

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

M^{lle} ALI CHERIF Hayat

M^{lle} BALOUEDJ Mansouria

M^{lle} BELHADJI Fatima Zohra

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité: Nutrition et Pathologie

THÈME

Résistance des Souches Lactiques Isolées de
l'anchois (*Engraulis encrasicolus*) aux Conditions
Digestives Simulées

Soutenue publiquement le 11/07/2019

DEVANT LE JURY

Président :	Dr. CHAALEL Abdelmalek	MCA
Examineur :	Dr. BENBOUZIANE Bouasria	MCB
Encadrante :	Dr. YAHLA Imène	MCB

Thème réalisé au Laboratoire de des micro-organismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS).

Année universitaire 2018/2019.

SOMMAIRE

Résistance des Souches lactiques isolées del'anchois (*Engraulis encrasicolus*)aux conductions digestives simulées.

Résumé

Abstract

ملخص

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des tableaux et figures

INTRODUCTION1

CHAPITRE I : PROBIOTIQUES

I. Les probiotiques.....3

I.1. Historique.....3

I .2. Classifications des probiotique3

I.2.1.Les bactéries lactique3

I.2.1.1 Les lactobacilles4

I. 2.1.2 .Les coques5

I .2.1.3 les bifidobactéries5

I.2.2. le bactérien non lactiques6

I.2.2.1. Les levures6

I.3.Définition d'un probiotique7

I.4.Critères de sélection des souches à potentiel probiotique.....7

I.4.1. Critère fonctionnelle (tests in vitro)8

SOMMAIRE

I.4.1.1. Probiotique.....	8
I.4.1.2. Technologique	8
I.4.2. Critère de sécurité (tests in vivo modèle animaux).....	8
I.4.3. La résistance à l'acidité gastrique.....	8
I.4.4. La résistance aux sels biliaires.....	9
I.4.5. L'adhésions aux cellules épithéliales	9
I.4.6. La production de substances antimicrobiennes	9
I.4.7. Résistance aux antibiotiques.....	10
I.5. effets des probiotiques sure la sante de hôte	10
I.5.1. Mécanismes d'action et d'adaptation des probiotiques.....	10
I.5.2. Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé.....	11
I.5.2.1. Effets sur les fonctions intestinales Activité enzymatique.....	12
I.5.2.2. Effets sure motricité intestinale.....	13
I.6. Les principales souches microbiennes à potentiel probiotique.....	15
I.7. Aliments probiotiques.....	17
I.8. Microbiotes intestinale.....	17

CHAPITRE II : l'appareil digestif

II. l'appareil digestif	19
II.1. Organisation sur l'appareil digestif.....	19
II .2. Physiologie digestive	19
II.3. Composants de l'appareil digestif	20
II.3.1. La cavité buccale.....	20
II.3.2. Estomac.....	20
II.3.2.1. Suc gastrique.....	22
II.3.2.2. Acide chlorhydrique.....	22
I.3.2.3. Pepsine.....	22

SOMMAIRE

II.3.2.4. Rénine.....	23
II.3.3. Pancréas exocrine.....	23
II.3.4 L'intestin grêle.....	23
II.4. Conclusion sur les fonctions digestives du tube digestif.....	24
CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES	
III.1. Matériel.....	25
III.1.1. Souches utilisées	25
III .1.2 Appareils utilisées	25
III .1.3. Les milieux de culture	26
III.1.4. Les réactifs chimiques	26
III.2. Repiquage et revivification.....	26
III.2.Vérification de l'identité des souches	26
III.2.2. Préparation de l'inoculum	26
III.2.3. Ajustement de l'inoculum	27
III .2.4 Dénombrement et conditions de croissance	27
III.3.Pré-identification des isolats.....	27
III.3.1. Caractérisation macroscopique.....	27
III.3.2. Caractérisation microscopique	27
III.4. Survie aux conditions digestives simulées	27
III.4.1. Effet de l' α - amylase salivaire sur l'intégrité de probiotiques	27

SOMMAIRE

III .4.2. Mesure de la tolérance des souches vis-à-vis du jus gastrique, pancréas et de la bile (model gastro-intestinal simulé).....	28
* Compartiment Estomac	28
* Compartiment de pancréas	28
* Compartiment Intestin	29
III.4.4. Traitement statistique.....	29
CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION	
IV.1.Survie aux conditions digestives simulées	30
IV.1.1.Effet de l'α- amylase salivaire sur les souches testées.....	30
IV.1.2.Mesure de la tolérance des souches testées vis-à-vis du jus gastrique, de la pancréatine et de la bile.....	32
IV.1.2.1.Compartiment Estomac	32
IV.1.2.2.Compartiment Pancréas	34
IV.1. 2.3. Compartiment Intestins	36
Conclusion.....	39

Références bibliographiques

Annexes

RESUME

Résumé

L'objectif de ce travail est l'évaluation *in vitro* de la survie de 9 souches lactiques, les souches (A, B, C, D, F, G, H, I) isolée à partir des anchois et la souche probiotique Bb12, dans des conditions digestives stimulées à savoir : la salive, le suc gastrique (pepsine 0.3% PV), la pancréatine 0.1%, et les sels biliaires 0.3%.

Les résultats fournis par l'étude *in vitro* de la survie des souches (A, B, C, D, F, G, H, I) et Bb12 dans les différentes conditions digestives sont intéressants, les bactéries lactiques testées ont affiché une résistance remarquable vis-à-vis des conditions hostiles de tractus gastro-intestinal : acidité ; pepsine, sels biliaires.

Mots clé : bactéries lactiques, anchois, alphaamylase, suc gastrique, sels biliaires, tractus gastro-intestinal.

RESUME

Abstract

The purpose of this work: is the *in vitro* evaluation of the survival of 9 lactic acid strains; the strains (A, B, C, D, F, G, H, I) isolated from anchovy and the probiotic strain Bb12, under stimulated digestive conditions, namely: saliva; gastric juice (pepsin 0.3% PV); 0.1% pancreatin, and 0.3% biliary salt precedence.

The results of the *in vitro* study of the survival of these strains (A, B, C, D, F, G, H, I) and Bb12 in the various digestive conditions are interesting, the lactic acid bacteria tested showed remarkable resistance to hostile conditions of the gastrointestinal tract: acidity; pepsin, bile salts.

All the strains studied are resisted under simulated digestive conditions, while there are strains with high resistance and strains with low resistance by supplying the Bb12 reference strain.

Key words: lactic acid bacteria, anchovy, alpha amylase, gastric juice, bile salts, and gastrointestinal tract.

RESUME

ملخص

الغرض من هذا العمل ؛ هو التقييم المختبري لبقاء سلالات حمض اللبنيك (09) ؛ السلالات (A ، B ، C ، D ، F ، G ، H ، I) المعزولة من أسماك سالي المائية والسلالة بروبيوتيك BB₁₂، تحت ظروف الجهاز الهضمي المحفزة ، وهي: اللعاب ؛ عصير المعدة (الببسين 0.3 % PV) ؛ 0.1 % البنكرياتين ، و 0.3 % الأسيقية الملح الصفراوي.

أظهرت نتائج الدراسة التي أجريت على التجارب المختبرية لبقاء هذه السلالات (A ، B ، C ، D ، F ، G ، H ، I) و Bb 12 في ظروف الجهاز الهضمي المختلفة نتائج مثيرة للاهتمام. مقاومة ملحوظة للظروف المعادية للجهاز الهضمي: الحموضة ؛ ببسين ، أملاح الصفراء.

تقاوم جميع السلالات المدروسة في ظل ظروف الجهاز الهضمي محاكاة ، في حين أن هناك سلالات ذات مقاومة عالية وسلالات مع انخفاض المقاومة من خلال توفير سلالة Bb12 المرجعية.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللبنيك ، أسماك الماء المالح ، ألفا الأميليز ، عصير المعدة ، أملاح الصفراء ، القناة الهضمية.

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions "Dieu" qui nous a donné la Patience, le courage et la volonté pour réaliser ce mémoire

Pais et salut sur notre premier éducateur (صلى الله عليه وسلم) le prophète pour ce qu'il a donné à l'humanité.

*Nous remercions notre encadrante Dr. **YAHYA Imène** pour la confiance qu'elle nous a accordée en acceptant cet encadrement*

Pour sa disponibilité tout au long de l'élaboration de ce mémoire, pour son aide, ses critiques et ses suggestions, et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire.

*Nous remercions Dr. **CHAALEL Abdelmalek** d'avoir accepté la présidence du jury de la soutenance.*

*Nous remercions Dr. **Benbouzinane Bouasria** qui a accepté d'examiner ce modeste travail.*

*Nous tenons aussi à remercier Pr. **Rhazi. A.** pour ses encouragements, ses conseils, qui ont été pour nous d'un grand apport.*

*Nous voudrions remercier aussi la technicienne du Laboratoire de des micro-organismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS)
Mme Djahira.*

Finalement, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

A vous tous, un grand Merci

Hayat, Mansouria, Fatima Zohra.



Dédicaces

Avant tout, je remercie mon dieu qui m'a donné le courage

Et la volonté de terminer ce mémoire.

Je dédie ce travail aux plus proches à mon cœur :

*A mes parents qui m'ont encouragé pour réaliser mon rêve après de longues années
d'étude, que dieu les protège et leur prête santé et longue vie.*

A mes très chères sœurs : Nadjat et Aridj.

A mes très chers frères : Brahim et Fayçal.

A mon meilleure ami(es) : Zheira, Nabila et Fathia.

A mes très chers collègues Mansouria et Fatima Zohra.

*Et à mon encadrante Mme. Fahla Imene merci pour votre disponibilité et
vos précieux conseils*

A Hayat.



Dédicaces

Avant tout je remercie ALLAH pour tout et je dédie ce modeste travail .

*A mes très chers parents Maman et Papa, sources de tendresse et la force de courage
d'étude.*

*Je vous remercie d'être toujours à ma coté de me soutenir, aimer, protéger et pour tout ce que
vous avez fait pour moi.*

A mon cher frère : Mohamed.

A mes chères sœurs : Ghaima, Hayat, Hafsaa, Amira, Djihaan, Maya.

A mes meilleures amies : Karima et Dhaiba.

A mon très chères collègues : Hayat et Fatima Zohra.

A toute la promotion des Sciences Alimentaires.

A tout les enseignants(e).

A. Mansouria



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mon père qui m'a épaulé tout au long de mes études

A ma mère que j'aime bien fort et que dieu me la garde

A mes chères sœurs Nasima , Mehdiia Et Hayet et mes frères

*Nacimo Et Amine et leurs femme Hizia Et Zouzou sans oublier
mon petit frère Sidali.*

Que dieu les protège.

A toute les familles Belhadji Et Aziria

à la belle famille Messadi

A mes chères amies :

*Nourelhouda ; Amouna, Lamia, Hayat, Mnsouria, Sara, Tmen,
Nesrine*

A Fatima Zohra

Liste Des Abréviations

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique.
ARN :	Acide ribonucléique.
ATP :	Adénosine-5'-triphosphate.
BL :	Bactéries lactiques.
BN :	Bouillon nutritif.
C ° :	Degré Celsius.
DO :	Densité Optique.
EMP :	Embden Meyerhoff Parnas
FAO:	Food and Agriculture Organization.
g :	Gramme.
g/l :	Gramme par litre.
G :	Grossissement.
GC%:	Pourcentage en guanine et cytosine.
GRAS:	Generally Recognized As Safe.
Iga :	Immunoglobuline A.
Log :	Logarithme.
MRS :	De Man, Rogosa et Sharpe.
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé.
PBS:	Tampon phosphate salin.
Sp :	Sous espèce.
ssp:	Subspecies.
T/min :	Tour pour minute .
t :	Temps.
UFC :	Unité formant colonies.
µL :	Microlitre.

