque totale de l'activité inhibitrice des surnageant neutre et cela indique que nos souches lactiques produisent d'autres substances inhibitrice. La photo 7 illustre l'activité de surnageant natif et neutre (pH 6) des bactéries lactiques sur les entérobactéries.



A : Surnageant natif

B : Surnageant neutre

Photo 7. Aspect inhibiteur des surnageants sur *E. coli* ATCC 25921.

**III.2.5. Résistance aux antibiotiques :**

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 18. La lecture des résultats indique la sensibilité des souches étudiées vis-à-vis de 70% des antibiotiques testés (photo 8). Cependant les espèces *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* et *Lb. delbrueckii ssp lactis* montrent une résistance très importante à l'Oxacilline.

Tableau 18. Résistance des bactéries lactiques aux antibiotiques.

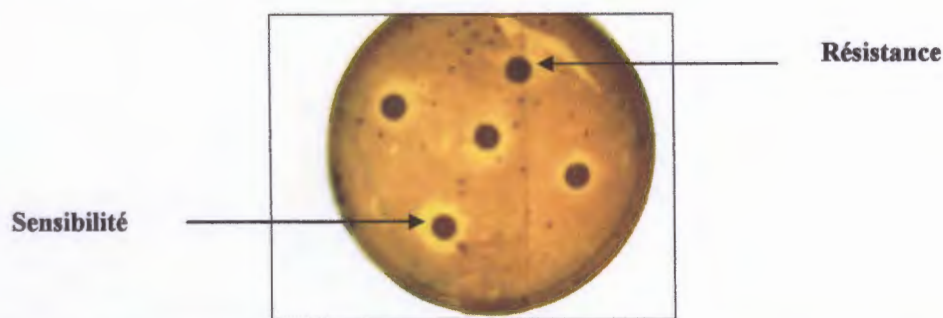
ATB Souches	Amoxicilline	Colystine	Erythromycine	Pénicilline-G	Oxacilline
S1	S	S	S	S	R
S3	S	R	R	R	R
S4	S	R	S	S	R
S5	S	R	S	S	R
S6	S	S	S	S	S
S8	S	S	S	S	S
S9	S	S	S	S	R
S10	S	R	S	S	R

S : Sensible                      R : Résistance

**Halami et al. (2002)** ont rapporté que les bactéries lactiques étudiées étaient résistantes aux principaux antibiotiques. Cependant des résultats similaires ont été trouvés par **Idoui et al. (2007)**, où une souche de *Lb. plantarum* BJ0021 a montré une résistance à tous les antibiotiques testés à l'exception du Chloramphénicol.

Les souches probiotiques qui sont résistantes aux antibiotiques sont intéressantes dans le traitement des maladies infectieuses nécessitant une antibiothérapie, c'est l'exemple des diarrhées infectieuses et l'infection à *Helicobacter pylori*. Par contre les autres souches sensibles sont utilisées par exemple dans le cas d'intolérance au lactose (**Hamilton, 2003**).

Parmi les critères biotechnologiques de sélection des probiotiques, la résistance à certains antibiotiques (**Dacosta, 2000**). Dans notre travail, la souche *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* montre un profil de résistance intéressant.



**Photo 8. Résistance et sensibilité de *Lb. Delbrueckii ssp bulgaricus* (S1) aux antibiotiques.**

### III.2.6. Pouvoir d'adhésion aux cellules épithéliales :

Après avoir testé l'aptitude de notre collection lactique à adhérer aux cellules épithéliales, il apparaît clairement que les souches étudiées ont montré une meilleure capacité d'adhésion vis-à-vis des cellules épithéliales. En effet, les taux d'adhésions obtenus varient très significativement entre les souches (figure 12 et photo 9).

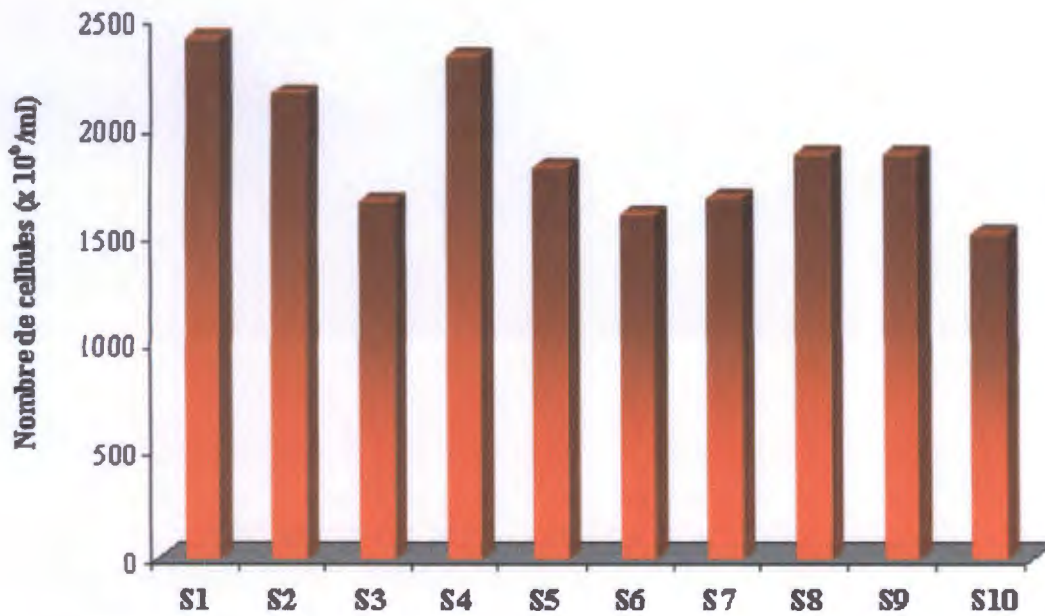


Figure 12. Pourcentages d'adhésion des lactobacilles aux cellules épithéliales.

La capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale est l'un des critères de sélection les plus importants des probiotiques parcequ'elle est considérée comme une condition préalable à la colonisation et à la croissance. L'effet probiotique serait maximal si les micro-organismes adhèrent aux cellules muqueuses intestinales (Roy, 2006).

Généralement, la surface des lactobacilles est entourée de protéines spécifiques à la souche pouvant être soit attachées à la surface cellulaire soit étendue à travers la paroi cellulaire. Dans la plupart des cas, ces protéines jouent un rôle d'adhésines et participent à l'association des bactéries avec la muqueuse intestinale (Izquierdo, 2009).

Une étude récente a montré que des souches adhérentes *Lb. plantarum* et *Lb. rhamnosus* pouvaient coloniser de manière prolongée une partie du tube digestif en limitant l'implantation des germes pathogènes par compétition au niveau des sites de fixation pour la colonisation (Robin et Rouchy, 2001).

Une autre étude a caractérisée une protéine de surface de grande taille qui contribue à l'adhésion de *Lactobacillus reuteri* 1063 au mucus porcine et aviaire : la protéine Mub. Dans le même cadre, il s'est avéré qu'une autre protéine caractérisée chez *Lactobacillus salivarius* UCC 118 qui est LsPA est impliquée dans l'adhésion de cette souche au mucus et aux cellules épithéliales. Donc, il apparaît que l'adhésion des probiotiques à la muqueuse intestinale de

l'hôte est un processus multifactoriel et complexe dans lequel interviennent de nombreuses molécules de nature différentes (Izquierdo, 2009).



**Photo 9. Aspect microscopique d'adhésion de la souche *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* (S1) au tissu épithélial.**

### **III.3. Evaluation *in vivo* de l'effet hypolipémiant des probiotiques lactiques comparativement à un médicament hypolipémiant :**

#### **III.3.1. Préparation du lait fermenté :**

##### **III.3.1.1. Mesure de l'acidité :**

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Le processus d'acidification, étroitement associé à la croissance bactérienne, se traduit par l'accumulation progressive d'acide lactique dans le milieu de culture.

Pour cela la détermination de l'acidité du lait fermenté permet d'apprécier la quantité d'acide lactique produite par les souches *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* (S3) et *Lb. casei ssp casei* (S9). Le pH et l'acidité du lait fermenté produit étaient de pH 4 et 67° D respectivement. En effet on a noté aussi que ces deux souches ont la capacité de coaguler le lait avec une forte exsudation du lactosérum (photo10).

