

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

Université Abdelhamid Ibn

Badis-Mostaganem

Faculté des sciences De la

Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس

مستغانم

كلية العلوم الطبيعية و الحياة

**DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

Présenté par :

**BENSALAH Mecheria BENSALAH Amina**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES**

**Spécialité : Agro-alimentaire et contrôle de qualité**

**Thème**

**Exploration de l'Activité Anti-Inflammatoire de  
Certaines Bactéries Lactiques Isolées à Partir du  
Poisson**

Devant le jury :

Président	Dr AIT SAADA Djamel	MCA	U. MOSTAGANEM
Encadrante	Dr YAHLA Imène	MCA	U. MOSTAGANEM
Examinatrice	Dr AIT CHAABANE Ouiza	MCA	U. MOSTAGANEM

**Année Universitaire: 2021-2022**

## REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions **Dieu** le tout puissant, le miséricordieux, de nous avoir donné la force, la patience et le pouvoir de raisonner.

Au terme de ce modeste travail, nous adressons nos remerciements à notre encadrante **Mme YAHLA Imène** pour son exceptionnel partage de savoir, sa patience et sa disponibilité durant la période de la réalisation de ce travail.

Nous tenons à remercier **Mr. AIT SAADA Djamel** d'avoir accepté de présider notre jury et **Mme AIT CHAABANE Ouiza** d'avoir accepté d'examiner notre modeste travail.

Nous remercions toute l'équipe du laboratoire pédagogique microbiologie N° 3 à l'ITA d'avoir mis à notre disposition le matériel et les moyens nécessaires à la réalisation de notre travail, et nos salutations spéciales s'adressent à **Mme. Houari** pour son aide et ses efforts.

Nous remercions l'équipe de la spécialité **Technologie Agro-alimentaire et Contrôle de Qualité**.

Nous remercions aussi tous ceux qui nous ont aidé, de près ou de loin, à accomplir ce travail.

*Amina et Mecheria...*

### **...Dédicaces...**

Avant tout, nous remercions Allah le tout puissant de nous a données le courage et la force pour finir ce travail.

Nous dédions ce travail à :

Nos pères et Nos mères pour leur soutien continu et pour nous avoir fourni tout ce que nous souhaitons. Nous demandons à Dieu de leur donner la santé, longue vie et les garde pour nous.

Notre encadrante **Mme. I. YAHLA** pour sa compréhension, son soutien et sa sagesse.

Nos familles **BENSALAH.**

Nos chers et adorables frères et sœurs qui sont toujours à nos côtés pendant ces longs jours  
**merci.**

Nos amis proches et à toute la promotion avec laquelle s nous avons passé les meilleures années et gardé les plus beaux souvenirs merci pour les jours qui nous ont réunis.

Egalement tous les professeurs qui nous ont enseignés.

*Amina et Mecheria...*

## RESUME

La présente étude consiste à explorer l'effet anti-inflammatoire de certaines bactéries lactiques à potentiel probiotique nouvellement isolées à partir des poissons (crevettes et sardines). Après leur isolement, caractérisation et identification par des méthodes physiologiques et biochimiques, les bactéries testées ont été explorées pour leur effet anti-inflammatoire in vitro par le test d'inhibition de la dénaturation des protéines et le test de stabilité des globules rouges. Les résultats de ces recherches ont démontré le pouvoir anti-inflammatoire des bactéries testées comparable à celui obtenu par le diclofénac. Le pourcentage d'inhibition des protéines obtenu est de (71,94%) et le pourcentage d'inhibition d'hémolyse des globules rouges est de (95,72%).

Enfin, nous avons mis en évidence les propriétés anti-inflammatoires in vitro mais l'ensemble de ces résultats suggèrent la réalisation d'autres études pour promouvoir les bienfaits de ces bactéries sur la santé.

**Mots clés :** bactéries lactiques, effets anti-inflammatoire, inflammation, hémolyse.

## **Abstract**

The present study consists in exploring the anti-inflammatory effect of certain lactic acid bacteria with probiotic potential newly isolated from fish (shrimp and sardine). After their isolation, characterization and identification by physiological and biochemical methods, the bacteria tested were explored for their anti-inflammatory effect in vitro by the protein denaturation inhibition test and the red blood cell stability test. The results of this research demonstrated the anti-inflammatory power of the bacteria tested compared to diclofenac the percentage of protein inhibition obtained is (71,94%) and the percentage of inhibition of hemolysis of red blood cells is (95,72%).

Finally, we have demonstrated anti-inflammatory properties on in vitro but these results suggest further studies to promote the health benefits of probiotic bacteria.

**Key words:** lactic acid bacteria, anti-inflammatory effects, inflammation, hemolysis.

## ملخص

تتمثل الدراسة الحالية في استكشاف التأثير المضاد للالتهابات لبعض بكتيريا حمض اللاكتيك ذات الإمكانيات الحيوية المعزولة حديثا من الأسماك (القريدس و السردين ) . بعد عزلها و توصيفها و تحديدها بالطرق الفسيولوجية و الكيميائية الحيوية ،تم استكشاف البكتيريا المختبرة لتأثيرها المضاد للالتهابات في المختبر عن طريق الاختبار تثبيط تمسخ البروتين و اختبار ثبات خلايا الدم الحمراء . أظهرت نتائج هذا البحث القوة المضادة للالتهابات للبكتيريا المختبرة مقارنة بالديكلوفيناك . بلغت نسبة تثبيط البروتين (71،94%) ونسبة تثبيط انحلال الدم في كريات الدم الحمراء (72،95%) .

وأخيرا لدينا أظهرت خصائص مضادة للالتهابات في نماذج مختلفة في المختبر ، ولكن كل هذه النتائج تشير إلى إنتاج البروبيوتيك الأخرى.

**الكلمات المفتاحية:** بكتيريا حمض اللاكتيك ، التأثيرات المضادة للالتهابات ، الالتهاب ، انحلال الدم .

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

- **AA:** acides aminés
- **AINS:** les anti-inflammatoires non stéroïdiens
- **AIS :** les anti-inflammatoires stéroïdiens
- **ATP:** adenosine triphosphate
- **BAL :** Bactéries lactiques
- **FAO :** Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
- **GRAS :** Generally Recognized As Safe
- **HRBC:** Human red blood cell
- **MRS :** ManRogosa et Sharp
- **OMS :** Organisation Mondiale de la Santé
- **PBS:** phosphate buffered saline
- **WHO :** World Health Organisation

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Numéros</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
Tableau 01	Présentation des espèces de bactéries lactiques	07
Tableau 02	Principaux genres des bactéries lactiques	09
Tableau 03	Principales souches probiotiques	14
Tableau 04	Critères de sélection des souches probiotiques	16
Tableau 05	Les cellules de la réaction inflammatoire, leurs caractéristiques, rôles et médiateurs libérés	24
Tableau 06	Les souches bactériennes étudiées	27
Tableau 07	Caractéristique physico- chimique des BL isolées	35

## LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
Figure 01	Arbre phylogénétique non raciné des BAL, y compris certains gram positifs aéro-anaérobies facultative de la subdivision à faible G+C	04
Figure 02	<i>Lactobacillus bulgarius</i> au microscope électronique	05
Figure 03	<i>Bifidobacterium</i> sp	06
Figure 04	Schéma montrant les différents types de fermentations	09
Figure 05	Lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques en vue d'une utilisation alimentaire	15
Figure 06	Evaluation de l'inflammation aigue	20
Figure 07	Effets des AINS sur isoformes de cyclooxygénase	22
Figure 08	Test de la catalase	31
Figure 09	HRBC après la centrifugation	32
Figure 10	Caractères macroscopiques des souches dans les milieux MRS après 48H	33
Figure 11	Observation Microscopique (Objectif × 100) Des Isolats Lactiques Après Coloration De Gram	34
Figure 12	Test De La Catalase (-)	35
Figure 13	Taux de stabilisation des membranes de HRBC (souche S1)	36
Figure 14	Taux de stabilisation des membranes de HRBC (souche S2)	37
Figure 15	Taux de stabilisation des membranes de HRBC (souche S3)	37
Figure 16	Taux de stabilisation des membranes de HRBC (souche S4)	38
Figure 17	Taux de stabilisation des membranes de HRBC (souche S5)	38
Figure 18	Taux d'inhibition des protéines par les bactéries lactiques	39
Figure 19	Taux d'inhibition des protéines par le Diclofénac	40

## Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction .....01

### Partie Bibliographique

**Chapitre I : les bactéries lactiques et les probiotiques**

I.1.Définition et caractéristiques des bactéries lactiques .....	02
I.2.Habitat .....	03
I.3.Taxonomie et classification .....	03
I.4. les principaux genres des bactéries lactiques .....	05
I.4.1. le genre <i>lactobacillus</i> .....	05
I.4.2. <i>streptococcus</i> et <i>lactococcus</i> .....	05
I.4.3.les genre <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissela</i> .....	05
I.4.4. <i>Enterococcus</i> .....	06
I.4.5. <i>Bifidobacterium</i> .....	06
I.5.Métabolisme des bactéries lactiques .....	08
I.5.1. Voie homofermentaire .....	08
I.5.2. Voie hétérfermentaire .....	08
I.5.3. Voie bifide ou FPC (Fructose 6- phospho- cétolase) .....	09
I.6. Application des bactéries lactiques .....	10
6.1. Domaine alimentaire .....	10
I. 6.1.1 Aptitude acidifiante .....	10
I.6.1.2 Aptitude protéolytique .....	10
I. 6.1.3 Aptitude texturant .....	11

I.6.1.4 Aptitude aromatisant .....	11
I.6.2 Domaine médical .....	11
I.7. Rôle dans la conservation .....	11
➤ Production d'acide lactique .....	11
➤ Production de bactériocines .....	11
I.8. Domaine de santé .....	12
I.9. Les probiotiques .....	12
I.9.1. Définition .....	12
I.10. Rôle probiotiques des BAL .....	12
I.11. Sources des probiotiques .....	13
I.12. Critères de sélection des souches probiotiques .....	13
I.13. Effets des probiotiques sur la santé .....	17
<b>Chapitre II : activité anti-inflammatoire</b> .....	18
II.1. Généralités sur l'inflammation .....	18
II.2. Les Types de l'inflammation .....	18
II.2.1. Inflammation aiguë .....	18
II.2.1.1. La phase vasculaire .....	18
II.2.1.2. La phase cellulaire .....	19
➤ A. les cellules du sang .....	19
➤ B. les cellules provenant du tissu .....	19
II.2.1.3. La phase de résolution et réparation .....	19
II.2.2. Inflammation chronique .....	20
II.3. Mécanisme de la réponse inflammatoire .....	21
II.4. Les anti-inflammatoires .....	21
II.4.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) .....	22
II.4.2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) .....	23
II.4.3. Les anti-inflammatoire d'origine naturelle .....	23
<b>Chapitre III : Matériel et Méthodes</b> .....	27
III.1. Objectif du travail .....	27
III.2. Matériel du laboratoire utilisé .....	27

III.3. Les Milieux de culture .....	27
III.4. Les souches bactériennes .....	27
III.4.1. Les souches de bactéries lactiques testées.....	27
III.4.2. Souches de références (témoin) .....	27
III.5.Réactivation des Souches .....	28
III.5.1. Ensemencement et purification des isolats .....	28
III.5.2. Identification des souches bactériennes .....	28
III.5.2.1. Critères morphologiques .....	28
III.5.2.1.1. Observation macroscopique.....	28
III.5.2.1.2. Observation microscopique .....	28
III.5.2.1.2.1. Coloration différentielle de Gram .....	28
III.5.2.2. Critères biochimiques et physiologiques.....	30
III.5.2.2.1. Test de catalase .....	30
III.6. Exploration de l'activité anti-inflammatoire in vitro .....	31
III.6.1. Méthode de stabilisation des membranes HRBC .....	31
III.6.1.1. Préparation des globules rouges .....	31
III.6.1.2. Hémolyse induite par la chaleur .....	32
III.6.2. Test de l'inhibition des protéines .....	32
<b>Chapitre IV : Résultats et discussion .....</b>	<b>33</b>
IV.1. Identification des souches lactiques .....	33
IV.1.1. Pré-identification des souches .....	33
IV.1.2. caractères macroscopiques .....	33
IV.1.3. Caractères microscopiques.....	33
IV.1.4. Test de la catalase .....	35
IV.2. Exploration de l'activité anti-inflammatoire in vitro .....	36
IV.2.1. Méthode de stabilisation des membranes HRBC .....	36
IV.2.1.1. Préparation des globules rouges .....	36
IV.2.1.1. Hémolyse induite par la chaleur .....	36

IV.2. Test d'inhibition des protéines .....38

**Conclusion** .....41

**Références bibliographiques**

**Annexes**

# *INTRODUCTION*

# INTRODUCTION

---

## INTRODUCTION

La découverte de la relation symbiotique entre l'homme et les bactéries a conduit à une nouvelle façon de voir les bactéries comme potentiellement bénéfiques, plutôt que pathogènes (**Belhamra, 2018**). Les bactéries lactiques constituent un vaste groupe bactérien dont la taxonomie est régulièrement remise à jour avec la progression des données moléculaires. Elles regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique (**Djerdir et al., 2018**).

Les bactéries lactiques sont des microorganismes présentant des caractéristiques morphologiques, physiologiques, et métaboliques variées (**Hammache et al., 2018**). Une large gamme d'activités métaboliques et propriétés sont recherchées chez ces bactéries pour un usage industriel, telle que l'acidification, la protéolyse, la production de polysaccharides, (**Aibeche, 2019**). En raison de leurs bienfaits pour la santé, certaines BAL sont largement utilisées comme probiotiques comme *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* (**Bougeurra, 2021**).

Les probiotiques sont donc définis comme des microorganismes vivants conférant des bienfaits pour la santé aux hôtes et certaines espèces de bactéries lactiques (**Lallali et al., 2018**). Les souches de probiotiques introduites dans l'alimentation sous forme de produits lactés fermentés ou suppléments alimentaires (dans les produits non-fermentés) et qui vont s'implanter dans le tube digestif, peuvent interagir avec la flore intestinale (**Bechachha et al., 2020**).

Les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé de l'hôte sont, en théorie nombreux, mais les preuves scientifiques confirmant ces allégations nécessitent des investigations supplémentaires (**Villeger, 2014**).

L'inflammation est un phénomène biologique lié à la régénération tissulaire, la protection contre les agents pathogènes et la réponse immunitaire, entre autres. Ca peut être dérégulé dans les états pathologiques, y compris les maladies auto-immunes, le cancer, altérations gastro-intestinales et allergies ; par conséquent, il doit être modulé chaque fois que nécessaire.

Bien qu'ils soient très efficaces, ces composés anti-inflammatoires sont associés à un grand nombre d'effets. L'objectif de ce travail consiste à explorer, *in vitro*, l'effet anti-inflammatoire de certaines bactéries lactiques isolé à partir du poisson.