Liste des tableaux et des figures

Liste des tableaux

Chapitre I : probiotiques

Tableau 01 : principales souches probiotiques (Shah, 2007).....16

Liste des figures

Chapitre I : probiotiques

Figure 01 : *Lactobacillus casei* (corrieu, 2008).....04

Figure 02 : *Streptococcus thermophilus* (corrieu, 2008).....05

Figure 03 : *Saccharomyces boulardii* (Dalmasso, 2006).....06

Figure 04 : Mécanismes d'action des probiotiques selon Leeber *et al.*, 2008.....11

Figure 05 : Les effets bénéfiques des probiotiques.....14

Chapitre II : l'appareil digestif

Figure 06 : L'estomac (Brooker, 1999).....21

Chapitre IV : Résultats et Discussion.

Figure 07: survie des souches (A, B, C, D, F, G, H, I) et Bb12 après 04 heures d'incubation à 37°C+pH=5,6 en présence d' α - amylase salivaire.....31

Figure 08 : Résistance des bactéries lactiques aux conditions digestive simulées (α - amylase salivaire, pH =5,6).....31

Figure09 : Survie des souches (A, B, C, D, F, G, H, I) et Bb12 aux conditions gastriques simulées (3g/L pepsine + pH 2).....33

Figure 10 : Résistance des bactéries lactique aux conditions gastriques simulées (3g/L pepsine + pH 2).....33

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

Figure11 : Survie des souches (A, B, C, D, F, G, H, I) et BB ₁₂ sous conditions pancréatiques simulées (1g/L pancréatine + pH 8).....	35
Figure 12 : Croissance des bactéries lactique dans les conditions pancréatiques simulées (1g/L pancréatine + pH 8).....	35
Figure13 : Survie des souches (A, B, C, D, F, G, H, I) et BB ₁₂ sous conditions intestinale simulées (3g/L de la bile + pH8).....	36
Figure 14 : Croissance des bactéries lactique des conditions intestinale simulées (3g/L de la bile + pH8).....	37

Introduction

INTRODUCTION

Depuis quelques années, la dimension santé de l'alimentation semble avoir pris une importance nouvelle, et ce au détriment des autres qui lui sont prêtées (**poulain, 2001**).

Cependant, L'idée qu'une partie des bactéries présentes dans notre alimentation puisse avoir des effets bénéfiques pour la santé est beaucoup plus vieille que le terme probiotique (**Metchnikoff, 1907**).

Dès la naissance, notre tractus gastro-intestinal est colonisé par de nombreux microorganismes qui vont constituer le microbiote digestif. Cet écosystème complexe et diversifié, propre à chaque individu, contribue au bon fonctionnement intestinal grâce aux multiples activités qu'il exerce. Cependant, l'équilibre du microbiote est fragile et sa rupture intervient dans la physiopathologie de diverses affections intestinales, d'où l'idée de moduler de façon positive un microbiote déséquilibré par l'administration de probiotiques.

Le terme « probiotique » signifie « promouvant la vie » et désigne des microorganismes vivants qui, ingérés en quantité appropriée, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte qui vont au-delà des fonctions nutritionnelles de base.

Les probiotiques sont souvent des bactéries lactiques (lactobacilles et bifidobactéries) ou des levures introduites dans l'alimentation sous forme de produits lactés fermentés ou de suppléments alimentaires. Ces micro-organismes renforcent la flore intestinale et vaginale. Leur présence permet notamment de lutter contre la prolifération des bactéries pathogènes.

Plusieurs études cliniques ont déjà démontré l'efficacité de certains probiotiques dans le traitement de maladies systémiques et infectieuses telles la diarrhée aiguë et la maladie de Crohn. D'autres études ont suggéré une application potentielle pour le traitement des infections urogénitales, des cancers du colon, de dermatite atopique et des maladies allergiques notamment l'allergie alimentaire telle que l'intolérance au lactose.

Le but de cette étude est l'évaluation in vitro de la résistance de certaines souches lactiques (A, B, C, D, F, G, H, I) isolées à partir de l'intestin de l'anchois et une

INTRODUCTION

souche probiotique de référence E (Bb12) aux conditions digestives simulées (α -amylase, pepsine, pancréatine et la bile).

Partie Théorique

Chapitre I

Probiotiques

CHAPITRE I : PROBIOTIQUES

I. Les probiotiques

I.1. Historique

La notion de probiotique est retrouvée dans l'ancien testament. Il a été écrit que la longévité d'Abraham était associée à la consommation de lait. C'est la première observation à ce sujet. Donc cela montre que la consommation d'un aliment fermenté peut avoir un effet sur la santé. Plus tard, un historien romain, Plinius (-76), a recommandé l'utilisation de produits fermentés laitiers pour le traitement des gastroentérites.

Au début du 20^{ème} siècle, Elie Metchnikoff (collaborateur Russe de Pasteur) a observé que les paysans Bulgares, qui consommaient quotidiennement des produits fermentés, étaient en bonne santé et présentaient une certaine longévité

. En 1916, Nissle (un chercheur Allemand) a isolé dans la microflore intestinale d'un soldat, qui a résisté à l'épidémie de shigellose, une souche d'*Escherichia coli* qui pourrait prévenir les infections entériques. C'est une souche de « fort index » capable de tuer *Salmonella typhi*.

En 1985, Gorbach et Goldin (Américains) isolent *Lactobacillus rhamnosus* ou souche GG ou LGG. C'est la souche la plus étudiée jusqu'à présent dans le monde. C'est en 1995 que le terme probiotique apparaît.

I.2. Classifications des probiotiques

Les probiotiques sont souvent des bactéries lactiques (lactobacilles et bifidobactéries) ou des levures introduites dans l'alimentation sous forme de produits lactés fermentés ou de suppléments alimentaires,

I.2.1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des siècles pour la conservation et la fabrication d'aliments, notamment des produits laitiers, bien avant que l'on ne connaisse leur existence en tant que telles.

Elles constituent un groupe hétérogène réunissant plusieurs genres caractérisés par

leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique.

La fermentation est dite homolactique lorsque l'acide lactique est le seul métabolite formé ; elle est qualifiée hétérolactique lorsque d'autres composés (éthanol, dioxyde de carbone, acides organiques volatils) sont produits en plus de l'acide acétique.

Selon le mode de fermentation obligatoire ou préférentielle, on parle de bactéries homofermentaires ou hétérofermentaires (Colado et al., 2005).

I.2.1.1 Les lactobacilles

Les lactobacilles font partie du phylum des *Firmicutes*, de la classe des *Bacilli*, de l'ordre des *Lactobacillales* et de la famille des *Lactobacillaceae*. Ces bactéries ont une forme de bâtonnets qui sont souvent groupés en chaînettes (figure 01) (Leveau, 1993) ;(Felies, 2007).

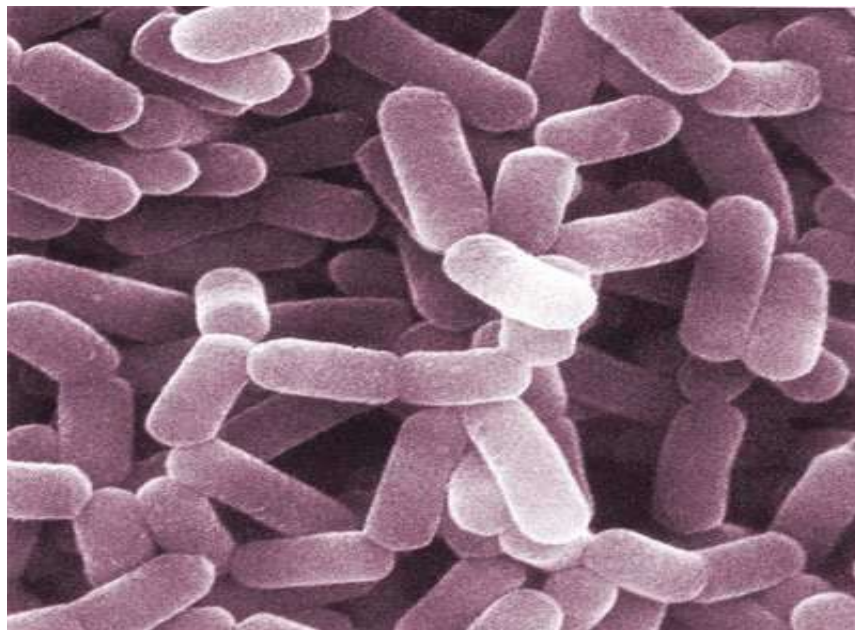


Figure 01 : *Lactobacillus casei* (Corrieu, 2008).

I. 2.1.2 .Les coques

Les bactéries lactiques des genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* sont des coques sphériques ou ovoïdes, généralement groupés en paires, en chaînettes ou en tétrades (figure 2).

Seuls les *Streptococcus*, les *Enterococcus* et éventuellement les *Lactococcus* sont utilisés comme probiotiques. Ces trois genres appartiennent au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Streptococcaceae*.

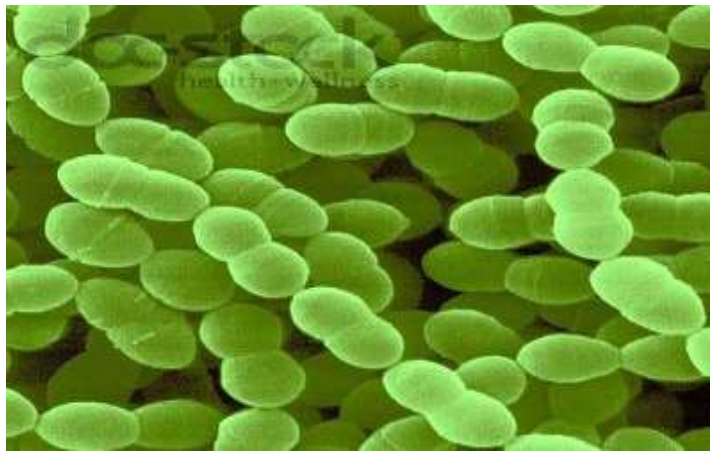


Figure 02: Streptococcus thermophilus (Corrieu,2008).

I .2.1.3 les bifidobactéries

Les premières bifidobactéries isolées et décrites aux débuts du 20^{ième} siècle ont été observées par Henri Tissier en 1906.

Il avait remarqué que les enfants nourris au lait maternel avaient une flore microbienne intestinale beaucoup plus riche en bactéries de forme Y et irrégulières, contrairement aux enfants nourris au biberon. Tissier les nomma ainsi : *Bacillus bifidus*.

Par la suite, le genre *Bifidobacterium* a été décrit en 1924 par Orla-Jensen lorsque *Bacillus bifidus* a été renommé comme *Bifidobacterium bifidus*. À ce moment-là, ce genre ne comportait qu'une seule espèce (Lealy, 2005).

I.2.2. le bactérien non lactiques

D'autres bactéries, dont le métabolisme est différent des précédentes, font également preuve d'intérêt en tant que probiotiques. Il s'agit notamment de la souche *Escherichia coli* Nissle 1917 et de bactéries sporulées dont *Bacillus subtilis* et *Bifidobacterium cereus*.

I.2.2.1. Les levures

Les levures, chez lesquels la forme unicellulaire prédomine, sont utilisées depuis des siècles par l'Homme en panification et pour la fermentation de boissons alcooliques.

Depuis de nombreuses années, elles sont également utilisées comme additifs alimentaires chez les animaux pour améliorer les performances zootechniques et comme régulateur du microbiote intestinal chez l'homme.