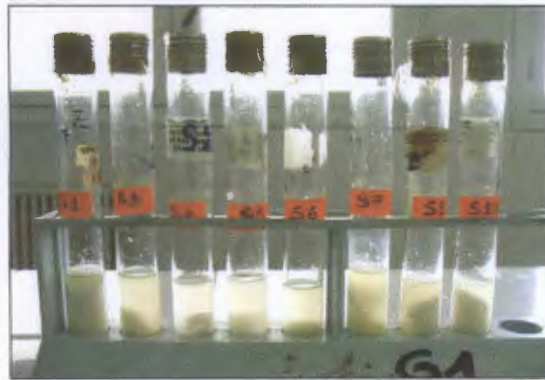


Photo 10. Coagulation du lait fermenté par les souches lactiques.

### III.3.1.2. Dénombrement des bactéries lactiques :

Après la coagulation du lait écrémé ensemencé par les souches *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* (S3) et *Lb. casei ssp casei* (S9), on remarque que le nombre de cellules des deux espèces augmente avec le prolongement des temps d'incubation. Pour les deux souches il passe  $480 \times 10^7$  cellules/ml, ce qui indique que ces souches ont une vitesse de croissance importante, pour laquelle le produit lactofermenté obtenu est dit vivant car la flore lactique qui règne dépasse  $10^7$  cellules/ml du produit.

### III.3.2. Effet des probiotiques sur les paramètres zootechniques :

#### III.3.2.1. Evolution de la croissance pondérale :

Le premier variable qui a été mesuré c'est bien le poids des animaux, en faite ils ont tous été pesés au début et à la fin de l'expérience. En effet le poids des animaux dont les résultats sont illustrés par la figure 13 ci-dessous, montre que le faible poids est enregistré chez les animaux des lots 2 et 3 en phase expérimentale 1, c'est-à-dire la phase du régime hyperlipémiant.

Par contre, après une semaine d'un traitement hypolipémiant, le poids des animaux qui prennent le lait fermenté est devenu supérieure à celui des animaux qui prennent le médicament avec une différence significative. Cela prouve que l'apport du probiotique, agit en faveur de la protéogénèse. Pour cela on a proposé une hypothèse qui explique que la consommation du gras incorporé et des sels biliaries par les rats pourrait être responsable de la baisse de croissance, en diminuant la digestibilité de l'aliment notamment les protéines.

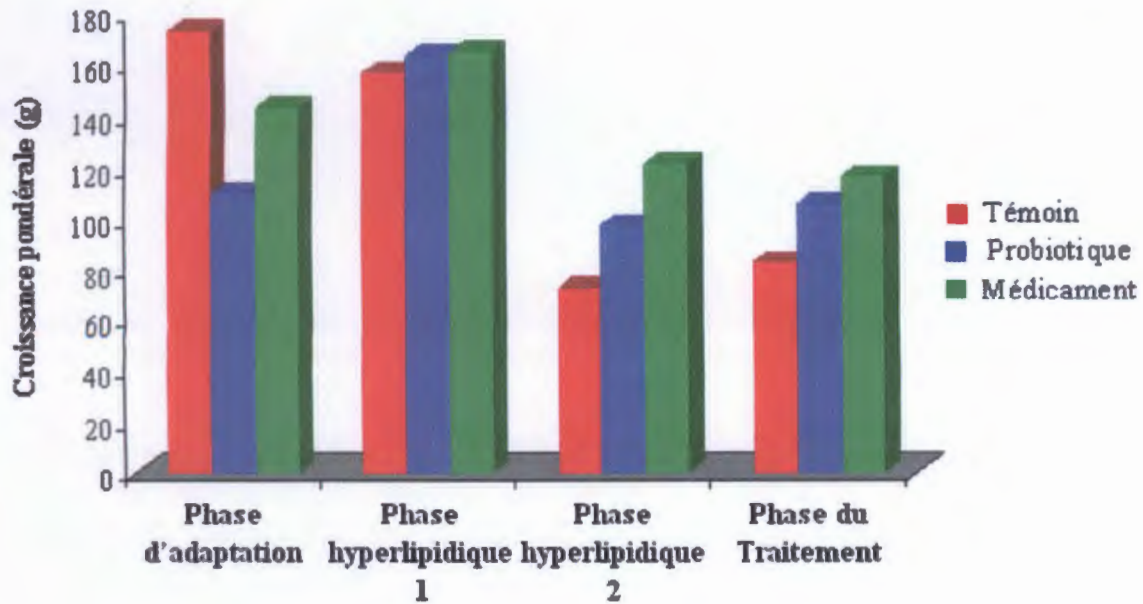


Figure 13. Evolution du poids des animaux durant 04 semaines.

**III.3.2.2. Evolution de l'indice de consommation :**

Les résultats relatifs à l'influence de l'apport du probiotique sur les paramètres de consommation des rats sont donnés dans la figure 14 ci-dessous :

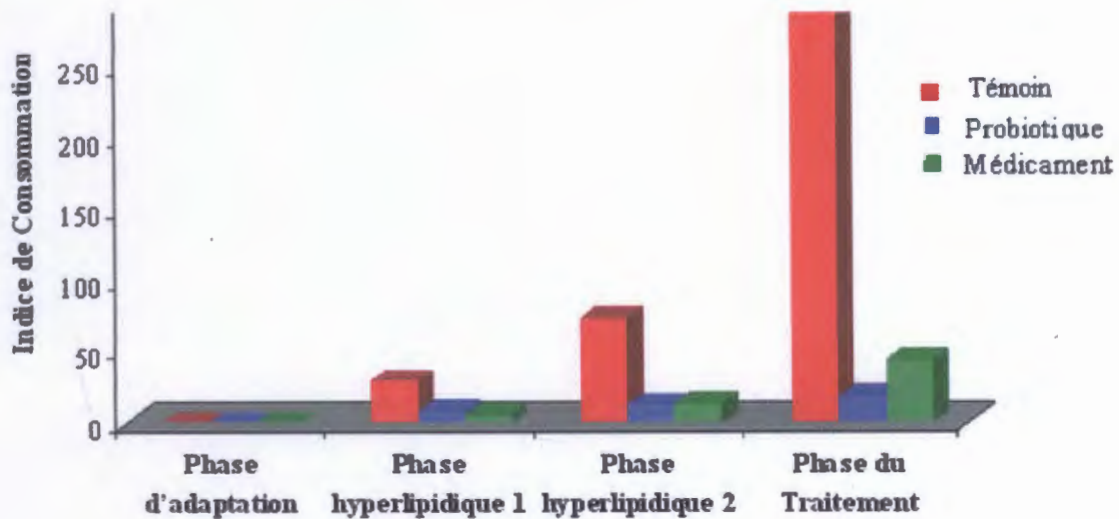


Figure 14 . Evolution de l'indice de consommation des animaux.

Les indices de consommation montrent des variations significatives tout au long de la période expérimentale, ceci est nettement observé dans le lot témoin marqué par une augmentation croissante.



L'utilisation de probiotique a amélioré l'indice de consommation des sujets du lot 2 donc une bonne valorisation de l'aliment. Enfin, il apparaît clairement que l'utilisation de probiotique n'affecte pas la mortalité au cours de l'étude expérimentale.

Les résultats trouvés sont en accord avec ceux de **Gunes et al. (2001)** et **Runho et al. (1997)** qui rapportent des effets positifs de l'apport de probiotiques ou d'acides organiques sur le gain de poids et l'amélioration de l'indice de consommation.

### III.3.3. Effet des probiotiques sur les paramètres plasmatiques :

#### III.3.3.1. Evolution du cholestérol total (CHT) :

Concernant le taux du cholestérol total, on constate d'après les résultats représentés par la figure 15, que les concentrations du cholestérol total dans le serum des animaux des lots 2 et 3 sont plus importantes que celles enregistrées chez les sujets du lot témoin, ceci pendant les deux premières semaines du régime hyperlipidique.

Cependant, lors du traitement, l'effet de la supplémentation de la ration en probiotiques *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* (S3) et *Lb. casei ssp casei* (S9) sous forme de produit lactofermenté a fait l'observation d'une diminution significative de la concentration de cholestérol total sérique. De même, une diminution similaire de cholestérol total sanguin a été notée avec les sujets du lot 3 traités par le médicament hypolipémiant (Torvast®).