# *Chapitre I*

## *LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES*

# **Chapitre I : LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES**

---

## **CHAPITRE I : LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES**

### **I.1. Définition et caractéristiques des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont définies comme un groupe omniprésent et hétérogène mais une caractéristique commune permet cependant de les unifier en un seul et vaste groupe : leur capacité à fermenter les hydrates de carbone en acide lactique. Sur la base des caractéristiques de fermentation, les bactéries lactiques sont homofermentaires ou hétérofermentaire (**Latreche, 2016**). Les BAL sont bien tolérés par les animaux et l'homme ayant le statut GRAS ' Generally Recognized As Safe (**khodja, 2018**).

Les BAL ce sont des souche à gram positif, asporulantes, micro aérophiles ou anaérobies, catalase négative, oxydase négative, acidotolérantes, non motiles, de forme coccoïde ou bâtonnet qui produisent l'acide lactique comme un produit principal final après fermentation de glucose à l'exception de quelques espèces, les membres des BAL sont des organismes non pathogènes et considérés comme «GRAS» (**Reddy et al., 2008 ; Papadimitriou et al., 2016**). En raison de leur faible capacité biosynthétiques, ces bactéries ont exigences nutritionnelles complexes pour les AA, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides ferments cibles (**Achemchem, 2014**).

Les BAL sont parfois classés en fonction de leur température optimale de croissance : 20 à 30°C pour les mésophiles, 40 à 45°C pour les thermophiles. Ces deux grandes familles de bactéries n'ont pas également les mêmes métabolismes azotés : on considère que les mésophiles ne sont protéolytiques durant qu'après leur lyse, alors que les thermophiles sont protéolytiques durant leur phase de croissance (**Joubert, 2016**).

Les BAL sont ubiquistes, et on les trouve dans différentes niches écologiques. Les espèces des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* se rencontrent plutôt chez les hommes, les animaux, les oiseaux. On peut les isoler de la peau des animaux, des matières fécales, mais aussi de l'ensilage, du foin ou des grains. Dans le domaine laitier, elles existent sur les ustensiles en quantité considérable. Certaines espèces des groupes sérologiques A et B peuvent être pathogènes, mais les autres sont plutôt saprophytes (**Guriaud et al., 2003**).

# Chapitre I :LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES

---

## I.2.Habitat

Grâce à leur souplesse d'adaptation physiologique, les BAL peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physico-chimique et biologique. Des différents écosystèmes, les BAL sont capable de d'exercer des effets bénéfiques ou, plus rarement, d'engendrer des altérations biologiques.

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes ubiquitaires susceptibles d'être retrouvés dans tous types d'habitat **(Belyagoubi,2014)**. Les BAL sont généralement associés à des matières premières végétales et animales et produits alimentaires fermentés correspondants, y compris les produits laitiers, viande, légumes et céréales, ou la fermentation peut avoir lieu **(Bouguerra,2021)**.elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain **(Menad, 2018)**.elles sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'homme ou l'animal, **(Belyagoubi, 2014)**. Certaines espèces sont également présentes dans les voies respiratoires, intestinales et génitales des humaines et des animaux **(Bouguerra, 2021)**.

La tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des BAL telle que *Bifidobacterium,lactobacillus,leuconstoc,etweisseilla* . Par ailleurs, l'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes responsables d'infections vaginales comme *Trichomonasvaginalis (T.vaginalis)*, pathogène responsable de la trichomonase vaginale et/ou *candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite **(Makhloufi, 2011)**.Les BAL isolées à partir du tractus gastro-intestinal des poissons. Des lactobacilles, notamment *lactobacillus plantarum*, on été retrouvés dans du saumon d'atlantiques.

Les BAL ont joué un rôle important dans la technologie alimentaire. Les BAL comprennent une grande variété de types de cellules et de caractéristiques physiologiques et biochimiques. Elles sont souvent associées aux cavités buccales et aux intestines des animaux, par exemple. *Enterococcusfaecalis*et feuilles de plante *lactobacillus, leuconostoc***(Ekundayo, 2014)**.

## I.3.Taxonomie et classification

La classification des BAL en différents genres est largement basée sur la morphologie, la mode de fermentation de glucose, la croissance à différentes températures, la configuration de l'acide lactique produit et tolérance à fortes concentrations en sel et aux acides ou bases. Des

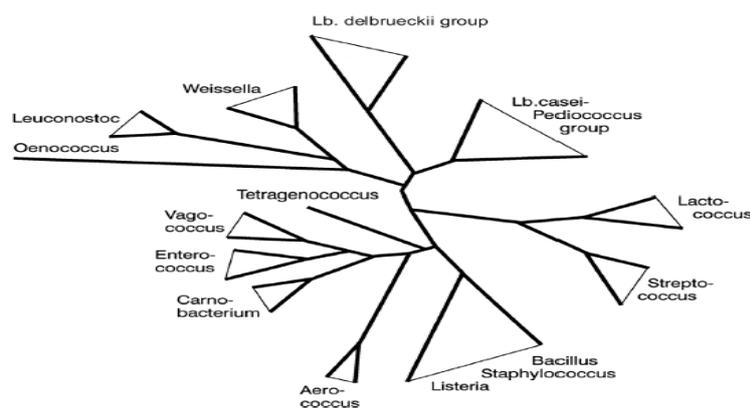
# Chapitre I : LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES

marqueurs chimio-taxonomiques tels que la composition en acides gras et les constituants de paroi cellulaire sont également utilisés dans la classification (Axelsson, 2004).

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen. Elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques, Biochimiques et physiologiques (Belyagoubi, 2014).

Le groupe des bactéries lactiques sensu est formé par des bactéries ayant une morphologie très diversifiée, parmi lesquelles on trouve des bactéries de forme coccoïde, cas des espaces appartenant aux genres *streptococcus*, *lactococcus*, *vagococcus*, *Entérocooccus*, *pedococcus*, *Aerococcus*, *Tetraenococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* et, *Atopobium*, et celles de forme bacillaire des genres *lactobacillus* et *carnobacterium* (Stiles et Holzapfel, 1997). Ce pendant la dénomination de bactéries lactique s'est étendu actuellement à d'autres genres comme *Bifidobacterium*, *micrococcus*, *Brevibacterium*, *propionibacterium*.

La classification peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires (Figure 1). Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour des espèces lactiques (Ho et al., 2007).



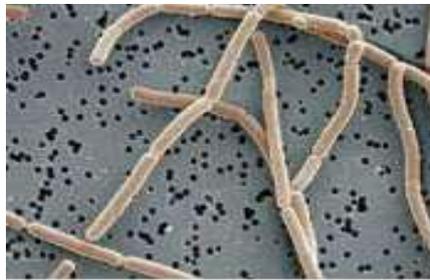
**Figure 1** : Arbre phylogénétique schématisé non raciné des bactéries lactiques, y compris certains gram positifs aéro-anaérobies facultative de la subdivision à faible G+C (salminen et al., 2004) .

# Chapitre I :LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES

## I.4. Les principaux genres des bactéries lactiques

### I.4.1. Le genre *Lactobacillus*

*Lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont racontées comme contaminants il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes (**figure 2**). Immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en AA, en Vita, AG, en nucléotides, en glucides et minéraux (**Menad, 2018**).



**Figure 2 :** *Lactobacillus bulgaricus* au microscope électronique (**Menad, 2018**)

### I.4.2. *Streptococcus* et *Lactococcus*

Appartenant à la famille des *Streptococcaceae*. Les espèces de ce genre sont des cellules ovoïdes, sphériques ou quelque fois allongées en fuseaux en paires ou en chaînettes. Les streptocoques lactiques se distinguent par leur capacité de croître à 45°C. Le genre *Lactococcus* (*streptocoque* du groupe N) représente les streptocoques dits «Lactiques » car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Ces genres partagent les caractères suivants : anaérobies facultatifs, chimioorganotrophes, homofermentaire, catalase négative, leur température de croissance est située entre 25 et 45°C (**Boudersa et al, 2017**).

### I.4.3. Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils ressemblent les coques lenticulaires en paires ou en chaînettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétéro-fermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO<sub>2</sub> et d'éthanol. Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend quatorze espèces, ils sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours

# Chapitre I :LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES

lente. Le développement des leuconostoc entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les leuconostoc principalement *Ln. mesenteroides*ssp.cremoriset*Ln. lactis*sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO<sub>2</sub>, des substances aromatiques telles que le diacétyl et l'acétoïne à partir des citrates du lait (**Hassan et Frank, 2001 ; Guiraud, 2003 ; Ogier et al., 2008**).

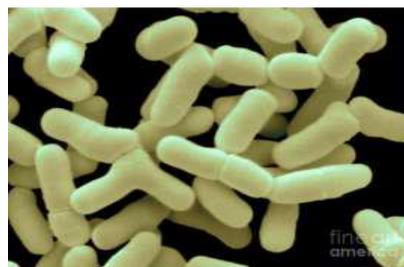
## I.4.4. *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus* regroupe les *sterptocoques* fécaux qui présentent de type  $\alpha$ ,  $\beta$  et qui appartiennent au groupe sérologique D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *E. faecalis* (auparavant *sterptococcus faecalis*), et ses variétés *E. durans* et *E. bovis*). Les *Enterococcus* sont les bactéries lactiques les plus controversées (**Franz et al., 2003**).

## I.4.5. *Bifidobacterium*

Traditionnellement, le genre *Bifidobacterium* a été associé aux BAL. Par la suite, il a été séparé en raison du contenu G+C supérieur à 50% et affecté au phylum des *Actinobacteria*.

Elles ont généralement un pH optimal de croissance autour de 6,5 à 7 et une température de croissance comprise entre 37°C et 41°C. Elles ont la forme irrégulière d'un V ou une morphologie bifide en forme de Y (**figure 3**). Elles sont hétérofermentaires et dégradent les hexoses en produisant de l'acide lactique et acétique (**Aibeche et al, 2020**).



**Figure 3 : *Bifidobacterium* sp. (Aibeche et al, 2020)**

# Chapitre I :LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES

**Tableau01.** Présentation des espèces des bactéries lactiques(Vandammeetal.,2014).

Famille	Genre	Espèce type	Nombre
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Abiotrophia</i>	<i>Ab.defectiva</i>	1
	<i>Aerococcus</i>	<i>Ae.viridans</i>	7
	<i>Dolosicoccus</i>	<i>Dc.paucivorans</i>	1
	<i>Eremococcus</i>	<i>Ere.coleocola</i>	1
	<i>Facklamia</i>	<i>F.hominis</i>	6
	<i>Globicatella</i>	<i>Glo.sanguinis</i>	2
	<i>Ignavigranum</i>	<i>Ig.ruoffiae</i>	1
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Alkalibacterium</i>	<i>Alk.olivapoliticus</i>	9
	<i>Allofustis</i>	<i>Af.seminis</i>	1
	<i>Alloiococcus</i>	<i>Ai.otitis</i>	1
	<i>Atopobacter</i>	<i>Ap.phocoe</i>	1
	<i>Atoopococcus</i>	<i>Ac.tabci</i>	1
	<i>Atopostipes</i>	<i>At.suicloacalis</i>	1
	<i>Bavariicoccus</i>	<i>B.seileri</i>	10
	<i>Carnobacterium</i>	<i>C.divergens</i>	1
	<i>Desmzia</i>	<i>D.incerta</i>	1
	<i>Dolosigranulum</i>	<i>Dg.pigrum</i>	3
	<i>Granulicatella</i>	<i>Gra.adiacens</i>	1
	<i>Isobaculum</i>	<i>Is.melis</i>	1
	<i>Lactcigenium</i>	<i>Lg.naphtae</i>	2

## **Chapitre I :LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES**

	<i>Marinilactibacillus</i>	<i>M.psychrotolerans</i>	5
	<i>Catelicoccus</i>	<i>Tr.flacculiformis</i>	1
<b><i>Enterococcaceae</i></b>	<i>Enterococcus</i>	<i>E.faecalis</i>	43
	<i>Melissococcus</i>	<i>Me.plutonius</i>	1
	<i>Tertagenococcus</i>	<i>Tet.halophilus</i>	5
	<i>Pilibacter</i>	<i>Pi.termitis</i>	1
	<i>Vagococcus</i>	<i>V.fluvialis</i>	8
<b><i>Lactobacillaceae</i></b>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb.delbrueckii</i>	151
	<i>Paralactobacillus</i>	<i>Pl.selangorensis</i>	1
	<i>Pediococcus</i>	<i>Ped.damnosus</i>	11
<b><i>Leuconostocaceae</i></b>	<i>Fructobacillus</i>	<i>Fru.fructosus</i>	5
	<i>Leuconostoc</i>	<i>Ln.mesenteroides</i>	13
	<i>Oenococcus</i>	<i>O.oeni</i>	2
	<i>Weissella</i>	<i>W.viridescens</i>	15
<b><i>Streptococcaceae</i></b>	<i>Lactococcus</i>	<i>Lc.lactis</i>	7
	<i>Lactovum</i>	<i>Lv.miscens</i>	1
	<i>Streptococcus</i>	<i>S.pyogenes</i>	78
<b>D'autres 'BAL'</b>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bif.bifidum</i>	41

# Chapitre I :LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES

---

## I.5.Métabolisme des bactéries lactiques

Les sucres représentent la principale source de carbone d'énergie chez les BAL. au cours de la fermentation, il y a production d'acide lactique. Ce métabolisme chez les BAL s'effectue selon la voie homolactique ou hétérolactique (Saidi, 2020).

### I.5.1. Voie homo-fermentaire

Généralement les bactéries lactiques homo-fermentaires comprennent les genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Le métabolisme est qualifié d'homolactique lorsqu'au moins 90% du glucose consommé est converti en lactate (Atlan et al., 2008). Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (figure 4) (Mozzi et al., 2010).