Les levures utilisées comme probiotiques sont des souches de *Saccharomyces cerevisiae*, et en particulier une souche bien déterminée dénommée *Saccharomyces boulardii* (figure 3) (Dalmasso G, Cottrez F et al., 2006).

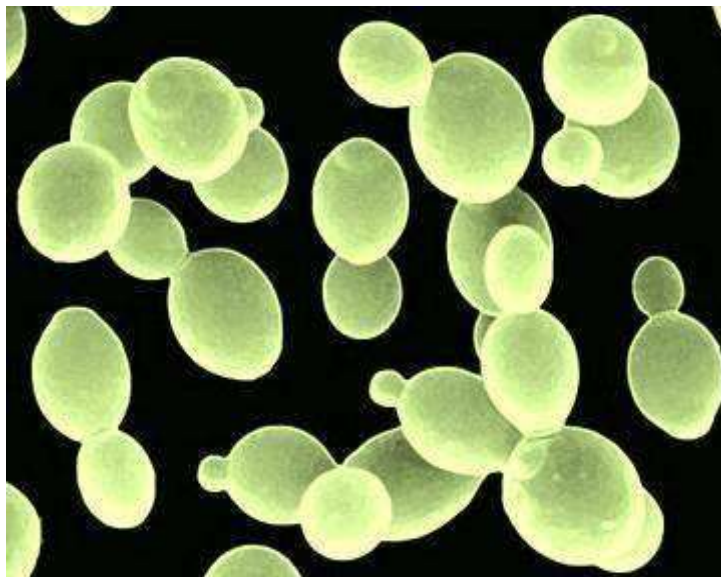


Figure 03 : *Saccharomyces boulardii* (Dalmasso,2006).

I.3. Définition d'un probiotique

Le terme probiotique a été utilisé pour la première fois en 1965 par l'équipe de Lilly et Stillwell, afin de décrire les substances produites par un organisme pour stimuler la croissance d'autres micro-organismes (**Lilly et al., 1965**). Ce terme dérive d'un mot grec signifiant "promouvant la vie" (**Reid et al., 2003**). Puis, cette définition a évolué suite aux travaux de Parker (**Parker, 1974**) qui a proposé que les probiotiques sont "des organismes et des substances qui contribuent à la balance intestinale bactérienne".

Depuis, plusieurs définitions ont été données aux probiotiques dépendamment de leurs effets sur la santé et selon la définition adoptée par le groupe de travail mixte formé par l'Organisation des Nations Unies (ONU) pour l'agriculture et l'alimentation et l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) (**Report of FAO/WHO, 2002**), les probiotiques sont « des microorganismes vivants administrés en quantités adéquates et qui sont bénéfiques pour la santé de l'hôte ».

Les probiotiques les plus fréquemment documentés sont les bactéries lactiques (lactobacilles, streptocoques et lactocoques) et les bifidobactéries. La classification des probiotiques est stricte et organisée en genres bactériens, composés eux-mêmes d'espèces puis de souches. Cette classification est importante à considérer car les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé sont non seulement doses dépendants mais également souches dépendants.

I.4. Critères de sélection des souches à potentiel probiotique

Le choix des probiotiques dépend de ses propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Selon le rapport de la **FAO/WHO (2002)**, un micro-organisme doit être soumis aux étapes de caractérisations suivantes avant d'avoir le statut probiotique:

- Être non pathogène.
- Résister au pH acide de l'estomac et aux concentrations biliaires présentes dans l'intestin grêle.
- Adhérer aux différents tissus épithéliaux du tractus gastro-intestinal.
- Avoir une bonne colonisation du tube digestif Produire des substances antimicrobiennes capables d'inactiver des pathogènes moduler les réponses immunitaires.

I.4.1. Critère fonctionnelle (tests *in vitro*)

I.4.1.1. Probiotique

- Tolérance à l'acidité et la bile.
- Antagonisme vis-à-vis des pathogènes.
- Production des substances anti microbiennes (bactériocines).
- Adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et /ou mucus.
- Réduction cholestérol.
- Stimulation de l'immunité.

I.4.1.2. Technologique

- Tolérance à l'oxygène.
- Résistance aux stress (NaCl, pH, température).
- Survie aux conditions de fabrication et de stockage.

I.4.2. Critère de sécurité (tests *in vivo* modèle animaux)

- Historique de non pathogénicité (GRAS).
- Pas résistance antibiotiques.
- Aucune activité métabolique nocive.
- Pas de production de toxines d'activité d'hémolytique.
- Absence d'effets secondaire.

I.4.3. La résistance à l'acidité gastrique

La survie des bactéries dans le suc gastrique dépend de leur capacité à tolérer les bas pH. Le temps de passage peut être d'une heure à quatre heures selon l'individu et son régime. Par conséquent, quelques auteurs proposent que les souches probiotiques doivent résister à un Phde 2.5 dans un milieu de culture pendant quatre heures (**Ammor et al., 2007**).

I.4.4. La résistance aux sels biliaires

Dans l'intestin grêle, la tolérance aux sels biliaires est un facteur important qui contribue à la survie des probiotiques. Les bactéries qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion des repas gras.

Les bactéries peuvent réduire l'effet émulsifiant des sels biliaires en les hydrolysant avec des hydrolases, de ce fait diminuant leur solubilité (Ammor et al., 2007 ; Gu et al., 2008).

I.4.5. L'adhésions aux cellules épithéliales

La capacité d'adhésion à la couche intestinale est un critère de sélection recommandé pour le choix des probiotiques, parce que c'est une condition pour la colonisation des entrailles. L'adhérence constitue le premier mécanisme de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes.

Elle est basée sur la réalisation d'un ensemble de tests *in vitro* puis *in vivo* en utilisant des cellules d'origine animale et/ou humaine (Palomares et al., 2007 ; Reyes-Gavilan et al., 2011).

Chez le souriceau, la colonisation par la flore conventionnelle de l'intestin est nécessaire à la fucosylation complète des glycoprotéines de la membrane entérocytaire (Bry et al., 1996). *L. rhamnosus GG*, *L. acidophilus* et *B. bifidum* ne dégraderaient pas les glycoprotéines du mucus intestinal, ce qui serait un gage de leur sécurité d'emploi (Ruseler-van Embden et al., 1995).

I.4.6. La production de substances antimicrobiennes

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide/bactériostatique comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments (Titiek et al., 1996 ; Labioui et al., 2005).

Beaucoup d'exemples existent d'une activité *in vivo* de bactéries probiotiques productrices de bactériocines contre de pathogènes. L'admiration de *L. acidophilus* à des

souris les protègent contre l'infection par *Helicobacter felis*, la consommation de bactéries vivantes de *L.johnsonii* par des enfants colonisés par *H.pylori* diminuait la production d'uréase (Cruchet et al., 1998). Des souches d'E.coli productrices de colicines ou de microcines sont utilisées chez les animaux pour combattre des entéropathogènes Gram négatifs typiques qui ne sont pas sensibles aux bactériocines des BAL (Cursino et al 2006).

I.4.7.Résistance aux antibiotiques

Les bactéries lactiques sont naturellement résistantes à beaucoup d'antibiotiques grâce à leur structure et physiologie. Les travaux de Temmerman et al. (2003) ont montré que 68.4% des probiotiques isolés ont une résistance à un antibiotique ou plus. Des souches de *Lactobacillus* ont été trouvées résistantes à la kanamycine (81%), à la tétracycline (29.5%), à l'érythromycine (12%) et au chloramphénicol (8.5%). 38% des isolats de *Enterococcus faecium* ont été trouvés résistants à la vanomycine. Dans la plus part des cas la résistance n'est pas transmissible, cependant, il est possible que le plasmide codant pour la résistance aux antibiotiques soit transféré à d'autre espèces et genre. C'est une raison significative pour choisir des souches manquant du potentiel de transfert de résistance (Denohue, 2004).

I.5. effets des probiotiques sur la sante de hôte

I.5.1.Mécanismes d'action et d'adaptation des probiotiques

Les mécanismes d'action des probiotiques sont encore très incomplètement connus. Il est par ailleurs vraisemblable qu'ils varient en fonction du (ou des) probiotique utilise, et peut-être de la dose administrée.

Les effets des probiotiques résultent essentiellement de leurs interactions avec le contenu digestif d'une part, à la fois avec les nutriments présents dans la lumière intestinale et avec les composants de la flore endogène, et avec le contenant d'autre part, principalement les cellules épithéliales intestinales et les cellules immunocompétentes (Backhed et al., 2005).

Le processus de résistance des bactéries aux stress rencontrés dans le tractus digestif, l'adaptation de leur métabolisme à l'environnement nutritionnel de l'hôte, que sur les déterminants de leur adhésion à la muqueuse intestinale ; les investigations concernent

un des trois mécanismes d'action communément attribués à ces bactéries qui sont (figure 4) : (Lebeer *et al.*, 2008) .

- L'inhibition des pathogènes et la restauration de l'homéostasie microbienne.
- La protection de l'épithélium intestinal.
- La modulation des réponses immunitaires.

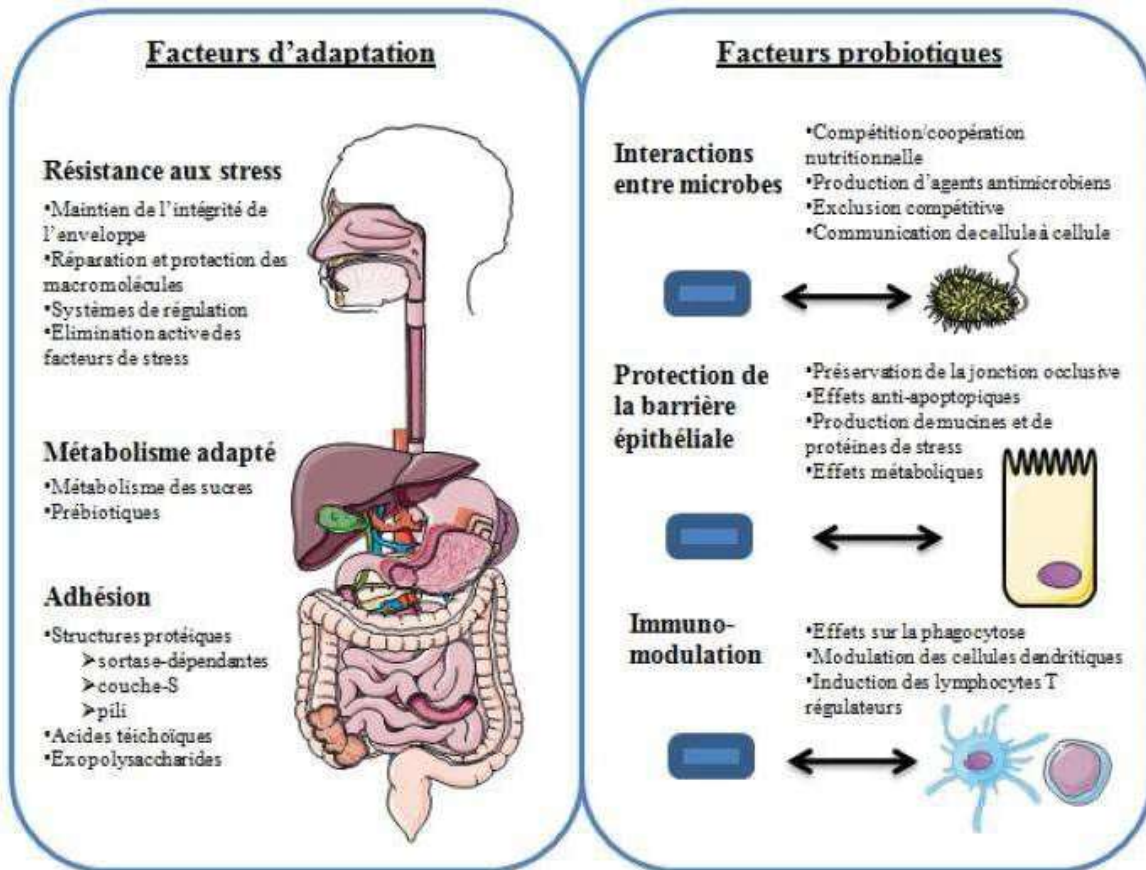


Figure 04 : Mécanismes d'action des probiotiques selon Lebeer *et al.*, (2008)

I.5.2. Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation des probiotiques, beaucoup de ces effets ont été démontrés avec des études cliniques sur l'homme. Cependant, d'autres ne sont pas avérés ou sont simplement basés sur des tests *in vitro* ou sur des essais avec des animaux (**De Vrese et al., 2001**).