Donc, selon ces résultats, on peut constater que les bactéries *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* (S3) et *Lb. casei ssp casei* (S9) entraînent un effet synergique dans la diminution du taux de cholestérol total sérique qui est similaire à celui du médicament hypolipémiant. Cette observation est en accord avec plusieurs études réalisées, bien que **Oyetayo et al. (2003)** ont montré que l'utilisation de *Lb. acidophilus* et *Lb. casei* comme probiotique provoque une réduction du taux de cholestérol sanguin chez les rats.

Par ailleurs **Fukushima et Nakao (1995)** ont démontré aussi qu'un complexe probiotique constitué de *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto*, *Bacillus megaterium*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *S. faecalis*, *S. lactis*, *S. thermophilus*, *Sc. cerevisiae* et *Candida utilis* provoque la réduction du taux du cholestérol sanguin chez les rats.

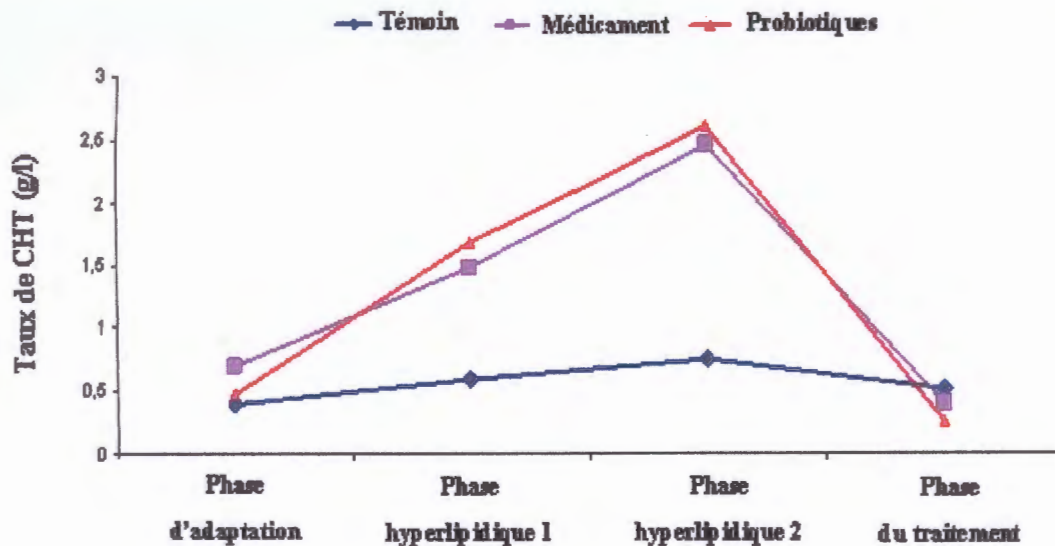


Figure 15. Evolution du cholestérol total (g/l).

### III.3.3.2. Evolution de la triglycéridémie (TG) :

Les résultats illustrés par la figure 16 montrent que, pendant la période à régime hyperlipidique, le taux des triglycérides des deux lots 2 et 3 augmente progressivement jusqu'à atteindre un seuil de **2,47g/l** pour les animaux du lot 3 et **2,33g/l** pour ceux du lot 2 comparativement aux animaux du lot témoin.

En revanche, il apparaît clairement qu'au cours de la dernière semaine du traitement, le taux des triglycérides dans le sang des sujets supplémentés avec le lait fermenté a diminué jusqu'à arriver à un seuil plus bas de **0,36g/l** comparativement aux sujets témoins.

Cela nous laisse avancer l'hypothèse que les bactéries lactiques peuvent réduire le taux des triglycérides sanguins. Cette hypothèse est confirmée par **Xiao et al. (2003)** qui ont montré que l'utilisation d'un lait fermenté par *Bifidobacterium longum* réduit significativement le taux des triglycérides chez les rats et l'homme.

Par ailleurs **Kawase et al. (2000)** ont rapporté que l'utilisation d'un lait fermenté par les souches *Lb. casei* MTCO409 et *S. thermophilus* MTC1543 engendre la réduction du taux des triglycérides dans le sang des rats.

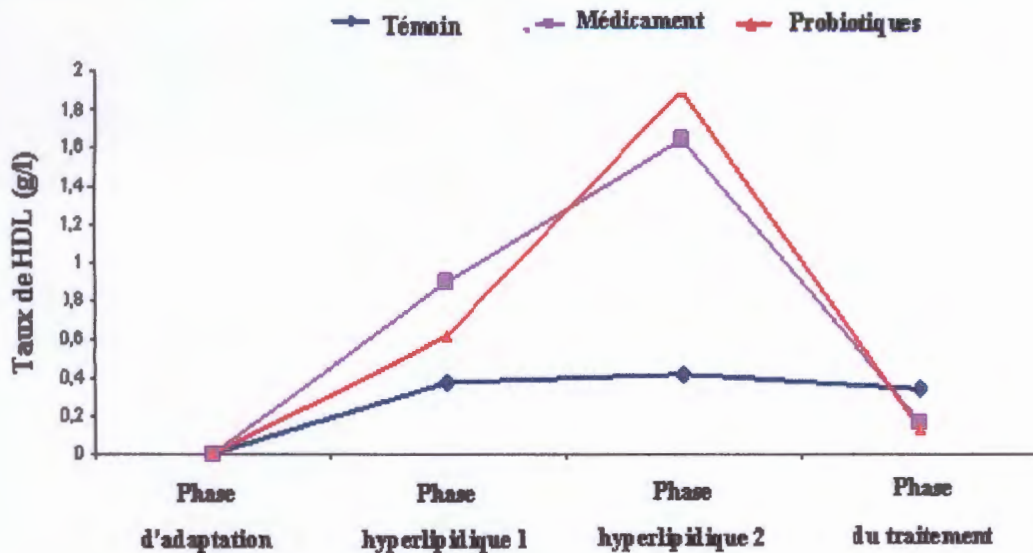


Figure17. Evolution du cholestérol des HDL (g/l).

### III.3.3.4. Evolution du cholestérol des LDL :

D'après les résultats illustrés par la figure 18, nous constatons une augmentation du cholestérol des LDL pour les animaux du lot 2 par rapport à celui des rats du lot 3 (0,89g/l contre 0,33g/l), en période expérimentale. À partir de la troisième semaine de l'étude qui correspond au traitement des animaux par le probiotique (lot 2) et le médicament (lot 3), on constate une diminution des taux du cholestérol des LDL pour chacun des deux lots ce qui entraîne une diminution de la cholestérolémie.

Ces résultats sont en accord avec d'autres études réalisées par Harrison et Peat (1975), Grunewald (1982), Gilliland *et al.* (1985) et Danielson *et al.* (1989).

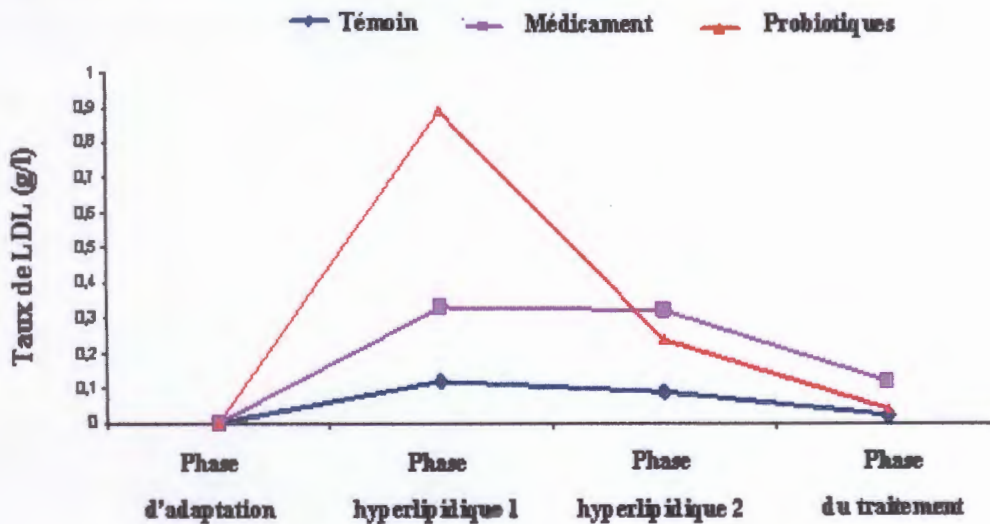


Figure18. Evolution du cholestérol des LDL (g/l).

