

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة العليا للعلوم البيولوجية بهران
Ecole Supérieure en Sciences Biologiques d'Oran



MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biologie Moléculaire

Isolement et caractérisation des probiotiques à effet anti-inflammatoire

Présenté par :

**DIFilhem
MAROUFKhedidja**

Soutenu publiquement le : 01/09/2020

Devant le jury :

Mme BENYETTOUImène	MAB	ESSB Oran	Présidente
Mme RAHLIFouzia	MCB	ESSB Oran	Encadreur
M.KHELLOmar	MAB	ESSB Oran	Examinateur
Mme BABA HAMED Samia	MCB	ESSB Oran	Examinatrice

Année universitaire :2019/2020

REMERCIEMENT

Nous tenons avant tout à remercier notre promotrice Madame **RAHLI Fouzia** qui a accepté de nous encadrer, qui nous a guidé par ses précieux conseils et suggestions pertinentes. Nous vous remercions profondément pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail, pour votre disponibilité et votre aide, qui ont permis l'aboutissement de ce travail. Nous vous sommes sincèrement reconnaissantes.

Nous remercions la présidente du jury Madame **BENYETTOU Imène**, pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury à l'occasion de cette soutenance. Recevez l'assurance de toute notre reconnaissance.

Aux membres du jury Monsieur **KHELIL Omar** et Madame **BABA HAMED Samia**, pour avoir accepté avec beaucoup de gentillesse de participer à ce jury. Veuillez recevoir les remerciements les plus chaleureux pour l'intérêt que vous portez au sujet de notre mémoire.

A nos chers parents, Grâce à vous, nous avons pu réaliser nos études dans les meilleures conditions. Nous vous remercions également pour votre soutien lors de ce travail mais aussi durant toutes ces années d'études.

À nos familles, merci pour votre soutien et vos encouragements.

À nos amis de promotion, nos compagnons de révisions et tous ceux qu'on aurait pu oublier. Les années d'études passées en votre compagnie ont filé si vite ! Merci pour tous ces instants de vie partagés, et pour tous les souvenirs que nous avons créés.

Nous remercions également tout le corps professoral et administratif de l'école supérieure en sciences biologiques, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Table des matières

Remerciement.....	II
Liste des figures.....	VI
Liste des tableaux.....	VII
Liste des abréviations.....	VIII
Résumé.....	X
Summary.....	XI
Résumé(arabe).....	XII
I. Introduction	4
II. Synthèse bibliographique.....	7
Chapitre I : Le microbiote et les maladies intestinales.	8
1. Généralité	8
2. Le microbiote intestinal : composition de l'inconnu qui nous colonise.	8
2.1. Composition quantitative	8
2.2. Composition qualitative	8
3. Les facteurs ayant un effet sur l'installation et la stabilité du microbiote intestinal	8
3.1. Le microbiote au cours de l'enfance	8
3.2. Le microbiote chez l'adulte.....	9
4. Les bénéfices du microbiote intestinal.....	9
4.1. Activité métabolique indispensable	9
4.2. Fonction de structure et de protection.....	9
4.3. Interactions avec le système immunitaire	10
5. Relation entre le microbiote et les pathologies.....	10
5.1. Maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI).....	10
5.1.1. Maladie de Crohn (MC).....	10
5.1.2. La rectocolite hémorragique (RCH)	11

5.2.	Le syndrome de l'intestin irritable (SII)	11
5.3.	Le syndrome de grêle court (SGC).....	11
5.4.	Entérocolite ulcéro-nécrosante du nourrisson (ECUN)	12
5.5.	Cancers digestifs	12
Chapitre II : Les probiotiques		13
1.	Historique et définition actuelle.....	13
2.	Les différents types de microorganismes probiotiques.....	13
3.	Critères de sélection des probiotiques.....	13
3.1.	Critères fonctionnels	13
3.2.	Critères sécuritaires.....	13
3.3.	Propriétés technologiques	14
4.	Effets des probiotiques sur le tractus gastro-intestinal.....	14
4.1.	Les diarrhées.....	14
4.1.1.	Diarrhées aiguës	14
4.1.2.	Diarrhées associées aux antibiotiques.....	14
4.1.3.	Diarrhée des voyageurs.....	14
4.2.	Les maladies inflammatoires intestinales.....	15
4.2.1.	Les coliques infantiles.....	15
4.2.2.	Le syndrome de l'intestin irritable.....	15
4.2.3.	Les MICI	15
4.2.4.	Le cancer colorectal	15
5.	Mécanismes d'action.....	16
5.1.	Effets sur les fonctions intestinales.....	16
5.2.	Modulation du microbiote intestinal.....	16
5.3.	Immunomodulation.....	16
III. Matériel et méthodes		17
1.	Echantillonnage	18
2.	Isolement et purification des bactéries.....	18

3.	Identification des isolats	19
3.1.	Examen microscopique	20
3.2.	Les tests physiologiques et biochimiques	20
4.	Conservation des souches bactériennes	21
5.	Mise <i>in vitro</i> de quelques propriétés probiotiques.....	21
6.	Etude des propriétés probiotiques et anti-inflammatoires des bactéries chez les souris Balb/c	22
6.1.	Echantillon.....	22
6.2.	Animaux	22
6.3.	Répartition des animaux.....	23
6.4.	Sacrifice.....	24
6.6.	Analyse statistique	26
IV.	Résultats et discussions.....	24
1.	Isolement et identification des bactéries	25
1.1	Pré-identification	25
1.2.	L'identification physiologique et biochimique	26
2.	Mise <i>in vitro</i> de quelques propriétés probiotiques.....	29
3.	Etude des propriétés probiotiques et anti-inflammatoires des <i>Lactobacillus</i> chez les souris Balb/c.....	29
3.1.	Effet de l'administration des souches de <i>Lactobacillus</i> sur les indices d'activité.....	29
3.1.1.	Effet sur la croissance pondérale	29
3.1.2.	Mesure de la température corporelle	30
3.1.3.	Interprétation	31
3.2.	Histologie de la muqueuse intestinale.....	32
V.	Conclusion et perspectives	35
VI.	Bibliographie	37
VII.	Annexes.....	47

Liste des figures :

Figure 1. Composition du microbiote intestinal chez l'humain (Gagnon, 2007).	9
Figure 2. Les fonctions du microbiote intestinal.	10
Figure 3. Image d'endoscopie entre un colon sain (à gauche) et un colon enflammé d'un patient atteint d'une RCH (à droite) (Watterlot, 2010).	11
Figure 4. Schéma résumant la méthode utilisée pour l'isolement les bactéries lactiques des différents échantillons.	19
Figure 5. Diagramme représentatif du protocole expérimental.	24
Figure 6. Sacrifice et prélèvement du colon des souris à J12.	24
Figure 7. Aspect macroscopique des colonies sur gélose MRS.	25
Figure 8. Aspect microscopique après coloration de Gram des souches isolées sur gélose MRS (Grossissement X100).	26
Figure 9. L'ensemencement de la galerie <i>Api 20 E</i> (avant et après incubation)	27
Figure 10. Exemple du profil fermentaire (galerie <i>Api 50 CH</i>) des bactéries lactiques (avant et après incubation).	28
Figure 11. Observation microscopique (G x 10) d'un fragment du colon coloré à l'hémalum-écotine d'une souris témoin négatif	32
Figure 12. Observation microscopique (G x 10) d'un fragment du colon coloré à l'hémalum-écotine d'une souris TP	33
Figure 13. Observation microscopique (G x 10) d'un fragment du colon coloré à l'hémalum-écotine d'une souris du groupe expérimental	33

Liste des tableaux :

Tableau 1. Les échantillons utilisés et la flore ciblée.	18
Tableau 2. Conditions d'isolement des différents microorganismes.	18
Tableau 3. Les critères utilisés pour l'identification et la sélection des colonies bactériennes.	20
Tableau 4. Résultats des paramètres biochimiques.	26
Tableau 5. Effet de l'administration des souches de <i>Lactobacillus</i> sur le gain pondéral.	30
Tableau 6. Effet de l'administration des souches de <i>Lactobacillus</i> sur la variation de la température corporelle.	31

Liste des abréviations :

ADH : AntiDiuretic Hormone.

g : Gramme.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

GN : Gélose nutritive.

API : Analytical Profile Index.

h : Heure.

ATCC : American Type Culture Collection.

H₂O : Dioxyde d'hydrogène.

B : *Bifidobacterium*.

H₂O₂ : L'eau oxygénée.

Balb/c : Lignée *BALB*, sous-lignée /c.

< : Inférieur à.

BN : Bouillon nutritif.

J : jour.

B8 : Biotine.

L. : *Lactobacillus*.

B9 : Acide folique.

50CHL : Identification de *Lactobacillus*.

B12 : Cobalamine.

LB : LuriaBertani.

C. : Clostridium.

MC : Maladie de Crohn.

CD : Cellule dendritique.

MH : Mueller-Hinton.

CFU : Unité Formant Colonie.

MICI : Maladies inflammatoires chroniques intestinales.

Cm : Centimètre.

NF-κB : Nuclear Factor-Kappa B.

CO₂ : Dioxyde de carbone.

μL : Microlitre.

°C : Degré Celsius.

ml : Millilitre.

DSS : Dextran sulfate sodium.

μm : micromètre.

E.coli : Escherichia coli.

mm: millimètre.

20E : Identification des entérobactéries.

MMR : Mismatch Repair.

ECUN : Entérocolite ulcéro-nécrosante du nourrisson.

mn : Minute.

FAO: Food and Agriculture Organisation of the United Nations.

MRS : Man, Rogosa et Sharpe.

MRS_c : MRS cysteine.

nm: Nanomètre.

n° : Numéro.

O₂ :oxygène.

Ox :oxydase.

PBS : phosphate buffered saline.

pH : Potentiel d'hydrogène.

+ : Plus de.

± : Plus ou moins.

% : Pourcentage.

p : Valeur de probabilité.

RCH : Rectocolite hémorragique.

S. : *Saccharomyces boulardii*.

SII : Syndrome de l'intestin irritable.

SGC : Syndrome de grêle court.

Spp : Sous-espèce.

SPSS : Statistical Package for the Social Sciences.

Th : Helper T cells.

TN : Témoin négatif.

Trs : Tours.

TP : Témoin positif.

Test «t » : Test de Student.

vs : (Versus) signifie Contre.

V : Volume.

Résumé :

Afin de stabiliser le microbiote intestinal et prévenir certaines maladies inflammatoires de l'intestin, il est suggéré d'utiliser certaines bactéries lactiques dites « probiotiques ». La consommation de ces bactéries, qui sont des composants normaux du microbiote intestinal, aurait des effets bénéfiques sur la santé. Cependant leur éventuel rôle thérapeutique n'a été que très peu étudié. Dans ce travail, nous avons évalué les propriétés probiotiques et anti-inflammatoires des bactéries lactiques isolées de différents échantillons. Quarante souches ont été isolées purifiées et identifiées par les méthodes classiques, appartenant au genre de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*.

L'étude *in vitro* de quelques paramètres probiotiques a permis de sélectionner trois souches de *Lactobacillus*, qui ont démontré une forte résistance aux conditions hostiles, la combinaison de ces trois souches a fait l'objet d'une étude *in vivo* afin de déterminer leur effet préventif dans un modèle animal d'inflammation intestinale induite par le DSS. Trente-six souris mâles âgées de 4 à 5 semaines, d'un poids moyen 22g ont servis pour notre protocole de 12 jours. Les animaux ont été répartis en 3 lots de 12 souris chacun comme suit : témoin négatif intubé par voie intra-gastrique avec 0,3 ml d'une solution saline pendant toute la durée de l'expérimentation ; témoin positif intubé par voie intra-gastrique avec 0,3 ml d'une solution saline pendant 7 jours, puis une solution de dextran sulfate-sodium (DSS) 4% à raison de 0.3ml pendant 5 jours ; le groupe expérimental intubé par voie intra-gastrique avec 0,3 ml d'un mélange de trois souches de *Lactobacillus* pendant 7 jours, puis la solution de DSS 4% à raison de 0.3ml pendant 5 jours jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Une cinétique de la prise de poids et de la température corporelle a été effectuée plusieurs fois au cours de l'expérimentation. Au 12ème jour, après le sacrifice des souris, des fragments de colon ont été prélevés pour une éventuelle étude histologique. Ce gavage probiotique a démontré des bénéfices en réduisant la perte du poids et en diminuant les scores de consistance et de présence de sang dans les fèces et préservant l'intégrité du colon comparativement au groupe témoin.

L'étude histologique a révélé que l'administration des bactéries lactiques a considérablement réparé les lésions du colon causé par l'agent toxique, ceci est témoigné par l'élongation du colon, la réduction de l'infiltration lymphocytaire et l'amélioration de la hauteur des villosités.

Mots clés : Bactéries lactiques, probiotiques, maladies inflammatoires intestinales, microbiote intestinale, effet anti-inflammatoire.

Summary:

In order to stabilize the intestinal microbiota and prevent certain inflammatory bowel diseases, it is suggested to use certain lactic bacteria called "probiotics". Consumption of these bacteria, which are normal components of the intestinal microbiota, would have health benefits. However, their potential therapeutic role has been little studied. In this work, we evaluated the probiotic and anti-inflammatory properties of lactic acid bacteria isolated from different samples. Forty strains were isolated purified and identified by classical methods, belonging to the genus *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*.

The in vitro study of some probiotic parameters made it possible to select three strains of *Lactobacillus*, which demonstrated a high resistance to hostile conditions, the combination of these three strains was studied in vivo to determine their preventive effect in an animal model of DSS-induced intestinal inflammation. Thirty-six male mice aged 4-5 weeks, with an average weight of 22g, were used for our 12-day protocol. The animals were divided into 3 lots of 12 mice each as follows: negative control intubated intra-gastric with 0.3 ml of saline solution for the duration of the experiment; positive control intubated intra-gastric with 0,3 ml of a saline solution for 7 days, then a solution of dextran sodium sulfate (DSS) 4% at a rate of 0,3ml for 5 days; the experimental group intubated intragastric with 0,3 ml of a mixture of three strains of *Lactobacillus* for 7 days, then the solution of DSS 4% at a rate of 0.3ml for 5 days until the end of the experiment.

Kinetics of weight gain and body temperature were performed several times during the experiment. On the 12th day, after the sacrifice of the mice, fragments of the colon were taken for a possible histological study. This probiotic gavage demonstrated benefits by reducing weight loss and decreasing consistency and blood scores in the faeces and preserving the integrity of the colon compared to the control group.

The histological study revealed that the administration of lactic bacteria considerably repaired the lesions of the colon caused by the toxic agent, this is testified by the elongation of the colon, reduced lymphocyte infiltration and improved villi height.

Keywords: Lactic bacteria, probiotics, inflammatory bowel diseases, intestinal microbiota, anti-inflammatory effect.