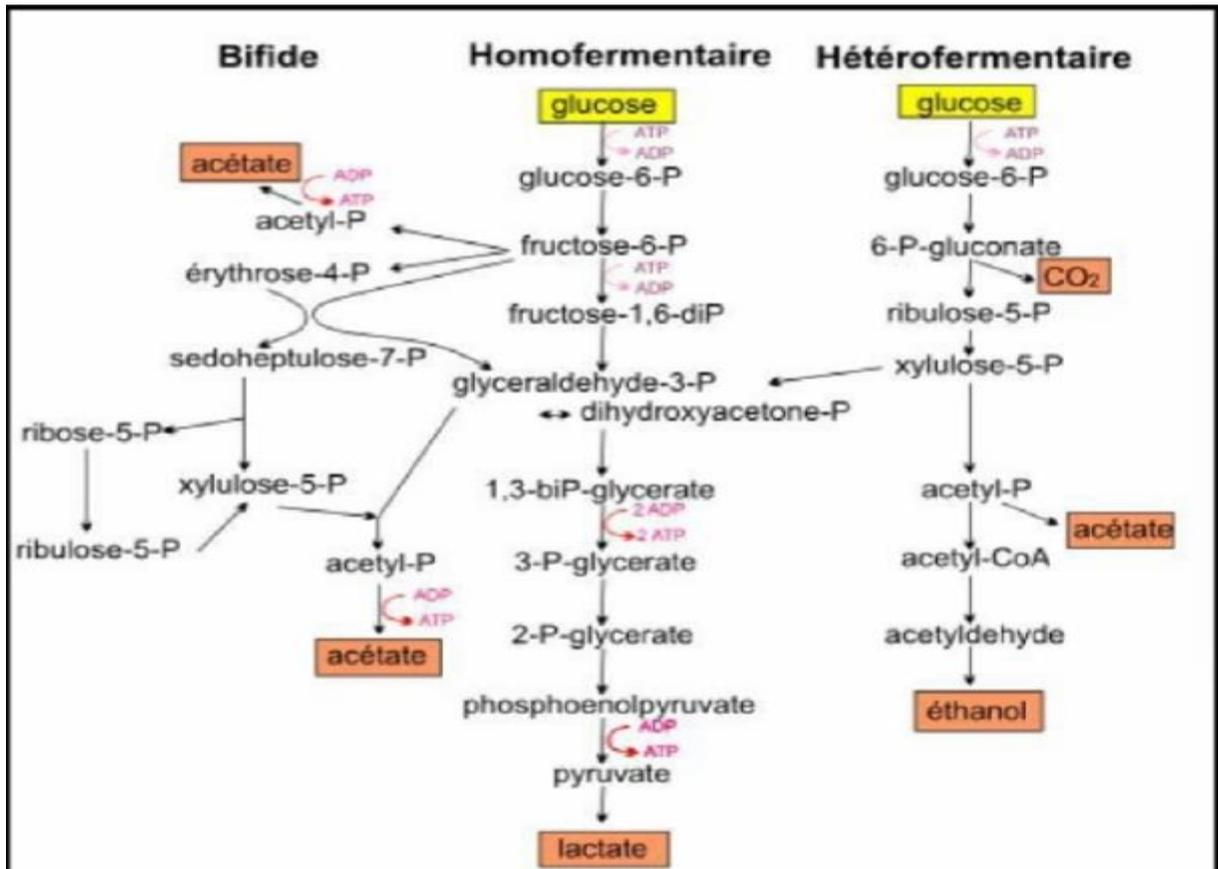
### I.5.2. Voie hétéro-fermentaire

Les bactéries présentant ce type de métabolisme sont des genres *Leuconostoc* et *Lactobacillus*, ces bactéries fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique (moins de 1,8 mole par mole de glucose), de l'acétate, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> (Charrad et Tazegouaret, 2020). Le métabolisme hétéro-fermentaire est deux fois moins énergétique que le métabolisme homo-fermentaire puisqu'une mole de glucose conduit à la production d'une mole de lactate, d'éthanol, de CO<sub>2</sub> et d'un seul ATP (figure 4) (Ghozlane, 2012).

### I.5.3. Voie bifide ou FPC (Fructose 6- phospho- céto-lase)

Cette voie est empruntée par les bactéries du genre *Bifidobacterium*, elle permet d'avoir 1.5 molécules d'acétate et 2.5 molécules d'ATP à partir d'une molécule d'hexose consommée (Figure 4) (Tahlaiti, 2019).

# Chapitre I : LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES



**Figure04** : schéma montrant les différents types de fermentation (Salminen et Von Wright, 2004).

**Tableau 02** : Principaux genres de bactéries lactiques

Genre	Forme de la cellule	Type de fermentation
<i>Carnobacterium</i>	<i>Bacilles</i>	Hétérofermentaire
<i>Enterococcus</i>	<i>Coques</i>	Homofermentaire
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacilles</i>	Homo ou hétéro
<i>Lactococcus</i>	<i>Coques</i>	Homo
<i>Leunostoc</i>	<i>Coques</i>	Hétéro
<i>Oenococcus</i>	<i>Coques</i>	Hétéro
<i>Pediococcus</i>	<i>Coques</i>	Homo

# Chapitre I :LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES

<i>Sterptococcus</i>	<i>Coques</i>	Homo
<i>Tetregenococcus</i>	<i>Coques</i>	Homo
<i>Vagococcus</i>	<i>Coques Ovoïdes</i>	Homo
<i>Weissella</i>	<i>Petits Bacilles</i>	Hétéro

## I.6. Application des bactéries lactique

### 6.1. Domaine alimentaire

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries qui possèdent le « statut GRAS» ce que qui autorise officiellement leur usage dans les applications alimentaires.

Ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits : les saucissons, les laits fermentés, les fromages, les olives fermentés et certains vins. Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand utilisateur de ferments lactiques commerciaux (**Hassaine, 2013**).

#### 6.1.1 Aptitude acidifiante

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne(**Boullouf, 2017**).

#### 6.1.2 Aptitude protéolytique

La croissance jusqu'à des densités cellulaires permettant aux bactéries lactiques d'assurer les fonctions de fermentation repose sur un système protéolytique capable de satisfaire tous les besoins en acides aminés en hydrolysant les protéines. Les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée. Les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques (**Hadef, 2012**).

#### 6.1.3 Aptitude texturant

# **Chapitre I :LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES**

---

Certaines souches de bactérie lactique ont la faculté de synthétiser des exopolysaccharides, glucanes et fructosanes, qui constituent la capsule cellulaire. Ces macromolécules contribuent à modifier la texture des produits dans lesquels se développent les souches compétentes cette aptitude texturant est aussi exercée par le pouvoir acidifiant, (Chemla-kheraz, 2013).

## **6.1.4 Aptitude d'aromatisant**

Cette activité est très liée aux propriétés organoleptiques du produit dans lequel elles se développent. En effet, certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart des composés d'arômes sont issus du métabolisme du citrate, l'acétoïne et diacétyl sont les plus importants.

Ces propriétés aromatisants ne sont pas toujours souhaitables, car elles sont redoutables dans la brasserie et dans le cas de nombreux produits. (Chemalal-kheraz, 2013).

## **6.2 Domaine médical :**

Les bactéries lactiques interviennent dans le contrôle des infections intestinales comme la prévention des diarrhées par l'introduction d'une nouvelle flore intestinale qui agit sur les entérobactéries responsables de ces désordres intestinaux. Elles sont aussi connues pour la production des agents antimicrobiens évitant ainsi l'usage des antibiotiques. Les bactéries lactiques colonisent l'intestin de la plupart des animaux, jouant un effet sur leur système immunitaire, souvent, en tant que probiotique pour améliorer certaines fonctions biologiques de leur hôte (Mermouri, 2018).

## **I.7. Rôle dans la conservation**

- **Production d'acide lactique :** les bactéries lactiques ont un rôle important dans l'inhibition des flores non lactiques.
- **Production de bactériocines :** ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand nombre de souches de bactéries lactiques, elles sont généralement thermorésistantes.

# Chapitre I :LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES

---

## I.8.Domaine de santé

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

## I.9.Les probiotiques

### I.9.1.Définition

Le terme « probiotiques » vient des mots grecs « pro » qui signifie « en faveur » et « biotoks »qui signifie « la vie », choisi par opposition au terme antibiotique. En 1989,fuller a défini les probiotiques par « suppléments alimentaires constitués de microorganismes vivants qui ont un effet favorable sur l'animal hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale(Chaouchi et Oulhadj,2020).

L'organisation des nations unies pour l'agriculture et l'alimentation et l'Organisation Mondiale pour la santé (FAO/OMS, 2002), ont définit les probiotiques comme des « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquates, produisent un effet bénéfiques pour la santé de l'hôte » (Chaouchi et Oulhadj,2020).

La plupart des probiotiques reconnus actuellement appartiennent à la famille des bactéries lactiques, notamment les espèces appartenant au genre *Lactobacillus*et*Bifidobacterium*. Certaines espèces de levures (*Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces boulardii*) ou encore des espèces et de *Bacillus* ont aussi était identifie comme probiotiques(Kalsum et al, 2012).

Ils peuvent être présents ou introduits dans certains aliments (compléments alimentaire) ou encore dans certains médicaments (ex : lactéol contenant des *Lactobacillus LB*)(Laffargue, 2015).

### I.10.Rôle probiotiques des BAL

De nombreuses études rapportées, depuis une quinzaine d'années, montrant que les bactéries sont de plus utilisées sous forme de probiotiques qui sont des préparations contenant des microorganismes et leur métabolites, utilisés comme additifs alimentaires et qui affectent de façon bénéfique l'organisme de l'hôte.

# **Chapitre I :LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES**

---

Ces bactéries présentent des propriétés prophylactiques et thérapeutiques par exemple leur activité anticholestérolémiante, leur action anticarcinogène, leur potentiel vaccinal et l'effet protecteur des tractus digestif (Chemlal,2012).

Les probiotiques ont pour but d'aider la flore microbienne naturelle intestinale et par conséquent, leur plus grande évidence, sur la santé humaine, concerne leur rôle sur l'intestin par l'inhibition des germes pathogènes et prévention et/ou le traitement des diarrhées infectieuses (Bahri, 2014).

## **I.11. Sources des probiotiques**

La source conventionnelle de probiotiques à usage humain, recommandée par la FAO/WHO, est le TGI. De nombreuses souches probiotiques ont été isolées de l'intestin, telles que : *Lb. Salivariussubsp. Lb.acidophilus*, ainsi qu'à partir des matières fécales humaines, telles que *B.longum* et *Lb.acidophilus*, et moins fréquemment l'estomac humain, comme : *Lb.fermentum*, *Lb.gasseri*, *Lb.vaginalis*, *Lb.reuterietLb.salivarius* (Zielińska et Kolozyn-Krajewska,2018).

Les principaux vecteurs alimentaires des probiotiques sont les yaourts et les laits fermentés. Ils fournissent un pH de l'environnement dans lequel la bactérie probiotique doit survivre. Cependant, de nombreuses études montrent que les souches probiotiques sont trouvées également dans les substrats fermentés non laitiers comme : les céréales, les légumineuses, les choux, les légumes, etc. (Anandharaj et al., 2014).

Outre les aliments, les probiotiques peuvent également être disponibles sous forme de liquide, de poudre, de gel, des granulés, des pâtes, des capsules, des sachets, des médicaments et des compléments alimentaires. Toutes ces formes de produits contiennent un grand nombre de bactérie qui restent des un état stable du fabricant aux consommateurs (Yadav et Shukla, 2017).

## **I.12. Critères de sélection des souches probiotiques**

Il est nécessaire d'établir des critères pour le criblage et la sélection des microorganismes candidats, sans oublier d'évaluer l'efficacité des souches sélectionnés sur l'homme avec des essais cliniques contrôlés. C'est un comité mixte d'expert FAO/OMS qui a établi les critères et une méthodologie à utiliser pour l'évaluation des probiotiques de défini des données nécessaires à la justification des allégations santé. La (figure05) résume les lignes directrices

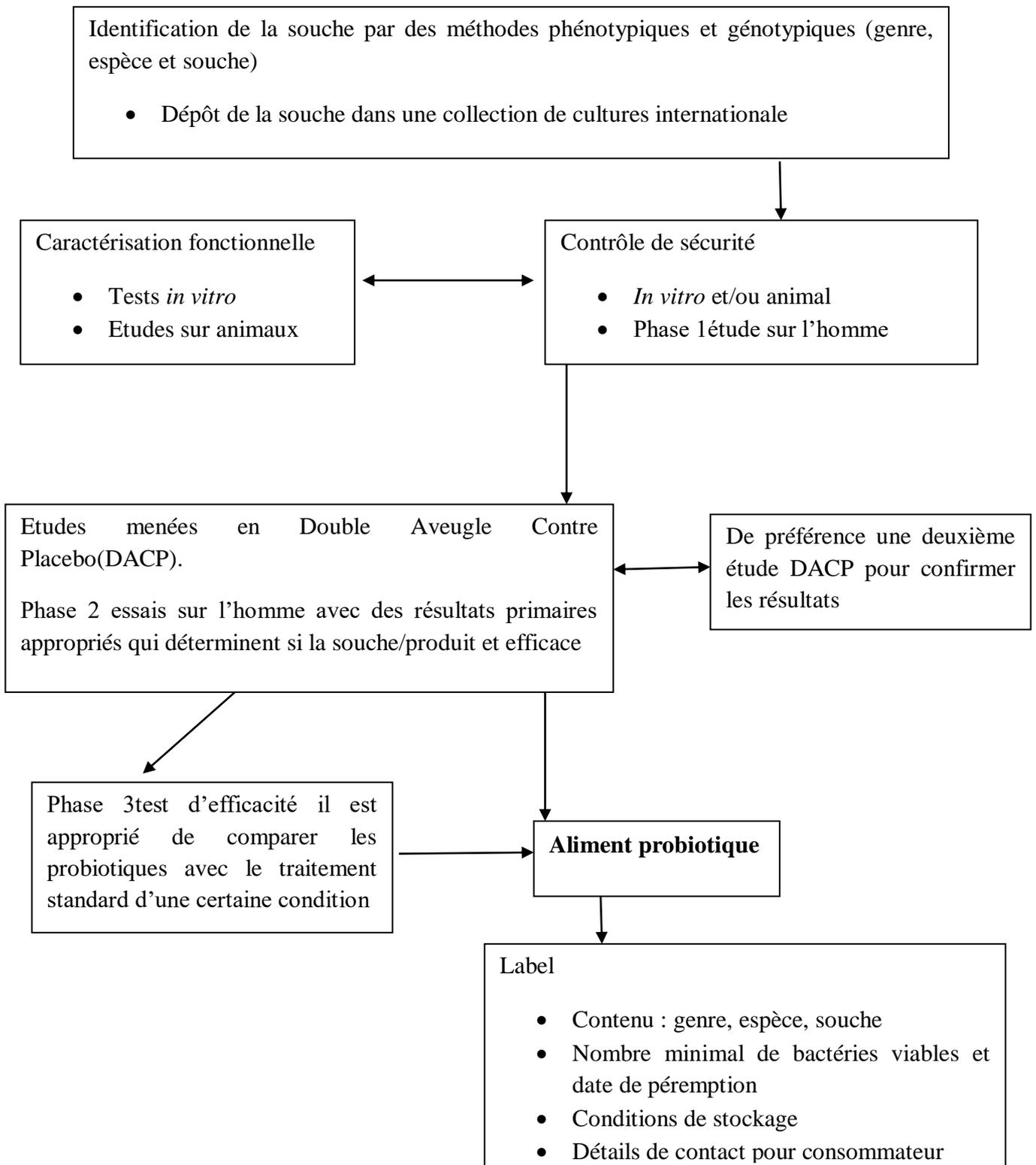
## Chapitre I :LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES

exposées dans le rapport rendu pas ce comité. Il ainsi recommandé de suivre celles-ci connue préalable à toute allégation concernant un produit probiotique (Piquebaille,2013).

**Tableau03:**principale souches probiotiques(Piquebaille, 2013)

Bactéries lactiques			Non lactiques
Espèces lactobacillus	Espèces Bifidobactérium	Autres	
<i>L.acidophilus</i>	<i>B.adolescentis</i>	<i>Enterococcusfaecium</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L.brevis</i>			<i>B.subtilis</i>
<i>L.casei</i>	<i>B.animalis</i>	<i>E.faecalisstrptococcuslactis</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>L.crispatus</i>		<i>S.thermophilus</i>	<i>boulardii</i>
<i>L.fermentum</i>	<i>B. bididum</i>	<i>Lactococcuslactis</i>	<i>S.cerevisaie</i>
<i>L.gasseri</i>			
<i>L.helveticus</i>	<i>B.breve</i>		
<i>L.johnsonii</i>			
<i>L.lactis</i>	<i>B.infantis</i>		
<i>L.pracasei</i>			
<i>L.plantarum</i>	<i>B.lactis</i>		
<i>L.reuteri</i>			
<i>L.rhamnosus</i>	<i>B.longum</i>		
<i>L.salivarius</i>			

# Chapitre I :LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES



**Figure 05 :** lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques en vue d'une utilisation alimentaire (Izquierdo Alegre, 2009).