D'une manière générale, l'évaluation *in vivo* de l'effet des deux souches probiotiques *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* (S3) et *Lb. casei ssp casei* (S9) sur les paramètres plasmatiques nous permet de conclure que ces souches lactiques ont la capacité de réduire le taux des lipides sanguins.

Cependant chez les rats à régime hyperlipidique, une baisse de la cholestérolémie a été le plus souvent induite par l'administration du probiotique sous forme du lait fermenté. Cet effet a été le plus souvent associé à une baisse de la concentration du cholestérol dans les lipoprotéines LDL.

Les mécanismes par lesquels les bactéries lactiques réduisent le taux des lipides sont mal connus mais des hypothèses émises peuvent expliquer cette observation. D'après **Beena et Prasad (1997)** et **Hashimoto et al. (1998)**, cinq mécanismes peuvent être à la base:

La première est que les produits de fermentation des bactéries lactiques inhibent l'activité enzymatique pour la synthèse du cholestérol et réduisent ainsi la production de ce dernier ; la deuxième est que les bactéries lactiques facilitent l'élimination du cholestérol hors de l'organisme dans les fèces ; la troisième est que les bactéries lactiques inhibent l'absorption du cholestérol en se liant avec ce dernier ; la quatrième est que les bactéries interfèrent avec le recyclage des sels biliaries (un produit métabolique du cholestérol) et facilitent leur élimination, qui augmente la synthèse des sels biliaries à partir du cholestérol et aboutit ainsi à la réduction du cholestérol et enfin la dernière c'est l'assimilation du cholestérol par les bactéries lactiques qui est incorporé dans la membrane cellulaire ou la paroi cellulaire bactérienne, cela pour augmenter la résistance de cette dernière au changement environnemental et par conséquent la réduction du cholestérol dans le corps.

En revanche, **Xiao et al. (2003)** ont rapporté que les bactéries lactiques ont la capacité d'assimiler le cholestérol et de le lier avec les acides biliaries au niveau de l'intestin, ce qui inhibe l'absorption du cholestérol et par conséquent la réduction des lipides sanguins. Egalement **Foo et al. (2003)** ont proposé le même mécanisme, dont les bactéries lactiques font une déconjugaison des acides biliaries et les précipitent avec le cholestérol à  $\text{pH} < 5,5$ , ensuite le cholestérol est converti à des nouveaux acides biliaries et excrété à l'extérieur du tractus gastro-intestinal ce qui diminue leur concentration sanguine.

Donc les souches de lactobacilles utilisées dans cette étude réduisent le taux du cholestérol et augmentent ce dernier incorporé dans la membrane cellulaire bactérienne (des données non montrées). Cela indique que ces bactéries sont efficaces dans la réduction du cholestérol en présence des sels biliaries. Selon l'étude de Noh *et al.* (1997), la réduction des sels biliaries est due à l'activité enzymatique de BSH « Bile Salt Hydrolase » que possèdent les bactéries lactiques.

### III.3.4. Etude histologique :

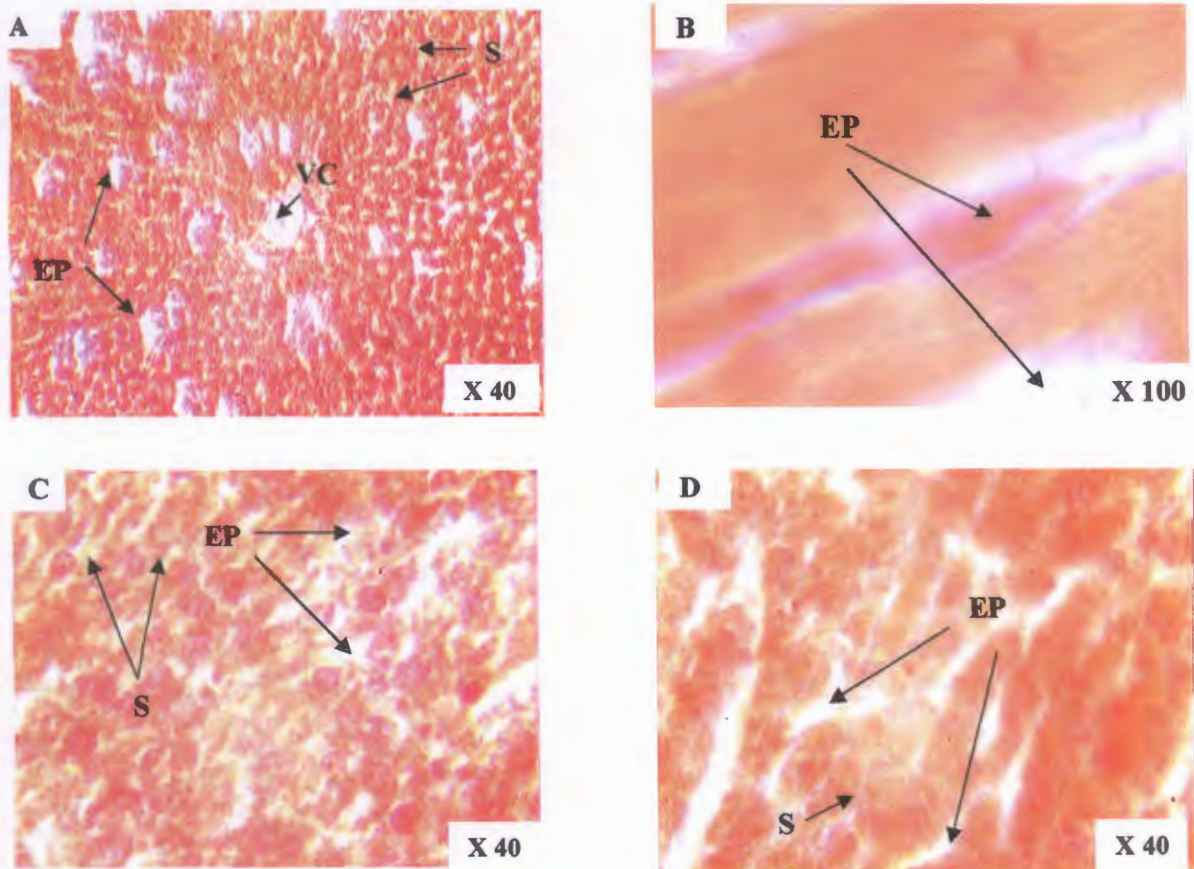
#### III.3.4.1. Morphologie hépatique :

Après avoir réalisé les coupes histologiques des organes des différents lots, et d'après les résultats illustrés dans la photo 11, on a noté une hépatite aigue dans le foie des rats considérés comme hyperlipidique, qui se traduit par un œdème et une infiltration cellulaire (monocytes, macrophages...) des espaces portes de façon plus intense avec présence de cellules hépatiques déformées. Ces lésions sont associées à une dilatation diffuse des sinusoides hépatiques et des vénules centrolobulaires. Les travées hépatocytaires conservent une architecture normale mais il apparaît des foyers pluricellulaires d'hépatocytes gonflées avec une dégénérescence du noyau (incolore) qui devient atypique et épiconcentrique comparativement au foie des rats pris comme témoins.

En effet ces observations d'atteintes hépatiques permettent de noter une élévation modérée des taux sériques des lipides qui est confirmée par le dosage des paramètres plasmatiques durant la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> semaine de notre étude expérimentale dont le taux du cholestérol est compris entre 0,60g/l et 2,61g/l.

En revanche, après le traitement des rats par les souches probiotiques *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* (S3) et *Lb. casei* ssp *casei* (S9), nous constatons une diminution moins importante du volume des espaces portes et les hépatocytes déformées conservent un aspect inflammatoire mais s'atténue dans quelques régions seulement, contrairement au traitement par le médicament hypolipémiant (Torvast®) qui est noté que les espaces portes sont par contre modérément dilatés et l'inflammation des hépatocytes s'atténue dans presque toutes les régions de la coupe.