I.5.2.1. Effets sur les fonctions intestinales Activité enzymatique

Les probiotiques, en produisant et/ou en augmentant l'activité de nombreuses enzymes digestives, permettent d'améliorer significativement la digestion et l'absorption intestinales, notamment chez des sujets ayant un déficit enzymatique.

L'un des effets des bactéries lactiques qui a été le plus mis en avant et démontré chez l'homme est l'amélioration de l'intolérance au lactose.

Le lactose, présent exclusivement dans le lait et ses dérivés, est formé de glucose et de galactose reliés entre eux par une liaison β . Sa digestion nécessite une lactase, ou β -galactosidase, qui hydrolyse cette liaison et permet alors l'absorption des sucres simples libérés. Chez les personnes souffrant d'intolérance au lactose, un déclin de la production de cette enzyme est observé au-delà de la petite enfance. La deuxième cause d'intolérance (intolérance secondaire) est représentée par les maladies dont la conséquence est une réduction de la surface de digestion-absorption ou accélération de transit jéjunale (**Burgain et al., 2012**).

Plusieurs études ont montré que la β -galactosidase des bactéries lactiques participait à la digestion du lactose dans l'intestin. En principe, le remplacement du lait par du yaourt conduit à une meilleure absorption et une meilleure tolérance chez les sujets présentant une intolérance au lactose. Il a été montré que les bactéries qui survivaient dans l'intestin gardaient une activité métabolique suffisante pour hydrolyser le lactose, et que celles dont la membrane est facilement lysée par les acides biliaires libéraient leur lactase dans l'intestin (**Flourie et al., 2007**).

Dans le même ordre d'idées, un travail a montré que l'ingestion de *Saccharomyces cerevisiae*, qui est riche en saccharase, aidait à la digestion du saccharose et supprimait les signes cliniques d'intolérance chez les enfants ayant une carence congénitale en saccharase-isomaltase (**Marteau, 2004**).

I.5.2.2. Effets sur motricité intestinale

Certaines souches probiotiques accélèrent le transit colique, total et/ou segmentaire. A ce sujet, les effets de l'ingestion de *Bifidobacterium animalis* DN- 173 010 ont été les mieux étudiés.

Ainsi, une étude menée chez des volontaires sains âgés de 21 à 42 ans, a montré que l'ingestion quotidienne de trois pots de yaourt contenant *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 (10^8 UFC par gramme) pendant onze jours raccourcissait d'environ 20 % le temps de transit colique par rapport à une même période d'ingestion de yaourt sans supLes mécanismes impliqués ne sont pas connus. Les probiotiques pourraient agir directement ou indirectement par l'intermédiaire des effets de leurs produits fermentaires sur l'activité motrice colique (figure 5) (**Adam et al., 2010**).

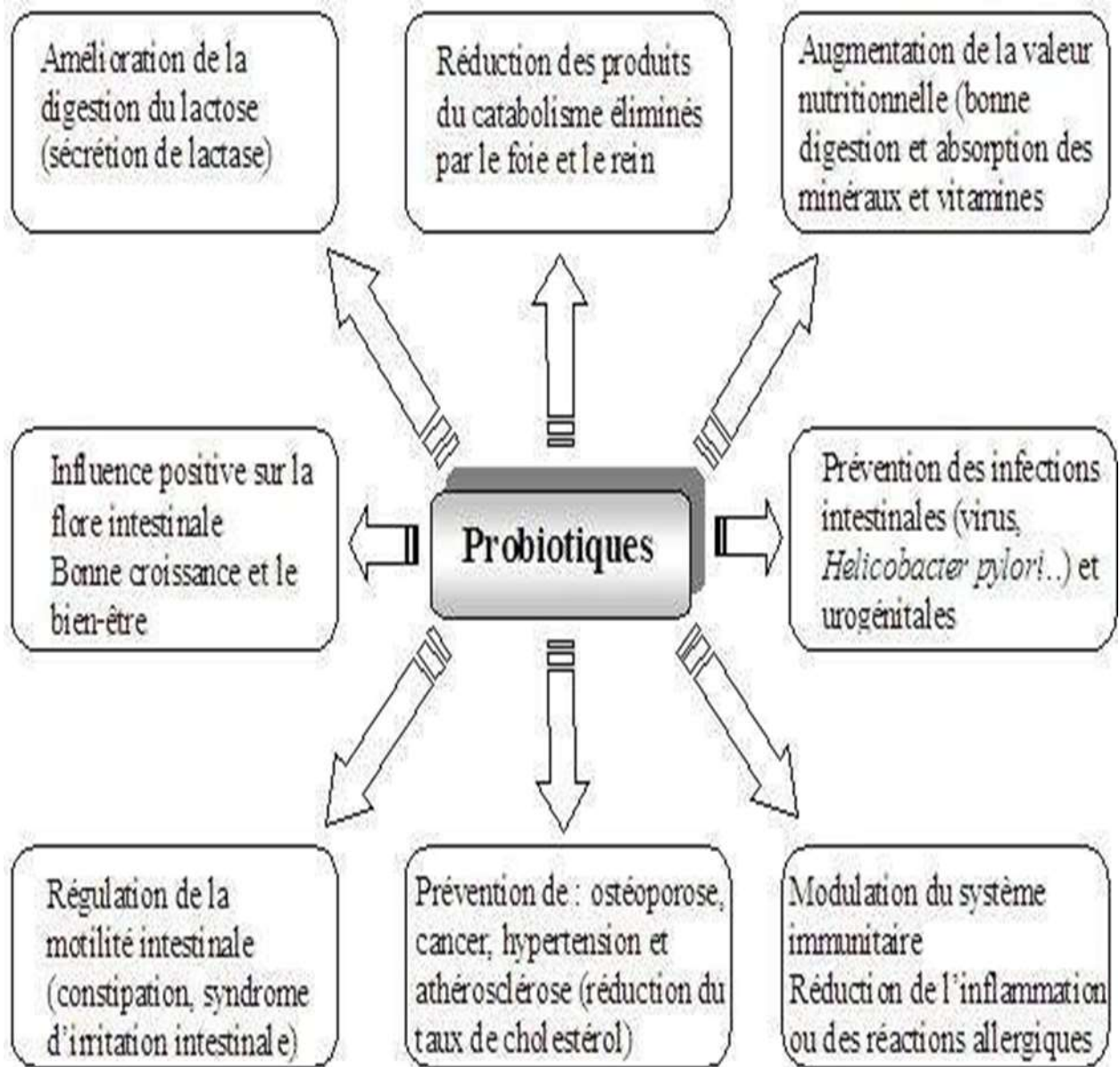
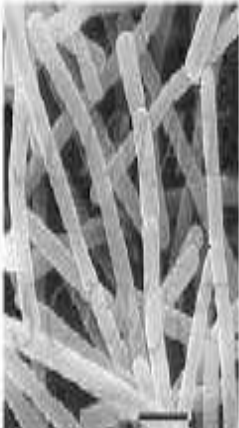
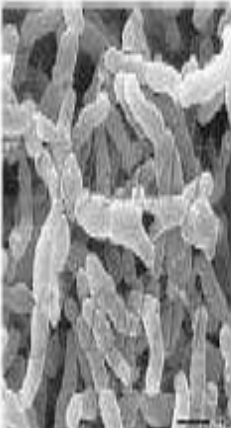




Figure 05 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Mercenier et al., 2002).

I.6. Les principales souches microbiennes à potentiel probiotique

Les souches ou espèces probiotiques sont des composants normaux de la flore intestinale (**Dunne et al, 2001**). En alimentation humaine, les genres microbiens les plus utilisés comme probiotiques sont *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* (**Berg, 1998**). Par contre, en alimentation animale de nombreux genres bactériens et fongiques sont utilisés, comme *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* et *Torulopsis* (tableau 1) (**Tannock,1997**).

Tableau 01 : Principales souches probiotiques (Shah, 2007).

Espèces de lactobacilles	Espèces de bifidobactéries	Autres bactéries lactiques	Microorganismes « non-lactiques »
 <p data-bbox="248 943 400 972"><i>Lactobacillus bulgaricus</i></p>	 <p data-bbox="584 943 727 972"><i>Bifidobacterium breve</i></p>	 <p data-bbox="906 943 1083 972"><i>Streptococcus thermophilus</i></p>	 <p data-bbox="1238 943 1366 972"><i>Saccharomyces</i> sp.</p>
<p><i>L. acidophilus</i> La5 (Chr Hansen)</p> <p><i>L. acidophilus</i> NCFM (Danisco)</p> <p><i>L. casei</i> Shirota (Yakult)</p> <p><i>L. casei</i> DN-114 001 (Danone)</p> <p><i>L. reuteri</i> ATCC 55730 (Biogala)</p> <p><i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 2038 (Meij Milk)</p> <p><i>L. gasseri</i> K7 (ALP)</p> <p><i>L. johnsonii</i> La1 (Nestlé)</p> <p><i>L. paracasei</i> CRL431 (Chr. Hansen)</p> <p><i>L. paracasei</i> F19 (Medipharm)</p> <p><i>L. plantarum</i> 298V (Probi AB)</p> <p><i>L. rhamnosus</i> GG (Valio)</p> <p><i>L. crispatus</i></p> <p><i>L. gallinarum</i></p>	<p><i>B. longum</i> BB538 (Morinaga)</p> <p><i>B. breve</i> Yakult (Yakult)</p> <p><i>B. lactis</i> Bb 12 (Chr. Hansen)</p> <p><i>B. lactis</i> HN019 (Danisco)</p> <p><i>B. animalis</i> DNI 73010 (Danone)</p> <p><i>B. Infantis</i> 35284 (Procter & Gamble)</p>	<p><i>S. thermophilus</i> 1131 (Meij Milk)</p> <p><i>E. faecalis</i> Symbioflor (Symbiopharm)</p> <p><i>E. faecium</i> SF88 (Cerbios)</p> <p><i>P. acidilactici</i> Bactocell® (Lallemand)</p>	<p><i>S. boulardii</i> Ultra-levure® (Biocodex)</p> <p><i>S. cerevisiae</i></p> <p><i>E. coli</i> Nissle 1917 (Ardeypharm)</p> <p><i>B. subtilis</i></p> <p><i>B. cereus</i></p>

I.7. Aliments probiotiques

Le marché mondial des aliments probiotiques est en forte croissance depuis le début des années 2000, particulièrement en Europe. Cette dynamique est notamment soutenue par le lien existant entre alimentation et bénéfices santé.

Les probiotiques utilisés comme compléments alimentaires, de même que les aliments fonctionnels, sont considérés comme des denrées alimentaires et sont régis par la législation y attenant. Ils se différencient des aliments diététiques qui sont destinés à une alimentation particulière et doivent faire l'objet d'une formulation ou d'un procédé de fabrication spécifique pour se différencier de l'aliment courant, et des médicaments, en particulier.