المخلص :

من أجل تثبيت الجراثيم المعوية ومنع بعض الأمراض الإلتهابية للأمعاء، يُقترح استخدام بعض بكتيريا حمض اللاكتيك المسماة "البروبيوتيك". إنَّ إستهلاك هذه البكتيريا ، التي هي مكونات طبيعية من الجراثيم المعوية ، سيكون له آثار مفيدة على الصحة. ومع ذلك ، فلم يتم دراسة دورها العلاجي المحتمل إلا قليلاً. في هذا العمل ، قمنا بتقييم الخصائص الحيوية والمضادة للالتهابات لبكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة من عينات مختلفة. تم عزل تنقية وتحديد أربعين سلالة بالطرق التقليدية تنتمي إلى جنس *Lactococcus*، *Bifidobacterium*، *Lactobacillus*.

أتاحت الدراسة المختبرية لبعض متغيرات البروبيوتيك إمكانية اختيار ثلاث سلالات من *Lactobacillus* ، والتي أظهرت مقاومة قوية للظروف المعادية ، كان خلط هذه السلالات الثلاثة موضوع دراسة في الجسم الحي لتحديد تأثيرها الوقائي في نموذج حيواني من التهاب الأمعاء الناجم عن DSS. تم استخدام ستة وثلاثين فأراً من الذكور بمتوسط 22 جراماً لبروتوكول 12 يوماً. تم تقسيم الحيوانات إلى 3 مجموعات من 12 فأراً على النحو التالي: تنبيب الشاهد السليبي داخل المعدة باستخدام 0.3 مل من محلول ملحي طوال مدة التجربة ؛ تنبيب الشاهد الإيجابي داخل المعدة باستخدام 0.3 مل من محلول ملحي لمدة 7 أيام ، ثم محلول كبريتات ديكستران الصوديوم (DSS) بنسبة 4 ٪ بمعدل 0.3 مل لمدة 5 أيام ؛ تم تنبيب المجموعة التجريبية داخل المعدة مع 0.3 مل من خليط من ثلاث سلالات من *Lactobacillus* لمدة 7 أيام ، ثم محلول 4 DSS ٪ بمعدل 0.3 مل لمدة 5 أيام حتى نهاية التجربة. تم إجراء حركية زيادة الوزن ودرجة حرارة الجسم عدة مرات خلال التجربة. في اليوم الثاني عشر، بعد التضحية بالفئران، تم أخذ قطع من القولون لدراسة نسيجية محتملة. لقد ثبت أن هذه التغذية القسرية من البروبيوتيك تفيد في تقليل فقدان الوزن بإنقاص درجات الإتساق ووجود الدم في البراز والحفاظ على سلامة القولون مقارنة بمجموعة التحكم. أظهرت الدراسة النسيجية أن إدخال بكتيريا حمض اللاكتيك قد أصلح بشكل كبير آفات القولون الناتجة عن العامل السام ، ويتضح ذلك من خلال استئالة القولون ، تقليل التسلل اللماوي ، وتحسين ارتفاع الزغابات .

كلمات مفتاحية : بكتيريا حمض اللاكتيك، بروبيوتيك، أمراض الإلتهابات المعوية، الجراثيم المعوية، أثر مضاد الالتهابات.

I. Introduction

« Nos amies les bactéries : elles détiennent les clés de la santé et du bien-être » dit Collen dans l'un de ses livres, cette phrase prend tout son sens quand on sait que notre intestin héberge 10^{14} bactéries formant un organe à part entière appelé microbiote intestinal, il joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Sa dysbiose, autrement dit son déséquilibre provoque diverses pathologies intestinales tels que les maladies inflammatoires ainsi que les troubles du transit (Biard, 2016).

Plusieurs études ont montré que la consommation d'aliments fermentés permet de rétablir la flore intestinale en générant des effets bénéfiques sur la santé de l'homme et des animaux. Les microorganismes dans ces aliments ont reçu le nom de probiotiques.

Le mot probiotique fait référence à l'administration de bactéries spécifiques dont la prépondérance dans le gros intestin exercerait un effet bénéfique sur la santé humaine.

Le besoin d'avoir des nouvelles pistes de prévention ou de thérapie vis-à-vis des pathologies digestives a permis de mettre en avant l'intérêt des souches probiotiques (Watterlot, 2010). La plupart des microorganismes probiotiques appartiennent essentiellement aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (Prasad et al., 1998; Rubio et al., 2014; Belhamra, 2018), cela n'empêche l'utilisation de d'autres bactéries plus résistantes aux conditions extrêmes telles que les *Bacillus*. En Algérie l'utilisation des probiotiques est un sujet qui reste à développer, leurs avantages sont généralement méconnus par les consommateurs mais aussi par les professionnels de santé (Bahri, 2014).

Ce travail aura donc permis d'améliorer nos connaissances sur le rôle des probiotiques dans la prévention et traitement des pathologies digestives.

L'objectif de cette étude consiste à évaluer le potentiel probiotique et anti-inflammatoire des bactéries lactiques et non lactiques isolées de différents échantillons. Pour atteindre cet objectif nous avons adopté une démarche intégrant :

- Isolement et identification des bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Bacillus*.
- Sélection *in vitro*, des souches à effet probiotique en étudiant plusieurs paramètres (tolérance à acidité, résistances aux sels biliaires, activité antibactérienne).
- Etude *in vivo*, du pouvoir curatif des souches sélectionnées capable de réduire l'inflammation et de prévenir les désordres métaboliques.

Pour mieux cerner l'objectif dans lequel s'inscrit ce sujet de mémoire, nous avons subdivisé notre travail en deux parties :

La première partie fait référence à une bibliographie faisant le point sur le microbiote intestinal, sa composition, ses fonctions ainsi que les pathologies qui l'affectent. Les probiotiques, les différents microorganismes utilisés, les critères de sélection et leur rôle dans le traitement des pathologies digestives.

La deuxième partie est consacrée aux méthodes et techniques employées, pour l'étude des aptitudes probiotiques et anti-inflammatoires des bactéries isolées et pour finir des perspectives sont proposées conjointement à la conclusion.

II. Synthèse bibliographique

Chapitre I : Le microbiote et les maladies intestinales.

1. Généralité :

le microbiote anciennement appelé flore commensal est l'ensemble des microorganismes non pathogènes vivant dans un milieu donné qui peut être animale ou végétal sans entraîner de désordre (Burcelin et al., 2016).

2. Le microbiote intestinal : composition de l'inconnu qui nous colonise.

Chez un individu sain, le microbiote est distribué de façon asymétrique du point de vue quantitative ainsi que qualitative tout le long du tube digestif (Barbut & Joly, 2010).

2.1. Composition quantitative :

La densité microbienne varie de manière croissante et progressive dans le tube digestif (O'Hara & Shanahan, 2006). Cette variation dépend des changements des conditions physico-chimiques caractéristiques de chaque écosystème présent dans le tractus gastro-intestinal. La présence bactérienne s'intensifie et atteint son maximale dans le colon (entre 10^{10} à 10^{11} CFU/ml), un écosystème très favorable pour la croissance des bactéries anaérobies strictes en raison d'absence d'oxygène.

2.2. Composition qualitative :

Le microbiote gastro-intestinal est dominé par la présence de 3 phyla bactériens bien distincts (Barbut & Joly, 2010): Les Firmicutes c'est le phylum des bactéries les plus abondantes. Les deux autres phyla majoritaires sont les Bacteroidetes et les Actinobacteria qui représentent respectivement 17% et 3% de l'écosystème intestinal (Lay et al., 2005; Tap et al., 2009). D'autres phyla sont rencontrés dans le microbiote intestinal mais à des faibles quantités qui sont : les Proteobacteries et les Verrumicobia. En plus de la flore bactérienne, le microbiote intestinal contient d'autres microorganismes : des champignons, des levures, des archées et des virus. Une illustration de la composition qualitative et quantitative est présentée dans (**Figure1**).

3. Les facteurs ayant un effet sur l'installation et la stabilité du microbiote intestinal

3.1. Le microbiote au cours de l'enfance :

Le fœtus durant la période du développement prénatal est entièrement stérile, le début de l'acquisition d'une flore bactérienne commence pendant l'accouchement (Campeotto et al., 2007). Cette acquisition est progressive et variable d'un individu à un autre, et c'est tout dépend les conditions dans lesquels le nouveau né va être exposé tels que le mode de délivrance, l'âge gestationnel et la nutrition néonatale (Cibik et al., 2004).

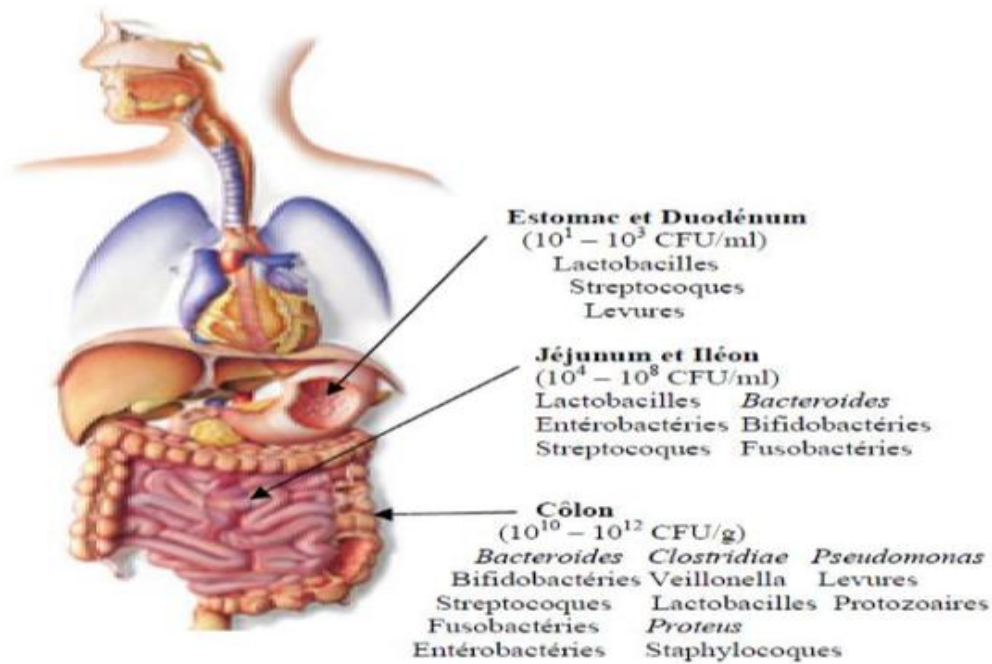


Figure 1. Composition du microbiote intestinal chez l'humain (Gagnon, 2007).

3.2. Le microbiote chez l'adulte :

La flore intestinal chez un adulte est sujette à des changements au cours de sa vie, sa composition variera tout dépend de plusieurs facteurs : L'âge, l'alimentation, l'usage des médicaments et plus précisément les antibiotiques, l'hospitalisation et l'alimentation. Cette dysbiose aura de lourdes conséquences sur le corps humains causant ainsi principalement l'obésité et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)(Schwiertz et al., 2003).

4. Les bénéfices du microbiote intestinal :

4.1. Activité métabolique indispensable :

Cette flore joue un rôle très important dans le métabolisme des gaz, des lipides et des xénobiotiques (Bourlioux, 2014; Seksik & Landman, 2015). Certaines bactéries du microbiote intestinal peuvent synthétiser la vitamine B8 (biotine), B9 (acide folique), B12 et elles participent également à la production de vitamine K, vitamine essentielle de la coagulation (O'Hara & Shanahan, 2006; Zoetendal et al., 2006).

4.2. Fonction de structure et de protection :

La communauté bactérienne intestinale associée à la muqueuse intestinale a un effet barrière contre les microorganismes pathogènes. Ce rôle est assuré grâce aux phénomènes de compétition pour les substrats, de la capacité d'adhésion et la synthèse de molécules à effet bactéricide (Olivier Goulet, 2009).

4.3. Interactions avec le système immunitaire :

Grace à l'utilisation de souris axéniques en d'autres termes : dépourvues de microbiote, des chercheurs ont pu prouver que la flore intestinale détient une fonction essentielle dans la stimulation du développement de l'immunité innée et adaptative de l'hôte (Seksik & Landman, 2015). Parmi les résultats obtenus, ils ont pu démontrer que les bactéries filamenteuses segmentées, entraînent la différenciation des lymphocytes Th17 qui sont des cellules pro-inflammatoires. Les fonctions du microbiote intestinales sont résumées dans (Figure2).

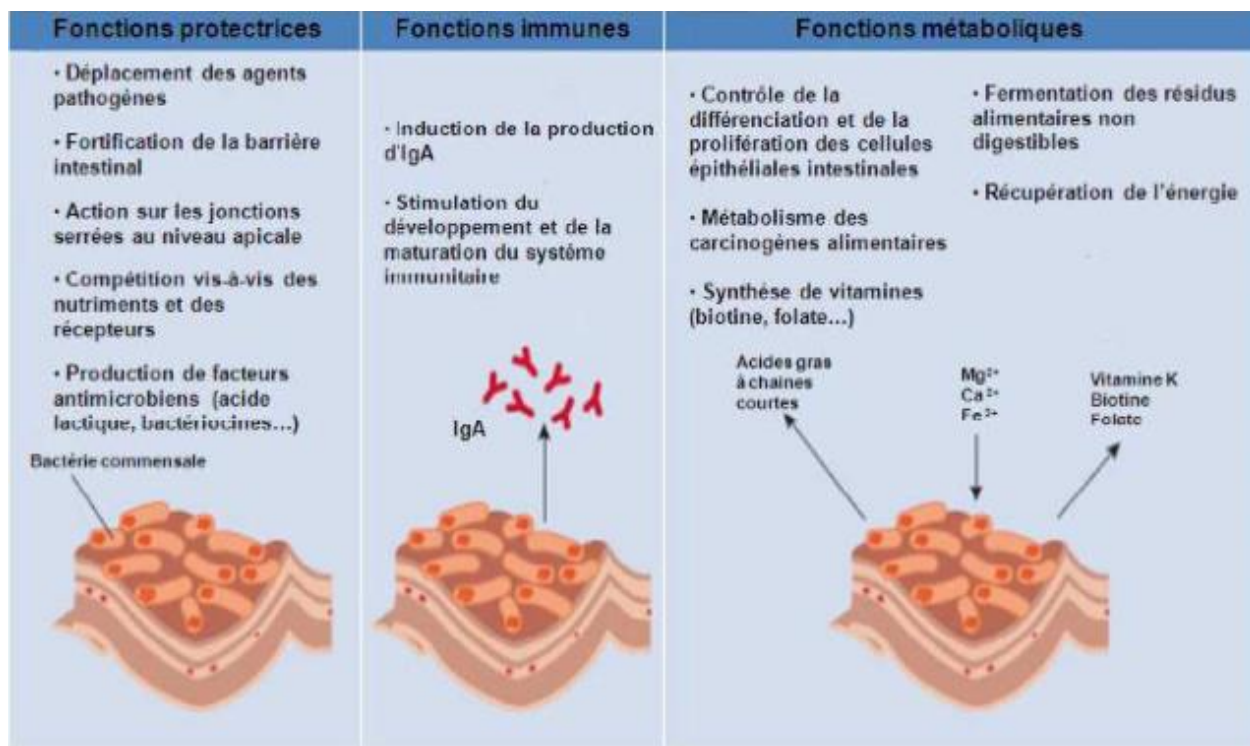


Figure 2. Les fonctions du microbiote intestinal.