# Chapitre I :LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES

En plus d'assurer l'absence totale de toxicité ou de pathogénicité de la souche, et afin de satisfaire la définition des probiotiques, les microorganismes doivent survivre, persister temporairement dans le tractus digestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets positifs pour l'hôte. Les microorganismes potentiellement probiotiques doivent donc être sélectionnés selon différents critères qui sont décrits dans le (**Tableau4**). Ces critères de sélection, ainsi que le test *in vitro* utilisés se réfèrent souvent à des propriétés bactériennes, telles que l'adhésion aux cellules épithéliales, la résistance aux conditions gastriques et la production de bactériocines, et plus rarement à des effets probiotiques proprement dits. Ces derniers sont en effet plus difficiles à mesurer et il n'existe pas de tests *in vitro* établis capables de les déterminer de manière fiable (**Piquebaille, 2013**).

**Tableau 04** : critères sélection des souches probiotiques(**Izquierdo Alegre, 2009**).

<b>Critères de sécurité</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Historique de non pathogénicité(GRAS)</li><li>• Souche d'origine humaine ou alimentaire</li><li>• Souche caractérisée par des méthodes phénotypiques et génotypiques</li><li>• Souche déposée dans une collection de cultures internationale</li><li>• Aucune possibilité de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques</li><li>• Pas de déconjugation excessive des sels biliaires</li></ul>
<b>Critères fonctionnels</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tolérance a l'acidité gastrique</li><li>• Tolérance a la bile</li><li>• Antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production de substances antimicrobiennes (bactériocines)</li><li>• Adhésion à divers lignées de cellules intestinales et au mucus</li><li>• Stimulation su système immunitaire</li></ul>
<b>Critères technologiques</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Stabilité au cours de procèdes de production et dans le produit fini</li><li>• Conservation des propriétés probiotiques</li></ul>

# **Chapitre I :LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES**

---

## **I.13.Effets des probiotiques sur la santé**

Plusieurs avantages pour la santé sont attribués à l'ingestion des probiotiques dont certaines ont été prouvés scientifiquement et d'autres nécessitent encore des études plus approfondies chez l'homme.

Les principaux avantages associés à la consommation des probiotiques sont les suivants **(Granato et al., 2010 ;Yadav et Shukla,2017) :**

- Les activités antimicrobiennes et antimutagènes
- Les propriétés anti cancérigènes et anti hypertensives
- Améliorer l'état nutritionnel de l'individu et le système immunitaire
- Augmenter de la disponibilité des vitamines, minéraux et des oligo-éléments pour l'organisme
- Diminuer les symptômes de l'intolérance au lactose
- Augmentation de la motilité du gros intestin qui aide à soulager la constipation
- Atténuation des symptômes intestinaux et du syndrome de crohn
- La réduction des symptômes d'allergies alimentaires et du taux de cholestérol LDL

# *Chapitre II*

## *L'INFLAMMATION*

# Chapitre II : L'INFLAMMATION

---

## CHAPITRE II : L'INFLAMMATION

### II.1. Généralités sur l'inflammation

L'inflammation est un moyen physiologique de défense de l'organisme vis-à-vis des différentes agressions qui peuvent être exogènes telles que les agressions chimiques (acide, base, etc.), physique (froid et chaud, irradiations par les rayons, etc.) et biologiques (toxines, bactériennes, virus, etc.) ou même les agressions endogènes. Elle se termine par l'élimination de l'agent pathogène causant cette agression (**Ndiaye et al., 2006**).

La réaction inflammatoire se fait par l'intervention des cellules immunitaires (phagocytes, lymphocytes, polynucléaires neutrophiles, basophiles, etc.) et des molécules telles que les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Elle est caractérisée par quatre principaux signes macroscopiques qui s'observent au niveau des tissus affectés : une chaleur, une rougeur, un gonflement et une douleur (**Yougbare-ziebrou, 2015**).

### II.2. Les Types de l'inflammation

#### II.2.1. Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est la réponse immédiate de l'organisme à un agent agresseur. Sa durée varie de quelques jours à quelques semaines selon le degré de blessure (**Raghavendra et al., 2015**). Ses principales caractéristiques sont l'exsudation des liquides et protéines plasmatiques (œdème) et la migration des leucocytes (principalement des neutrophiles) des vaisseaux sanguins vers le site inflammatoire (tissu blessé) (**Raghavendra et al., 2015**). L'immunité innée va jouer un rôle dans l'élimination directe du pathogène, mais elle permet également le déclenchement de la réponse adaptative qui va aider à l'éradication du danger (**Noack et kolopp-sarda, 2018**). Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante.

➤ La réponse inflammatoire aiguë se déroule en trois phases :

#### ❖ La phase vasculaire

Elle se caractérise par des modifications importantes de la microcirculation locale (**Genetet, 1997**), par dilation et augmentation de l'espace intercellulaire (**Raymondjean, 2007**), elle se traduit cliniquement par l'apparition des quatre signes cardinaux classiques de l'inflammation aiguë : rougeur, chaleur, œdème, douleur, (**Rousselet et al, 2005**) sous l'effet des radicaux

## Chapitre II : L'INFLAMMATION

---

libres de l'oxygène, l'oxyde d'azote (NO) et de nombreux métabolites de l'acide arachidonique (Raymondjean, 2007). Elle comporte trois phénomènes :

Une congestion active; déclenchée par un mécanisme nerveux et l'action de médiateurs chimique ; un œdème inflammatoire (l'exsudant) ; résultat d'une augmentation de la pression Hydro statique et de la perméabilité de la paroi des petites vaisseaux sous l'effet de médiateurs chimiques, et une diapédèse leucocytaire ; par migration des leucocytes en dehors de la microcirculation et leur accumulation dans le foyer lésionnel (Rousselet et al., 2005).

### ❖ La phase cellulaire

La provenance des cellules du foyer inflammatoire est issue de deux origines : le sang tel que les neutrophiles ou bien le tissu lui-même comme les cellules phagocytaires (Duyckaerts et al., 2002).

#### ➤ A. les cellules du sang

Le chimiotactisme est le phénomène responsable de la migration des polynucléaires, les monocytes et les lymphocytes vers le foyer lésionnel. Les polynucléaires neutrophiles sont présentes des premières heures et disparaissent après 48 heures, le temps que les monocytes macrophages deviennent abondants. Au moment du stade subaigu et chronique les infiltrats lymphocytaires sont observés (Duyckaertsetal., 2002 ; Rousselet et al., 2005).

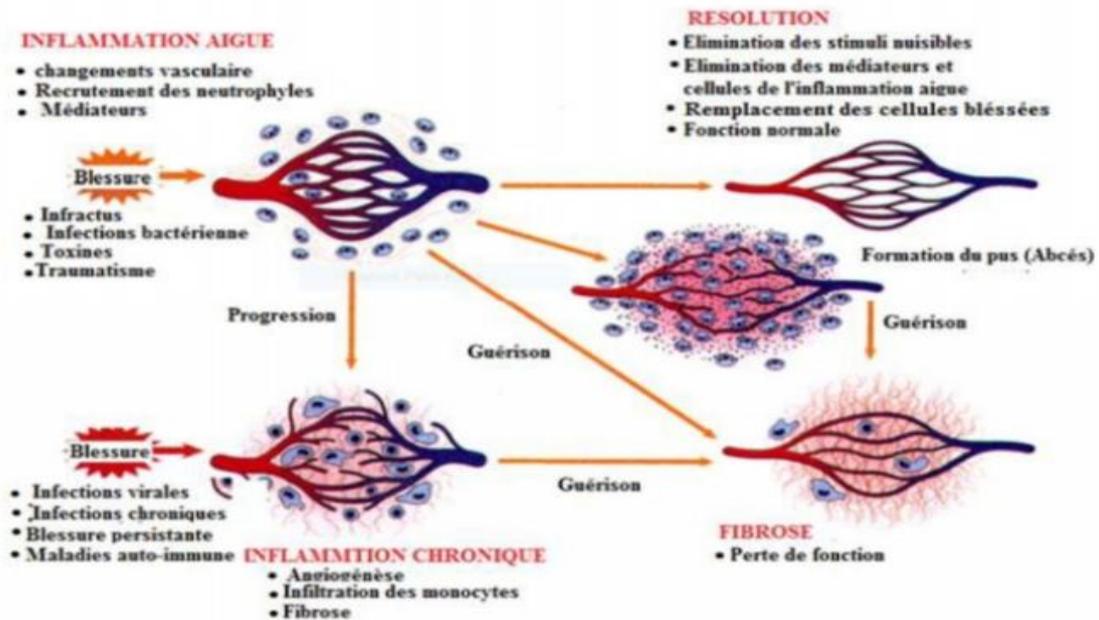
#### ➤ B. les cellules provenant du tissu

Les histiocytes sont des macrophages résidant dans les tissus eux-mêmes (cellules de Küpffer du foie, macrophages alvéolaires du poumon, microglie du cerveau). Les mastocytes, contenant des granulations riches en histamine et sérotonine résident aussi dans les tissus (Duyckaerts et al., 2002).

### ❖ La phase de résolution et réparation

Une fois l'agression maîtrisée, la réaction inflammatoire est arrêtée. Les macrophages vont nettoyer les débris cellulaires mais également sécréter des cytokines permettant la réparation du tissu par les fibroblastes (collagènes) et par les cellules endothéliales (néoangiogenèse).

## Chapitre II : L'INFLAMMATION



**Figure 06** : Evolution de l'inflammation aiguë (Kada, 2018).

Des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 vont progressivement remplacer les médiateurs inflammatoires et inhiber leur sécrétion et leur action. L'inflammation est alors en phase de résolution (Noack et kolopp-Sarda, 2018). Une fois que les cellules immunitaires ne sont plus requises sur le site inflammatoire, elles vont quitter le tissu ou bien mourir, par perte de signaux de survie ou par apoptose. Les mécanismes de l'inflammation aiguë sont identiques quel que soit l'agent déclenchant (Noack et kolopp-Sarda, 2018).

### II.2.2. Inflammation chronique

L'inflammation chronique correspond à un échec de l'inflammation aiguë et induit de nombreuses pathologies (Noack et kolopp-Sarda, 2018). Elle est caractérisée par une évolution prolongée pouvant s'étaler sur des mois voire des années, l'inflammation chronique est définie par une durée supérieure à six semaines (Heymonet, 2013).

- Une inflammation chronique peut survenir suite :
  - ✓ A un échec dans l'élimination d'agent provoquant une inflammation aiguë : tel que les organismes infectieux qui défense de l'hôte et dans le tissu pendant une période prolongée (Pahwa et al., 2020).
  - ✓ A une exposition à un faible niveau d'un matériau irritant ou étranger particulier : qui ne peut pas être éliminé par dégradation enzymatique ou phagocytose dans le corps tel que la poussière de silice (Pahwa et al., 2020).

## Chapitre II : L'INFLAMMATION

---

- ✓ A une maladie auto-immune : dans laquelle le système immunitaire reconnaît le composant normal du corps comme un antigène étranger et attaque le tissu sain donnant lieu à des maladies telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR) (**Pahwa et al., 2020**).

A la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aiguë, les phases vasculaire et cellulaires ne se succèdent pas mais coexistent tout au long de l'évolution de cette inflammation (**Kada, 2018**). L'infiltrat cellulaire sur le site inflammatoire perdure et contribue ainsi à l'hyperplasie et à la destruction du tissu. Le microenvironnement joue un rôle primordial dans ce processus. En effet, la production de cytokines et chimiokines va favoriser la survie et le maintien des cellules sur le site inflammatoire (**Noack et Kolopp-Sarda, 2018**).

### II.3. Mécanisme de la réponse inflammatoire

La réponse inflammation est l'action coordonnée de voies de signalisation qui régulent les niveaux de médiateurs inflammatoire dans les cellules tissulaires résidentes et les cellules inflammatoires recrutées dans le sang (**Lawrence, 2009**). L'inflammation est une pathogenèse commune à de nombreuses maladies chroniques, notamment les maladies cardiovasculaires et intestinales, le diabète, l'arthrite et le cancer (**Libby, 2007**).

Bien que les processus de réponse inflammatoire dépendent de la nature précise du stimulus initial et de sa localisation dans l'organisme, ils partagent tous un mécanisme commun, qui peut être résumé comme suit (**Chen et al., 2017**).

- 1) Les récepteurs de surface des cellules reconnaissent les stimuli nuisibles.
- 2) Les voies inflammatoires sont activées.
- 3) Les marqueurs inflammatoires sont libérés.
- 4) Les cellules inflammatoires sont recrutées.

### II.4. Les anti-inflammatoires

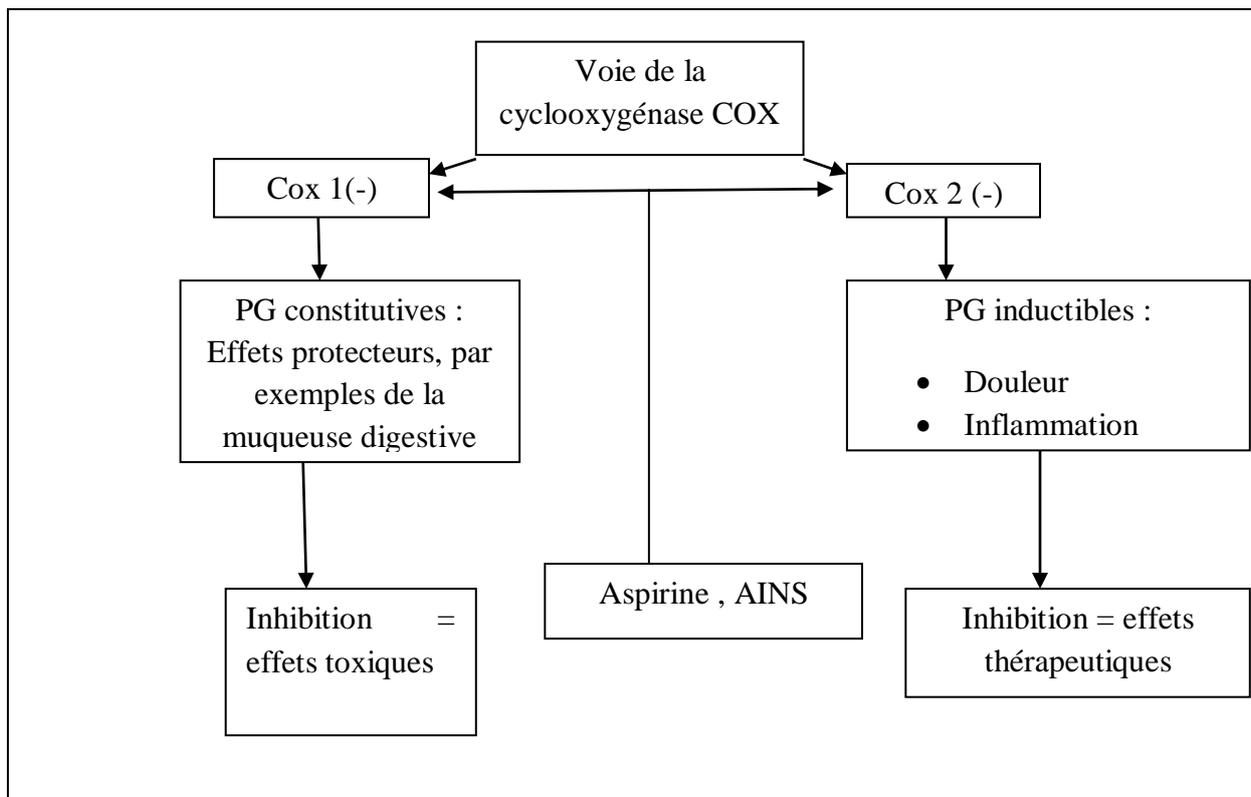
La thérapie anti-inflammatoire est destinée à contrôler l'excès des réactions aspécifiques des tissus et d'éviter la transformation de la phase aiguë de l'inflammation en phase chronique. Les anti-inflammatoires sont utilisés dans tous les domaines de la pathologie, ils appartiennent à des classes différentes les unes des autres et se sont souvent doués en outre d'une activité antipyrétique et antalgique (**Muster, 2005**).