Les produits laitiers, plus particulièrement les yaourts, sont les aliments probiotiques les plus nombreux, avec en tête de file les produits Activia® et Actimel® de Danone pour ce qui est des allégations (Ninane et al, 2009) et (FAO/WHO, 2001).

I.8. Microbiotes intestinale

Les souches probiotiques d'origine humaine sont considérées comme les plus compatibles avec le tractus intestinal humain.

Les probiotiques modulent la composition et l'activité de la flore intestinale. Ils ont une action protectrice en limitant la colonisation, la reproduction et l'adhérence de bactéries pathogènes.

Le microbiote intestinal, appelé anciennement flore intestinale, se définit comme l'ensemble des microorganismes présents dans l'écosystème digestif et assurant des relations symbiotiques avec l'hôte.

Le tube digestif de l'Homme héberge des bactéries, des virus et des *Archaeae*. Parmi toute cette communauté microbienne, les bactéries forment le groupe le plus largement représenté. On peut donc considérer que le microbiote intestinal correspond à l'ensemble des bactéries qui colonisent notre tractus digestif (Quevrain, 2013).

Il représente une biomasse et un potentiel génétique considérable avec 10^{14} bactéries correspondant à environ 1000 espèces bactériennes, et plus de 5 millions de gènes, ce qui dépasse largement le nombre de cellules et gènes eucaryotes. La diversité qualitative et quantitative du microbiote intestinal crée un équilibre qui peut être considéré comme unique pour chaque individu, presque au même titre qu'une empreinte digitale **(Sommer et al., 2013)**.

Le microbiote intestinal joue un rôle multiple et complexe, aussi bien sur le plan nutritionnel que sur le développement des défenses immunitaires de la muqueuse intestinale.

Chapitre II

Appareil digestif

CHAPITRE II : L'APPAREIL DIGESTIF

II.1. Organisation sur l'appareil digestif

Le rôle principal du tube digestif est de digérer, d'extraire les nutriments contenus dans le bol alimentaire et d'éliminer ou transformer les produits non assimilables. Ces processus débutent dans la bouche et se déroulent tout au long de la progression du contenu dans la lumière digestive jusqu'à l'anus. Comme la peau, la présence d'un épithélium permet également au tube digestif d'établir une barrière entre le milieu extérieur (lumière digestive) et le milieu intérieur. Ces défenses sont renforcées par un système immunitaire local capable de combler les défaillances de la barrière **(Ducarouge, 2006)**.

Le tube digestif héberge une communauté microbienne complexe et diversifiée, composée principalement de bactéries mais incluant également des archées, des virus, des champignons et des protozoaires. Les bactéries intestinales sont dix fois plus nombreuses que les cellules eucaryotes constituant le corps humain. Ainsi, au niveau du côlon, la densité bactérienne atteint 10¹⁴ bactéries. Le microbiote intestinal établit une relation mutualiste avec son hôte et participe à la nutrition et au métabolisme, au développement et à la maturation du tractus digestif, aux fonctions immuno-modulatrices ainsi qu'à la protection contre les pathogènes. Quelques espèces bactériennes particulières, comme celles du phylum Proteobacteria et la bactérie *Akkermansia muciniphila*, appartenant au phylum des Verrucomicrobia, sont capables d'adhérer, de coloniser et de dégrader la couche de mucus. La capacité de liaison au mucus permet d'augmenter le temps de séjour des bactéries dans l'intestin. Celles dégradant le mucus, du fait de la présence d'un large éventail d'enzymes, telles que les glycosidases, les sulphatases ou les sialidases, possèdent un réel avantage sélectif au sein de la niche écologique mucosale **(Dasilva, 2013)**.

II.2. Physiologie digestive

Le système digestif inclut le tractus gastro-intestinal ainsi que les organes accessoires de la digestion, notamment les glandes salivaires, le foie, la vésicule biliaire et le pancréas exocrine. Le tractus gastro-intestinal permet l'acheminement des aliments mais aussi la digestion chimique et enzymatique de ces derniers depuis leur ingestion au

niveau de la bouche jusqu'à leur excrétion au niveau du rectum. Il est composé de la bouche, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle, lui-même comportant le duodénum, le jéjunum et l'iléon et est terminé par le gros intestin. Il a pour fonction l'absorption des nutriments (glucides, protéines, lipides, minéraux et vitamines), mais aussi de l'eau et des électrolytes. Il joue aussi un rôle de protection de l'organisme en prévenant le passage des bactéries et des autres substances indésirables provenant de la lumière intestinale, et exerce enfin un rôle de surveillance immunitaire *via* l'association avec les tissus lymphoïdes. Les fonctions du tractus gastro-intestinal sont régulées par des hormones du système nerveux autonome (**Reed *et al.*, 2009**).

II.3. Composants de l'appareil digestif

II.3.1. La cavité buccale

La bouche joue un rôle dans la mastication que ce soit au niveau du broyage c'est-à-dire la préparation à l'activité des enzymes mais aussi en terme de salivation : humidification des aliments, sécrétion d'amylases (qui démarrent la digestion des glucides) et alcalinisation. La bouche participe également à l'assimilation de certaines substances.

Il faut donc manger lentement et mastiquer longuement avant d'avaler, éviter de « mastiquer » à vide mais aussi éviter les édulcorants qui déclenchent la stimulation d'insuline.

La santé de la bouche est en étroite relation avec la santé de l'intestin. Il y aura une protection des muqueuses par les IgAs produites par le système immunitaire intestinal sous l'influence de la flore intestinale (**Rambaud ,2004**)

II.3.2. L'estomac

L'estomac est une poche digestive interposée entre l'œsophage et l'intestin (**Brooker, 1999**).

L'estomac est divisé en trois parties : le fundus, le corps et l'antrum. La première zone, appelée cardia, sous-partie du fundus, relie le sphincter de l'oesophage inférieur à l'antrum (**Huether *et al.*,2006**).

L'estomac est une zone de stockage temporaire des aliments, qui sont alors mélangés avec l'eau et les sucs gastriques afin de produire le chyme. Cet organe contrôle ensuite le passage de son contenu vers la partie supérieure de l'intestin grêle, le

duodénum, *via* la régulation du sphincter pylorique. Les cellules caliciformes produisent du mucus qui protège la muqueuse gastrique (Alcama 1996).

Les dimensions de l'estomac moyennement distendu sont de : 25 cm pour la longueur, 11 cm pour la largeur, 9 cm pour le diamètre antéro-postérieur. La forme générale de l'estomac est celle d'un J majuscule avec deux segments : un segment vertical et un segment horizontal (figure 6).

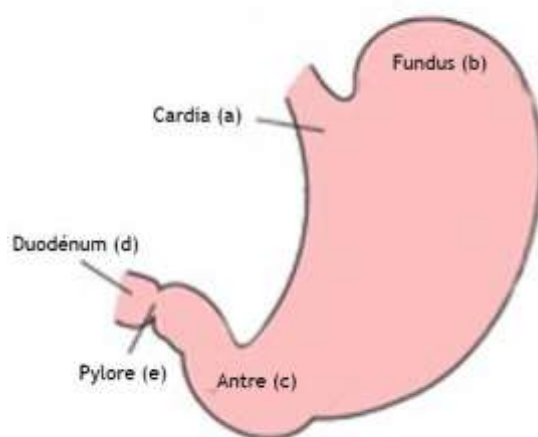


Figure 06 :L'estomac (Brooker, 1999)

L'évacuation gastrique commence en moyenne vingt minutes après le début du repas et se termine cinq à six heures après ce dernier. Le pylore sélectionne, il laisse passer les liquides et refoule les solides. Une heure après le repas, les solides sont évacués trois fois moins vite que les liquides. Par ailleurs, seules les particules solides de taille inférieure à 0,25 mm franchissent le pylore. L'évacuation des lipides est particulièrement lente, elle dure plus de six heures après l'ingestion du repas (Bigo, 2017).

L'estomac présente une quantité bactérienne de 10 cellules par gramme de contenu luminal. Le pH de l'estomac, acide chez l'Homme (entre 2,5 et 3,5), a un effet délétère pour la majorité des bactéries ingérées au cours des repas. Seuls les micro-organismes à Gram positif aérobies ou anaérobies facultatifs acido-tolérants sont capables de survivre et sont composés de lactobacilles, de streptocoques ainsi que d'espèces de levures. Cependant, des bactéries anaérobies strictes résistantes à l'acidité

gastrique peuvent s'y implanter, comme le pathogène *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), capable de se loger dans la couche de mucus (**Holzappel et al. 1998**).

Le rôle principal de l'estomac est de transformer les aliments à l'état de chyme semiliquide afin de les rendre acceptables pour l'intestin. L'agent de cette transformation est le suc gastrique. De plus, l'estomac sécrète un mucus qui forme une couche de protection pour la muqueuse gastrique vis-à-vis de l'acidité gastrique et qui, en lubrifiant les ingestas en facilite le passage vers l'aval.

II.3.2.1. Suc gastrique

Au niveau de l'estomac est synthétisé le suc gastrique. C'est un liquide incolore, de réaction très acide. Sa sécrétion journalière est d'environ 1500 cm³. Il est composé d'acide chlorhydrique, de pepsine, de rénine et d'un facteur intrinsèque (**Bigo, 2017**).

II.3.2.2. Acide chlorhydrique :

Le suc gastrique contient de l'acide chlorhydrique sécrété par les glandes du corps de l'estomac (**Bigo, 2017**).

- L'acide chlorhydrique a pour rôle :
- ✓ Le dégraissage et le début de digestion des protéines. En effet, l'acide chlorhydrique favorise la lyse des macromolécules en molécules plus simples. Il joue aussi un rôle d'antiseptique pour détruire les bactéries ingérées en même temps que la nourriture.
- ✓ La précipitation de certaines protéines en milieu acide (caséine) limitant leur hydrolyse par les enzymes, leur assimilation et leur reconnaissance par le système immunitaire.
- ✓ L'extraction et la réduction des minéraux (le fer sera à l'état Fe³⁺ au niveau de l'estomac).
- ✓ La stimulation de la sécrétion du pancréas.
- ✓ L'activation des ferments protéolytiques ; il transforme notamment le pepsinogène (inactif) en pepsine (active).

II.3.2.3. Pepsine

Le suc gastrique contient également la pepsine qui est sécrétée sous forme de pepsinogène par les cellules principales des glandes de l'antra et du fundus. La pepsine attaque les grosses molécules protidiques et les transforme en composés plus simples, les polypeptides. Elle décompose également le caséogène contenu dans le lait en un

polypeptide et en caséine ; la caséine est une protéine qui est attaquée aussi par la pepsine (**Bigo , 2017**).

II.3.2.4. Rénine :

Le suc gastrique peut aussi contenir de la rénine. Les cellules pariétales produisent la rénine.

La rénine et la pepsine sont impliquées dans la digestion du lait chez le nourrisson (**Bigo, 2017**).

II.3.3. Pancréas exocrine

C'est une glande mixte. C'est un organe digestif annexe qui joue un rôle important dans la digestion car il sécrète et déverse dans le duodénum une vingtaine d'enzymes qui dégradent tout type de substances présentes dans les aliments. Le suc pancréatique, produit de l'activité exocrine du pancréas, (**Brouker, 1999**) s'écoule par le conduit pancréatique. Des glandes endocrines libèrent de l'insuline et du glucagon.