5. Relation entre le microbiote et les pathologies :

5.1. Maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) :

Elles englobent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (Legendre, 2014) caractérisées par une dysrégulation du système immunitaire des malades (Rofes, 2014). Il s'agit d'une inflammation chronique d'une partie de la paroi de l'appareil digestif (Matricon, 2010).

5.1.1. Maladie de Crohn (MC) :

Cette maladie est caractérisée par des signes digestifs à type de diarrhée, de douleur de l'abdomen ou de lésion de l'anus (Legendre, 2014). Des études sur la flore des malades ont montré une diminution quantitative et qualitative du phylum Firmicutes surtout le groupe *Clostridium leptum*, ce qui suggère son rôle anti-inflammatoire, de plus d'autres bactéries bénéfiques pour

l'organisme (Lactobacilles et des Bifidobacteries) étaient quantitativement diminuées, alors que les Enterobactéries étaient en augmentation (Sartor & Mazmanian, 2012).

5.1.2. La rectocolite hémorragique (RCH) :

C'est une inflammation chronique qui touche le côlon et le rectum et elle s'évolue par des poussées successives de l'extrémité distale du tube digestif. Le diagnostic de cette maladie doit être fait devant toute diarrhée prolongée, surtout sanglante (Xavier & Podolsky, 2007; Dolié, 2018). Il a été observé dans ce cas une altération de la diversité du microbiote intestinal; une diminution des Firmicutes, des Bacteroidetes et une augmentation des Proteobacteries et Actinomycetes (Shen et al., 2018). Une comparaison entre l'aspect du colon sain et du colon d'un patient atteint de RCH est présentée dans (Figure3).

5.2. Le syndrome de l'intestin irritable (SII) :

C'est une affection fréquente du côlon qui provoque des douleurs abdominales, des troubles de transit et un inconfort intestinal avec un ballonnement de l'abdomen (Camilleri, 2012). Des études de métagénomique sur cette pathologie ont prouvé que la dysbiose du microbiote intestinal est caractérisée par une pauvre diversité surtout de la flore intestinale qui est en contact avec la muqueuse causant la réduction des Lactobacilles, ce qui favorise le développement d'autres colonies bactériennes qui sont responsables de la production du gaz par fermentation colique comme le méthane et l'hydrogène (Ducrotte, 2005; Joly et al., 2007; Salonen et al., 2010).

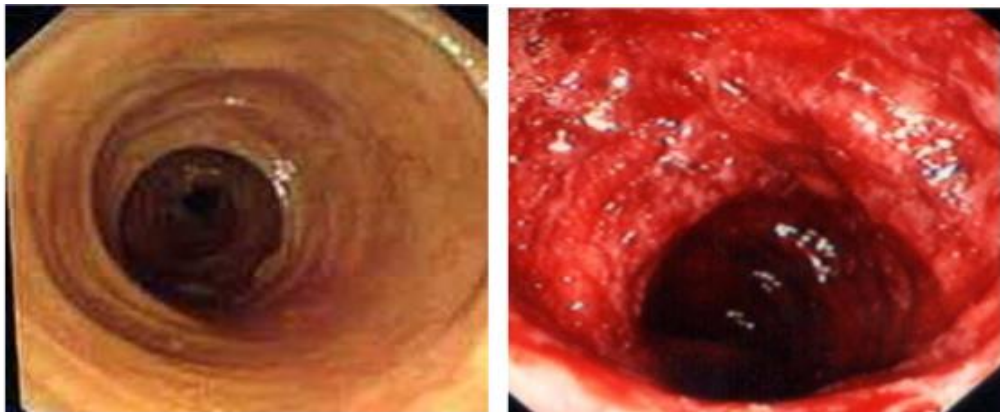


Figure 3. Image d'endoscopie entre un colon sain (à gauche) et un colon enflammé d'un patient atteint d'une RCH (à droite) (Watterlot, 2010).

5.3. Le syndrome de grêle court (SGC) :

Cette maladie est caractérisée par la résection étendue de l'intestin grêle provoquant une malabsorption intestinale qui nécessite une nutrition parentérale, dans ce cas l'intestin grêle s'adapte par une autonomie. Ce processus se fait par l'interaction entre le colon, le microbiote et la

muqueuse de l'intestin (Goulet & Ruemmele, 2006; Goulet & Joly, 2010). D'après une expérience sur le microbiote intestinal des malades atteints de SGC, les bactéries les plus dominantes sont les lactobacilles (plus de 90%) telles que *L. acidophilus*, *L. fermenti* et *L. mucosa*, ces espèces produisent du D-lactate qui peut être responsable d'une encéphalopathie D-lactique, Confirmant aussi l'absence de *C. leptum* et *C. coccoides* (1%) qui sont largement présentées dans le microbiote témoin (Goulet et al., 2009; Joly et al., 2010).

5.4. Entérocolite ulcéro-nécrosante du nourrisson (ECUN) :

Cette maladie gastro-intestinale se caractérise par une infection aiguë ou chronique, elle affecte une partie de l'intestin, de façon privilégiée l'iléon (Rofes, 2014).

Chez les enfants prématurés, le retard de colonisation de l'intestin de certaines bactéries anaérobies comme les bifidobactéries et les Bacteroides et l'implantation rapide d'autres bactéries comme les staphylocoques, les entérocoques et les entérobactéries peuvent être la cause de diverses pathologies digestives telle que l'ECUN (Bultel, 2017).

5.5. Cancers digestifs :

Le rôle du microbiote intestinal dans la genèse du cancer colorectal a été établi avec certitude par plusieurs données, on peut citer l'exemple d'*E. coli* qui fabrique la génotoxine et la colibactines qui induisent la cassure double brin d'ADN des cellules de la muqueuse intestinale provoquant l'instabilité chromosomique, des mutations génétiques et la transformation cellulaire (Petit et al., 2013). Parmi les cancers les plus dangereux aussi le cancer d'estomac (Polk & Peek, 2010). Par l'intervention d'*Helicobacter pylori* (de Martel et al., 2012), elle tamponne son environnement par l'utilisation d'une activité uréasique pour survivre dans l'acidité gastrique (Sachs et al., 2000), elle cause au début de l'infection une inflammation chronique de la muqueuse gastrique induisant une augmentation du renouvellement des cellules ce qui favorise la survenue de lésions d'ADN et des mutations somatiques avec des altérations du système de réparation des mésappariements de l'ADN MMR (mismatchrepair) (Mégraud et al., 2015).

Chapitre II : Les probiotiques

1. Historique et définition actuelle :

Les premières initiatives traitant les probiotiques remontent au XXe siècle, où Elie Metchnikoff (prix Nobel de médecine en 1908) a émis l'hypothèse que la bonne santé et la longévité de la population bulgare seraient dues à leur consommation quotidienne de laits fermentés (Sanders, 2000). A peu près au même temps (1906), un chercheur à l'Institut Pasteur nommé Henry Tissier proposa d'administrer les bifidobactéries aux patients diarrhéiques pour les aider à réparer leur flore intestinale. Lilly et Stillwell définissaient les probiotiques comme étant « Des substances produites par un microorganisme et stimulant la croissance d'autres microorganismes » (Lilly & Stillwell, 1965), quant à Parker (1974) c'est des « Microorganismes contribuant au maintien de la flore intestinale » (Ninane et al., 2009). Pour le moment, la définition officielle des probiotiques est celle proposée par la FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations) en 2002, selon l'organisation c'est des «micro-organismes vivant qui lorsqu'il est administré en quantité adéquate exerce un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (« Probiotiques, Prébiotiques, Symbiotiques », 2008).

2. Les différents types de microorganismes probiotiques :

Les probiotiques font partie de la flore normale de l'intestin ayant une action positive sur la santé (Dunne et al., 2001). Parmi les microorganismes les plus utilisés comme probiotiques les bactéries lactiques, elles regroupent principalement les genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* et d'autres bactéries non lactiques notamment les *Bacillus* et les levures (Ait Belgnaoui, 2006; Naimi, 2014).

3. Critères de sélection des probiotiques :

3.1. Critères fonctionnels :

Selon le rapport de l'organisation mondiale de la santé, Il faut évaluer :

1. Leur tolérance à l'acidité gastrique et aux acides biliaires, ainsi que leur aptitude à les hydrolyser.
2. Leur potentiel d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales.
3. Leur activité antimicrobienne face à des agents pathogènes et leur capacité à réduire l'adhésion des pathogènes aux cellules.

3.2. Critères sécuritaires :

Les probiotiques doivent présenter une totale innocuité pour le consommateur, c'est-à-dire être non toxiques et dépourvues de toute pathogénicité. Afin de s'assurer de leur sécurité il faut étudier tout risque possible tel que la résistance aux antibiotiques, la production de toxines, le potentiel

infectieux et l'activité hémolytique. Cependant, De nombreux probiotiques, y compris les bactéries lactiques et les bifidobactéries, font partie de la microflore normale du tube digestif humain, et de nombreuses études ont montré que l'ingestion de ces probiotiques n'a aucun effet négatif.

3.3. Propriétés technologiques :

Plusieurs aspects technologiques jouent un rôle essentiel dans la sélection des probiotiques pour assurer la bonne qualité du produit fini. Ces microorganismes doivent avoir la capacité de survivre durant les étapes de la production (Izquierdo, 2009). La stabilité génétique de ces bactéries doit être prise en compte et les bonnes qualités doivent être assurées telles que la facilite à être cultivées concevant leurs propriétés biologiques jusqu'à la date de péremption pour qu'elles puissent donner leurs effets positifs sur la sante (Champagne et al., 2005; Guarner et al., 2012).

4. Effets des probiotiques sur le tractus gastro-intestinal:

4.1. Les diarrhées :

4.1.1. Diarrhées aiguës:

Plusieurs études ont été faites sur l'effet des probiotiques dans le cas des diarrhées aiguës, parmi les résultats obtenus, différentes souches et notamment les souches *L. reuteri* DSM 17938 (Urbańska& Szajewska, 2014) et *Saccharomyces boulardii* (Szajewska et al., 2007) ont montré une réduction significative de la durée de la diarrhée aiguë chez les enfants en association à une réhydratation orale.

4.1.2. Diarrhées associées aux antibiotiques :

On a montré que certains probiotiques préviennent la diarrhée associée aux antibiotiques : La souche la plus documentée dans ce sujet est *S. boulardii* (Surawicz, 2010). Szajewska et son équipe ont également fait une étude sur cette espèce en 2007, les résultats obtenus montrent une diminution significative dans la survenue de diarrhées dans les groupes qui associent les probiotiques à la prise d'antibiotique par rapport aux groupes placebo.

4.1.3. Diarrhée des voyageurs :

Appelée souvent la « turista », est une diarrhée qui survient brutalement au cours d'un séjour dans un pays étranger (Buxeraud, 2008). Plusieurs probiotiques ont montré de bons résultats dans la prévention de la diarrhée du voyageur. Un mélange de probiotiques a été administré à des touristes danois en Egypte par l'équipe de Black. Ce mélange contenait les souches: *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* et des bifidobactéries. Ceci a permis une réduction des diarrhées significatives en passant de 43% contre 71% sans supplémentation (Carré et al., 2005).

4.2. Les maladies inflammatoires intestinales :

4.2.1. Les coliques infantiles :

Les probiotiques ont montré des résultats positifs dans de multiples études contre la colique infantile, Gutierrez-Castrellón et son équipe (Gutiérrez-Castrellón et al., 2017) ont montré grâce à leur analyses qu'il y'a un effet positif de la souche *L.reuteri* pour le traitement des coliques du nourrisson allaités ou nourris au lait artificiel, et notamment une diminution significative du temps de pleurs par jour.

4.2.2. Le syndrome de l'intestin irritable :

Certaines souches probiotiques ont montré des effets positifs pour lutter contre les douleurs abdominales et les troubles digestifs liés au SII comme *B. infantis* (Whorwell et al., 2006) ou l'association des souches *L. plantatum* et *B. breve* (Saggiaro, 2004).

4.2.3. Les MICI :

En effet, plusieurs essais cliniques utilisant des probiotiques ont été fait, parmi les études les plus prometteuse celle de Kato et son équipe (Kato et al., 2004) qui ont ajouté au traitement anti-inflammatoire un lait fermenté avec *Bifidobacterium spp* et *L acidophilus* pendant 3 mois chez 20 patients atteints de RCH. Ils ont pu observer une amélioration des scores d'activité clinique, endoscopique et histologique chez les patients recevant le probiotique (Netgen, s. d.).

En ce qui concerne la MC, de nombreuses études réalisées sur l'utilisation des souches usuelles de probiotiques dans la MC ne montrent pas d'amélioration des taux de rechute que ce soit seuls ou en association aux traitements conventionnels. Toutefois, une étude faite par (Guslandi et al., 2000) consistait à donner la levure *S. boulardii* combinée à 2 g de mésalazine versus 3 g de mésalazine seule à des patients avec MC quiescente pendant six mois. Seuls 6% des patients du groupe probiotique contre 37% du groupe placebo avaient présenté une récurrence de la maladie, suggérant un effet positif de *S. boulardii* (Netgen, s. d.).

4.2.4. Le cancer colorectal :

L'intérêt des probiotiques dans le cancer se manifeste dans leur capacité à inhiber la production des enzymes procarcinogènes engendrées par le métabolisme bactérien du microbiote intestinal (glycosidases, β -glucuronidases, azoréductases et nitroréductases). Ainsi, plusieurs études chez l'animal suggèrent que certains probiotiques pourraient être efficaces en prévention du cancer colorectal (Rowland, 2004). Plusieurs auteurs ont montré que certains probiotiques pouvaient diminuer l'activité d'enzymes, de mutagènes ou des acides biliaires secondaires dans les selles, qui

pourraient chacun être impliqué dans la cancérogenèse colique et la transformation de précarcinogènes en carcinogène.

5. Mécanismes d'action :

Parmi les principaux mécanismes d'action des probiotiques qui interfèrent avec le système immunitaire et améliorent la santé gastro-intestinale de l'hôte 3 fonctions envisagées dans l'organisme (Boclé et al., 2005).

5.1. Effets sur les fonctions intestinales :

Les probiotiques ont la capacité d'améliorer la digestion et l'absorption intestinale par la production ou la stimulation des enzymes, c'est le cas de la lactase, cette enzyme est responsable de la dégradation du lactose en 2 sucres simples le glucose et le galactose (Marteau et al., 1990; Burgain et al., 2012; Rofes, 2014).

Des expériences ont prouvé que la bêta-galactosidase des bactéries lactiques peut entrer dans la digestion du lactose au niveau de l'intestin, donc obtenir une meilleure absorption et tolérance c'est le cas de *L. acidophilus* (Rambaud et al., 2004; Flourié & Nancey, 2007).

5.2. Modulation du microbiote intestinal :

Les probiotiques peuvent moduler positivement le microbiote intestinal et empêcher l'installation de microorganismes pathogènes dans le tube digestif de différentes manières :

- L'inhibition de l'adhésion des bactéries pathogènes (Collado et al., 2005).
- La synthèse des composés antimicrobiens tels que les bactériocines (Klaenhammer, 1993), mais notamment des acides organiques qui diminuent le pH du cytoplasme et ainsi inhiber le développement de certaines souches bactériennes (Bruno & Shah, 2002; Servin, 2004).
- Compétition au niveau de l'utilisation des nutriments et la réduction des substrats essentiels pour l'implantation des bactéries pathogènes (Fooks & Gibson, 2002; Bultel, 2017).