La photo suivante montre tous les phénomènes observés durant 04 semaines de notre expérimentation :



**Photo 11 (A, B, C, D). Coupes histologiques du foie.**

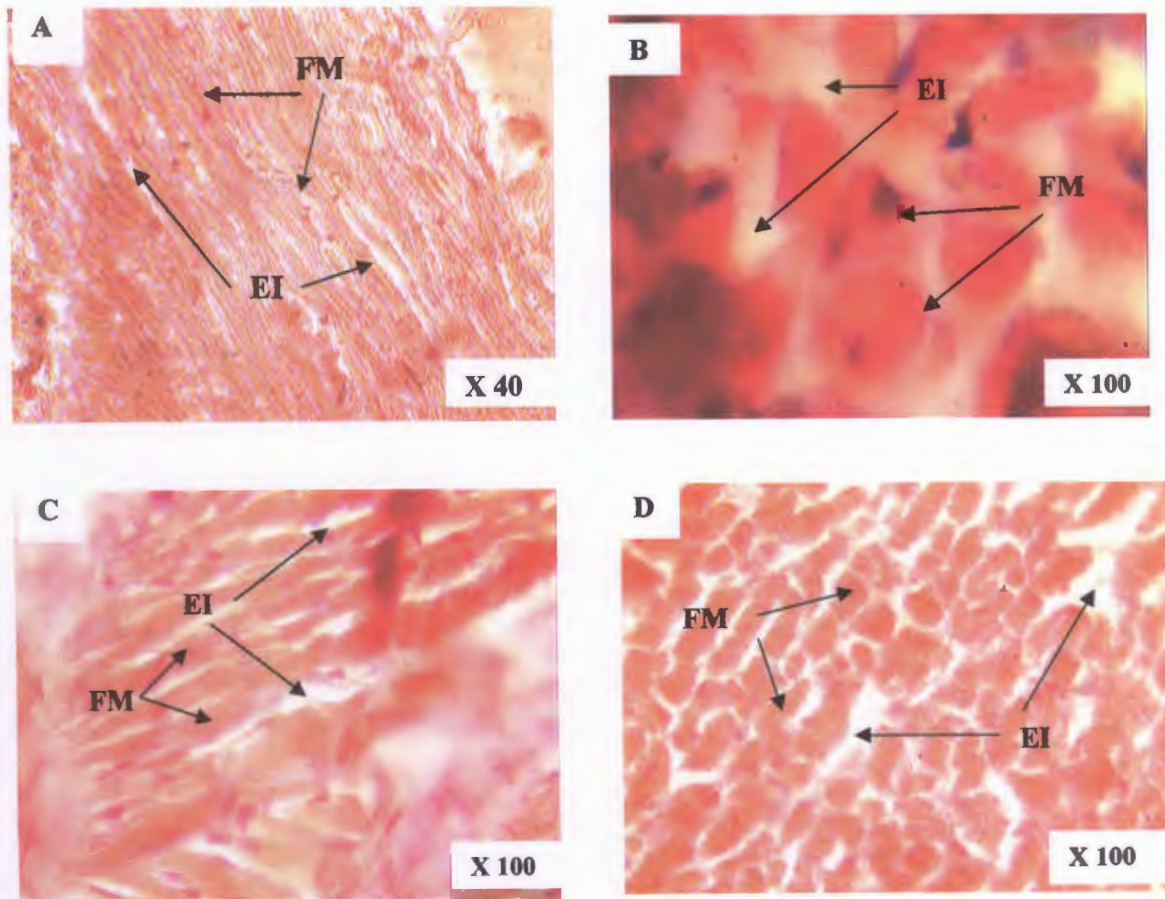
**A : Foie témoin, B : Foie à régime hyperlipidique, C : Foie après traitement par le médicament, D : Foie après traitement par les probiotiques. EP : Espaces portes ; S : Sinusoïdes ; VC : Vénules centrolobulaire.**

### III.3.4.2. Morphologie cardiaque :

Les coupes transversales du cœur après un régime hyperlipidique, nous permettent de noter une hypertension due à une myocardite qui se manifeste par des lésions plus intenses et plus diversement réparties au niveau du tissu musculaire. Ces lésions sont associées à un gonflement des fibres musculaire cardiaque présentant sous forme de plages irréguliers et un élargissement qui occupe tous les espaces interstitiels (photo 12).

Par ailleurs, les coupes longitudinales du cœur après traitement par le médicament hypolipémique permettent d'observer les fibres musculaires cardiaques de taille normale et anastomosées en réseau, autour desquelles les espaces interstitiels sont légèrement dilatés, comparativement au traitement par les probiotiques qui permet de noter que la dilatation des espaces bordant les fibres musculaires persiste mais s'atténue modérément dans quelques régions seulement.

Toutes ces observations nous permettent de conclure que le traitement par les probiotiques manifeste un effet hypolipémiant en réduisant l'intensité des lésions au niveau cardiaque comme le montre le dosage des lipides sanguins durant la dernière semaine de notre étude expérimentale.



**Photo 12 (A, B, C, D). Coupes histologiques du cœur.**

**A : Cœur témoin, B : Cœur à régime hyperlipidique, C : Cœur après traitement par le médicament, D : Cœur après traitement par les probiotiques. FM : Fibres musculaires cardiaques ; EI : Espace intetstiel.**

## *VI. Conclusion*



## CONCLUSION GENERALE

L'écosystème intestinal constitue un intermédiaire entre les aliments et l'hôte. Depuis plusieurs années, l'impact des probiotiques sur la nutrition et la physiologie de l'hôte a fait l'objet de nombreuses études. En effet, le concept de probiotique appliqué à l'écosystème intestinal est ainsi original et séduisant. Il satisfera sûrement de les adaptés comme des traitements dits naturels qui souhaitent éviter l'utilisation excessive d'antibiotiques. Cependant, de nombreuses études *in vivo* sont encore nécessaires afin de valider leur efficacité en tant que traitement préventif ou curatif.

Ce modeste travail a aboutit dans un premier temps à l'identification de la notion des probiotiques au temps des bons bactéries et de visualiser leurs pharmacocinétique notamment *in vitro*. Bien qu'il est important de noter que la détermination de ces paramètres pharmacocinétiques permet d'améliorer de plus en plus les performances gastriques des êtres humains où on essaye de comprendre certains mécanismes d'interaction hôtes/probiotiques.

Au-delà, certains travaux scientifiques élaborent actuellement plusieurs stratégies visant à maintenir l'hypothèse que la consommation de laits fermentés enrichis en probiotiques puisse moduler le taux de cholestérol sanguin et de rendre une hyperlipidémie à la normale.

Réellement, notre expérimentation nous a permis de démontrer *in vitro* que nos souches bactériennes ont des intérêts probiotiques, ceux-ci concernaient la production d'agents antimicrobiens, la résistance aux conditions gastro intestinales (acidité et présence de la bile) et la capacité d'adhésion à la muqueuse gastro intestinale.

De même, l'étude *in vivo* conduite sur des rats Wistar, à ration supplémentée par du lait fermenté, enrichi par deux souches de bactéries probiotiques isolées des selles d'enfants s'est avéré intéressante pour leur usage au tant qu'agent hypolipémiant, cela dit, le médicament était plus efficace en cette situation pathologique. En effet ces deux souches de *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* et *Lb. casei* ssp *casei* ont présenté un effet synergique dans la réduction du taux de cholestérol sanguin chez des rats hypercholestérolémiques, preuve appuyé par l'étude histologique. Enfin, nos résultats sont en accord avec le recours aux

probiotiques comme étant des hypolipémiants naturels mais cette hypothèse reste à vérifier encore plusieurs fois sur le même modèle animale.

Enfin, il est souhaitable de compléter cette étude par d'autres travaux dont le perspectif vise à identifier au niveau moléculaire des bactéries lactiques les gènes codants pour l'expression de cet effet hypolipémiant.