## Chapitre II : L'INFLAMMATION

Les anti-inflammation bloquent les sécrétion ou l'action de certains médiateurs chimiques de l'inflammation comme les prostaglandines et donc diminuent la sensation de la douleur (Orliaguet et al., 2013). Ces molécules sont classées en anti-inflammatoires synthétiques (les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS), les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et anti-inflammatoires d'origine naturelle.

### II.4.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les principales actions thérapeutique des AINS sont particulièrement mises en œuvre par leur capacité à bloquer la synthèse de certains prostaglandines par l'inhibition des enzymes cyclooxygénases (Cox-1 et Cox-2). L'inhibition de la Cox-1 joue un rôle majeur dans les effets secondaires indésirables, tels que la toxicité gastro-intestinale (dyspepsie, ulcères gastroduodénaux... etc.), la toxicité rénale et des effets indésirables cardiovasculaires perforation, hypertension, insuffisance cardiaque congestive (Little, 2008) (Figure07). C'est une catégorie de médicaments renfermant de nombreuses molécules, telles que le diclofénac, ibuprofène, aspirine et l'indométacine (Erdogan et al., 2019).



**Figure 07 :** effets des AINS sur les isoformes de cyclooxygénases (Erdogan et al., 2019).

## Chapitre II : L'INFLAMMATION

---

### II.4.2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou les glucocorticoïdes sont des dérivés synthétiques de la cortisone, naturellement sécrétée par les glandes surrénales. Ils sont de puissants anti-inflammatoires doués également de propriétés immuno-modulatrices et antiallergiques (**Heymonet, 2013**). Ils ont tous une activité hormonale sur les régulations métaboliques (glucidiques, protidique, lipidique notamment) et ils entraînent la mise au repos des surrénales par un mécanisme de freination hypothalamo-hypophysaire (**Muster, 2005**).

Contrairement aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les glucocorticoïdes sont capables d'inhiber toutes les phases de la réaction inflammatoire. Par leur action directe sur les vaisseaux, ils diminuent les phénomènes vasculaires de l'inflammation. Par leur effet antiprolifératif sur les histiocytes-macrophage de tous les types, les lymphocytes, les plasmocytes, les fibroblastes et les polynucléaires neutrophiles, ils inhibent les phénomènes cellulaires précoces et tardifs de l'inflammation (**Muster, 2005**).

### II.4.3. Les anti-inflammatoire d'origine naturelle

Les composés phytochimiques issus du règne végétal sont très nombreux (**Kouadio, 2021**). Certains parmi eux possèdent une activité anti-inflammatoire et ont pour cibles particulières les cyclooxygénases, les lipoxygénases, le NO, la phospholipase A2... etc(**Yatoo, 2018**). Ces molécules présentent un intérêt grandissant, avec moins d'effets secondaires (**Dhingra et al., 2018**). Les stéroïdes, les glycosides, les composés phénoliques, les flavonoïdes, les alcaloïdes, et les polysaccharides sont des phyto-constituants courants présents dans les plantes médicinales (**Sangiovanni et Dell Agil, 2020**). Différents mécanismes ont été explorés pour l'action anti-inflammatoire de ces principes actifs. Ils peuvent agir en synergie avec les enzymes, les facteurs, les protéines de la voie anti-inflammatoire ou interférer avec ceux-ci dans la voie inflammatoire comme les lipoxygénases, les cyclooxygénases, les facteurs de nécrose tumorale, les interleukines, la prostaglandine, et l'oxyde nitrique (**Yatoo, 2018**).

## Chapitre II : L'INFLAMMATION

**Tableau 05** : cellules de la réaction inflammatoire, leurs caractéristiques, rôles et médiateurs libérés (Duyckaerts et *al.*, 2002 ; Espinosa et Chillet, 2006 ; Hellal, 2007 ; Abbaletal.,2009).

Cellule	Caractéristique	Rôle principale	Médiateurs chimiques sécrétés
<b>Monocyte</b>	Les monocytes sont de grosses cellules ( 15 à 30 <i>um</i> ), leur membrane plasmique contient de nombreux lysosomes. Représentent 3 à 10 % des globules blancs.	Elle a une fonction majoritairement phagocytaire et plus accessoirement de cellule présentatrice de l'antigène.  Elle joue un rôle dans la destruction tissulaire et l'entretien du processus inflammatoire.	Cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12).  Facteurs chimiotactiques (IL-8), PGE2, LTB4.  -IL-10.
<b>Granulocyte</b>	Les cellules de la lignée granulaire possèdent de nombreuses granulations, elles comportent un noyau polylobé ou segmenté. Les propriétés des granules intracellulaires permettent de distinguer trois types cellulaires : les granulocytes neutrophiles, basophile, éosinophile.	Leur rôle principal c'est la phagocytose, et peuvent intervenir dans la réponse inflammatoire allergique.	Histamine Héparine Sérotonine Leucotriènes (LT) Prostaglandine (PG).
	sont issus de la	Les macrophages	Cytokines : IL1, IL6,

## Chapitre II : L'INFLAMMATION

<p><b>Macrophage</b></p>	<p>différenciation des monocytes concomitante à leur passage dans les tissus.</p> <p>Ce sont des grosses cellules (20 à 30um).</p> <p>Contient des pseudopodes.</p>	<p>assurent la phagocytose, la sécrétion des cytokines, la présentation de l'antigène.</p>	<p>TNF-<math>\alpha</math>.</p> <p>Chimiokines : IL-8.</p>
<p><b>Mastocyte</b></p>	<p>Les mastocytes sont des cellules tissulaires de (10 à 20um) mononuclée, le cytoplasme contient de tailles variables.</p>	<p>Cellule impliqué dans la réaction inflammatoire, les défenses antimicrobiennes et les manifestations allergiques.</p>	<p>TNF-<math>\alpha</math>, l'histamine, la sérotonine, PAF (plateletactivating factor), prostaglandines, leucotriènes.</p>
<p><b>Lymphocyte</b></p>	<p>Les cellules de l'immunité spécifique, humorale et cellulaire, sont : de type B et T ou NK ( pour Naturel killer).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Type T/CD3+ :immunité cellulaire secrètent des cytokines</li> <li>- La maturation de la lignée type B/CD20+ : immunité humorale secrètent les anticorps</li> <li>- Cellules NK</li> <li>- Cytotoxique directe</li> <li>- Elimination des cellules cibles</li> <li>- Modulent la réponse immunitaire</li> </ul>	<p>Cytokines pro-inflammatoire (IL2, IFN-<math>\gamma</math> , TNF-<math>\alpha</math>).</p> <p>Anti-inflammatoire (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10).</p>

## Chapitre II : L'INFLAMMATION

---

<b>Cellule endothéliale</b>	Vaisseaux de petit et moyen calibre	<p>Joue un rôle actif important au cours de l'inflammation.</p> <p>L'état de jonction des cellules entre elles</p> <p>Tonus vasculaire et la vasomotricité</p> <p>Elle participe aux phénomènes de réparation post-inflammatoire par la production de protéines matricielles et de différentes protéases</p>	
-----------------------------	-------------------------------------	--	--

*Chapitre III*

*MATERIELS*

*ET*

*METHODES*

# Chapitre III : MATERIELS ET METHODES

## CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

### III.1.Objectif du travail

Le but de ce travail est d'explorer le potentiel anti-inflammatoire de certaines souches lactiques isolées à partir du poisson.

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire pédagogique microbiologie N=03 de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université Abdelhamid ibn Badis de Mostaganem durant la période entre les mois de mars et juin.

### III.2. Matériel utilisé

- **Appareillage** : balance (**KERN&SohnGmbH , D-72336**), étuve à 37°C(**memmert**), spectrophotomètre(**JENWAY, 6715UV/Vis**) , autoclave(**PED 97/23 EEC**), réfrigérateur, bain-marie(**TERMOSTATIC BATC**), pH-mètre(**OSI**) .
- **Milieux de culture**
  - **Milieu MRS (pH=6,5)** : Gélose de Man, Rogosa, sharpe(1960) gélosé ou bouillon pour réactivation et culture des bactéries lactiques, et incubé à 37°C
  - **Milieu MRS gélosé ou bouillon acidifiés** : à (pH=6,5) sont utilisé pour la pour la culture des *Lactobacilles*.
  - **Milieu M17 (pH=6.5)** : Gélose ou bouillon pour réactivation et culture des streptocoques.
  - **Milieu M17** : Gélose ou bouillon acidifiés (pH=4,5) sont utilisés pour réactivation et culture de streptocoques.
- **Souches de bactéries lactiques testées**

Les souches utilisées au cours de cette étude sont des bactéries lactiques isolées à partir des poissons (sardines et crevettes). Les souches sont indiquées dans le tableau(06)

**Tableau 06** : Souches bactériennes étudiées.

Souche	Milieu de culture
S1	MRS
S2	MRS
S3	MRS
S4	MRS
S5	MRS

## Chapitre III : MATERIELS ET METHODES

---

### III.3. Réactivation des souches

Les souches utilisées étaient conservées dans des eppendorfs contenant du glycérol à une température de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Elles sont réactivées et maintenues vivantes par un repiquage d'un inoculum de 1% dans les milieux MRS bouillon, incubées à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24h et sont ensuite conservées à  $4^{\circ}\text{C}$ .

### III.4. Ensemencement et purification des isolats

Un volume de 0.1 ml de chacune des souches bactériennes réactivées précédemment, a été déposé sur milieu adéquat soit Man de Rogosa Sharpe (MRS) a pH correspondant ( $\text{pH} = 5,4$  et  $\text{pH} = 6,2$ ) (voir l'annexe). Ensuite, les dépôts ont été étalés uniformément avec une pipette pasteur boutonnées stérile par un mouvement de balayage et rotation sur l'ensemble de surface de la gélose. Enfin, les boîtes ont été incubées à  $37^{\circ}\text{C}$ , pendant 24 à 48h en condition anaérobie dans une boîte.

### III.5. Identification des souches bactériennes

#### III.5.1. Critère morphologique

##### ❖ Observation macroscopique

L'étude de l'aspect macroscopique consiste en une observation à l'œil nu de la taille (petite, moyenne, grande) la forme de la colonie (ronde, irrégulière...), transparence, élévation de la colonie, type de colonie et le relief (Guiraud, 1998).

##### ❖ Observation microscopique

#### a. Coloration différentielle de Gram

C'est la coloration de base en bactériologie qui permet de distinguer les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, cette distinction est fondamentale pour leur identification. En effet, le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries Gram négatif, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool (ou le mélange alcool+ acétone) qui décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet.

## Chapitre III : MATERIELS ET METHODES

---

### ❖ Réactifs

- ❖ Violet de gentiane phénique
- ❖ Lugol (iodo-iodure de potassium)
- ❖ Alcool à 95% (ou mélange alcool absolu+ 1/5ème d'acétone)
- ❖ Safranine (ou Fuchsine phéniquée de ziehl)

### ❖ Mode opératoire

1. Réaliser un frottis et fixer à la flamme.
2. Réalisation des frottis : les frottis doivent être étalés en couche mince et régulière, puis séchés et fixés.

#### a. Etalement sur lame de verre

1. Notez la référence de l'échantillon sur une lame parfaitement propres et dégraissées.
2. Prélevez stérilement à l'aide d'une anse de platine une goutte de culture bactérienne et étalez un film mince.

#### b. Séchage

Le séchage est effectué à l'air libre jusqu'à ce que le frottis présente un aspect mat.

#### c. Fixation du frottis sec

Cette étape consiste à tuer les bactéries et les coller sur la lame, sans en altérer la structure. La fixation s'effectue par la chaleur :

- 1- La lame, tenue par une pince (frottis situé sur le dessus) est passé 3 ou 4 fois dans la flamme de bec Bunsen. Laisser refroidir avant d'entreprendre une coloration.
- 2- Verser le violet de Gentiane sur la lame ; laisser en contact 1 min
- 3- Jeter le colorant et finir de la chasser par la solution de lugol ; laisser agir le lugol environ 1 min.
- 4- Jeter le lugol et faire couler de l'alcool sur la préparation ; rincer immédiatement à l'eau.
- 5- Recouvrir la préparation de safrnine, laisser agir environ 1min. lavé abondamment.
- 6- Sécher au-dessus de la flamme d'un bec bunsen. A l'issue de cette coloration, on peut distinguer :

## Chapitre III : MATÉRIELS ET MÉTHODES

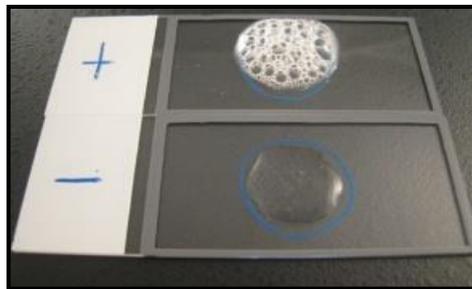
---

- Des bactéries colorés en violet foncé ; elles ont gardé le violet, le Gram elles sont dites « Gram positif ».
- Des bactéries colorées en rose ou rouge pâle ; elles ont perdu le violet, le Gram elles sont dites « Gram négatif ».

### III.5.2. Critères biochimiques et physiologiques

#### - Test de catalase

C'est une enzyme décomposant l'eau oxygénée en eau et en oxygène gazeux. La méthode consiste à prélever une colonie du germe à étudier sur l'extrémité d'une pipette Pasteur fermée que l'on plonge ensuite dans un millilitre d'eau oxygénée. Le dégagement de bulles gazeuses signe la présence de l'enzyme (**Figure 08**)



**Figure (08) :** Test de la catalase.

#### \* Préparation de l'inoculum

72 heures avant de commencer chaque expérience, les cultures sont revivifiées par une série de trois inoculations de 200 microlitres dans 10 ml de MRS bouillon et incubées à 37°C pendant 24h dans une jarre d'anaérobiose avec système générateur de CO<sub>2</sub> (Anaérocult).