5.3. Immunomodulation :

Les probiotiques peuvent réagir positivement sur le système immunitaire par plusieurs mécanismes :

- Activation des macrophages locaux (Dolié, 2018).
- Diminution de l'inflammation par des cytokines anti-inflammatoires (Bultel, 2017).
- La maturation des cellules dendritiques CD et par conséquent sur l'activation des lymphocytes T naïves (Ezzariga, 2015).
- L'utilisation des probiotiques comme adjuvants en modulant une réponse rapide de la muqueuse intestinale et aident ainsi le système immunitaire intestinale (Naimi, 2014).

III. Matériel et méthodes

1. Echantillonnage :

Plusieurs échantillons ont été collectés pour isoler les bactéries lactiques. La collecte a été réalisée selon les règles d'hygiène et d'asepsie recommandées en microbiologie. Chaque échantillon est récupéré dans un flacon stérile et transporté au laboratoire dans des sacs isothermes. Tous les échantillons utilisés ont été manipulés le jour même de la récolte. Les milieux de culture utilisés durant cette étude et leur composition sont présentés dans l'**annexe I**.

Tableau 1. Les échantillons utilisés et la flore ciblée.

Echantillons	Bactéries isolées
Fèces de nouveau-né	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i>
Lait maternel	La flore lactique
Sardine (intestin)	La flore lactique

2. Isolement et purification des bactéries :

Une série de dilution décimale dans de l'eau physiologique stérile jusqu'à 10^{-8} est réalisée à partir des échantillons homogénéisés par agitation. Un ml des trois dernières dilutions a été prélevé puis ensemencé en profondeur dans un milieu approprié (**Figure 4**). Les conditions ainsi que les milieux de culture employés sont illustrés sur le **tableau 2** ci-dessous.

Tableau 2. Conditions d'isolement des différents microorganismes.

Microorganisme isolé	Les dilutions utilisées	Milieux de culture	Conditions d'incubation
<i>Bifidobacterium</i>	10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6}	MRSc	37°C pendant 48h, en anaérobiose
<i>Lactobacillus</i>	10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6}	MRS acide	37°C pendant 48h, en anaérobiose
<i>Lactococcus</i>	10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6}	M17	30°C pendant 24h, en aérobiose
Flore lactique	10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6}	MRS	37°C pendant 24h, en aérobiose

La purification consiste à faire des repiquages successifs sur des milieux sélectifs cités précédemment jusqu'à l'obtention de colonies pures bien distinctes et homogènes.

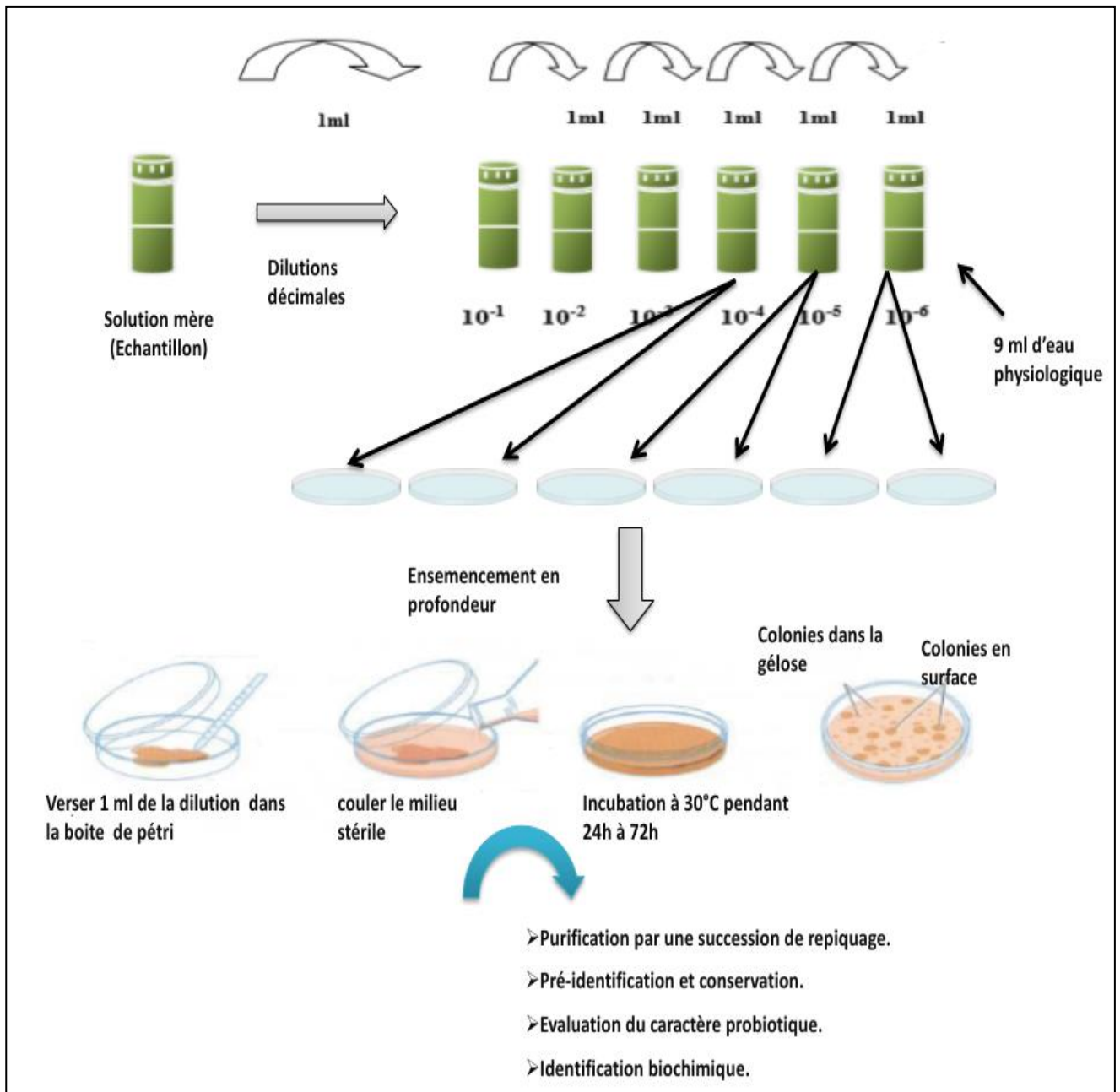


Figure 4. Schéma résumant la méthode utilisée pour l'isolement des bactéries lactiques des différents échantillons.

3. Identification des isolats :

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

3.1. Examen microscopique :

Après l'examen macroscopique des colonies sur boîtes, les isolats ont été soumis à la coloration de Gram (**Annexe 2**), celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets des coques, et de déterminer le mode de regroupement. Les critères d'observation et de sélection sont résumés dans le tableau suivant.

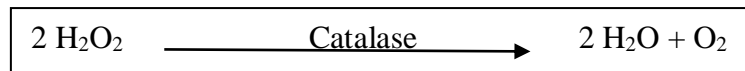
Tableau 3. Les critères utilisés pour l'identification et la sélection des colonies bactériennes.

Genre	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
<i>Lactobacillus spp</i>	Taille petite (2–5 mm), marge bien définie, convexes, lisses, brillantes et opaques sans pigments.(Ozogul & Hamed, 2016)	bâtonnets Gram positif, non sporulés.(Ozogul & Hamed, 2016)
<i>Bifidobacterium spp</i>	Colonies lisses, convexes, blanches (Shah, 2011)	Bacilles, Gram positif, ramification donnent une forme de v, y, x (Shah, 2011)
<i>Lactococcus spp</i>	Colonies de petite taille, blanches rondes ou lenticulaires	Coques, Gram positif, asporulés (Samelis et al., 1994).

3.2. Les tests physiologiques et biochimiques :

- **Recherche de la catalase :**

Chez les bactéries douées d'un métabolisme oxydatif, le système respiratoire compte parmi d'autres enzymes une catalase. Celle-ci décompose l'eau oxygénée selon la réaction suivante :



La méthode de recherche de la catalase consiste à étaler une colonie sur une lame de verre sur laquelle on ajoute une goutte du H₂O₂, à 10 volumes. La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement de bulles de gaz (Marchal et al., 1991).

- **Type fermentaire :**

Ce test permet de classer les bactéries en homo ou hétéro-fermentaires. Les souches sont ensemencées dans des tubes contenant le milieu culture avec une cloche du Durham pour apprécier la production de CO₂. Après incubation à 37°C pendant 48h, la présence ou l'absence du gaz dans la cloche indique le type fermentaire (Al-Otaibi, 2012).

- **Galerie Api (Biomerieux):**

Les bactéries lactiques isolées sont identifiées à l'aide des galeries *Api 50 CHL* et *Api 20 E* (Biomerieux). La galerie *Api 50 CHL* est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques). La fermentation des sucres conduit à la formation des acides organiques qui provoquent le virage de l'indicateur de pH du violet au jaune. Le premier tube, sert de témoin négatif.

La galerie *Api 20 E* contient 20 microtubes de substrats sous forme déshydratée, qui permettent la recherche de 20 caractères biochimiques à travers des réactions enzymatiques. Le résultat positif se traduit par le virage de couleur spontané ou après addition de réactifs (Delarras, 2007).

Les bactéries sont repiquées sur milieu MRS, les cultures sont centrifugées (6000rpm, 10 min). Le culot est remis en suspension dans 4 ml d'eau distillée stérile. 400 à 500 µl de cette suspension est prélevée de manière que la capacité du mélange corresponde à l'étalon n°2 dans l'échelle de Mac Farland. Cette suspension est répartie dans les 50 microtubes de la galerie qui sont recouvertes ensuite d'huile de vaseline stérile. Les galeries sont incubées à 37°C et des lectures sont faites à 6h, 24h et 48h (Al-Otaibi, 2012). L'interprétation des résultats peut se faire par le logiciel *Api Web*.

4. Conservation des souches bactériennes :

Deux types de conservation des souches pures sont utilisés. Une à courte durée et l'autre à longue durée :

- Conservation à court terme : Les souches pures sontensemencées sur des géloses inclinées, après croissance les cultures sont maintenues à 4°C, et le renouvellement se fait par repiquage toutes les 4 semaines (Badis et al., 2005).
- Conservation à long terme : les cultures pures sont conservées en suspension dense et en tubes Eppendorfs contenant 70 % de milieu de culture sélectif et 30 % de glycérol tenus à -80°C déposées à une température de -20°C (Badis et al., 2005).

5. Mise *in vitro* de quelques propriétés probiotiques:

Les bactéries isolées ont été testés pour quelques caractères probiotiques afin de sélectionner les plus performantes pour une éventuelle étude *in vivo* du pouvoir probiotique et anti-inflammatoire. Pour déterminer si les souches isolées ont un caractère probiotique, des tests *in vitro* ont été réalisés

5.1.Résistance aux conditions gastro-intestinales simulées :

- Tolérance à l'acidité : l'aptitude des souches à résister à l'acidité gastrique, a été déterminé selon la méthode décrite par (Both et al., 2010). Une préculture bactérienne est inoculée dans

une solution ajustée préalablement à pH 2, pH 3 et pH 7 et incubée à 37°C. La résistance à ce facteur hostile est estimée par mesure de la densité optique à 660 nm à 0h et après 3h d'incubation.

- **Résistance aux sels biliaires** : ce test est effectué selon la technique décrite par (Both et al., 2010). Une préculture bactérienne est inoculée dans une solution à 0.3% de sels biliaires ajustée à pH 7 et incubée à 37°C. La résistance à ce facteur hostile est estimée par mesure de la densité optique à 660 nm à 0h et après 3h d'incubation.

5.2. Activité antimicrobienne :

Ce test consiste à évaluer l'activité inhibitrice des souches isolées vis-à-vis les bactéries pathogènes. Les bactéries indicatrices utilisées pour cet effet sont : *Staphylococcus aureus* (ATCC 27923), *Salmonella enteritidis* (ATCC 2453), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella montevideo* (ATCC 3581), *Proteus mirabilis* (ATCC 35659), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 70603).

La méthode décrite par (Fleming et al., 1975) a été adoptée : elle consiste à ensemercer en touche les souches isolées sur une gélose. Après incubation à 37°C pendant 24h, la culture est recouverte d'un mélange homogénéisé composé de 7ml de gélose molle MH en surfusion et 0.5ml de culture fraîche de bactérie pathogène. Après solidification de cette deuxième couche, les cultures sont incubées pendant 24h à 37°C. L'inhibition se manifeste par l'apparition de zones claires autour des touches (Zergoug, 2017).

6. Etude des propriétés probiotiques et anti-inflammatoires des bactéries chez les souris Balb/c :

6.1. Echantillon :

Les souches utilisées dans cette étude sont sélectionnées pour leur pouvoir probiotique (résistance aux conditions hostiles, activités antimicrobienne) intéressant.

Okayasu et son équipe ont mis en place un protocole qui permet d'utiliser le dextran sulfate sodium (DSS) afin de provoquer une inflammation intestinale. La concentration du DSS administré varie entre 1% et 5% selon la type de colite souhaité, colite légère à sévère respectivement.

6.2. Animaux :

Les animaux utilisés dans cette étude sont des souris de souche BALB/c, une souche congénique particulièrement appréciée dans les recherches immunologiques (Zhou et al., 2016). Elles sont obtenues auprès de l'Institut Pasteur d'Alger et sont mises en reproduction et hébergées conformément à la réglementation dans l'animalerie de l'Ecole Supérieure en Sciences Biologiques

d'Oran. Les animaux sont maintenus dans des conditions favorables d'élevage à une température de 25 à 30°C et un taux d'humidité entre 50 et 60%, et des cycles de lumière-obscurité de 12 heures chacun. Les expériences sont effectuées en respectant le bien-être de l'animal, évitant le stress et l'agitation susceptibles d'interférer avec les résultats. Ils sont maintenus dans des cages appropriées munies chacune d'un biberon et d'une mangeoire et sont nourris ad libitum avec un aliment pour rongeurs et de l'eau de robinet.

Dès l'âge de trois semaines, les nouveaux portés sont sevrés et triés selon le sexe ; les mâles serviront ainsi à la formation des différents groupes de notre étude.

6.3. Répartition des animaux :

Trente-six souris mâles sont utilisées au cours de cette étude ; elles sont âgées de 4 à 5 semaines et pesant en moyenne 22 ± 2 g. Pour les besoins de chaque expérience, les animaux ont été répartis en 3 lots de 12 souris chacun comme suit (**figure 5**) :

- **Lot 1** : 12 souris intubées par voie intra-gastrique avec 0,3 ml d'une solution saline pendant toute la durée de l'expérimentation. Ce lot constitue témoin négatif (TN).
- **Lot 2** : 12 souris intubées par voie intra-gastrique avec 0,3 ml d'une solution saline pendant 7 jours, puis une solution de dextran sulfate-sodium (DSS) 4% à raison de 0.3ml pendant 5 jours ; le reste de l'expérimentation. Ce lot constitue témoin positif (TP).
- **Lot 3** : 12 souris intubées par voie intra-gastrique avec 0,3 ml d'un mélange de trois souches de *Lactobacillus* pendant 7 jours, puis la solution de DSS 4% à raison de 0.3ml pendant 5 jours.