## Références bibliographiques

- Ait-Belgnaoui A.** (2006). Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress : rôle de la barrière épithéliale colique (Thèse de doctorat). *Unité de Neuro-Gastroentérologie et Nutrition, INRA Toulouse* ; p. 1-191.
- Azizpour K., Bahrambeygi S., Mahmoodpour S. et Azizpour A.** (2009). History and basic of probiotics. *Res J Biol Sci* ; 4(4): 409-426.
- Balfour Sartor R.** (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*; 134 (2): 577-594.
- Beena A. et Prasad V.** (1997). Effect of yogurt and bifidus yogurt fortified with skim milk powder, condensed whey and lactose-hydrolysed condensed whey on serum cholesterol and triacylglycerol levels in rats. *J Dairy Res*; 64: 453-457.
- Bourgeois C.M. et Larpent J.P.** (1996). Manuel de bactériologie alimentaire. Paris: Lavoisier Tech & Doc; p. 398-401.
- Boussboua H.** (2002). Elément de microbiologie générale. Constantine: Compus Club; p.149.
- Bucolo G. et David H.** (1973). Quantitative determination of serum triglyceride by the use of enzyme. *Clin Chem*; 19: 476-482.
- Corrieu G. et Luquet F.M.** (2008). Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Paris: Lavoisier Tech&Doc; p. 515-793.
- Cuibai F.** (2008). L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris (Thèse de doctorat). *INRA-Agro. Paris- Tech* ; p. 1-193.
- Dacosta Y.** (2000). La bio-protection des aliments. Paris: Lavoisier Tec&Doc; p. 1-14.
- Danielson A.D., Peo E.R.J., Shahani K.M., Lewis A.J., Whalen P.J. et Amer M.A.** (1989). Anticholesterolemic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars. *J Anim Sci*; 67: 966-974.
- Delzenne N.** Modulation nutritionnelle du métabolisme des triglycérides. (2008). In : Roberfroid M. B., Coxam V. et Delzenne N. Aliments fonctionnels. Paris: Lavoisier Tec&Doc; p. 485-540.
- Drasar B.S. et Barrow P.A.** (1985). Intestinal Microbiology - Aspects of Microbiology 10 - Van Nostrand Reinhold Co. Ltd U.K.
- Drouault S. et Corthier G.** (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vét. Res* ; 32: 101-117.

**El Gandaoui S., El Ghomari H., Chadli A. et Farouqui A. (2007).** Les hyperlipidémies : étiologies et traitement. *La Chronique Ibn Rochd* ; **2** : 39-45.

**FAO/OMS.** « Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes ». Corboda-Argentine, octobre 2001. Available from. URL: <http://www.who.int/foodsafety/publications/en>.

**Foo H.L., Loh T.C., Lai P.W., Lim Y.Z., Kufli C.N. et Rusul G. (2003).** Effect of adding *Lb. plantarum* I-UL4 metabolites in drinking waters of rats. *Pakistan Journal of Nutrition*; **2(5)**: 283-288.

**Friedewald W.T., Levy R.I. et Fredrickson D.S. (1972).** Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*; **18**: 499-502.

**Fukushima M. et Nakao M. (1995).** The effect of a probiotic on faecal and liver lipid classes in rats. *British Journal of Nutrition*; **73**: 701-710.

**Geraldine L. (2008).** Effet de transgalacto-oligosaccharides sur la fonction intestinale – maturation et fonction immunitaire (Thèse de doctorat). *INRA-Agro. Paris- Tech*; p. 1-178.

**Gibson T. et Abd-El-Malek Y. (1945).** The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *J Dairy Res*; **14**: 35-38.

**Gilliland S.E., Nelson C.R. et Maxwell C. (1985).** Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*; **49**: 377-381.

**Grove T.H. (1979).** Effect of reagent pH on determination of HDL cholesterol by precipitation with sodium phosphotungstate-magnesium. *Clin Chem*; **25**: 560-568.

**Grunewald K.K. (1982).** Serum cholesterol levels in rats fed skim fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J Food Sci*; **47**:2078-2079.

**Guiraud J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Paris: DUNOD; p: 190-200.

**Guiraud J.P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Paris: DUNOD; p: 89-200.

**Gunes H., Cerit H. et Altinel A. (2001).** Etlik piliçlerin verim özellikleri üzerine preprobiotigin (Fermacto-500) etkisi. *Ist Univ Vet Fak Derg*; **27**: 217-229.

**Halami P.M., Chandrashkar A. et Nand J. (2002).** *Lactobacillus farciminis* MD, a newer strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay. *Applied Microbiology*; **30**: 197-202.

**Hamilton J.M. (2003).** The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Int J Antimicrob Agents*; **22**: 360-366.

**Hariri A., Ouis N., Saharo F. et Bouhadi D. (2009).** Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube. *Rev Microbiol Ind San et Environn*; **10**: 37-55.

**Harrison V.C. et Peat G. (1975).** Serum cholesterol and bowel flora in the newborn. *Am J Clin Nutr*; **28**: 1351-1355

**Hashimoto H., Yamazaki K., Arai Y., Kawase M., He F., Hosoda M. et Hosono A. (1998).** Effect of lactic acid bacteria on serum cholesterol level in rats fed cholesterol diet. *Anim Sci Technol*; **69**: 702-707.

**Hashimoto H., Yamazaki K., He F., Kawase M., Hosoda M. et Hosono A. (1999).** Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* TMC 0409 strain observed in rats fed cholesterol contained diets. *Anim Sci J*; **72**: 90-97.

**Hosoda M., Hashimoto H., He D., Morita H. et Hosono A. (1996).** Effect of administration of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA-2 on faecal mutagenicity and microflora in human intestine. *J Dairy Sci* ; **79**: 745-749.

**Idoui T., Leghouchi E. et Karam N.E. (2007).** Selection of *Lactobacillus plantarum* BJ0021 for rabbit probiotic adjunct. *International Journal of Prebiotics and Probiotics*; **2**(1): 144-149.

**Idoui T. (2008).** Les bactéries lactiques indigènes : Isolement, identification et propriétés technologiques. Effets probiotiques chez le poulet de chair ISA15, le lapin de souche locale et le rat Wistar (Thèse de Doctorat). *Université d'Oran* ; p. 1-196.

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

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

**Izquierdo E. (2009).** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique (Thèse de doctorat). *IPHC Strasbourg* ; p. 1-230.

**Jeusette L., Istasse L. et Diez M. (2004).** Métabolisme lipidique et hyperlipémies chez le chien. *Ann. Méd. Vét* ; **148** : 79-89.

**Joffin J.N. et Leyral G. (2006).** Microbiologie alimentaire. France : Dictionnaire des techniques ; p : 12-239.

**Kalliomaki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P. et Isolauri E. (2001).** Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet* ; **357**: 1076-1079.

**Karam N.E. et Zadi-Karam H. (1994).** Isolement et caractérisation de bactéries lactiques du lait crus d'Algérie. In: Desjeux J.F. et Touhami M. Alimentation, génétique et santé de l'enfant. L'Harmattan; p. 257-264.

**Kawase M.**, Hashimoto H., Hosoda M., Morita H. et Hosono A. (2000). Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. *J Dairy Sci*; **83**(2): 255-263.

**Keim N.L.**, Marlett J.A. et Amundson C.H. (1981). The cholesterol effect of skim milk in young men consuming controlled diets. *Nutr Res*; **1**: 422-429.

**Klaenhammer T.R.** (1988). Bacteriocins of lactic bacteria. *Biochimie*; **70**: 337-349.

**Lambin S.** (1969). Le précis de microbiologie. Paris: Masson et CIE; p. 1-52.

**Leveau J.Y.**, Bouix M. et De Roissart H. (1991). La flore lactique: Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires. Paris : Lavoisier Tech & Doc; p : 152- 186.

**Lin W.H.**, Yu B., Jang S.H. et Tsen H.Y. (2007). Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*; **13**: 107-113.

**Lüllmann H.** et Mohr K. (2003). Atlas de poche de pharmacologie. Paris: Flammarion Médecine-Sciences; p. 380.

**Marteau P.**, Flouirié B., Pochart P., Chastang C., Desjeux J.F. et Rambaud J.C. (1990). Effect of the microbial lactase (EC 3.2.123) activity in yogurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase deficient humans. *Br J Nutr*; **64**: 71-79.

**Marteau P.** et Rambaud J-C. (1998). Probiotiques en gastroentérologie: bases rationnelles, effets démontrés et perspective. *Hépatogastro*; **5** (4) : 267-273.

**Marteau P.** (2001). Safety aspects of probiotic products. *Scand. J. Nutr*; **45**: 22-24.

**Marteau P.** et Seksik P. Probiotiques et alicaments. (2005). In : Luquet F. M. et Corrieu G. Bactéries lactiques et probiotiques. Paris: Lavoisier Tec&Doc ; p : 255-289

**Moreau M-C.** Bactéries lactiques probiotiques et immunité. (2005). In : Luquet F. M. et Corrieu G. Bactéries lactiques et probiotiques. Paris: Lavoisier Tec&Doc ; p. 211-253.