II.3.4. L'intestin grêle

Il s'agit de la partie la plus distale du tractus gastro-intestinal. Dans le prolongement de l'intestin grêle, il est constitué du cæcum auquel est rattaché l'appendice, du côlon, du rectum et se termine par le canal anal. Le gros intestin présente une longueur comprise généralement entre 1,20 et 1,50 mètres. La valve iléo-caecale permet la transition entre l'iléon et le cæcum et assure ainsi la liaison entre l'intestin grêle et le gros intestin. Le côlon peut être divisé en 4 parties : le côlon ascendant, transverse, descendant puis la partie sigmoïde. La principale fonction du côlon est la réabsorption de l'eau et des électrolytes, débutée dans l'intestin grêle. Le canal anal se termine par deux sphincters : un involontaire interne et un volontaire externe (**Huether et al., 2006 ; Griffin-Sobel, 2007**).

La fonction principale de l'intestin est d'absorber l'eau et les nutriments contenus dans notre alimentation pour les rendre disponibles au reste de l'organisme (**Ducarouge ,2006**).

II.4. Conclusion sur les fonctions digestives du tube digestif

La digestion est un processus qui permet la transformation mécanique ou chimique des aliments en nutriments afin que ces derniers soient absorbés au niveau du système digestif.

Dans cette première partie, nous avons vu que dans la bouche, les aliments sont broyés par les dents. La salive les humidifie, les ramollit, les solubilise, et l'amylase attaque l'amidon cuit.

De plus, le lysozyme a une action antimicrobienne. Les actions mécaniques sont largement prédominantes et rendent les aliments prêts à être déglutis. La déglutition et le transit oesophagien permettent une arrivée progressive du bol alimentaire dans l'estomac. Il s'agit de phénomènes moteurs parfaitement coordonnés et contrôlés par le système nerveux extrinsèque.

Au niveau de l'estomac se forme le chyme : c'est le bol alimentaire broyé finement, acidifié par l'acide chlorhydrique, où les différents nutriments se trouvent solubilisés ou émulsifiés.

En définitive, les phénomènes mécaniques étaient plus importants dans la bouche, l'oesophage et l'estomac. En revanche, l'absorption est pratiquement nulle à ces endroits. A l'inverse, les phénomènes chimiques sont prédominants dans l'intestin grêle. Lorsque le chyme, acide, arrive au niveau duodénum, les sécrétions intestinales, biliaires et pancréatiques se déversent dans le duodénum. Ces sécrétions attaquent de façon puissante les aliments.

C'est dans l'intestin grêle que se fait presque toute l'absorption. Le gros intestin, qui est la partie terminale du tube digestif, a surtout pour fonction d'absorber l'excès d'eau et de minéraux dissous. Les phénomènes chimiques sont représentés par le métabolisme des bactéries. Les selles sont alors éliminées par le rectum qui est la terminaison du gros intestin (**Dupin , 1992**) .

Partie Pratique

Chapitre III

Matériels et méthodes

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES.

L'ensemble de ce travail a été réalisé au laboratoire des micro-organismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS,)entre mareset avril 2019 de l'université Abdelhamid Ibn Badis (INES), Mostaganem.

III.1. Matériels

III.1.1. Souches utilisées

Dans cette étude, neuf souches bactériennes ont été utilisées, dont huit ont été nouvellement isolées à partir des intestins et de la chair de l'anchois et une souche probiotique de référence Bb12.

*Dans le milieu MRS

- **CH₁ : A**
- **CH₂ : B**
- **I₁ : C**
- **I₂ : D**
- **Bb12 : E**

*Dans le milieu M17

- **CH₁ : F**
- **CH₂ : G**
- **I₁ : H**
- **I₂ : I**

III -1-2 Appareils utilisés

- ✓ L'étuve :Etuve universelle de 5 à220°C.
- ✓ Spectrophotomètre : UV-Visible double faisceau (JENWAY 7305 UV/VIS).
- ✓ Centrifugeuse : (ROTOFIX 32 A).
- ✓ Bain Marie (KOTTERMANN).
- ✓ Agitateur magnétique (VELP scientifica).
- ✓ vortex (Stuart).

- ✓ Balance (KERN) Max 421g d= 0.01g, Balance (KERN) Max 6100g d= 0.1g.
- ✓ PH mètre (WTW Ph 330).
- ✓ Micro pipette (Smart) « 100 -1000 µl », Micro pipette (Unique) « 10 – 50 µL ».

III .1.3. Les milieux de culture

- **Bouillon MRS** : Le bouillon MRS de MAN, ROGOSA et SHARPE (**De Man et al, 1960**), référence E Merck, 64271 Darmstadt, Allemagne, a été utilisé pour la réactivation des souches.

- **Bouillon M17** : le bouillon M17 (**Terzaghi et Sandine, 1975**), (Merck) est utilisé pour la réactivation des souches.

- **MRS gélosé**:le gélose MRSde MAN, ROGOSA et SHARPE (**De Man et al. 1960**)utilisé pour la culture et dénombrement des bactérie lactique, etauclové 15 minutes à 121°C.

- **M17 gélosé** :est utilisée in vitro pour la culture et dénombrement des bactéries lactiques et autoclavé 15 minutes à 121°C.

- **Eau physiologique** : utilisé pour lavage et la dilution.

III.2. Repiquage et revivification

Les souches ont été réactivées et maintenues vivantes par un repiquage d'un inoculum de 1% dans le milieu MRS bouillon et le milieu M17 bouillon, incubées à 37°C pendant 24 h et sont ensuite conservées à 4°C.

III.2.Vérification de l'identité des souches

Avant de procéder aux cultures, les souches bactériennes utilisées ont été sujettes aux colorations au bleu de méthylène et de Gram.

III.2.2.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 M17 bouillon et incubées à 37°C pendant 24h dans une jarre d'anaérobiose (Anaérocult).

III.2.3. Ajustement de l'inoculum

L'ajustement de l'inoculum s'effectue à l'aide d'une cellule de Thomas. 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.

III .2.4 Dénombrement et conditions de croissance

Le dénombrement des bactéries lactiques : A, B, C, D et F, G, H, I est réalisé (24 h à 48 h à 37°C), respectivement sur milieux M17 et MRS gélosé, celui de E(Bb12) sur milieu MRS gélosé.

**L'incubation des boites inoculées est faite en anaérobiose (Bougie et système d'anaérocult A) pour l'ensemble des souches étudiées.

III.3.Pré-identification des isolats

III.3.1. Caractérisationmacroscopique

Une observation macroscopique a permis de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu solide (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité, couleur).

III.3.2. Caractérisationmicroscopique

L'observation microscopique avec l'objectif à immersion (G x 100) a permis de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire et leur mode d'association (**Joffin et Leyral, 1996**).

III.4. Survieaux conditions digestives simulées

Les souches seront sujettes à un model gastro-intestinal dynamique simulé.

III.4.1. Effet de l' α - amylase salivaire sur les pobiotiques

- Préparer une solution stérile (filtres Whatman polysulfoné, 0.22 μ m) de α -amylase à raison de 75 UE dans le tampon acétate de sodium (0.1 M, pH =5.6).
- Faire incuber 4 h à 37°C, 1 ml d'une culture bactérienne (concentration finale 1 à $5 \cdot 10^{10}$ UFC/ml) dans 9 ml de la solution enzymatique. (*)

- prendre 100 μ L du milieu réactionnel diluédéposer desspots sur milieu MRS gélosé et M17 gélosé.
- dénombrer les cellules viables après une incubation des boites de Pétri 24 et 48 h à 37°C.
- Mesurer la densité optique de ces solutions enzymatiques à t= 0 min et t=4h des souches à une longueur d'onde 600 nm.

III .4.2.Mesure de la taux de survie des souches vis-à-vis du jus gastrique, pancréatine et de la bile (model gastro-intestinal simulé). ☐

- **Compartiment Estomac**

- Préparer les conditions simulées de l'estomac avec de la pepsine (0.3%, p/v dans le tampon HCL-KClà pH = 2, stérilisée sur filtres millipores 0.22 μ m).
- Prendre 100 μ L du culot bactérien (*) de **III-3-1** (centrifugation à 5000 \times g / 10 min à 4 °C) et le mélanger avec la préparation gastrique simulée.
- Incuber à 37°C pendant 120 minutes..... (**)
- Evaluer la survie des bactéries lactiques aux conditions hostiles de l'estomac aux intervalles de temps suivants : 0, 30, 60 et 120 min.

- **Compartiment de pancréas**

- Préparer les conditions simulées de pancréas avec les enzymes pancréatiques. (0,1%, dans le tampon PBS, pH=8, stérilisées sur filtres millipores 0.22 μ m).
- Utiliser comme source du complexe enzymatique une capsule de Creon ®10 000 composée de :
 - 150 mg de pancréatine
 - 10 000 F.I.P. unités de lipases
 - 8 000 F.I.P unités d'amylases
 - 600 F.I.P unités de protéases
- Prendre 100 μ L du culot bactérien (***) de **III-3-2** (centrifugation à 5000 \times g / 10 min à 4 °C) et le mélanger avec la préparation pancréatique simulée.☐
- Incuber à 37 °C pendant 02 h (***)).
- faire les spots dans les boites pétries après la dilution.
- Dénombrer les cellules viables après une incubation des boites de Pétri24h et 48h à 37 °C.

• **Compartiment Intestins**

- Préparer les conditions simulées de l'intestin avec de la bile (0.3%, p/v dans le tampon phosphate à pH = 8, stérilisée sur filtres millipores 0.22 µm).
- Prendre 100 µL du culot bactérien (***) de **III-3-2** et le mélanger avec la préparation intestinale simulée.
- Incuber à 37 °C pendant 16 h.
- Evaluer la survie des bactéries lactiques aux conditions intestinales par dénombrement sur milieu gélosé (méthode des spots) et par mesure de la densité optique à 600 nm.

III.4.4. Traitement statistique

Des résultats Chaque expérience a été indépendamment répétée trois fois dans un dispositif en randomisation totale et les résultats obtenus ont été soumis à l'analyse de variance (ANOVA) en utilisant le logiciel STATBOX (version 6.1, France).

La comparaison de moyennes a été réalisée par le test de Student-Newman-Keuls au seuil de 5% pour comparaison multiple. $AP < 0.05$, la différence est considérée signification.

Chapitre IV

Résultats Et Discussion

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Survie aux conditions digestives simulées

IV.1.1. Effet de l' α -amylase salivaire sur les souches testées

L'histoire d'amylase a commencé en 1811 lorsque la première enzyme de dégradation d'amidon a été découverte par Kirchoff, ceci a été suivi par la mise en évidence d'une amylase digestive et une amylase de malt et c'est en 1930 qu'Ohlsson a proposé le classement de β amylase et l' α 1,4-a-D-glucan-glucanhydrolase, EC. 3.2.1.1) selon le type du sucre produit par la réaction (**Gupta et al., 2003**).

Selon **Kashket et al., (1988)**, les proportions de cette enzyme dans la salive seraient plus élevées à raison de 1.6g par 24 heures. Bien que très active au niveau buccal (pH entre 5 et 7), cette enzyme se limite à ce niveau en raison du pH gastrique de 2 qui la dénaturerait (**Rosenblum et al., 1988**).

Les résultats de la résistance des 9 souches testées à l' α -amylase sont exprimés sur les **figures 7 et 8**. Les souches utilisées ont montré leur résistance pendant leur passage à la cavité buccale (la salive) avant d'arriver au niveau de l'estomac.

Au début les souches (F, H, I) ont affiché un taux de survie très important de 93,24% jusqu'à 181,81%, par rapport à la souche Bb12 qui affiché un taux de survie de 89.9% (**figure 07**).