La température et le poids des souris sont mesurés régulièrement en utilisant un thermomètre et une balance adaptés pour souris, durant le protocole expérimental afin de suivre respectivement la température corporelle et la cinétique pondérale qui permet d'évaluer l'effet inflammatoire du DSS et l'impact des bactéries probiotiques sur l'évolution de la température et la croissance pondérale des animaux.

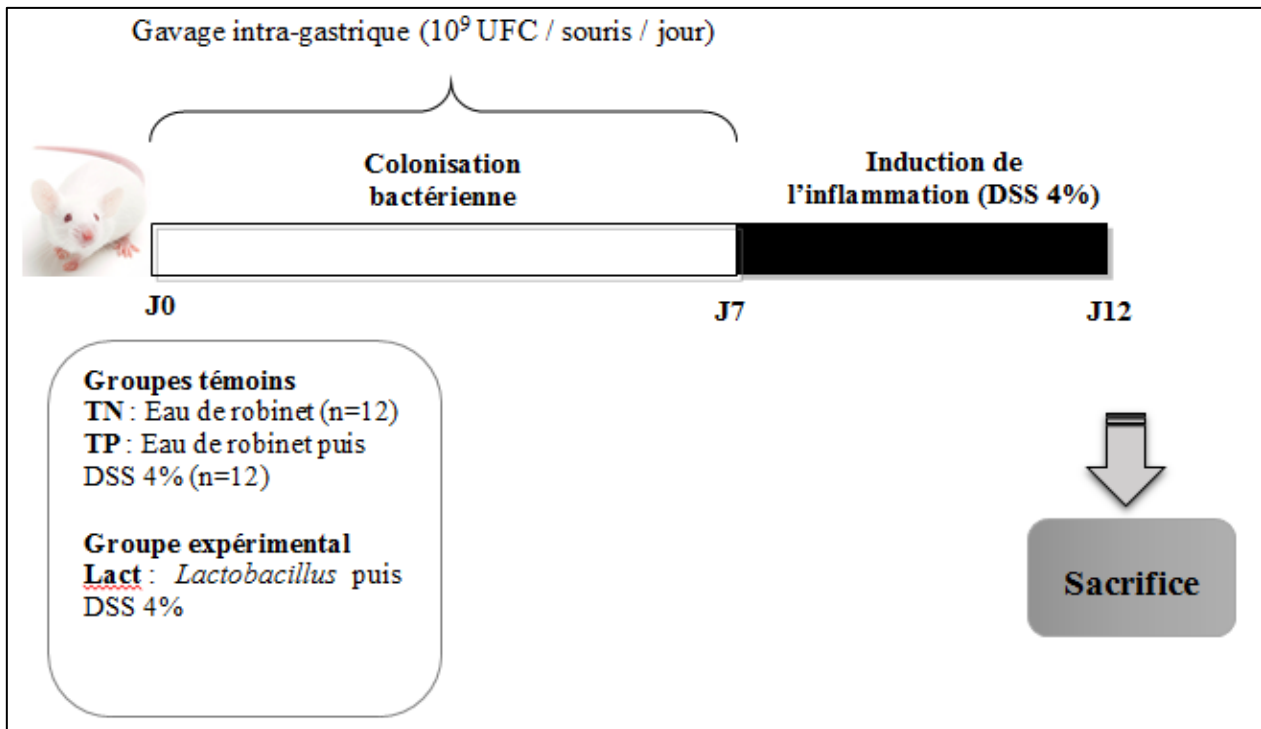


Figure 5. Diagramme représentatif du protocole expérimental.

6.4. Sacrifice :

A J12 les souris des différents lots sont sacrifiées par dislocation cervicale, la dissection est réalisée le plus aseptiquement possible. Après le sacrifice, une partie du colon est soigneusement prélevée rincée avec une solution de NaCl à 0.9 %, séchée puis fixée dans du formol pour l'étude histologique (figure 6).



Figure 6. Sacrifice et prélèvement du colon des souris à J12.

6.5. Etude histologique :

L'étude histologique est réalisée dans le but d'évaluer l'effet probiotique et curatif des bactéries après l'induction de l'inflammation.

- La fixation :

La fixation a pour but essentiel d'assurer une immobilisation des constituants cellulaires ou tissulaires dans un état aussi voisin que possible de l'état vivant (Nzelof, 1972). Des fragments d'intestin sont plongés dans une solution de formaldéhyde à 10% pendant 24h. Puis coupé en segments annulaires (2–3 mm longueur) pour effectuer la déshydratation dans une série de bain d'alcool éthanol gradué (70/80/100°) pendant 3 heures.

- La déshydratation :

Après la fixation, les tissus ont été déshydratés dans des bains successifs d'alcool à degré croissant pendant un temps suffisant (alcool à 70°, 90° et alcool absolu).

- La clarification :

Cette opération s'effectue juste après la déshydratation. Les pièces sont placées dans bain de toluène pendant une heure.

- L'inclusion :

Les échantillons sont placés dans des moules contenant de paraffine fondue au préalable à 65°C, pendant une heure, puis laisser refroidir à température ambiante.

- Microtomisation et étalement de coupes :

Après inclusion à la paraffine, les blocs contenant le fragment sont coupés à l'aide d'un microtome à une épaisseur de 4 µm.

Une fois les coupes terminées, elles sont mises sur une lame de verre recouvertes de colle (2g d'albumine + 50 ml de glycérine dans 1000 ml d'eau distillée), puis placées sur une plaque chauffante réglée à une température convenable ; inférieure à celle du point de fusion de la paraffine. L'ensemble coupe-lame est retiré de la plaque, égoutté et mis à sécher.

- Déparaffinage et réhydratation :

Une succession de bains dans un solvant (2 bains) permettant l'élimination de la paraffine (toluène ou xylène) puis dans des alcools à titre décroissant (100/90/70°), et un bain dans l'eau pure assurant la réhydratation finale.

- Coloration :

La lame est d'abord plongée dans l'hémalum (hématoxyline) pendant 5 à 10 minutes, rincée par trois bains successifs dans l'eau de conduite puis dans l'eau distillée.

La coupe est ensuite recouverte d'une goutte d'éosine (Eosine jaunâtre –Erythrosine aqueuse à 2%) directement sur la lame. Après deux minutes de coloration, la coupe est rincée par l'eau sous le robinet puis dans l'eau distillée. Il faut alors procéder à la déshydratation, opération inverse de celle menée au début, avant de pouvoir faire le montage dans la résine.

La déshydratation est réalisée en plongeant successivement la lame dans deux bains d'alcool à 95% puis dans deux bains d'alcool à 100 % et enfin dans deux bains de solvant (toluène ou xylène) (95/95/100/100°/solvant/solvant).

À la sortie du solvant, une goutte de résine de montage (par exemple, Eukit) est disposée sur la coupe et une lamelle est appliquée de façon à ce que la résine recouvre l'ensemble de la coupe. La résine polymérise en une vingtaine de minutes. La préparation microscopique est alors prête pour l'observation.

6.6. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm écart-type. L'analyse statistique des données a été réalisée avec le logiciel SPSS 20.0 (IBM SPSS Statistics, USA). Nous avons comparé les moyennes des groupes en utilisant les modèles et les tests statistiques suivants : Tests de comparaison des groupes : test "t" de Student entre groupes, et ANOVA, un test paramétrique pour l'inégalité des Moyennes. Pour les résultats, nous avons retenu celles qui sont significatives et celles qui sont susceptibles de donner une signification. Ce choix est fondé sur la pertinence d'une recherche bibliographique approfondie. Les valeurs ont été considérées comme statistiquement significatives pour $p < 0,05$.

IV. Résultats et discussions

1. Isolement et identification des bactéries :

1.1 Pré-identification :

La morphologie des bactéries isolées est un critère important pour leur identification.

- Observation macroscopique :

Un total de quarante souches ont été isolées et purifiées sur des milieux sélectifs. Sur gélose, les isolats sont apparus de petite taille, de forme circulaire ou lenticulaire, à pourtour régulier et de couleur blanchâtre, ce qui caractérise le groupe de bactéries lactiques (**Figure 7**). Sur bouillant, les souches présentent un trouble homogène.

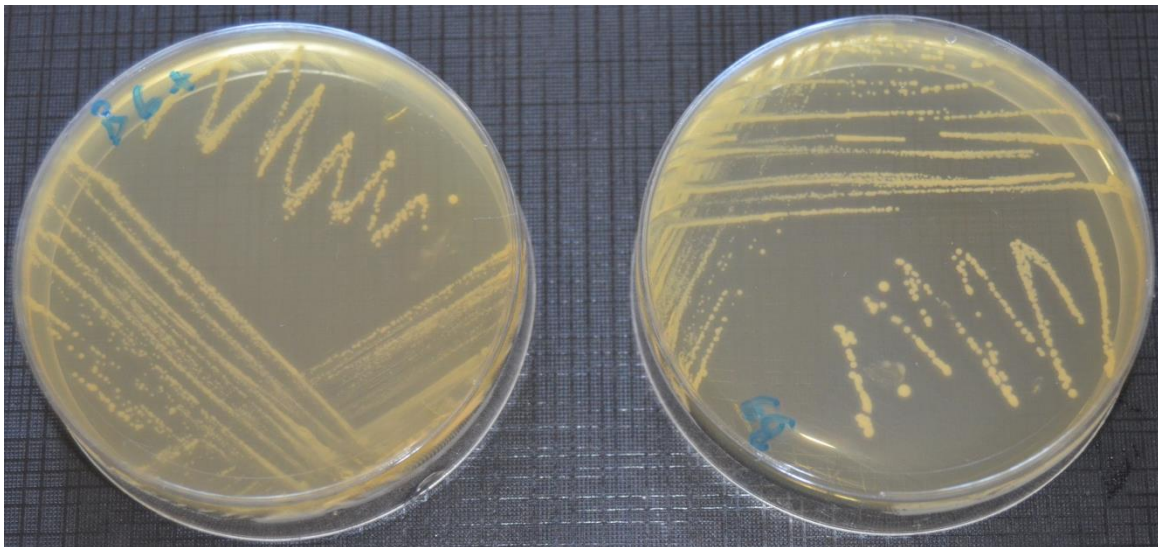


Figure 7. Aspect macroscopique des colonies sur gélose MRS.

- Observation microscopique :

Cette observation permet d'identifier la forme cellulaire des bactéries isolées. L'observation (G : 10x 100) après coloration a révélé plusieurs formes allant de cellules sphériques aux cellules bâtonnets à Gram positif (**figure 8**).

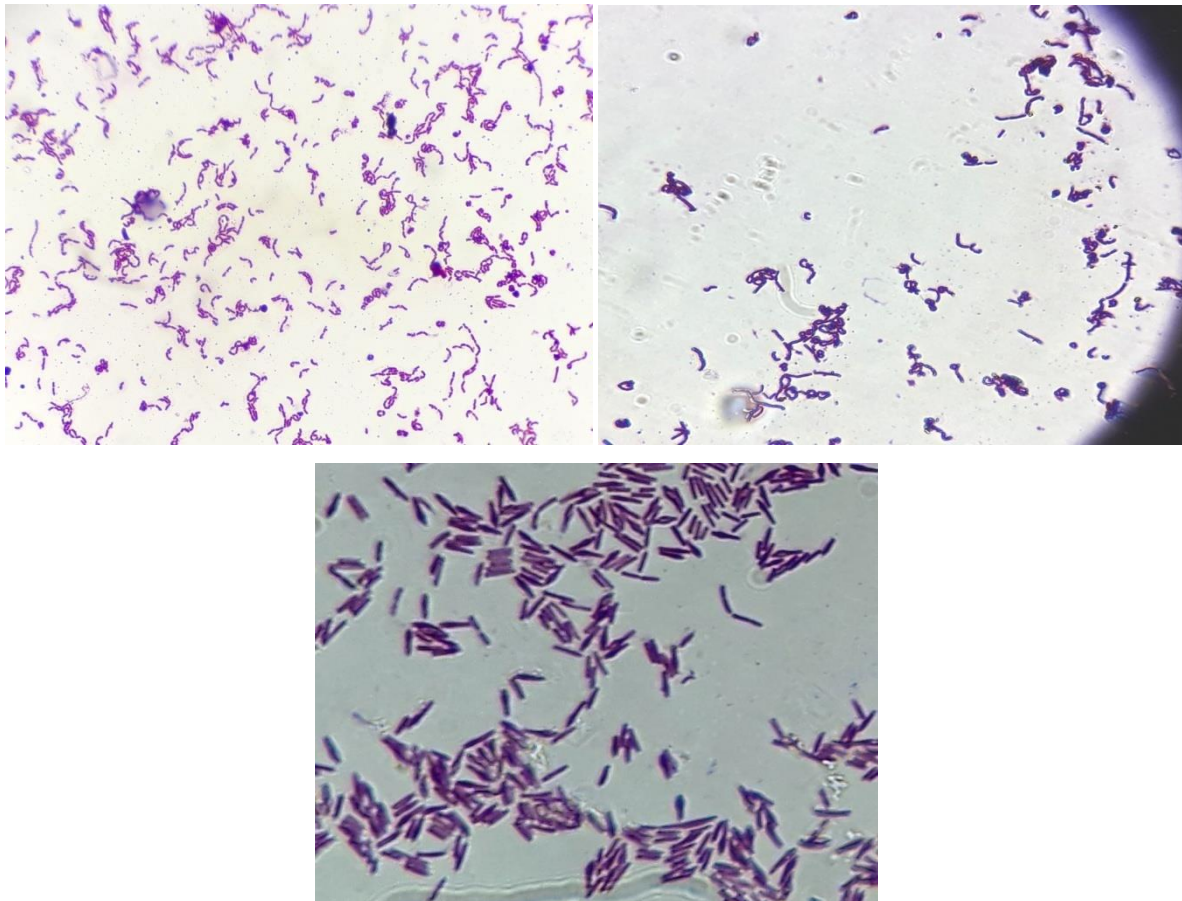


Figure 8.Aspect microscopique après coloration de Gram des souches isolées sur gélose MRS (Grossissement X100).

1.2. L'identification physiologique et biochimique :

Les isolats purifiés à Gram positif, catalase négatif, immobiles et asporulés sont considérés comme des bactéries lactiques.

Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation des galeries *Api 50 CHL* et *Api 20 E* pour déterminer le genre et espèce de notre collection (**Figure 9**). Après 48h, nous avons observé un virage de l'indicateur du pourpre au jaune dans plusieurs puis de la galerie. Ce virage est attribué à la production de quantité plus ou moins importante de l'acide lactique en utilisant des sucres fermentescibles. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le **tableau 4** ci-dessous.

Tableau 4.Résultats des paramètres biochimiques.