#### \* Ajustement de l'inoculum

L'ajustement de l'inoculum s'effectue à l'aide d'une cellule de Thoma. La formule de dénombrement est la suivante :

$$X = 4 \cdot 10^6 \cdot n$$

Où: X: nombre de cellules dans 1 ml.

n : nombre de cellules dénombrées dans un carré.

## Chapitre III : MATERIELS ET METHODES

---

### \* Préparation des dilutions décimales

La dilution est un processus qui consiste à réduire la concentration d'une substance dans la dilution  $10^{-3}$  (Begloul, 2011). Une série de dilutions dans le PBS stérile a été réalisée jusqu'à  $10^{-3}$  selon la technique des dilutions décimales.

### III.6.Exploration de l'activité anti-inflammatoire in vitro

#### III.6.1. Méthode de stabilisation des membranes HRBC

##### III.6.1.1. Préparation des globules rouges

Le sang (10 ml) doit être prélevé d'une personne saine qui n'a pris aucun médicament anti-inflammatoire. Le sang prélevé sera mélangé avec un volume égal de solution d'Alsever stérilisée (2% de dextrose, 0,8% de citrate de sodium, 0,05% d'acide citrique et 0,42% de chlorure de sodium dans l'eau).

Le mélange doit être centrifugé à 3000 tr / min pendant 10 min et les cellules emballées doivent être utilisées directement.



**Figure (09):** HRBC après la centrifugation

## Chapitre III : MATERIELS ET METHODES

---

### III.6.1.2. Hémolysé induite par la chaleur

Le principe en jeu ici est la stabilisation de la lyse membranaire HRBC induite par l'hypotonicité.

Le mélange d'essai contient les souches à tester (0,5 ml ; 3, 1,5, 0,75 et 0,37 mg / ml), le médicament standard de Diclofénaç-sodium (0,5 ml ; 3, 1,5, 0,75 et 0,37 mg / ml), 1 ml de tampon phosphate (0,15 M, pH 7,4), 2 ml d'hyposaline (0,36%), 0,5 ml de HRBC, puis incubation du mélange à 37 ° C pendant 30 min et centrifugation pendant 20 min à 3000 tr/min. La teneur en hémoglobine dans la suspension est estimée à l'aide d'un spectrophotomètre à 560 nm (**Yoganandam et al, 2010**).

L'expérience doit être réalisée en trois exemplaires pour tous les échantillons d'essai. Le pourcentage d'hémolyse produit en présence d'eau distillée a été pris comme 100%.

### III.6.2. Test de l'inhibition des protéines

Le mélange réactionnel (5 ml) se compose de 0,2 ml d'œuf (provenant d'un œuf de poule frais), 2,8 ml de solution saline tampon phosphate (PBS, pH -6,4) et 2 ml de concentrations variables de suspension bactérienne. Un volume similaire d'eau bidistillée sert de contrôle. Ensuite, les mélanges doit être incubés à  $37 \pm 2$  ° C dans un incubateur DBO (BIOTECH) pendant 15 minutes puis chauffés à 70 ° C pendant 5 minutes. Après refroidissement, leur absorbance est mesurée à 660 nm (LAB INDIA, UV 3000) en utilisant un véhicule comme blanc. Le Diclofénaç sodique à la concentration finale de (50, 100, 300, 600, 1200, 2500, µg / ml) est utilisé comme médicament de référence et traité de façon similaire pour la détermination de l'absorbance. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines doit être calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = 100 \times [V_t/V_c - 1]\%$$

Où :

$V_t$  = absorbance de l'échantillon d'essai.

$V_c$  = absorbance du témoin.

# *Chapitre IV*

*RESULTATS*

*ET*

*DISCUSSION*

# Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSION

---

## CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

### IV.1. Identification des souches lactiques

#### IV.1.1. Pré-identification des souches

L'identification des souches purifiées sur milieu MRS liquide et MRS solide à PH = 6.5, et basée sur des observations macroscopique, microscopiques, et sur des tests physico-chimiques.

#### IV.1.2. Caractères macroscopiques

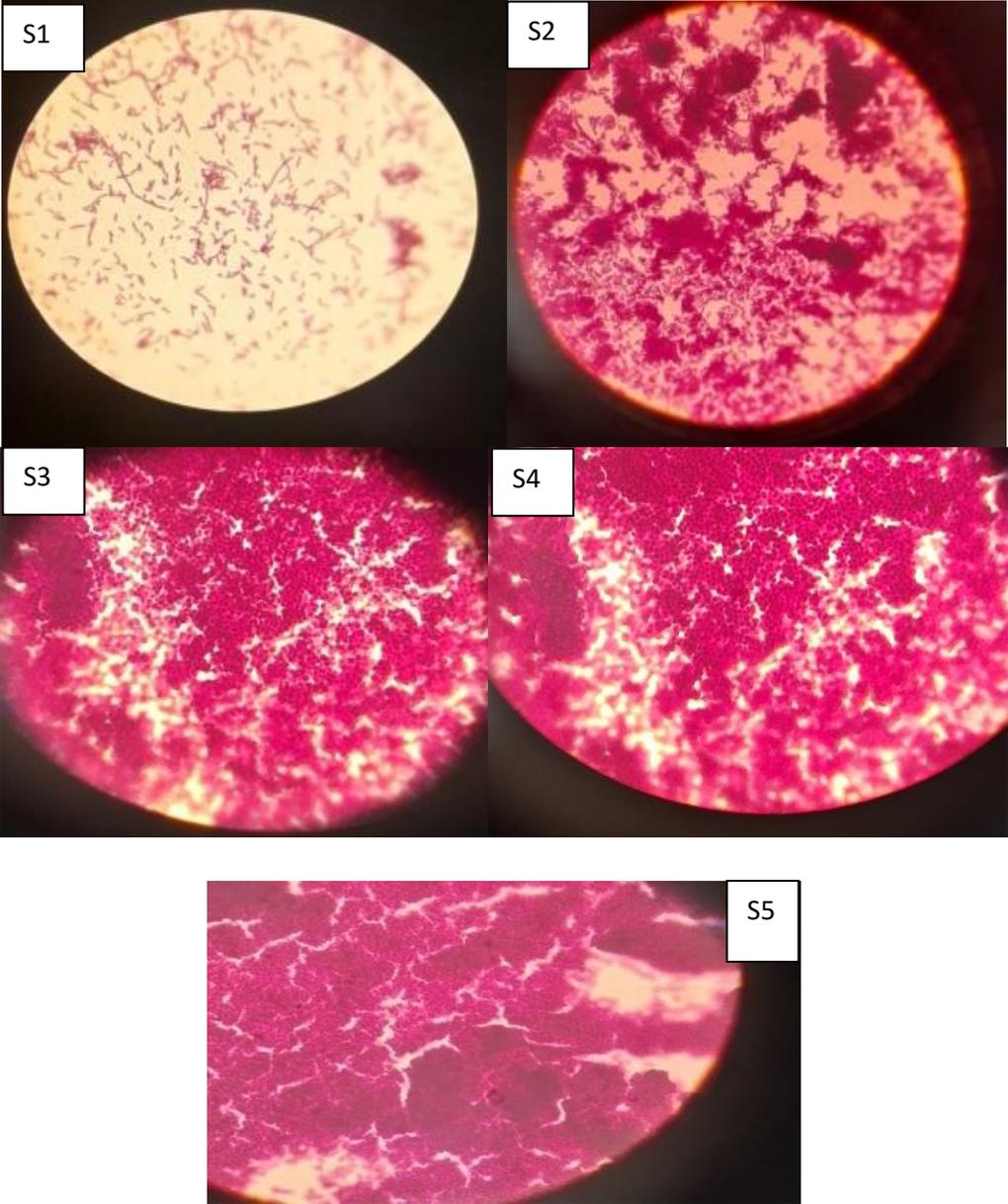
Après réactivation des souches et ensemencement sur les boites de pétri, elles ont été incubées pendant 48H. Les colonies bactériennes sont ensuite observées à l'œil nu pour caractériser leur forme, leur taille, leur aspect ainsi que leur couleur. La **figure10** montre que les colonies sont homogènes de couleur blanchâtre et de taille moyenne.



**Figure 10:** caractères macroscopiques des souches dans les milieu MRS de la boîte petri après **48H**d'incubation.

#### IV.1.3. Caractères microscopiques

L'aspect microscopique a révélé que les souches bactériennes sont Gram (+) apparaissant sous ; différentes formes (coques et bacilles) avec différentes modes d'association, associées en paires ou en chaines courts et incurvées (**figure 11**).



**Figure 11** : observation microscopique (objectif  $\times 100$ ) des isolats lactiques après coloration de Gram

## Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSION

### IV.1.4. Test de la catalase

Les résultats du test de la catalase pour les différentes souches sont représentés dans la figure 12.

Les résultats du test de la catalase se sont révélés négatifs (-) pour toutes les souches (pas de dégagements gazeux). Les caractères physicochimiques des souches testées sont illustrés sur le tableau 7.

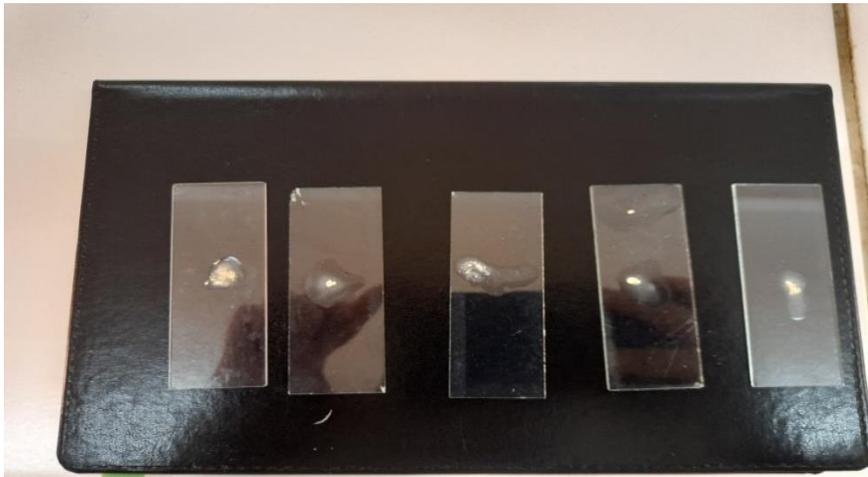


Figure 12 : test de la catalase (-)

Tableau 07: Caractéristique physico- chimique des BL isolées

Les souches	S1	S2	S3	S4	S5
<b>Gram</b>	+	+	+	+	+
<b>Catalase</b>	-	-	-	-	-

## Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSION

### IV.2. Exploration de l'activité anti-inflammatoire in vitro

#### IV.2.1. Méthode de stabilisation des membranes HRBC

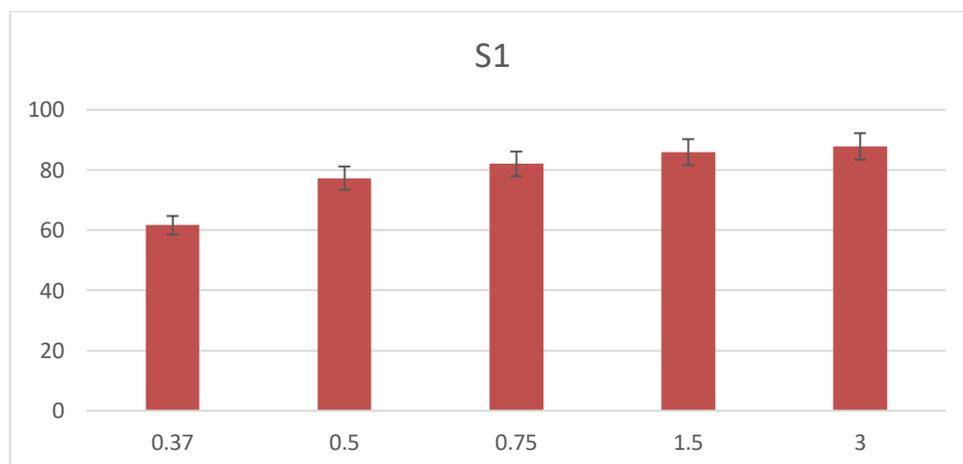
##### IV.2.1.1. Hémolysé induite par la chaleur

Les résultats de stabilisation des membranes **HRBC** par les bactéries lactiques sont représentées dans les **figures (13, 14, 15, 16,17)**. D'après ces résultats on constate que les valeurs enregistrées sont significativement différents ( $p>0.05$ ) entre les souches.

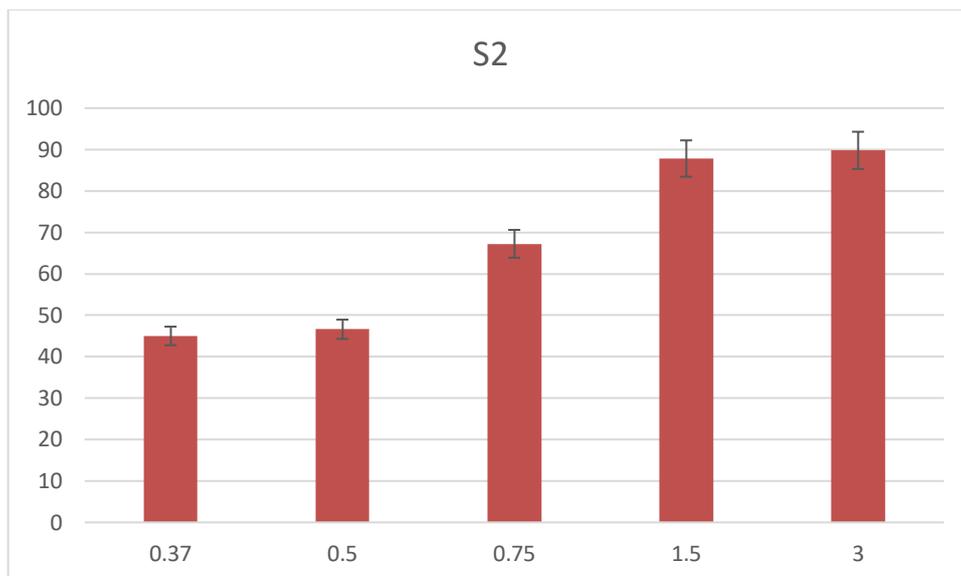
La souche S5 donne le plus grand taux de stabilisation des membranes **HRBC** et ce, avec les différentes concentrations étudiées (de 95,72% à 47,02%). Cependant, la souche S2 donne la plus faible de taux de stabilisation de **HRBC** avec ses différentes concentrations (de 89,81% à 45,01%).

D'une autre part, les taux de stabilisation des membranes **HRBC** observés chez les souches S1, S3 et S4 sont à l'ordre de : S1 (87,83% à 61,62%), S3 (88,82% à 75,4%), S4(84,18% à 75,94%) respectivement.