**Morin Y.**, Wainsten J-P. et Lemaire V. Larousse Médicale. Larousse/VUEF 2003, 1219p.

**Noh D.O.**, Kim S.H. et Gilliland S.E. (1997). Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J Dairy Sci*; **80**: 3107-3113.

**Nuoffer J-M.** (2005). Athérosclérose et hyperlipidémies primaires – un problème pédiatrique? *Paediatrica*; **16**(6): 34-37.

**Oatley J.T.**, Rarick M.D., Ji G.E. et Linz J.E. (2000). Binding of aflatoxin B1 to bifidobacteria *in vitro*. *J Food Prot*; **63**: 1133-1136.

**Obadina A.O.**, Oyewole O.B., Sanni L.O. et Tomlins K.L. (2006). Bio-preservative activities of *Lb. plantarum* strains in fermentating Cassava "fufu". *African Journal of Biotechnology*; **5**(8): 620-623.

**Oyetayo V.O., Adetuyi F.C. et Akinyossye F.A. (2003).** Safety and protective effect of *Lb. acidophilus* and *Lb. casei* probiotic agent *in vivo*. *African Journal of Biotechnology*; **2**(11): 448-452.

**Raibaud P., Ducluzeau R., Dubos F., Hudault S., Bewa H. et Muller M. C. (1980).** Implantation of bacteria from the digestive tract of man and various animals into gnotobiotic mice. *Am J Clin Nutr*; **33**: 2440-2447.

**Reid G., Bruce A. W. et Taylor M. (1995).** Instillation of *Lactobacillus* and stimulation of indigenous organisms to prevent recurrence of urinary tract infections. *Microecol Ther*; **23**: 32-45.

**Reid G., Bruce A. W., Fraser N., Heinemann C., Owen J. et Henning B. (2001).** Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Microbiol Med Immunol*; **30**: 49-52.

**Reid G. et Bruce A. W. (2001).** Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications. *J Immunol Des* ; **183**: 77-80.

**Reinheimerj A. (1990).** Inhibition of coliforme bacteria by lactic culture. *Australia Journal of Dairy Technology*; **72**: 113-142.

**Richmond W. (1973).** Preparation and properties of a cholesterol oxydase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin Chem*; **19**: 1350-1356.

**Robin J. M. et Rouchy A. (2001).** Les probiotiques. *Nutrithérapie info*; **6**: 1-4.

**Rossouw J.E., Burger E., Van der Vyver P. et Ferrerira J.J. (1981).** The effect of skim milk, young and full cream on human serum lipids. *Am J Clin Nutr*; **34**: 351-356.

**Rousseau V. (2004).** Evaluation d'oligosaccharides à effet prébiotique vis-à-vis de la microflore vaginale (Thèse de doctorat). *INSA Toulouse* ; p. 1- 186.

**Roy D. (2006).** Innocuité, qualité et efficacité des probiotiques. Résumé du rapport « Développement d'une expertise de pointe et de méthodes efficaces et rigoureuses en matière d'innocuité, qualité et efficacité des probiotiques. *AISA* ; Available from. URL: [http://www.aisa-ahif.org/index.php?menu=dossier\\_reglementaire](http://www.aisa-ahif.org/index.php?menu=dossier_reglementaire).

**Runho R.C., Sakomura N.K., Kuana S., Banzatto D., Junoqueria O.M. et Stringhini J.H. (1997).** Uso do acido organico (acido fumarico) nas racoes de frangos de corte. *Rev Bras Zoot*; **26**: 1183-1191.

**Saïle R. et Taki H. (2007).** Cholestérol, lipoprotéines et athérosclérose : de la biochimie à la physiopathologie. *Les Technologies De Laboratoire*; **2** : 4-11.

**Savado A., Cheik A.T., Ouattara Imael H.N. et Alfred S.T. (2004).** Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pakistan Journal of Nutrition*; **3**(3): 174-179.

*Annexe I**Composition des géloses et des bouillons*❖ **Gélose MRS (pH 6,2) :**

• Peptone	10g
• Extrait de levure	8g
• Extrait de viande	4g
• Glucose	20g
• Acétate de sodium trihydraté	5g
• Citrate d'ammonium	2g
• Hydrogénophosphate de potassium	2g
• Sulfate de magnésium heptahydraté	0,2g
• Sulfate de manganèse tétrahydraté	0,05g
• Tween 80	1ml
• Agar	1,5g
• Eau distillée	1000ml

❖ **Gélose HEKTOEN (pH 7,6) :**

• Protéose-peptone	12g
• Extrait de levure	3g
• Chlorure de sodium	5g
• Thiosulfate de sodium	5g
• Sels biliaires	9g
• Citrate de fer ammoniacal	1,5g
• Salicine	2g
• Lactose	12g
• Saccharose	12g
• Fushine acide	0,1g
• Bleu de bromothymol	65g
• Gélose	13g

❖ **Gélose nutritive (pH 7,5) :**

• Peptone	10g
• Extrait de viande	5g
• Chlorure de sodium	5g
• Agar	15g

❖ **Milieu Moeller (pH 6) :**

• Peptone	5g
• Extrait de viande	5g
• Pourpre de brocrésole	0,1g
• Rouge de crésol	5mg
• Pyridoxal	5mg
• Glucose	0,5g



**Savadogo A., Cheik A.T., Ouattara Imael H.N. et Alfred S.T. (2006).** Bacteriocins and lactic acid bacteria- a mini review. *African Journal of Biotechnology*; **5(9)**: 383-678.

**Schillinger V. (1990).** Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biotechnology and Food Safety*; **4**: 55-74.

**Shanahan F. (2000).** Probiotics and inflammatory bowel disease: Is there a scientific rationale? *Inflamm Bowel Dis*; **6(2)**: 107-115.

**Sharpe M.E. (1979).** Identification of lactic acid bacteria. In: Skinner F.A. et Lovelock D.W. Identification methods for microbiologists. *Academic Press London UK*; p: 233-259.

**Tagg J.R., Dajani A.S. et Wannamaker L.W. (1976).** Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriol Rev*; **40**: 722-756.

**Taranto M. P., Medici M., Perdigon G., Ruiz Holgado A. P. et Valdez G. F. (1998).** Evidence for Hypocholesterolemic Effect of *Lactobacillus reuteri* in Hypercholesterolemic Mice. *J Dairy Sci* ; **81(9)**: 2336-2340.

**Thissen J-P. (1999).** Les normes du cholestérol. *Louvain Med*; **118**: 139-144.

**Todorov S.V., Theodore L.M. et Dicks H. (2005).** Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lb. plantarum* ST194BZ, a strain isolated from Bosa. *Food Technol Biotechnol*; **43(2)**: 165-173.

**Xiao J.Z., Kondo S., Takahashi N., Miyoji K., Oshidat K. et Hiramatsu A. (2003).** Effect of milk products fermented by *Bifidobacterium logum* on blood lipids in rats and adult male volunteers. *J Dairy Sci*; **86**: 2452-2461.

**Yusrizal A. et Chen T.C. (2003).** Effect of adding chicory fructans in feed on broiler growth performance, serum cholesterol and intestinal length. *International Journal of Poultry Science*; **2(3)**: 214-219.

## ❖ Milieu MRS (pH 6,2) :

• Peptone	10g
• Extrait de levure	8g
• Extrait de viande	4g
• Glucose	20g
• Acétate de sodium trihydraté	5g
• Citrate d'ammonium	2g
• Hydrogénophosphate de potassium	2g
• Sulfate de magnésium heptahydraté	0,2g
• Sulfate de manganèse tétrahydraté	0,05g
• Tween 80	1ml
• Eau distillée	1000ml

## ❖ Milieu Gibson Abdel Malek (pH 7) :

• Lait écrémé à 0,01%	800ml
• Teinture de tournesol	qq. gouttes
• Glucose	55g
• Peptone	2g
• Extrait de viande	2g
• NaCl	1g
• Agar	4g
• Eau distillée	200ml
• Jus de tomate	100ml
• Extrait de levure	2,8g

## ❖ Milieu MEVAG (pH 7,7) :

• Extrait de viande	3g
• Chlorure de potassium	5g
• Rouge de phénol	20mg
• Gélose	3g

## ❖ Milieu PBS (pH 7,2) :

• NaCl	8g
• KCl	0,20g
• KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24g
• K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44g

*Les colorants*❖ **Violet de Gentiane :**

- Violet de Gentiane 1g
- Ethanol à 9% 10ml
- Phénol 2g
- Eau distillée 100ml

❖ **Lugol :**

- Iode 1g
- Iodure 2g
- Eau distillée 300ml

## Annexe II

Tableau 1. Profil fermentaire des souches par galeries API50 CH.