Groupe	Gram	Forme	Mode d'association	Catalase	Type fermentaire	Identification par <i>Api 50 CHL</i> et <i>Api 20 E</i>
Gr : 01	Positif	Bacille	Paire/courte chaine	Négatif	Homo/Hétéro	<i>Lactobacillus spp</i>

Gr : 02	Positif	Cocci	Isolé/paire/ courte chaîne	Négatif	Homo	<i>Lactococcus spp</i>
Gr : 03	Positif	Bacille incurvé	Isolé	Négatif	Homo	<i>Bifidobacterium spp</i>

Les isolats sont répartis en trois grands groupes :

Groupe 01 : *Lactobacillus* : 22 isolats présentent des cellules cylindriques, certains ADH-, VP (v), citrate-, homofermentaire, xylose -, sorbose -, inositol -, sorbitol +, salicine +, arabinose +, galactose +, lactose +, rhamnose -, ils sont qualifiés comme *Lactobacillus plantarum* ; d'autres sont ADH+, citrate+, hétérofermentaire, xylose +, arabinose +, melibiose +, mannose -, salicine -, sorbitol -, lactose - *Lactobacillus brevis* ; la troisième espèce se caractérise par la fermentation du cellobiose, salicine, sorbitol, mannose, inositol, sorbose et par l'absence de fermentation de l'arabinose, melibiose, raffinose, xylose elle est considérée comme *Lactobacillus casei*.

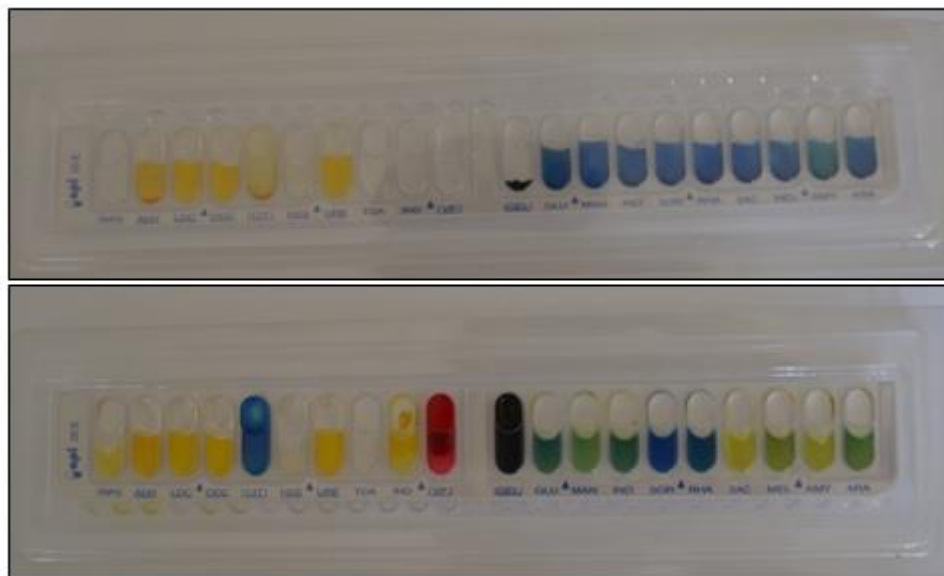


Figure 9. L'ensemencement de la galerie Api 20 E (avant et après incubation)

Groupe 02 : *Lactococcus* : 10 isolats présentent des cellules sphériques, homofermentaires, certains sont ADH+, VP+, arabinose -, raffinose -, xylose-, sorbitol -, melibiose -, rhamnose -, sorbose -, ribose +, mannose +, maltose+, cellobiose +, fructose +, tréhalose +, salicine +, ils peuvent s'apparenter à *Lactococcus lactissubsp lactis* ; d'autres sont ADH-, VP+, citrate +, galactose -, mannose -, cellobiose -, tréhalose -, ils sont pré-identifiés comme *Lactococcus lactissubsp cremoris*.

Groupe 03 : *Bifidobacterium* : 8 isolats présentent des cellules incurvées, homofermentaires, ADH-, citrate +, cellobiose +, mannose +, raffinose +, sorbitol +, salicine -, sucrose -, rhamnose -, ils sont qualifiés comme *Bifidobacterium breve*.



Figure 10. Exemple du profil fermentaire (galerie *Api 50 CH*) des bactéries lactiques (avant et après incubation).

2. Mise *in vitro* de quelques propriétés probiotiques:

L'ensemble des tests réalisés *in vitro* de quelques paramètres probiotiques montre que les souches réagissent différemment par rapport au pH acide et aux sels biliaires. Nous avons observé que le genre de *Lactobacillus* présente une meilleure résistance aux conditions hostiles et possède un pouvoir antimicrobien puissant. La survie des bactéries aux conditions de tube digestif est un critère incontournable de sélection de souches probiotiques (FAO/WHO, 2006). Cependant, c'est une fonction complexe mettant en jeu de nombreux mécanismes permettant aux bactéries de survivre à des environnements successifs très divers (pH acide, présence de sels biliaires, présence de germes pathogène). La combinaison de trois espèces *Lactobacillus* a fait l'objet d'une étude *in vivo*.

3. Etude des propriétés probiotiques et anti-inflammatoires des *Lactobacillus* chez les souris Balb/c :

3.1. Effet de l'administration des souches de *Lactobacillus* sur les indices d'activité :

3.1.1. Effet sur la croissance pondérale :

Le **tableau 5** représente l'impact de l'administration de *Lactobacillus* sur l'évolution des poids corporels chez les souris du groupe expérimental en comparaison avec les souris du groupe TN et/ou les souris du groupe TP.

Nos résultats montrent qu'à J0, aucune différence significative du poids corporel moyen n'a été notée entre les trois groupes. Cependant, une augmentation significative du poids corporel est notée respectivement à J7 et à J12 comparé à J0 chez les groupes TN (23.30 ± 2.09 vs 19.32 ± 3.07 g) ($p < 0.01$) ; (24.38 ± 2.09 vs 19.32 ± 3.07 g) ($p < 0.001$).

Chez le groupe TP, aucune différence significative du poids corporel n'est notée durant toute la durée de l'expérimentation.

De même, chez le groupe expérimental des souris ayant reçu les bactéries lactiques, une augmentation non significative du poids corporel est notée à J7 par rapport à J0. Par contre à J12, nous avons noté une diminution non significative du poids corporel en comparaison à J0.

Par ailleurs, les valeurs du gain pondéral révèlent une diminution significative chez le groupe gavé par les bactéries lactiques à J12 comparé à J7 (-1.96 ± 1.84 vs 2.46 ± 2.08 g) ($p < 0.001$). De même, le gain pondéral chez le groupe TN a augmenté de façon significative à J12 par rapport à J7 (1.08 ± 2.29 vs 3.97 ± 3.22 g) ($p < 0.05$). Tandis que, chez le groupe TP, une perte de poids non significative est notée à J12 comparé au J7.

A J12 et en comparaison avec le groupe TN, le gain pondéral chez le groupe expérimental a significativement diminué (-1.96 ± 1.84 vs 1.08 ± 2.29 g) ($p < 0.01$). Par contre, à J7, aucune différence significative du gain pondéral n'est notée chez le groupe expérimental par rapport au groupe TN.

Tableau 5. Effet de l'administration des souches de *Lactobacillus* sur le gain pondéral.

	Poids initial (g) J0	Poids (g) J7	Gain pondéral (g) à j7	Poids (g) J12	Gain pondéral (g) à j12
Groupes témoins					
TN	19,32±3,07	23,30±2,09 **	3.97±3.22	24,38±2,09 ###	1.08±2.29 \$
TP	23,95±1,20	24,43±3,03	0.48±3.25	22,79±4,40	-1.64±4.58
Groupe expérimental					
Lac	24,77±2,34	27,22±2,08	2.46±2.08	25,26±2,35 £££	-1.96±1.84 §§

Les valeurs reportées représentent les moyennes \pm écart type à J0 (Début de l'expérimentation), à J7 (la fin de l'administration de *Lactobacillus*), de J8 à J12 (l'induction de l'inflammation à base de DSS) et à J12 (la fin de l'expérimentation).

L'analyse de variance (ANOVA) est réalisée au sein du même groupe à différents J et entre les 2 groupes témoin négatif et le groupe gavé par *Lactobacillus* à J12.

- ** $p < 0.01$ TN : J0 vs J7
- ### $p < 0.001$ TN : J0 vs J12
- £££ $p < 0.001$ BL : J7 vs J12
- \$ $p < 0.05$ TN : J12 vs J7
- §§ $p < 0.01$ A J12 : TN vs Lac

3.1.2. Mesure de la température corporelle :

A la différence des souris du groupe témoin négatif, dont la température corporelle est restée stable au cours de l'expérimentation, les souris du groupe témoin positif et du groupe expérimental ont révélé une augmentation significative de la température corporelle à J12 après l'induction de

l'inflammation par le DSS comparé à J0 dont les valeurs sont respectivement (35.25 ± 0.59 vs $37.06 \pm 0.31^\circ\text{C}$) ($p < 0.001$) et (35.11 ± 0.49 vs $36.44 \pm 1.01^\circ\text{C}$) ($p < 0.001$) (**Tableau 6**).

Tableau 6. Effet de l'administration des souches de *Lactobacillus* sur la variation de la température corporelle.

Groupes	Température Corporelle ($^\circ\text{C}$)		
	J0	J7	J12
TN	35.25 ± 0.59	35.25 ± 0.59	35.22 ± 0.75
TP	35.25 ± 0.59	35.91 ± 0.39	37.06 ± 0.31 ***
BL	35.11 ± 0.49	35.07 ± 0.51	36.44 ± 1.01 ###

Les valeurs reportées représentent les moyennes \pm écart type à J0 (Début de l'expérimentation), à J7 (la fin de l'administration des bactéries lactiques), de J8 à J12 (l'induction de l'inflammation à base de DSS) et à J12 (la fin de l'expérimentation).

L'analyse de variance (ANOVA) est réalisée entre les souris du groupe témoin positif et les souris colonisées en bactéries lactiques.

*** $p < 0.01$ TP : J0 vs J12

$p < 0.001$ BL : J0 vs J12

3.1.3. Interprétation :

La réaction inflammatoire peut être définie comme une réaction de défense de l'organisme non spécifique dirigée contre des agents agresseurs de nature infectieuse, chimique, physique ou encore auto-immune. Lors de la réaction inflammatoire les vaisseaux sanguins se dilatent par le processus de vasodilatation. Ce phénomène provoque des rougeurs et de la chaleur qui sont des signes cliniques de l'inflammation (Vargas Robles et al., 2017).

Les maladies inflammatoires de l'intestin désignent deux maladies semblables, la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Il s'agit de maladies auto-immunes, qui semblent déclenchées par une combinaison de facteurs génétiques, immunitaires et environnementaux (Précourt, 2005). Plusieurs bactéries probiotiques différentes ont démontré la capacité de réduire les symptômes associés aux

maladies inflammatoires de l'intestin, dans des expériences animales et même dans des études cliniques chez l'humain. Parmi les modèles d'animaux d'inflammation intestinale induite chimiquement, celui utilisant le DSS est le plus souvent rencontré, il est jugé fiable pour démontrer une preuve de concept quant à la validité d'un traitement ou d'une intervention (Pizzaro et al., 2003). Les principaux symptômes causés par le DSS sont la perte de poids rapide, la rupture de l'épithélium intestinal, ce qui entraîne de la translocation bactérienne, de la diarrhée ainsi que des fèces sanguinolentes. L'inflammation au DSS entraîne aussi un raccourcissement de la longueur du côlon ainsi que l'épaississement de sa paroi (Okayasu et al., 1990). Nos résultats ont montré que le traitement par le DSS a conduit à une perte de poids en augmentation continue, comme prévu (Vargas Robles et al., 2017) pour le témoin positif. Les souches de *Lactobacillus* utilisées dans cette étude ont semblé apporter une certaine protection aux souris, en réduisant plusieurs symptômes majeurs causés par le DSS (poids, température, consistance et présence de sang dans les fèces).

3.2. Histologie de la muqueuse intestinale :

Cette partie de notre étude a pour but de vérifier l'effet de l'intubation intra-gastrique des souris par les bactéries lactiques sur la structure de l'épithélium intestinal, particulièrement au niveau de l'architecture villositaire, après l'induction de l'inflammation par le DSS.

Sur le plan structural, les villosités intestinales des souris témoins négatif apparaissent longues et fines avec un contour régulier, bordées par un épithélium simple, constitué de cellules cylindriques pourvues de noyaux réguliers en position basale. Le chorion est l'aspect fibreux contenant des cellules immunitaires peu abondantes (**Figure 11**).

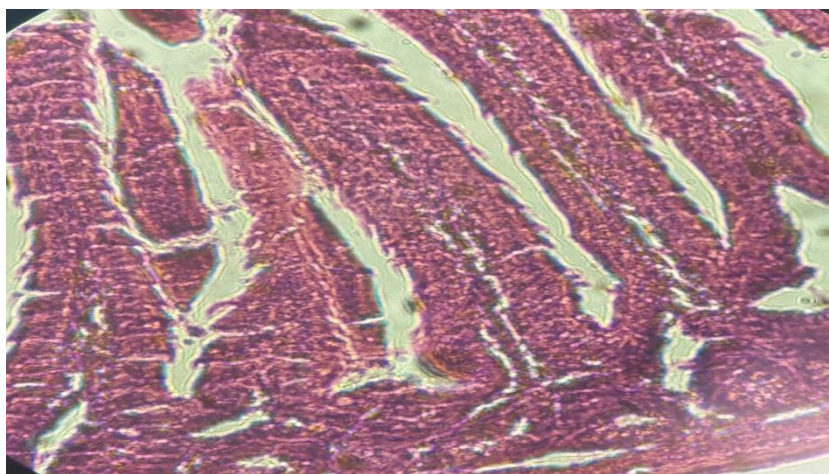


Figure 11. Observation microscopique (G x 10) d'un fragment du colon coloré à l'hémalun-éosine d'une souris témoin négatif.

Cependant, les villosités du groupe témoin positif présentent une atrophie villositaire partielle, avec un élargissement accentué, ainsi qu'une infiltration très prononcée des lymphocytes intra-épithéliaux (**Figure 12**). Ce groupe a enregistré une diminution très significative de la hauteur villositaire en comparant avec le groupe témoin négatif et le groupe expérimental.

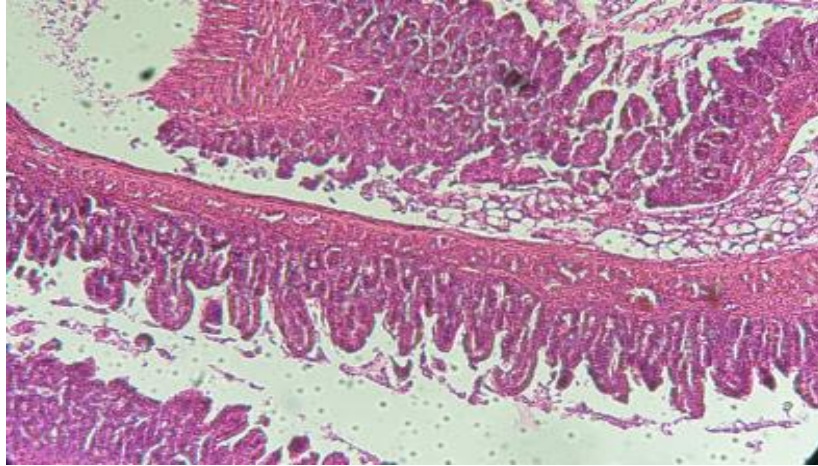


Figure 12. Observation microscopique (G x 10) d'un fragment du colon coloré à l'hémalum-éosine d'une souris TP.