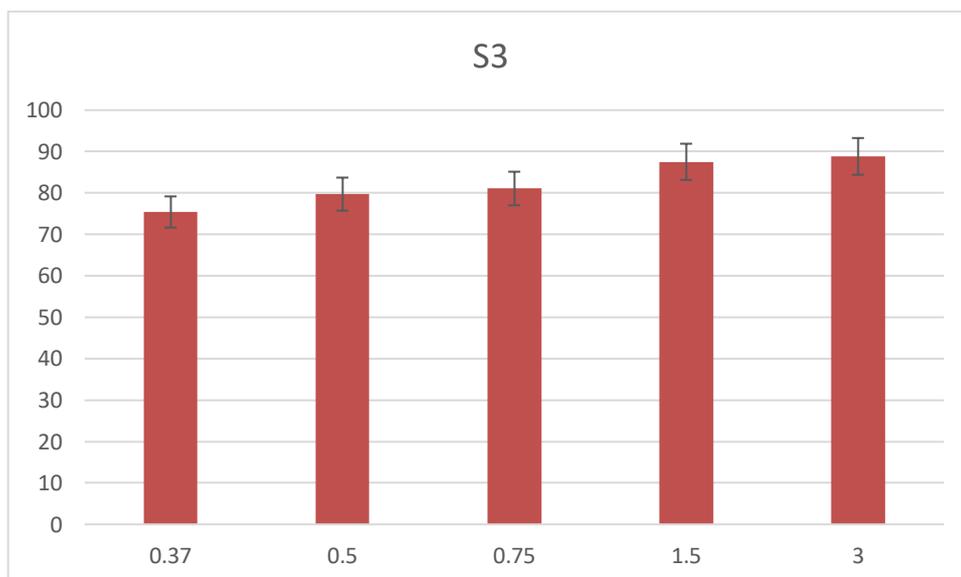
Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Garcia et al.(2020)** qui ont constaté que l'activité d'hémolysé reste le principal facteur de virulence des bactéries pathogènes, et les souches probiotiques doivent être sûres, notamment au sein de l'organisme hôte. Toutes les souches ont présenté l'effet  $\alpha$ -hémolysé après 48 h d'incubation sur des plaques de gélose au sang. Une étude précédente a montré que les bactéries lactiques  $\alpha$ -hémolytiques non entérococciques isolées des produits laitiers ont été considérées comme sûres (**Agryi et al., 2013 ;Touret T et al ., 2018**).



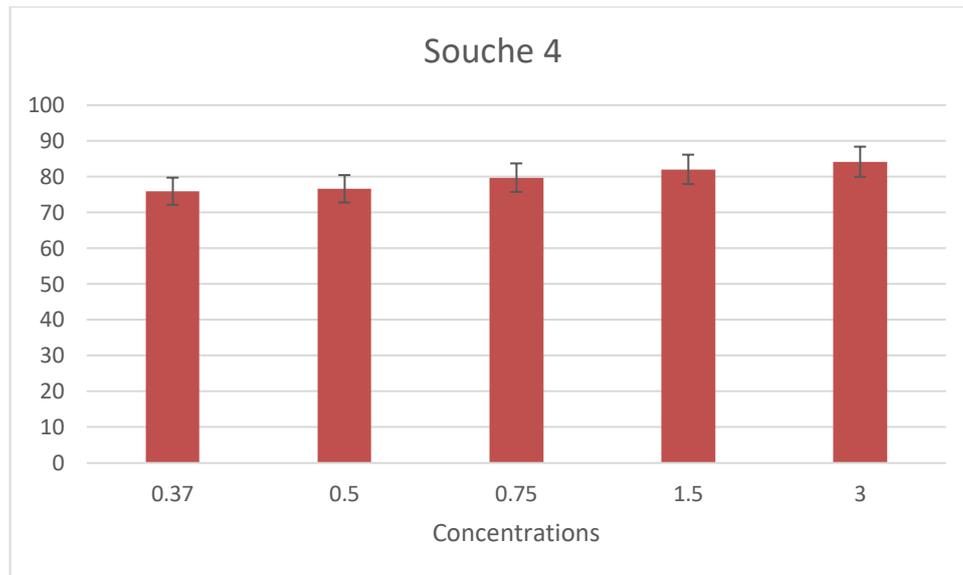
**Figure 13** : taux de stabilisation des membranes de **HRBC** (souche S1)



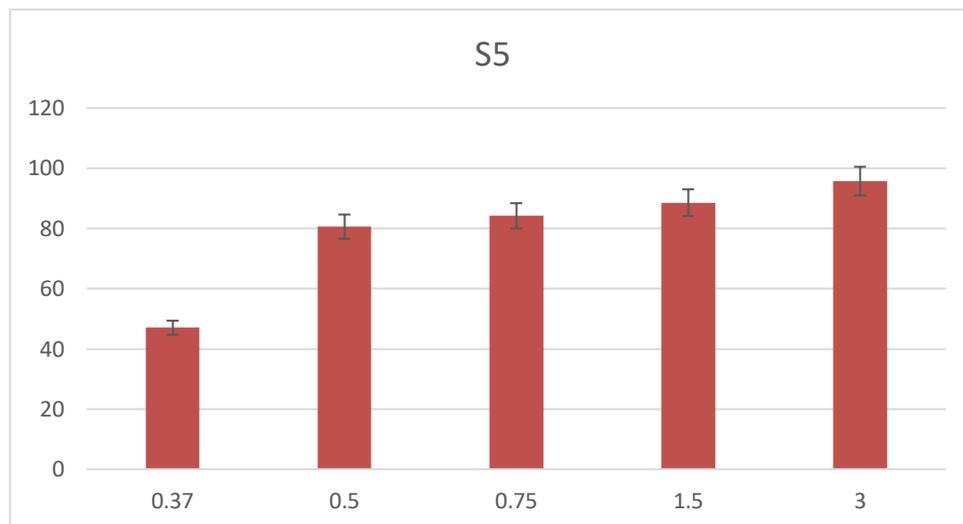
**Figure 14** : taux de stabilisation des membranes de **HRBC (souche S2)**



**Figure 15** : taux de stabilisation des membranes de **HRBC (souche S3)**



**Figure 16** : taux de stabilisation des membranes de **HRBC (souche S4)**



**Figure 17** : taux de stabilisation des membranes de **HRBC (souche S5)**

### IV.2. Test d'inhibition des protéines

Les résultats relatifs au taux d'inhibition des protéines par les bactéries lactiques sont représentés dans la (**Figure18**). D'après ces résultats on constate que les taux d'inhibition enregistrés sont significativement différents ( $p > 0.05$ ) entre les souches.

La souche S4 donne le plus grand taux d'inhibition des protéines (71,94%), alors que la souche S2 donne le plus faible taux d'inhibition des protéines (24,25%). D'une autre part, les taux d'inhibition observés chez les souches S1, S3 et S5 sont à l'ordre de 66,03%, souche 64,63% et 67,25% respectivement.

## Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Nos résultats sont en accord avec les travaux de (Kim et al., 2021). Qui ont mis en évidence l'effet anti-inflammatoire de cinq bactéries lactiques ; (*Enterococcus faecium* MG9003(YH9003), *Enterococcus faecium* MG9007(YH9007), *Lactobacillus reuteri* MG9012(YH9012), *Lactobacillus fermentum* MG9014(YH9014), et *Pediococcus pentosaceus* MG9015(YH9015) avec des taux d'inhibition de 64.3, 60.2, 57.4, et 53.4%, respectivement.

Les résultats relatifs au taux d'inhibition des protéines par le Diclofénac sont représentés dans la (figure19). D'après ces résultats on constate que les taux d'inhibition enregistrés sont significativement différents ( $p > 0.05$ ) entre le Diclofénac et les souches bactériennes testées.

La concentration de diclofénac 2500ug/mL donne le plus grand taux d'inhibition des protéines (46,86%), alors que la concentration de diclofénac 50 ug/mL donne le plus faible taux d'inhibition des protéines (26,89%). D'une autre part, les taux d'inhibition observés chez les concentrations 100, 300 et 600, 1200ug/mL sont à l'ordre de 31,52%, 35,26% et 39,12%, 42,18% respectivement.

On observe que les taux d'inhibition des protéines par les bactéries lactiques sont plus efficaces que les taux d'inhibition des protéines par le diclofénac

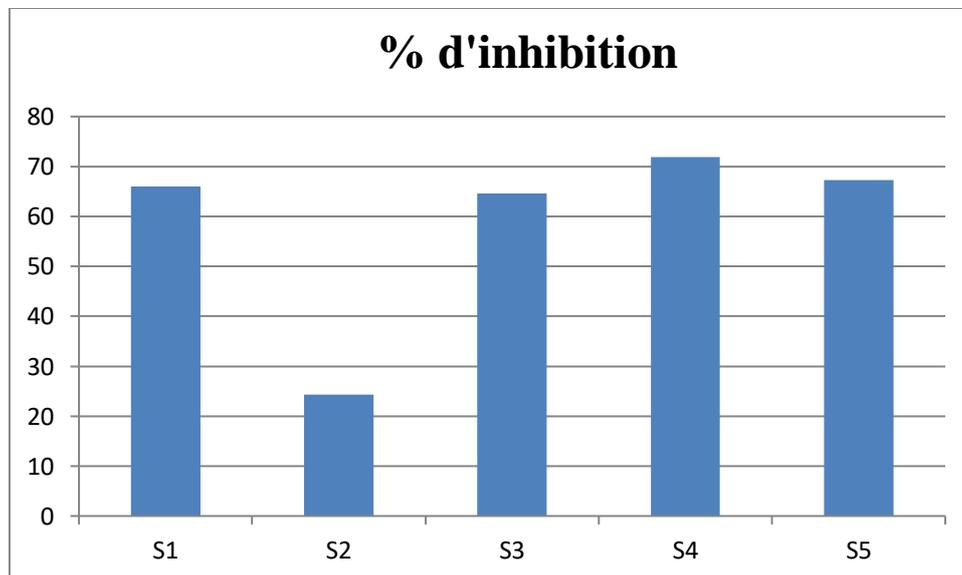
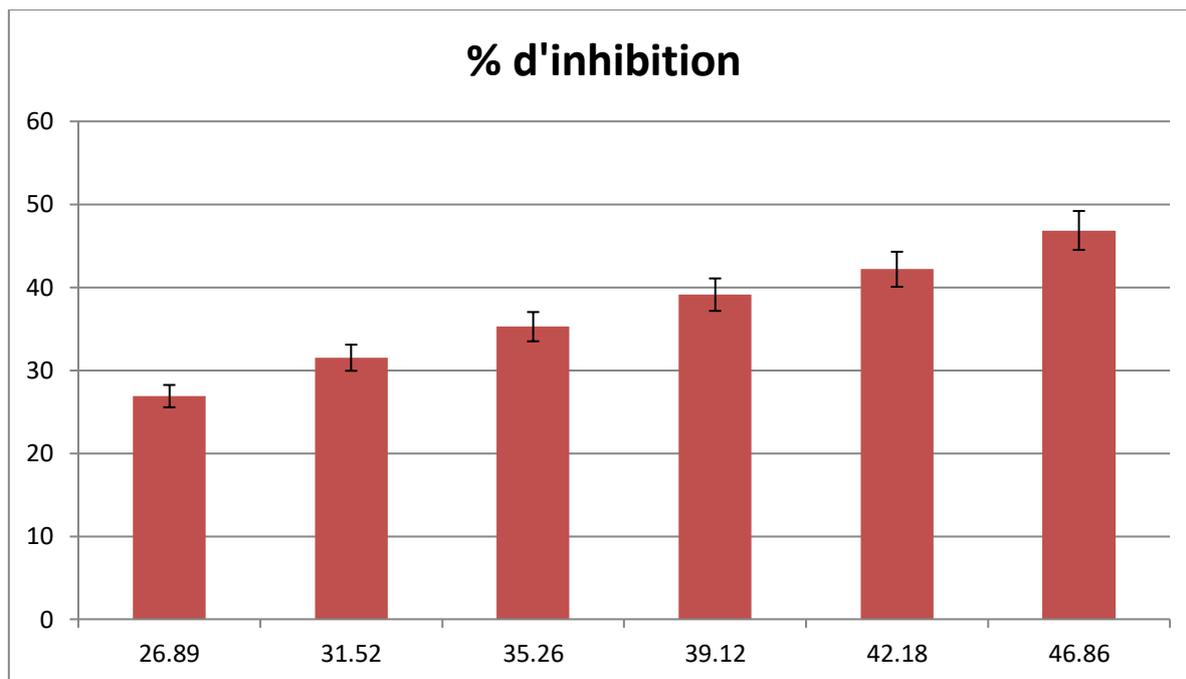


Figure 18:taux d'inhibition des protéines par les bactéries lactiques



**Figure 19 :** taux d'inhibition des protéines par le Diclofénac

# *CONCLUSION*

## CONCLUSION

---

### CONCLUSION

Dans le cadre de la préparation du mémoire de fin d'étude, nous avons travaillé sur l'exploration de l'effet anti-inflammatoire de certaines souches probiotiques isolées à partir du poisson.

Dans un premier temps, nous avons commencé par la pré-identification des souches lactiques et la détermination de l'aspect des colonies sur milieu MRS, la coloration de Gram et test de la catalase.

Dans un deuxième temps, l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro a été explorée par le test de stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC) et test d'inhibition des protéines.

Les résultats obtenus dans cette étude, ont montré que les bactéries lactiques testées ont exercé un effet anti-inflammatoire in vitro.

En perspective, et après l'identification génétique des souches testées, des études in vivo seront nécessaires pour confirmer leur potentiel anti-inflammatoire.