Souches sucres	S1	S4	S6	S8	S10
0	-	-	-	-	-
GLY	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
ERY	-	-	-	-	-
D.ARA	-	-	-	-	-
L.ARA	+/-	+/-	+	+/-	+/-
RIB	+	+	+	+	+
D.XYL	-	-	-	-	-
L.XYL	-	-	-	-	-
ADO	-	-	-	-	-
MDX	-	-	-	-	-
GAL	-	+/-	+	+/-	-
GLU	+	+	+	+	+
FRU	+	+	+	+	+
MNE	+	+	+	+	+
SBE	-	-	+	-	-
RHA	-	-	-	-	-
DUL	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-
MAN	+	+	+	+	+/-
SOR	+	+	+/-	+	-
MDM	-	-	-	-	-
MDG	-	-	-	-	-
NAG	+	+	+	+	+
AMY	+	+	+	+	+/-
ARB	+	+	+	+	+
ESC	+	+	+	+	+
SAL	+	+	+	+	+
CEL	+	+	+	+	+
MAL	+	+	+	+	+
LAC	-	-	+	-	-
MEL	-	-	+/-	-	-
SAC	+	+	+	+	+
TRE	+	+	+	-	+
INU	-	-	-	-	-
MLZ	+	+	+	+	+
RAF	-	-	-	-	-
AMD	-	-	-	-	-
GLYG	-	-	-	+	-
XLT	-	-	-	-	-
GEN	+	+	+	+	+
TUR	+	+	+	+	+
LYX	-	-	-	-	-
TAG	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
DFUC	-	-	-	-	-
LFUC	-	-	-	-	-
DARL	-	-	-	-	-
LARL	-	-	-	-	-
GNT	-	-	-	-	+
2KG	-	-	-	-	+/-
5KG	-	-	-	+/-	+/-

Tableau 2. Tolérance des bactéries lactiques aux acides.

Souches	Avant l'incubation		Après 3 h d'incubation	
	DO	Nombre de cellules	DO	Nombre de cellules
S1	2,40	1232	2,42	2016
S2	2,50	1036	2,51	1960
S3	2,50	1120	2,51	3024
S4	2,58	700	2,59	2324
S5	2,61	560	2,69	1764
S6	2,66	1344	2,72	2632
S7	2,63	1400	2,69	1904
S8	2,30	1624	2,45	3136
S9	2,09	980	2,24	2548
S10	2,11	1036	2,27	2436

DO : densité optique /  $\lambda = 620\text{nm}$

Tableau 3. Tolérance des lactobacilles aux sels biliaries.

Souches	A T= 0	A T = 4h			
	0 %	DO	0 %	DO	0,3 %
S1	88	0,386	200	0,168	160
S2	144	0,355	196	0,079	72
S3	48	0,322	136	0,001	64
S4	28	0,327	104	0,142	96
S5	44	0,320	280	0,130	128
S6	48	0,278	152	0,016	88
S7	16	0,417	176	0,008	128
S8	288	0,238	296	0,069	80
S9	104	0,211	336	0,043	48
S10	36	0,231	480	0,005	96

Tableau 4. Résistance aux antibiotiques.

Souches ATB	S1	S3	S4	S5	S6	S8	S9	S10
Amoxicilline	2.8	2.3	2	2.7	1.8	2	2	2.8
Colystine	2.4	0	1.5	0	2	2.5	1.9	0
Erythromycine	2.8	0	3.5	2.8	4	4	2	4.5
Pénicilline-G	2.7	0	3	3	2.5	2.1	2	2.5
Oxacilline	0	0	0	0	1.8	2.1	0	0

Tableau 7. Résultats du dosage des paramètres plasmatiques.

		Lot Témoin	Lot Probiotique	lot Médicament
<b>1<sup>ère</sup> Semaine</b>	<b>CHT</b>	0,40	0.47	0,70
	<b>TG</b>	0,59	0.46	0,70
	<b>HDL</b>	/	/	/
	<b>LDL</b>	/	/	/
<b>2<sup>ème</sup> Semaine</b>	<b>CHT</b>	0,60	1.68	1,48
	<b>TG</b>	0,50	0.84	1,25
	<b>HDL</b>	0,38	0.62	0,9
	<b>LDL</b>	0,12	0.89	0,33
<b>3<sup>ème</sup> Semaine</b>	<b>CHT</b>	0,75	2.61	2,46
	<b>TG</b>	1,20	2.33	2,47
	<b>HDL</b>	0,42	1.9	1,65
	<b>LDL</b>	0,09	0.24	0,32
<b>4<sup>ème</sup> Semaine</b>	<b>CHT</b>	0,51	0.25	0,40
	<b>TG</b>	0,72	0.36	0,52
	<b>HDL</b>	0,34	0.13	0,17
	<b>LDL</b>	0,02	0.04	0,12

## Résumé :

L'objectif de ce travail vise à maintenir l'hypothèse que la consommation du lait fermenté enrichi en probiotiques puisse moduler le taux de cholestérol sanguin et de rendre une hyperlipidémie à la normale. Au début, l'étude de la pharmacocinétique *in vitro* des bactéries lactiques isolés des selles d'enfant nous a porté à croire qu'elles ont un intérêt probiotique et se retrouvent viables et cultivables aux conditions gastro intestinales (acidité et présence de la bile) et de leurs aptitude d'adhérer la muqueuse gastro intestinale.

Par ailleurs, une deuxième partie dédiée à caractériser les effets induits par la consommation d'une supplementation du lait fermenté enrichi par deux souches *Lb.delbrueckii ssp bulgaricus* et *Lb.casei ssp casei* sur la réduction du taux de cholestérol dans le sang chez des rats *wistar albinos* et d'une part de comparer leur effet synergique vis-à-vis d'un médicament hypolipémiant

**Mots Clés :** Probiotiques, *Lactobacillus*, Hyperlipémie, Rat.

## Abstract:

The objective of this work is maintaining the assumption that the consumption of the fermented milk enriched into probiotic can modulate the blood cholesterol level and to return a hyperlipidemy to the normal. At the beginning, the study of pharmacocinetic *in vitro* of the lactic bacteria isolated from the saddles of child carries us to believe that they have an interest probiotic and find themselves viable and cultivable in the intestinal conditions gastro (acidity and presence of the bile) and of their aptitude to adhere the intestinal mucous membrane gastro. In addition, a second part dedicated to characterize the effects induced by consumption of a supplementation of the fermented milk enriched by two strains *Lb.delbrueckii ssp bulgaricus* and *Lb.casei ssp casei* on the reduction of the cholesterol level in blood in rats *albino wistar* and on the one hand of compared their synergistic effect with a hypolipemiant drug.

**Keywords:** probiotics, *Lactobacillus*, hyperlipemia, hypolipemiant, Rat.

## المخلص :

إن الهدف من هذا العمل هو الحفاظ على فرضية أن استهلاك الحليب المخمر بالبروبيوتيك يمكن أن يعدل نسبة الكولسترول والدهون في الدم و إعادة تخفيض ارتفاع نسبة الدهون الى نسبتها العادية. في البداية ، دراسة التأثير الدوائي من البكتيريا الألبان في المختبر المعزولة من براز الأطفال يقودنا الى الاعتقاد أن لديهم ميزات البروبيوتيك وإيجاد أن لهم القدرة على النمو في ظروف الجهاز الهضمي (الحموضة وجود الصفراء) ومدى صلاحيتها للاتصاق بمخاطية المعدة والأمعاء. بالإضافة إلى ذلك، الجزء الثاني من الدراسة مكرس لتبيان الآثار الناجمة عن استهلاك الحليب المخمر مع اثنين من سلالات *Lb.delbrueckii ssp bulgaricus* و *Lb.casei ssp casei* على خفض نسبة الكولسترول في دم الفئران وستار البيضاء ومن جهة أخرى مقارنة تأثيرها المزوج مع دواء مخفض لنسبة الدهون في الدم.

**الكلمات المفتاحية:** بروبيوتيك, لاكتوباسيلوس, ارتفاع الدهون, مخفضات الدهون, الجرد.