En revanche, le groupe intubé par voie intra-gastrique avec le mélange de trois souches de *Lactobacillus*, ne montre aucune différence significative sur le plan structural ni au niveau de la hauteur des villosités en comparant avec le groupe témoin négatif, l'unistratification de l'épithélium reste comparable à celle du groupe témoin négatif (**Figure 13**). Nos résultats suggèrent que l'ingestion de probiotiques a un effet bénéfique sur la structure de l'épithélium intestinal des souris. Ces résultats sont en accord avec (Fernandez, 2011), qui montrent que les probiotiques favorisent l'intégrité de l'épithélium intestinal en exerçant un rôle protecteur sur la structure de l'épithélium.

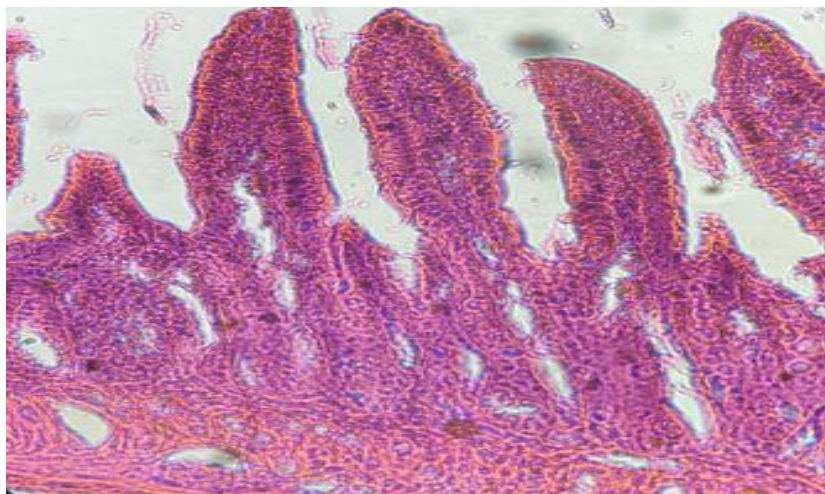


Figure 13. Observation microscopique (G x 10) d'un fragment du colon coloré à l'hémalum-éosine d'une souris du groupe expérimental.

L'inflammation intestinale induite chimiquement par l'administration de DSS, entraîne l'inflammation par la suractivation de certaines populations de cellules immunitaires ou par des dommages directs de la paroi intestinale (Hibi et al., 2002). *Lactobacillus salivarius* UCC118 a démontré la capacité d'améliorer les symptômes de l'inflammation intestinale chez des souris déficientes pour le gène de l'IL-10, qui est une cytokine responsable de maintenir l'équilibre de l'état inflammatoire contrôlé au niveau intestinal (O'Mahony et al., 2001).

Les probiotiques participent aux défenses de la "barrière intestinale" en utilisant des nutriments, en modifiant le pH intraluminal et en occupant des sites potentiels de colonisation.

De plus, elles sécrètent au niveau de la surface épithéliale des molécules antimicrobiennes telles les bactériocines et rentrent en compétition pour l'accès à des récepteurs de l'hôte.

Ils jouent également un rôle trophique en facilitant la prolifération et la différenciation épithéliale et en promouvant le système immunitaire.

Les probiotiques stimulent la composante "sécrétoire" de la barrière intestinale, par la production de la couche de mucus et des peptides antibactériens et, d'autre part, favorisent la composante "physique" de cette barrière, par la production de substances protégeant ou réparant l'épithélium (N-cadherin, acides gras à chaînes courtes, etc.) (Maeda, 2004 ; Tewari, 2019).

De plus, les cellules de l'épithélium intestinal en collaboration étroite avec le contenu intraluminal et les probiotiques jouent un rôle crucial dans la stimulation et la modulation du système immunitaire inné et adaptatif (Pickard, 2004). En bref, l'activation du système immunitaire inné est basée sur la reconnaissance de composants moléculaires bactériens par des récepteurs spécifiques, dont entre autres les récepteurs qualifiés de "Toll-like receptors" et ceux de la famille "NOD".

La reconnaissance de composés bactériens par ces récepteurs va entraîner une réaction en chaîne, très complexe entraînant l'activation de facteurs de transcription (NF- κ B), qui stimule la production de gènes codant la synthèse des cytokines inflammatoires (Tewari, 2019).

V. Conclusion et perspectives

Les MICI se caractérisent par un développement anormal et récurrent de l'inflammation. La recherche se focalise sur de nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant des bactéries en alternative aux traitements existant actuellement essentiellement composés d'immunosuppresseurs et de corticoïdes qui, en plus de leurs coûts élevés, peuvent induire de nombreux effets secondaires pour le patient. Les recherches actuelles ont démontré que le microbiote jouait un rôle essentiel dans le développement, l'induction ou l'arrêt de l'inflammation. Comme nous l'avons vu précédemment, certaines bactéries ont un potentiel anti-inflammatoire, elles n'induisent aucun effet secondaire reconnu à l'heure actuelle et sont présentes dans l'environnement du patient, que ce soit au sein de l'alimentation ou en tant que bactéries commensales. Le développement de traitements alternatifs utilisant le potentiel de ces bactéries semble donc prometteur et c'est en s'appuyant sur ce concept, que nous avons étudié les effets probiotiques et anti-inflammatoires de souches commensales telles que *Lactobacillus* sur un modèle animal d'inflammation intestinale induite par le DSS. Les souches administrées ont semblé apporter une certaine protection aux animaux, en réduisant plusieurs symptômes majeurs causés par le DSS (perte de poids, la rupture de l'épithélium intestinal, un raccourcissement de la longueur du côlon ainsi que l'épaississement de sa paroi, la diarrhée et des fèces sanguinolentes).

Il est important de vérifier les effets de chacune des souches à l'étude de manière individuelle. En effet, toutes les souches peuvent avoir des effets distincts, même si elles sont de la même espèce et très rapprochées phylogénétiquement. Il est aussi important de mentionner qu'il n'y a pas de souche miracle pouvant régler tous les problèmes inflammatoires ou auto-immunes. Chaque effet attribué à un probiotique doit être démontré par des recherches scientifiques rigoureuses.

Le mécanisme d'action des probiotiques reste l'objet de discussion : modulation de la flore bactérienne intestinale ? Protection de la muqueuse ? L'effet immunostimulant des mécanismes de réparation de l'épithélium et d'augmenter la synthèse de peptides antibactériens.

Cela dit, une meilleure compréhension des mécanismes d'action et des interactions potentielles pour chaque souche probiotique est nécessaire. Pour cela, l'identification des molécules anti-inflammatoires produites par les souches probiotiques ainsi que les gènes responsables de ces effets peuvent être menés.

VI. Bibliographie

- 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 [Phd]. <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000470/>
- Al-Otaibi M.M. isolation and identification of lactic acid bacteria and years from sameel milk : Asaudu traditional fermented milk. *Int J dairy Sci*, 2012 ; 7(4) : 73-83.
- Badis, A., ND, L., D, G., Mebrouk, K., & R, O. (2005). CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES BACTERIES LACTIQUES ISOLEES A PARTIR DE LAIT CRU DE CHEVRE DE DEUX POPULATIONS CAPRINES LOCALES « ARABIA ET KABYLE ». *Sciences et technologie*, 30-37.
- Bahri, F. (2014). Isolment et caracterisation des souches de lactobacilles a caracteres probiotiques a partir de selles d'enfants.
- Barbut, F., & Joly, F. (2010). Le microbiote intestinal : Équilibre et dysbiose. *Hépto-Gastro & Oncologie Digestive*, 17(6), 511–520.
- Belhamra, Z. (2018). Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires [Thesis]. <http://dspace.univ-setif.dz:8888/jspui/handle/123456789/1146>
- Biard, N. (2016). Le microbiote intestinal, les probiotiques et leur place dans les pathologies digestives basses du nourrisson (p. non renseigné) [Other, Université de Lorraine]. <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01734070>
- Boclé, J., Baelde, D., Brassart, D., Corthier, G., Doré, J., Heyman, M., & Marteau, P. (2005). Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte. <http://www.afssa.fr/Ftp/Afssa/28500-28501.pdf>
- Both, E., Gyorgy, E., Kibedi-Szabo, C. Z., Tamas, E., Abraham, B., Miklossy, I., & Lanyi, S. (2010). Acid and bile tolerance, adhesion to epithelial cells of probiotic microorganisms. *UPB Buletin Stiintific, Series B: Chemistry and Materials Science*, 72(2), 37–44.
- Bourlioux, P. (2014). Actualité du microbiote intestinal. *Annales pharmaceutiques françaises*, 72(1), 15–21.
- Bruno, F. A., & Shah, N. P. (2002). Inhibition of pathogenic and putrefactive microorganisms by *Bifidobacterium* sp. <http://hub.hku.hk/handle/10722/144335>
- Bultel, A. (2017). Les probiotiques aujourd'hui : Où en est-on ? [Doctorat de pharmacie, université de Lille 2]. <http://pepite-depot.univ-lille2.fr/nuxeo/site/esupversions/b1c39013-f249-4bc7-8e78-10096fae46bc>
- Burcelin, R., Nicolas, S., & Blasco-Baque, V. (2016). Microbiotes et maladies métaboliques : De nouveaux concepts pour de nouvelles stratégies thérapeutiques. *médecine/sciences*, 32(11), 952-960. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163211010>

- Burgain, J., Gaiani, C., Jeandel, C., Cailliez-Grimal, C., Revol, A.-M., & Scher, J. (2012). Maldigestion du lactose : Formes cliniques et solutions thérapeutiques. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 47(4), 201-209. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2012.02.005>
- Buxeraud, J. (2008). La diarrhée du voyageur ou “turista”, fréquente et invalidante. *Actualités pharmaceutiques*, 476(47), 23. [https://doi.org/10.1016/S0515-3700\(08\)70156-3](https://doi.org/10.1016/S0515-3700(08)70156-3)
- Camilleri, M. (2012). Peripheral Mechanisms in Irritable Bowel Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 367(17), 1626-1635. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1207068>
- Campeotto, F., Waligora-Dupriet, A.-J., Doucet-Populaire, F., Kalach, N., Dupont, C., & Butel, M.-J. (2007). Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 31(5), 533-542. [https://doi.org/10.1016/S0399-8320\(07\)89424-3](https://doi.org/10.1016/S0399-8320(07)89424-3)
- Carré, D., Simon, F., Hance, P., Coton, T., Delpy, R., & Guisset, M. (2005). Diarrhée du voyageur. *EMC - Hépto-Gastroenterologie*, 2(3), 249-263. <https://doi.org/10.1016/j.emchg.2005.04.002>
- Champagne, C. P., Gardner, N. J., & Roy, D. (2005). Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(1), 61-84. <https://doi.org/10.1080/10408690590900144>
- Cibik, R., Marcille, F., Corthier, G., & Dore, J. (2004). La flore intestinale : Mise en place, description et influence du mode d'alimentation. *Archives de pédiatrie (Paris)*, 11(6), 573–575.
- Collado, M. C., Gueimonde, M., Hernández, M., Sanz, Y., & Salminen, S. (2005). Adhesion of Selected Bifidobacterium Strains to Human Intestinal Mucus and the Role of Adhesion in Enteropathogen Exclusion. *Journal of Food Protection*, 68(12), 2672-2678. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.12.2672>
- Collen, A. (s. d.). Nos amies les bactéries. Elles détiennent les clés de la santé et du bien-être. Consulté 16 juin 2020, à l'adresse <https://www.decitre.fr/livres/nos-amies-les-bacteries-9782709647670.html>
- de Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., & Plummer, M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008 : A review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology*, 13(6), 607-615. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70137-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70137-7)
- Dolié, E. (2018). Rôle de la flore intestinale dans l'immunité : Usage actuel des probiotiques et futures indications [Exercice, Université Toulouse III - Paul Sabatier]. <http://thesesante.upstlse.fr/2231/>
- Ducrotté, P. (2005). Physiopathologie et traitement des troubles fonctionnels intestinaux. *EMC - Hépto-Gastroenterologie*, 2(4), 400-412. <https://doi.org/10.1016/j.emchg.2005.07.002>

- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F., & Collins, J. K. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin : Correlation with in vivo findings. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 386s-392s.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.386s>
- Ezzariga, N. (2015). PROBIOTIQUES : Applications thérapeutiques et Effets secondaires [Thesis].
<http://ao.um5.ac.ma/xmlui/handle/123456789/14823>
- FAO/WHO. Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. In : FAO Food and Nutrition Paper 85 Roma 2006.
- Fernandez EM, Valenti V, Rockel C, Hermann C, Pot B, Boneca IG et Grangette C. antiinflammatory capacity of selected lactobacili in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut*, 2011 : 60 (8) : 1050-1059.
- Fleming, H. P., Eтчells, J. L., & Costilow, R. N. (1975). Microbial Inhibition by an Isolate of *Pediococcus* from Cucumber Brines 1. *Applied Microbiology*, 30(6), 1040-1042.
- Flourié, B., & Nancey, S. (2007). Propriétés fonctionnelles des probiotiques. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42, 38-44. [https://doi.org/10.1016/S0007-9960\(07\)91320-6](https://doi.org/10.1016/S0007-9960(07)91320-6)
- Fooks, L. J., & Gibson, G. R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88(S1), s39-s49. <https://doi.org/10.1079/BJN2002628>
- Gagnon, M. (2007). Rôle des probiotiques lors d'infections entériques d'origine bactérienne et virale : Analyses in vitro et études in vivo chez des modèles murins.
<https://corpus.ulaval.ca/jspui/handle/20.500.11794/19707>
- Goulet, O., & Joly, F. (2010). Microbiote intestinal dans le syndrome du grêle court. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 34(4, Supplement 1), 41-47.
[https://doi.org/10.1016/S0399-8320\(10\)70006-3](https://doi.org/10.1016/S0399-8320(10)70006-3)
- Goulet, O., & Ruemmele, F. (2006). Causes and Management of Intestinal Failure in Children. *Gastroenterology*, 130(2, Supplement), S16-S28.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.12.002>
- Goulet, Olivier. (2009). La flore intestinale : Un monde vivant à préserver. *Journal de pédiatrie et de puériculture*, 22(3), 102–106.
- Goulet, Olivier, Colomb-Jung, V., & Joly, F. (2009). Role of the Colon in Short Bowel Syndrome and Intestinal Transplantation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 48, S66.
<https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181a118ef>

- Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., Krabshuis, J., Lemair, T., Kaufmann, P., de Paula, J. A., Fedorak, R., Shanahan, F., Sanders, M. E., Szajewska, H., Ramakrishna, B. S., Karakan, T., Kim, N., & Experts, R. T. outside. (2012). World Gastroenterology Organisation Global Guidelines : Probiotics and Prebiotics October 2011. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 46(6), 468–481.
<https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3182549092>
- Gusils C., Chaia A.P., Olivier G et Gonzalz S., 2010. Microtechnique for identification of lactic acid bacteria. Dans : *Methods in molecular biology*, Vol. 268 : Public Health Microbiology : Methods and Protocols Humana Press. Otowa, pp. 453-458.
- Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M., & Testoni, P. A. (2000). *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences*, 45(7), 1462–1464.
- Gutiérrez-Castrellón, P., Indrio, F., Bolio-Galvis, A., Jiménez-Gutiérrez, C., Jimenez-Escobar, I., & López-Velázquez, G. (2017). Efficacy of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 for infantile colic. *Medicine*, 96(51). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000009375>
- Hibi, T., H. Ogata et A.Sakuraba. 2002. Animal Models of Inflammatory Bowel Disease, *Journal of Gastroenterology*, vol. 37, no. 6, p. 409-417.
- Idoui T., Karam N.E., 2008. Lactic Acid Bacteria from Jije l'sbutter : isolation, identification and major technological traits. *Gr.Y. Aceites* 59(4) : 361-367.
- Izquierdo, E. (2009). Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique [These de doctorat, Strasbourg]. <https://www.theses.fr/2009STRA6034>
- Joly, F., Coffin, B., & Messing, B. (2007). Rôle de la flore dans les pathologies digestives (maladie de Crohn, rectocolite ulcérohémorragique, cancer colorectal exclus). *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 21(2), 89-94. <https://doi.org/10.1016/j.nupar.2007.04.004>
- Joly, F., Mayeur, C., Bruneau, A., Noordine, M.-L., Meylheuc, T., Langella, P., Messing, B., Duée, P.-H., Cherbuy, C., & Thomas, M. (2010). Drastic changes in fecal and mucosa-associated microbiota in adult patients with short bowel syndrome. *Biochimie*, 92(7), 753-761.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.02.015>
- Kato, K., Mizuno, S., Umesaki, Y., Ishii, Y., Sugitani, M., Imaoka, A., Otsuka, M., Hasunuma, O., Kurihara, R., & Iwasaki, A. (2004). Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 20(10), 1133–1141.

- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), 39-85. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x>
- Larpent J.P, 1997. Microbiologie alimentaire. Tec & doc, Lavoisier. Paris. 10-72.
- Lay, C., Rigottier-Gois, L., Holmstrøm, K., Rajilic, M., Vaughan, E. E., de Vos, W. M., Collins, M. D., Thiel, R., Namsolleck, P., & Blaut, M. (2005). Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(7), 4153–4155.
- Legendre, J. (2014). Microbiote intestinale et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [PhD Thesis].
- Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics : Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147(3659), 747–748.
- Louis Philippe Précourt, 2005. Evaluation du potentiel probiotique de différentes souches de *Lactobacillus kefiranofaciens*. Thèse de Doctorat en microbiologie appliquée. Université du Québec.
- Maeda, H., X. Zhu, S. Suzuki, K. Suzuki et s. Kitamura. 2004. Structural Characterization and Biological Activities of an Exopolysaccharide Kefiran Produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, p. 5533-5538
- Man, J. C. D., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130-135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
- Marchal N., Bourdon J.L. et Richard, C.L. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème édition, Doin éditeurs, Paris.
- Marteau, P., Flourie, B., Pochart, P., Chastang, C., Desjeux, J.-F., & Rambaud, J.-C. (1990). Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose : An in vivo study in lactase-deficient humans*. *British Journal of Nutrition*, 64(1), 71-79. <https://doi.org/10.1079/BJN19900010>
- Matricon, J. (2010). Immunopathogénèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *médecine/sciences*, 26(4), 405-410. <https://doi.org/10.1051/medsci/2010264405>
- Mégraud, F., Bessède, E., & Varon, C. (2015). Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(11), 984-990. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.06.004>

- Mueller, J. H., & Hinton, J. (1941). A protein-free medium for primary isolation of the *Gonococcus* and *Meningococcus*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 48(1), 330–333.
- Naimi, S. (2014). Isolement, caractérisation et étude « in vitro » de l'activité anti-inflammatoire de différentes souches probiotiques [Université Laval].
<https://corpus.ulaval.ca/jspui/handle/20.500.11794/25210>
- Netgen. (s. d.). Place des probiotiques dans le traitement des maladies inflammatoires intestinales. *Revue Médicale Suisse*. Consulté 29 mai 2020, à l'adresse
<https://www.revmed.ch/RMS/2012/RMS-352/Place-des-probiotiques-dans-le-traitement-des-maladies-inflammatoires-intestinales#rb7>
- Ninane, V., Mukandayambaje, R., & Berben, G. (2009). Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir : Le point sur la situation réglementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir. *BASE*. <https://popups.uliege.be:443/1780-4507/index.php?id=4366>
- Nzelof N. technique microscopique. Ed Flammarion Medecine Sciences, 1972 ; p :1-3-35-70.
- O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7(7), 688–693.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., & Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98(3), 694–702.
- O'Mahony, L., M. Feeney, S. O'Halloran, L. Murphy, B. Kiely, J. Fitzgibbon, G. Lee, G.C. O'Sullivan, F. Shanahan et J.K. Collins. 2001. Probiotic Impact on Microbial Flora, Inflammation and Tumor Development in IL-10 Knockout Mice, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 15, no. 8, p. 1219-1225.
- Ozogul, F., & Hamed, I. (2016). Lactic Acid Bacteria : *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus acidophilus*. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00852-0>
- Petit, C., Oswald, E., & Nougayrede, J.-P. (2013). Rôle des génotoxines produites par des bactéries du microbiote dans le cancer colorectal.
</data/revues/1773035X/v2013i456/S1773035X13722263/>. <https://www.em-consulte.com/en/article/853186>
- Pizarro, T.T., K.O. Arseneau, G. Bamias et F Cominelli. 2003. Mouse Models for the Study of Crohn's Disease, *Trends in Molecular Medecine*, vol. 9, no.5, p. 218-222.

- Polk, D. B., & Peek, R. M. (2010). *Helicobacter pylori* : Gastric cancer and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 10(6), 403-414. <https://doi.org/10.1038/nrc2857>
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., & Gopal, P. K. (1998). Selection and Characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains for Use as Probiotics. *International Dairy Journal*, 8(12), 993-1002. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00024-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00024-2)
- Rambaud, J.-C., Buts, J.-P., Corthier, G., & Flourié, B. (2004). *Flore microbienne intestinale : Physiologie et pathologie digestives*. John Libbey Eurotext.
- Rofes, C. (2014). *Intérêts du microbiote intestinal et probiotiques [Exercice, Université Toulouse III - Paul Sabatier]*. <http://thesesante.ups-tlse.fr/414/>
- Rowland, I. (2004). Probiotics and colorectal cancer risk. *British Journal of Nutrition*, 91(6), 805-807. <https://doi.org/10.1079/BJN20041161>
- Rubio, R., Jofré, A., Martín, B., Aymerich, T., & Garriga, M. (2014). Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiology*, 38, 303-311. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.015>
- Sachs, G., Shin, J. M., Munson, K., Vagin, O., Lambrecht, N., Scott, D. R., Weeks, D. L., & Melchers, K. (2000). The control of gastric acid and *Helicobacter pylori* eradication. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 14(11), 1383-1401. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2000.00837.x>
- Saggiaro, A. (2004). Probiotics in The Treatment of Irritable Bowel Syndrome. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 38, S104. <https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000129271.98814.e2>
- Salonen, A., de Vos, W. M., & Palva, A. (2010). Gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome : Present state and perspectives. *Microbiology*, 156(11), 3205-3215. <https://doi.org/10.1099/mic.0.043257-0>
- Samelis J, Maurogenakis F, Metaxopoulos J, 1994. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturelly fermented Greek dry salami. *Int.J.Food Microbiol.* 23 :179-196.
- Sanders, M. E. (2000). Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *The Journal of nutrition*, 130(2), 384S–390S.
- Sartor, R. B., & Mazmanian, S. K. (2012). Intestinal microbes in inflammatory bowel diseases. *The American journal of gastroenterology supplements*, 1(1), 15.
- Schwartz, A., Gruhl, B., Löbnitz, M., Michel, P., Radke, M., & Blaut, M. (2003). Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatric research*, 54(3), 393–399.
- Seksik, P., & Landman, C. (2015). Understanding microbiome data : A primer for clinicians. *Digestive Diseases*, 33(Suppl. 1), 11–16.

- Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4), 405-440.
<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.01.003>
- Shah, N. P. (2011). BACTERIA, BENEFICIAL | *Bifidobacterium* spp. : Morphology and Physiology. In J. W. Fuquay (Éd.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)* (p. 381-387). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00043-1>
- Shen, Z.-H., Zhu, C.-X., Quan, Y.-S., Yang, Z.-Y., Wu, S., Luo, W.-W., Tan, B., & Wang, X.-Y. (2018). Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis : Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World Journal of Gastroenterology*, 24(1), 5-14. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i1.5>
- Surawicz, C. M. (2010). Mechanisms of Diarrhea. *Current Gastroenterology Reports*, 12(4), 236-241. <https://doi.org/10.1007/s11894-010-0113-4>
- Szajewska, H., Skorka, A., & Dylag, M. (2007). Meta-analysis : *Saccharomyces boulardii* for treating acute diarrhoea in children. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 25(3), 257–264.
- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J.-P., Ugarte, E., Muñoz-Tamayo, R., Paslier, D. L., & Nalin, R. (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental microbiology*, 11(10), 2574–2584.
- Terzaghi, B. E., & Sandine, W. E. (1975). Improved Medium for Lactic Streptococci and Their Bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29(6), 807-813.
- Tewari S, David J et Gautam A,. 2019. A review on probiotic dairy products and digestive health. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, vol. 8, Issue 3 (2019).
- Urbańska, M., & Szajewska, H. (2014). The efficacy of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in infants and children : A review of the current evidence. *European journal of pediatrics*, 173(10), 1327–1337.
- Vargas Robles H., Castro Ochoa K. F., Nava P., Silva Olivares A., Shibayama M., & Schnoor M. (2017). Analyzing Beneficial Effects of Nutritional Supplements on Intestinal Epithelial Barrier Functions During Experimental Colitis. *Journal of Visualized Experiments*, 119, 55095. <https://doi.org/10.3791/55095>
- Watterlot, L. (2010). Analyse des effets de souches probiotiques anti-inflammatoires [Phdthesis, AgroParisTech]. <https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00570505>
- Whorwell, P. J., Altringer, L., Morel, J., Bond, Y., Charbonneau, D., O'Mahony, L., Kiely, B., Shanahan, F., & Quigley, E. M. M. (2006). Efficacy of an Encapsulated Probiotic

Bifidobacterium infantis 35624 in Women with Irritable Bowel Syndrome. *American Journal of Gastroenterology*, 101(7), 1581–1590.

Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427-434. <https://doi.org/10.1038/nature06005>

Zergoug, A. (2017). Effet des probiotiques et bactériocines vis-à-vis des pathogènes responsables des infections urinaires [Thesis, *South Asian J Exp Biol*; 6 (1): 15-22; 2016.ISSN: 2230-9799 Vol. 6, Issue 1, Page 15-22 <http://www.sajeb.org>.REGULAR ARTICLE.In Vitro antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's raw milk of Mostaganem (West Algeria) against Gram negative bacteria responsible for urinary tract infectionsZergoug Amina*1, Cheriguen Abderrahim1, Chougrani Fadela1.1Laboratory of Microbiology and Plant Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Mostaganem, B.P. 227, 27000 Mostaganem, Algeria.]. <http://e-biblio.univ-mosta.dz/handle/123456789/561>

Zhou C., Ludmila T., Sun N., Wang C., Pu Q., Huang K., & Che H. (2016). BALB/c mice can be used to evaluate allergenicity of different food protein extracts. *Food and Agricultural Immunology*, 27(5): 589-603.

Zoetendal, E. G., Vaughan, E. E., & De Vos, W. M. (2006). A microbial world within us. *Molecular microbiology*, 59(6), 1639–1650.

VII. Annexes

Annexe 1

Composition de milieux de cultures :

Milieux de cultures des bactéries lactiques :

Milieu MRS (g/L) : (Man et al., 1960)

Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure.....	5 g
Glucose.....	20 g
Citrate d'ammonium	2 g
Acétate de sodium.....	5 g
Sulfate du magnésium	,2 g
Sulfate de manganèse	0,05g
Phosphate dipotassique	2 g
Tween.....	1 ml

pH 6,2±0,2

- **MRS solide** : rajouter 15g/l d'agar-agar.
- **MRS acide nalidixique+cysteine** : rajouter 0,05% de cysteine-Hcl, 2mg/l acide nalidixique.
- **MRS acide** : ajuster le pH à 5,7 avec de Hcl.

Autoclavage 120°C/20min

Gélose M17 (g/l) : (Terzaghi & Sandine, 1975)

Tryptone	2,50 g
Peptone pepsique de viande.....	2,50 g
Peptone papainique de soja	5,00 g
Extrait autolytique de levure	2,50 g
Extrait de viande	5,00 g

Annexes

Lactose	5,00 g
Glycérophosphate de sodium.....	19,00 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Acide ascorbique.....	2,50 g
Agar agar bactériologique	15,00 g

pH 7,1 ± 1,2

Autoclavage 120°C/20min

Milieu de culture des bactéries non lactiques

Bouillon nutritif:

Extrait de viande	1 g
Extrait de levure.....	2 g
Peptone	5 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Eau distillée	1000 ml

pH=7,4.

- **Gélose nutritive** : Rajouter 15 g/l d'agar-agar

Autoclavage 120°C pendant 20min

Gélose LuriaBertani (Milieu LB)

Bactopeptone	5 g
Extrait de levure.....	2.5 g
Nacl.....	2.5 g
Eau distillée	500 ml
Agar agar bactériologique	15 g/l

pH : 7,1

Autoclaver 20 min à 120 °C

Gélose au sang :

Mélange spécial de peptones	23	g/l
Amidon.....	1	g/l
NaCl.....	5	g/l
Agar.....	10	g/l
Sang de mouton	50	mL

pH final = 7,3

Milieu Mueller-Hinton(Mueller & Hinton, 1941) :

Infusion de viande de bœuf.....	3000ml
Peptone de caséine	17,5g
Amidon de maïs.....	1,5g
Agar-agar	17g
Eau distillée	1000ml

pH=7,4. Autoclavage: 120°C pendant 20minutes.

Eau physiologique:

Chlorure de sodium.....	8,5 g/l
Eau distillée	1000 ml
Extrait de levure.....	0,5 g/l

Eau physiologique cystéiné :

Chlorure de sodium.....	8,5 g/l
Eau distillé	1000 ml
Extrait de levure.....	0,5 g/l
Cysteine-Hcl	0,2%

Annexe 2

Coloration de Gram a été mise au point en 1884 par Hans Christian

Préparation de frottis

- Prélever une goutte de la suspension bactérienne et la déposer au centre de la lame ;
- Etaler avec la pipette sur la lame, de façon à obtenir un étalement mince ;
- Sécher et fixer en portant la lame au-dessus de la flamme du Bec Bunsen.

Coloration

- Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane sur le frottis fixé, et laisser agir 1 min puis jeter l'excès ;
- Déposer quelques gouttes de lugol, laisser agir quelques secondes ;
- Rincer à l'eau ;
- Contre-colorer en déposant la Fushine pendant 1 minute ; Rincer à l'eau ;
- Laisser sécher à l'air ;
- Déposer une goutte de l'huile à émersion ;
- Observer au microscope optique ($G \times 100$), la forme, la disposition, et le Gram (Gram+ : couleur violette ; Gram- : couleur rose).