Sous l'effet de l' α amylase, nous avons constaté une faible diminution de taux de survie (89.9%) pour les cellules de la souche Bb12, contrairement aux souches (F, H, I) qui affichent un taux élevé après l'action de l' α amylase, Ceci reflète la bonne tolérance de ces souches aux conditions buccales.

Nos résultats se concordent d'une part avec les nombreux travaux qui démontrent une très bonne résistance chez les bactéries lactiques à l' α -amylase salivaire (**Reid et al (2007)**).

Ensuite les souches (A, B, C, D, G) ont affiché un taux de survie faible de 12,36% jusqu'à 77,58%, par rapport au taux de survie de la souche de références Bb12 (90%).

Sous l'effet de l' α amylase, nous avons remarqué une diminution du taux de survie des souches (B, C, D) par rapport au taux de survie de la souche Bb12. Ceci reflète une faible tolérance de ces souches aux conditions buccales.

RESULTATS ET DISCUSSION

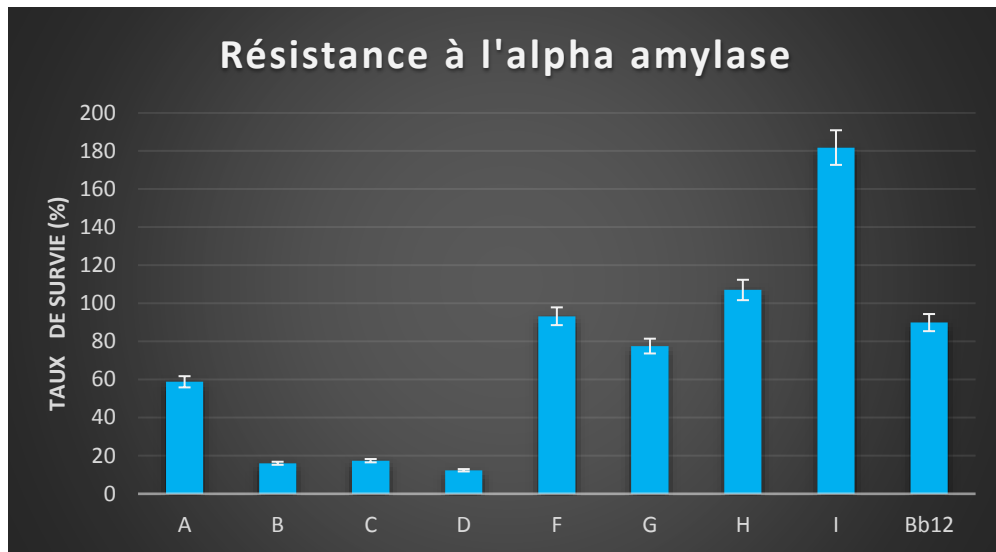


Figure 07 : survie des souches (A,B,C,D,F,G,H,I) et Bb12 après 04 heures d'incubation à 37°C+pH=5,6 en présence d' α - amylase salivaire.

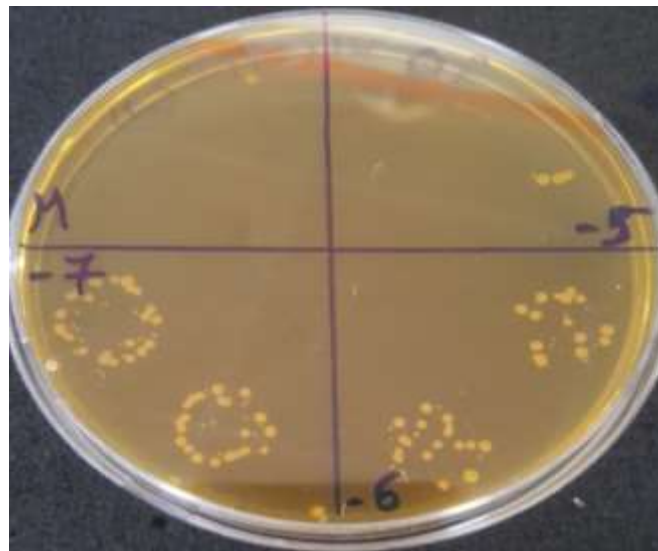


Figure 08 : Résistance des bactéries lactiques aux conditions digestive simulées (α - amylase salivaire.pH =5,6)

IV.1.2. Mesure de la tolérance des souches testées vis-à-vis du jus gastrique, de la pancréatine et de la bile

IV.1.2.1. Compartiment Estomac

La pepsine est une enzyme de suc gastrique qui joue un rôle dans la digestion des protéines. Après avoir subies l' α amylase salivaire, les souches (A, B, C, D, F, G, H, I) et Bb12 ont été mises sous l'action de la pepsine (3g/L) associée à une acidité de pH= 2 simulant les conditions gastriques. Les effets de ces conditions sur les souches bactériennes ont été suivis à des intervalles de temps de 0, 30, 60 et 120 min. Les résultats obtenus sont représentés sur la **figure 9** et la croissance bactérienne est illustrée sur la **figure 10**.

A 30 min les souches (A, B, C, D, F, G, H) testées ont exprimé des taux de survie allant de 22,5% jusqu'à 48,71%, par rapport la souche Bb12 qui affiché un taux de survie de 225,9%.

Ces résultats révèlent que les souches sont tolérantes à ces conditions hostiles de l'estomac.

En contre partie la souche (I) est exprimé de taux de survie très important 233.3% par rapport le taux de survie de Bb12, donc la souche (I) a une plus résistance aux conditions de l'estomac.

A 60 min les souches (A, B, C, D, F, G, H) testées ont exprimé des taux de survie de 31,5% jusqu'à 62,5% , par rapport la souche Bb12 qui affiché un taux de survie de 97,5% .

Et la souche (I) est exprimé de taux de survie très important 307,4% par rapport le taux de survie de Bb12, donc les souches (A, B, C, D, F, G, H) ont une faible résistance par contre la souche (I) a une forte résistance aux conditions de l'estomac.

A 120 min les souches testées (A, B, C, D, F, G, H) ont exprimé des taux de survie entre 38,8% et 84,2%, il y a une moins résistance par rapport la souche de référence. Et on trouve que la souche (I) aussi a une bonne tolérante avec un taux de survie 213,3% par rapport le taux de survie de Bb12 (96,5%).

RESULTATS ET DISCUSSION

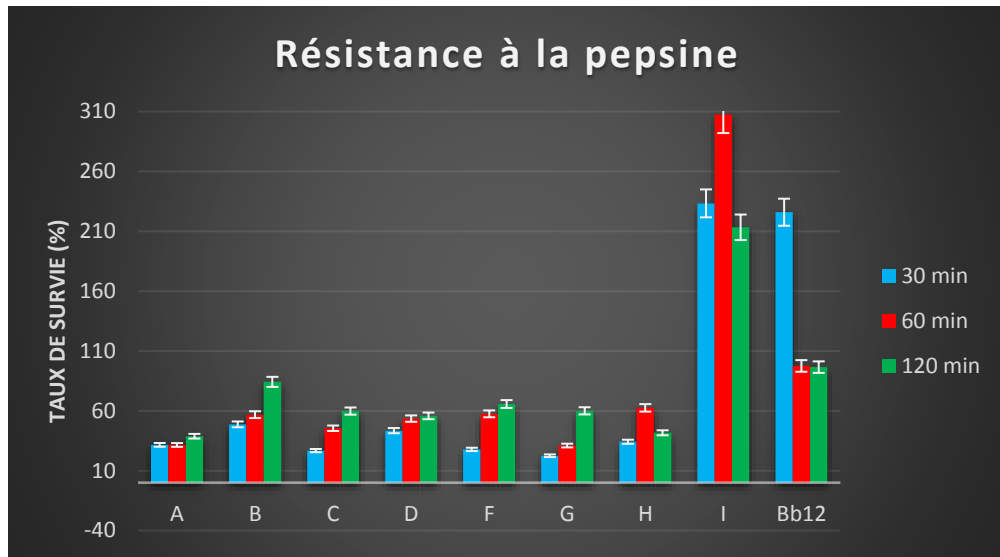


Figure 09 : Survie des souches (A, B, C, D, F, G, H, I) et Bb12 aux conditions gastriques simulées (3g/L pepsine + pH 2).

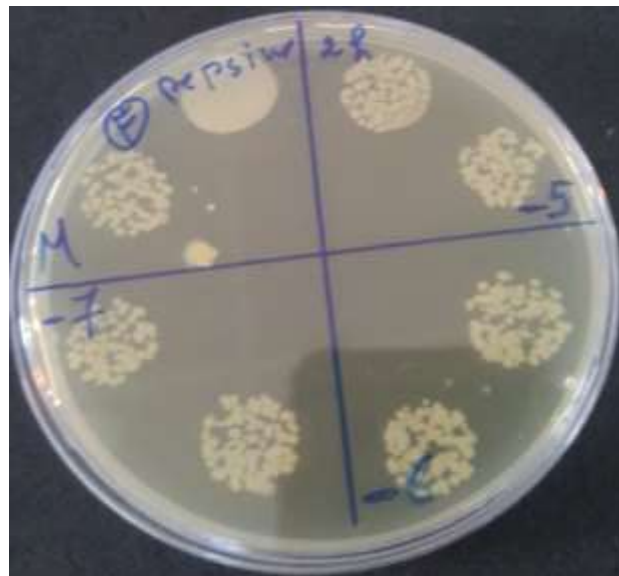


Figure 10 : Résistance des bactéries lactique aux conditions gastriques simulées (3g/L pepsine + pH 2).

Ces résultats sont en accord avec l'étude réalisée par **Rahli. (2013)**, qui ont prouvé une résistance remarquable des souches étudiées additionnées de 3mg /mL de la pepsine à pH 3 pendant 3h. D'une autre part, **Tokath et al. (2015)**, ont rapporté que les taux de survie de *Lb .plantarum* et *Lb .breve* exposées aux mêmes conditions étaient importantes sauf pour la souche *Lb. breve* MF343.

IV.1.2.2. Compartiment Pancréas

L'influence des sécrétions digestives sur la survie des bactéries lactiques ingérées n'a pas encore été clairement démontrée *in vivo*. Des modèles *in vitro* existent cependant et ont permis des études préliminaires (**Charteris et al., 1998 ; Marteau et al., 1997**).

Après avoir traversé les barrières buccales et gastriques, les souches étaient transférées aux conditions pancréatiques simulées sous l'action de la pancréatine (0.1%) pendant 2 h.

Les résultats affichés par les souches testées vis-à-vis de la pancréatine sont représentés sur la **figure 11**, exprimés en taux de survie (%). La croissance bactérienne est illustrée sur la **figure 12**.

Les résultats obtenus dans cette partie par les souches testées (A, B, C, D, F, G, H, I) et (Bb12) ont montré une tolérance à la pancréatine pour les souches (à 49,4% jusqu'à 60,3%) inférieure à celle de la souche Bb12 qui affiche (89,9%) du taux de survie à ces conditions.