# CONCLUSION

---

*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abbal M, Alric L, Cantagrel A, Delisle B.** (2009). Réaction inflammatoire : Aspect Biologique et chimique. Conduit à tenir . Module 8-Item 112 :1-25 .
- **AchemchemF,( 2014).** Bactériocines de bactéries lactiques de lait et de fromage de chèvre. Presses academiques Francophones. 24-25p.
- **Aibeche,A&Bellounes, N.** (2020).Etude du pouvoir protéolytique des bactéries lactiques, mémoire de master. Université Djilali Bounaama- khemis Miliana, faculté des sciences de la nature et de vie et des sciences de la terre Département de biomogie, 44p.
- **Anabdharaj, M., sivasankari, B., Parveen rani, R.** 2014. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on hypercholesterplemia : A Review . Chinese Journal of biology, 2014, 1-7.
- **Atlan, D., Béal, C., &Champomier-Verges, M. C.** (2008). Métabolisme et ingénierie métabolique. Bactéries lactiques- de la génétique aux ferments. 271-509.
- **Axelsson, L.** (2004). Lactic acid bacteria : classification and physiology. In :salminen, S., vtional aspects. von Wright, A., ouwehand, A. (eds.). Lactic Acid bacteria : microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, Inc., New york, pp1-66.
- **Bahri, F.** (2014). Isolement et caractérisation des souches de lactobacilles a caractères probiotiques à partir de selles d'enfants (université constantine 1, Microbiologie appliquée).
- **Bechachha, K&Bouderhem, R,** (2020), les bactéries lactiques : Rôles et intérêts. Mémoire de master. Université 8 Mai 1945 Guelma faculté des sciences de la nature et de vie, 89p.
- **Belhamra,Z.** Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires (Doctorant dissertation, Université ferhat ABBAS- Sétif 1, Microbiologie).
- **Belyagoubi, L.** (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens, thèse de doctorat. Université AboubakrbelkaidTlemcen, faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de Terre et de L'Univers. 209p.
- **Boudersa, W&Nekkaa, R.** (2017).Etude de l'activité. Antibactérienne de bactéries lactiques isolées a partir d'un produit laitier fermenté : le yaourt brassé, thèse de doctorat. Université des frères mentouri Constantine Faculté des Sciences de la nature et de la vie, 84p.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- **Bouguerra, A. (2021).** Evaluation du potentiel probiotique des souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle, Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas, Sétif 1 faculté des sciences de la nature et de la vie, 141p.
- **Boullouf, A. (2017).** Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries lactiques du fromage traditionnel bouhezza, thèse de Magister. Université des frères Mentouri Constantine, institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A.), 135p.
- **Calvez S, Belguesmia Y, prévost H, Drider D et Kergourley G, 2009.** Les bactériocines : de la synthèse aux applications. Physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles édition : Economica. Paris.
- **Chaouchi, T., Oulhadj, O. (2020).** Application des probiotiques dans le traitement des dysbioses intestinales (Mémoire de master, université akilmohamedoulhadj- bouira, biotechnologie microbienne).
- **Chemlal-kheraz, D. (2013).** Isolement et identification phénotypique des bactéries lactiques isolées du Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) et mise en évidence de leur potentiel probiotique, thèse de doctorat. Université D'Oran faculté des sciences département de biologie, 2017 p.
- **Chemlal-kherraz, D., Sahnouni, F., Matallah-Boutiba, A., & Boutiba, Z. (2012).** The probiotic potential of lactobacilli isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)'s intestine. African Journal of Biotechnology, 11(68), 13220-13227.
- **Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L (2017).** Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. Oncotarget. 9(6) : 7204-7218. DOI : 10.18632/oncotarget. 23208.
- **Cherrad, Z., Tazegouaret, I., & Chékara Bouziani, M. (2020).** Isolement, identification et diversité génétique par les marqueurs moléculaires des bactéries lactiques qui présentent l'activité protéolytique isolées du lait de Chèvre (université Larbi Ben M'hidi Oum el-Bougaghi, Microbiologie appliquée).
- **Dhigra Ak, Chopra B, Bonthagarala B, Anti-inflammatory agents : recent advances and future prospects. Annals of pharmacology and pharmaceuticals 2018 ;3 (5) : 1158.**
- **Djerdir, Z. & Nasri, K. (2018).** Criblage de souches de bactéries lactiques douées d'activités antimicrobiennes, mémoire de master. Université A.MIRA-Bejaia faculté des sciences de la Nature et la vie Département de Microbiologie, 69p.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- **Duyckaerts, C., Fouret, P., Jacques-Hauw, J. (2002).** Chapitre 13 : l'inflammation. Cours Anatomie pathologique PCEM2, Université paris VI, faculté de médecine Pierre et marie Curie, 2003, 60-98.
- **DuyckartsCh, Ouret P, Hauw J. (2002).** Chapitre 13 : l'inflammation. Cours Anatomie pathologiques PCEM2. Université paris VI, faculté de médecine pierre et Marie curie : 60-98.
- **Erdogan B, Aker F, Emon ST, Engin T, Akar EA, Sayman E, SomayH.** Preventive effect of diclofenac sodium and / or diltiazem in rats with epidural fibrosis. Bratislavskelekarskelisty 2019 ; 120(11) : 813-818.
- **Espinosa E, chillet P. (2010).** Immunologie. Ellipses édition marketing : 25-37.
- **Franz C.M.A.P., StilesM.E.P.,Stiles M.E.,Schleifer K.H., Holzapfel W.H. 2003.** Enterococci in foods- a conundrum for food safety. International Journal of Food Microbiology Enterococci in foods. Functional and safety Aspects. Vol. 88, 105-122.
- **Garcia-Aranda M.I., Gonzalez-padilla J.E., Gomez-castro C.Z., Gomez-Gomez Y.M., Rosales-Hernandez M.C., Garcia-Baez E.V., Franco-Hernandez M.O., Castrejon-Flores J.L., Padilla-Martinez I.I.** Anti-inflammatory effect and inhibition of nitric oxide production by targeting COXs and iNOS enzymes with the 1, 2-diphenylbenzimidazole pharmacophore. Bioorg. Med. Chem. 2020 ; 28 :115427. Doi : 10.1016/j.bmc.2020.115427. [PubMed] [crossRef] [Google Scholar].
- **Ghozlane, D. (2012).** Isolement et caractérisation des bactéries lactiques productrices d'arômes (di acétyle) (doctoral dissertation).
- **Granato, D., Branco, G.F., Cruz, A.G., Faria, J. de A. F., Shah, N. P. (2010).** Probiotic dairy products as functional foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9(5), 455-470.
- **Guiraud J.P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Edition : Dunod. Paris : 615p.
- **Guiraud Joseph-Pierre (2003) :** Microbiologie alimentaire Technologiques. Ed. Dunod, paris, 651p.
- **Hadef, S. (2012).** Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales, thèse de magister. Université KasdiMerbah-Ouargla Faculté des Sciences de la Nature et de la vie et Sciences de la terre et de l'univers département des sciences de la nature et de la vie, 135p.
- **Hassaine, O. (2013).** Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien, thèse de doctorat. Université d'Oran Esenia, 180p.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- **Hassan A.N., Frank J.F.2001.** Starter cultures and their use. In : Applied dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York.151-205 .
- **Hellal M,** (2007à. Phtalazinones et 2,3-benzodiazépinones dérivées de l' azélastine : synthèses et activités anti-cytokine. Thèse de doctorat : pharmaco chimie. Strasbourg : université louis pasteur (strasbourg I). In : taiba I, Boumahrat M, Boulifa A, (2017). Evaluation de l'activité anti inflammatoire, analgésique, antioxydant et antipyrétique de la plante médicinale algérienne *SalviaOfficinalis.L.* Mémoire du master. Spécialité toxicologie. Université des frèresMentouri Constantine.
- **Heymonet, C. (2013).** Les plantes à visée anti-inflammatoire utilisées en phytothérapie. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Lorraine. France. 36-37.
- **Ho T.N.T., Tuan N.N., deschamps A., Caubet R. 2007.** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nemchua fermented meat product of Vietnam. Int. Workshop on Food Safety and ProcessingTechnology. 134-142.
- **Joubert D, 2016.** Les ferments lactiques. Revue des ENIL N° 345-12-2016.23p.
- **Kada, S. (2018).** Recherche d'extraits de plantes médicinales doués d'activités biologiques. Thèse de doctorat en Sciences Spécialité : Biochimie. Université Ferhat Abbas Setif 1. 6-11.
- **Kalsum, U., soetanto, H., &sjofjan, O.(2012).** Influence of a probiotic containing lactobacillus fermentum on the laying performance and egg quality of Japanese quails. International Journal of poultry science, 11(4), 311-315.
- **Khodja, B. (2018).** Caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de bactéries lactique productrice de bactériocine. Thèse de doctorat, Université Djilali Liabes de Sidi Bel Abbas Faculté des sciences de la nature et de la vie département de biologie, 100p.
- **Kim KT ,Baek SH, Kim JB, Kim JS.** Primary ventriculitis presenting with isolated vestibular syndrome. J Neurol. 2021 Dec; 268(12):4891-4893;
- **Kouadio KJ,** Ouattara-Soro FS, Abizi G, Zougrou NE, Kouakou KR, Begbin KE, et al. Activité Anti-Inflammatoire et études phytochimiques de l'extrait aqueux des écorces *distemonanthusBenthamianusBaill.*European Scientific Journal 2021 ; 17(17) :1857-7881.
- **Laffargue, C. (2015à).** Intérêt des probiotiques dans la prévention de pathologies et conseils en officine, thèse d'exercice. Université Toulouse paulsabatier faculté des sciences pharmaceutiques, p133.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- **Lallali, H & Lallali, M**, (2018). Etude des propriétés probiotiques de quelques souches du genre *Lactobacillus* isolée de lait et rumen de la chèvre. Mémoire de Master. université de jijel, faculté de la science de la nature et de vie, 56p.
- **Langella P.**, nouaille S., commissaire J., Bolotine A., Gruss A. et le loir Y., 2001. Characterization of host factors affecting heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Lait* 81, 19-28.
- **Latreche, B.**(2016). Caractérisation des bactéries lactiques isolées du beurre cru, évaluation de leurs aptitudes technologiques et leur utilisation dans la fabrication de la crème sure. Thèse de magister, Université Des Frères Mentouri Constantine Institut De La nutrition, De L'alimentation Et Des Technologies Agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A) , 150p.
- **Lawrence T.**(2009). The Nuclear Factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation. *CSH Perspect Biol.* 1(6) : a001651. DOI : 10.1101/cshperspect. A001651.
- **Libby P** 2007. Inflammatory mechanisms : the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev.* 65 (12) : S140-S146. DOI : 10.1111 /j . 17753-4887.2007.tb00352.x.
- **Lzquierdo A**, 2009. Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg. 17-18p.
- **Makhloufi K M**, (2011). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. 6p.
- **Menad, N.** (2018). Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis de *salmonella sp.* Thèse de doctorat. Université Abdelhamid ibn badis Mostaganem, Faculté des Sciences de la nature et de la vie, 196p.
- **Merouri, L** (2018). Etude de l'effet de souches probiotiques de bactéries lactique (*Lactobacillus spp.*), isolées e produits fermentés, sur la valeur nutritive de fourrages conservés par ensilage, thèse de doctorat. Université des sciences et de la technologie d'Oran Mohamed-Boudiaf, 177p.
- **Muster, D.** (2005). Médicaments de l'inflammation. *Edition Elsevier paris.* 21-29.
- **NDIAYE, M, DIEYE, AM, FAYE, B et al.** Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de feuilles d'*Annona reticulata* (Annonaceae) sur l'œdème igue de la patte de rat induit par la carragénine. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*, 2006, vol. XIV, p. 179-186.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- **Nicolas Jean-François, Florences Cousin and Jean Thivolet., 2001** : immunologie clinique et allergologie. Aspirine et AINS : intolérance et allergie. *John libbeyEurotext*, 2001, 55-58.
- **Noack, M. et Kolopp-sarda, M. N. (2018)**. Cytokines et inflammation : physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Revue francophone des laboratoires*, 2018 : 499, 28-37.
- **Orliguet G, Gall O, Benabess-Lambert F**. News concerning and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *The resuscitation anesthesia practitioner* 2013 ; 17(5) : 237-228.
- **Pahwa, R., Goyal, A., Bansal, P., & Jialal, I. (2020)**. Chronic inflammation. *StaptPearls*. (Internet).
- **Papadimitriou, K., Alegria, A., Bron, P.A., Angelis, M. De, Gobetti, M., Kleerebezem, M., ... Kok, J. (2016)**. Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80 (3), 837-890.
- **Piquepaille C, 2013**. Place des probiotiques dans le traitement de diverses pathologies intestinales. Thèse doctorat en pharmacie. Université de limoges.
- **Raghavendra, G.M., Varaprasad, K., et Jayaramudu, T. (2015)**. Biomaterials ; design, developement and biomedical applications. In *Nanotechnology applications for tissue engineering williamandrewpublishing*. 21-44.
- **Reddt, G., Altaf, M., Kumar, E. V. (2008)**. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation- a review. *Biologyadvances*, 26(1), 22-34.
- **Rousselet, M.C ; Vignaud, J.M ; Hofman, P ; Chatelet, F.P. (2005)**. Inflammation et pathologie inflammatoire. Copyright AFECAP.
- **Saidi, Y. (2020)**. Biodiversité de la microflore lactique du lait cru de dromadaire et évaluation de ses caractères technologiques (Doctoral dissertation, université Oran 1 Ahmed Ben Bella, microbiologie appliquée).
- **Salminen S., von wright A et Ouwehand A. (2004)**. Lactic acid bacteria : microbiological and functional aspects. Third Edition, vol.629 : 15-52.
- **Sangiovanni E, Dell Agli M**. Anti-inflammatory activity of plant polyphenols. *Biomedicine* 2020 ; 8:64.
- **Tahlaiti, H.(2019)**. Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté (doctoral dissertation, Université de Mostaganem-Abdelhamid IbnBadis, Microbiologie).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- **Vandamme, P, De Bruyne, K., Pot, B. (2014)** .Phylogenetics and systematics. In : Holzappel, W.H., wood,B.J.B. (Edds). Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. John Wiley & sons, ltd, chichester, united kingdom. Pp. 31-44.
- **Yadav, R., Shukla, P. (2017)**. Probiotics for Human Health: Current progress and Applications. In: Shukla, P. (ed), Recent Advances in Applied Microbiology. Springer Nature Singapore pte Ltd, pp. 133-147.
- **YOUGBARE-ZIEBROU, M.N, OUEDRAOGO, N, LOMPO, M, et al.** Activités anti –inflammatoire, analgésique et antioxydant de l'extrait aqueux des tiges feuillées de *sabasenegalensis* Pichon (Apocynaceae). *Phytothérapie*, 2015, vol. 14, p 213-219.
- **Zielinska, D., kolozyn-krajewska, D. (2018)**. Food-origin lactic acid bacteria may exhibit probiotic properties: review. *bioMed research international*, 2018, 1-15.

# *Annexes*

## Annexes

---

### ANNEXES

La composition des milieux de culture décrite ci-dessous, est calculée pour un litre de milieu de culture. Tous les milieux préparés sont autoclavés à 121 °c /min.

#### Milieu MRS (De Man, Rogosa et Sharpe) (De Man et al., 1960) :

Glucose .....	20g
Peptone.....	10g
Extrait de viande de bœuf .....	8g
Acétate de sodium, 3H <sub>2</sub> O .....	5g
Extrait de levure.....	4g
K <sub>2</sub> HPPO <sub>4</sub> .....	2g
Citrate d'ammonium .....	2g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,2g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O .....	0,05
H <sub>2</sub> O .....	1000ml
Tween 80.....	1,0ml
PH .....	6.5 ±0,2

#### MRS Cystéiné

Glucose .....	20g
Peptone.....	10g
Extrait de viande de bœuf .....	8g
Acétate de sodium, 3H <sub>2</sub> O .....	5g
Extrait de levure.....	4g
K <sub>2</sub> HPPO <sub>4</sub> .....	2g
Citrate d'ammonium .....	2g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,2g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O .....	0,05
CysHCl.....	0,5g
H <sub>2</sub> O .....	1000ml
Tween 80.....	1,0ml
Agar .....	17g
PH .....	6.5 ±0,2

## Annexes

---

### Dilution simple(DS)(Nebra et Blanch ,1999)

Peptone .....	1g
NaCl .....	8,5g
L-cyctéine-HCl.....	0,5g
H <sub>2</sub> O.....	1000mL
PH .....	7.0±0.2

### PBS(saline tampon phosphate)

NaCl.....	8g
KCl.....	0, 2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1, 44g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,24g
H <sub>2</sub> O.....	1000ml
PH.....	7 ,4