RESULTATS ET DISCUSSION

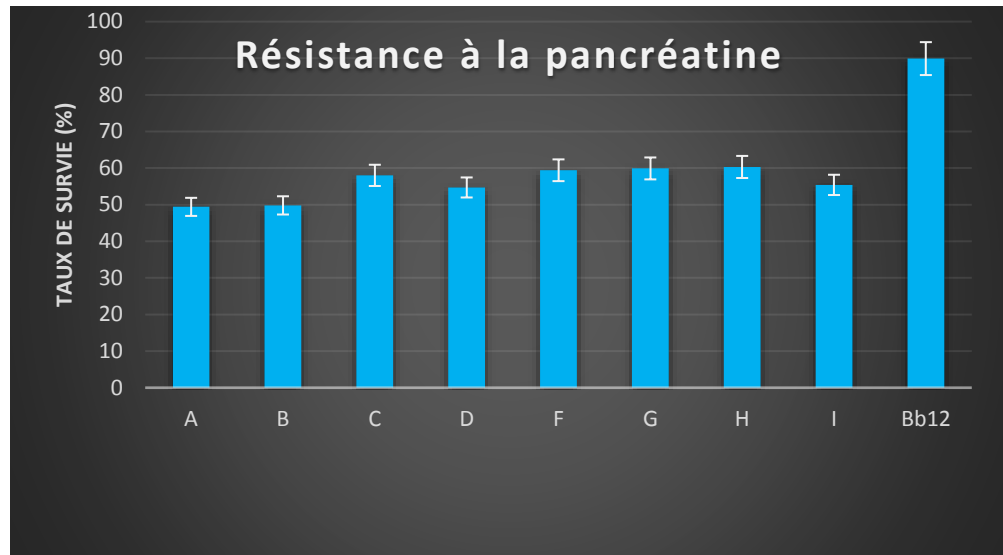


Figure 11: Survie des souches (A, B, C, D, F, G, H, I) et Bb12 sous conditions pancréatiques simulées (1g/L pancréatine + pH 8).

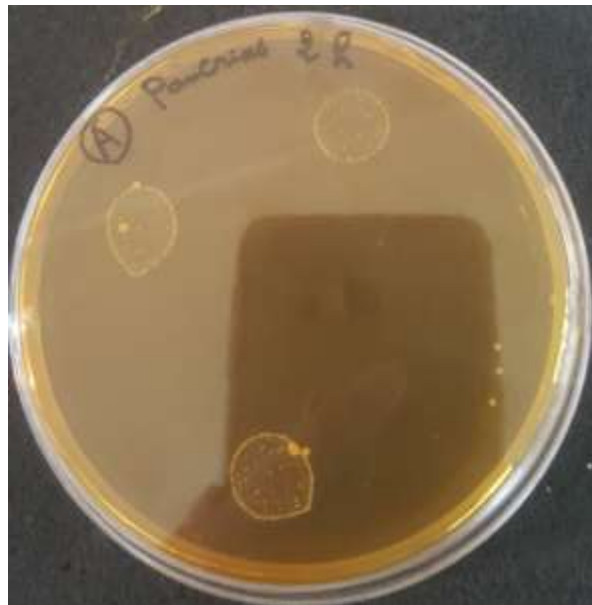


Figure 12: Croissance des bactéries lactiques dans les conditions pancréatiques simulées (1g/L pancréatine + pH 8).

RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. 2.3. Compartiment Intestins

Après avoir traversé les barrières buccales et gastriques, les souches étaient transférées aux conditions intestinales simulées sous l'action de la bile (0.3%, p/v) pendant 16 heures. Les sels biliaires sont l'une des barrières à franchir par les bactéries probiotiques pour gagner leur site d'action, de ce fait la résistance des souches étudiées en présence de 0,3% des sels biliaires a été testée, ensuite la proportion de cellules viables a été évaluée.

Les résultats de ce test sont représentés sur la **figure 13**, exprimés en taux de survie (%), la croissance bactérienne est illustrée sur la **figure 14**.

Les résultats obtenus dans cette partie par les souches testées (G,I) ont montré une bonne tolérance aux sels biliaires pour la souche (G)77%et la souche(I) 89,6% par rapport à la souche Bb12dont le taux de survie est de 61,6 %, donc on note une perte cellulaire pour la souche Bb12.

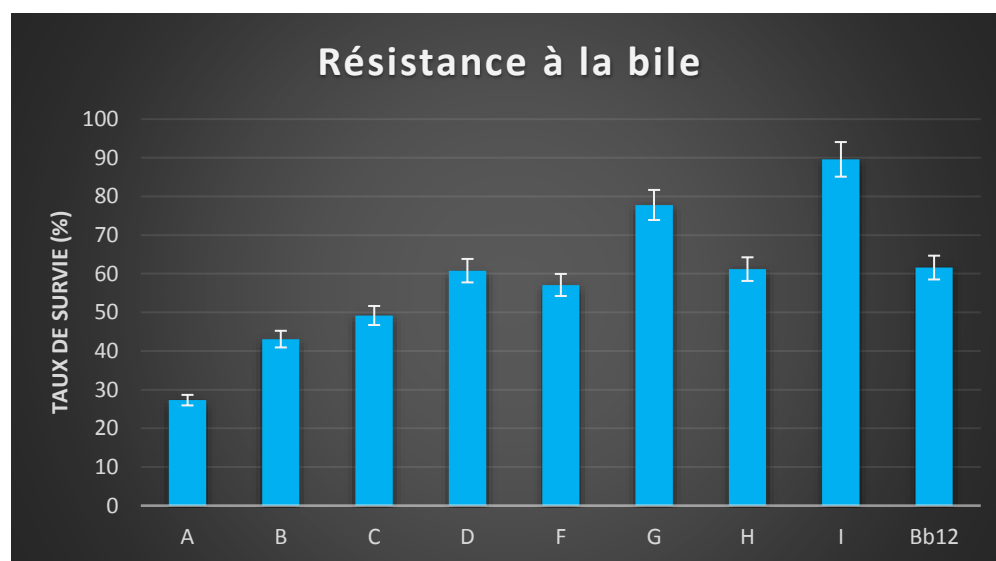


Figure 13: Survie des souches (A, B, C, D, F, G, H, I) et Bb12 sous conditions intestinale simulées (3g/L de la bile + pH8).

RESULTATS ET DISCUSSION

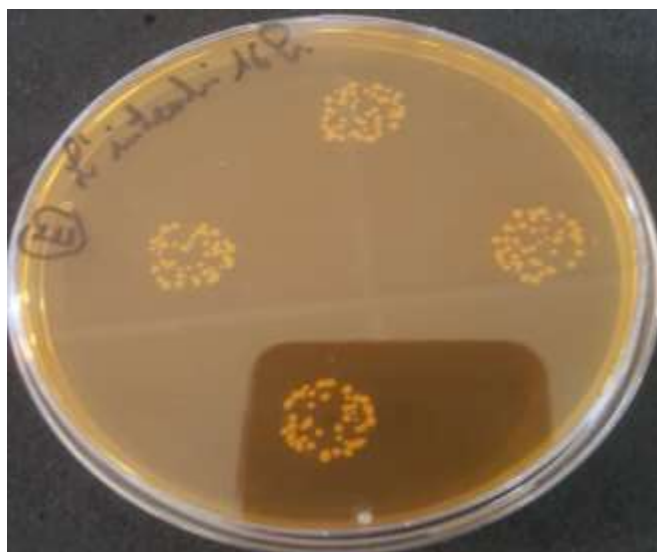


Figure 14 : Croissance des bactéries lactiques dans conditions intestinale simulées (3g/L de la bile + pH8).

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Boonklao et al. (2006)**, où les souches de *Lactobacillus thermotolerans* isolées de la matière fécale de poulet tolèrent 0,3% de sels biliaries.

Des résultats publiés par **Burns et al. (2008)**, ont montré que la plus part des souches de *Lb. delbrueckiissp. bulgaricus* et *Lb. delbrueckiissp. lactis* sont sensibles aux sels biliaries. Alors que nos résultats montrent le contraire.

D'une part les résultats obtenus dans cette partie par les souches (A, B, C, F) ont exprimé des taux de survie entre 27,3% et 57,1%, il y a une résistance faible par rapport la souche de référence Bb12.

D'après l'étude réalisée par (**Marteau et al. 1997**), qui a clairement démontré, in vitro, que les sels biliaries avaient un effet bactéricide. De la même manière que pour l'acidité gastrique, cette étude démontre une différence dans la sensibilité aux sels biliaries entre les espèces bactériennes *Lb. bulgaricus* et *S. thermophilus* ont un pourcentage de survie très faible par rapport aux taux affichés par *Lb. acidophilus* et *B. bifidum*. Les sels biliaries auraient un effet détergeant sur les membranes cellulaires résultant en une augmentation de la perméabilité cellulaire.

RESULTATS ET DISCUSSION

Et D'autre part les souches testées (D, H et Bb12) ont exprimé des taux de survie proches de 60,8% - 61,2% - 61,6% respectivement.

Sukumar et Ghosh (2010), ont rapporté que les souches de *Pediococcus* isolées à partir des produits alimentaires fermentés d'origine indiens ont montré une tolérance significative aux sels biliaire.

Une étude récente de **Tokath et al. (2015)**, a montré que les souches de *Lb. plantarum* et *Lb. brevis* (isolées de cornichons) ont présenté une résistance à 0,3% de sels biliaires après 4 heures d'exposition, alors aucune des souches de *Pediococcus* examinées étaient capables de résister à cette concentration après ce temps d'incubation.

Nos résultats de tolérance aux sels biliaires semble être en concordance avec plusieurs études ; **Amar sidi Mohamed.(2015)** ont étudié les potentialités probiotiques de 15 souches de *Lactobacillus* et 07 souches de *Streptococcus* isolés à partir de matières fécales, les bactéries testées étaient nettement plus résistantes aux sels biliaires à une teneur physiologique de 0,3% par rapport au milieu acide où la plupart des souches ont été inhibées.

Conclusion

CONCLUSION

Conclusion

Au cours de ce travail ,des souches lactiques A, B, C, D, F, G, H, I ont été isolées, purifiées et pré-identifiées à partir des échantillons de l'anchois. Les objectifs fixés étaient d'évaluer la résistance de ces souches ainsi que la souche probiotique de référence aux conditions digestives stimulées.

Les résultats obtenus montrent que les souches sélectionnées ont présenté une résistanceaux différentes conditions digestives hostiles lors de cette étude in vitro.

Les résultats du dénombrement de croissance sur milieu MRS et milieu M17pour le test d'alpha amylase (pH=5,6), représente une forte résistance comme la souche (I) avec une valeur de 181,81% et une faible résistance comme la souche (D) avec une valeur de12,36% par apport la souche de références Bb12 ayant un taux de89,9%

Le potentiel de résistance des souches a été montré pour les autres tests ; de pepsineet de bile tous les résultats montrent que la souche (I) aune forte résistance aux conditions digestives et présente un taux de survie élevé.

Nos résultats permettent de placer ces souches lactique comme candidates probiotiques qui doivent être engagées dans un parcours expérimental complémentaire visant à en explorer d'autres propriétés qui leurs permettraient de remplir les nombreux critèresrequis pour l'acquisition du statu probiotique.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- **Adam, C.A.** The probiotic paradox: live and death cells are biological response modifiers. *Nutrition Research Reviews* **2010**. Vol. 23 (1):37-46.
- **Alcamo I. E. (1996)**. "Anatomy and physiology." Hauppauge NY: Barron's Educational Series, Inc.
- **Amar Sidi Mohamed El Yacine (2014-2015)**. Effet préventif et curatif de certains aliments fonctionnels sur le développement du cancer colorectal **p**.
- **Ammor Mohammed Salim, Ana Belen Florez, Baltasar Mayo.(2007)**. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Food Microbiology* **24:559–570**.
- **Benjamin DUCAROUGE, 2006**, Régulation des systèmes d'adhérence cellulaire par le CRF2: Un effecteur du Stress dans le tube digestif, +THÈSE de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE, p 207.
- **Berg R. D., 1998**. Probiotics, prebiotics or ‘conbiotics’. *Trends in Microbiology*, **6**, 89-92.
- **Boonklao P, kongthong P et Assavaning A. (2006)**. Acid and bile tolerance on *Lactobacillus thermotolerans* a novel species isolated from chicken feces. *Kasetsart J Naturel Science*. **40**, 13-17.
- **Bry, L., Falk, P. G., Midtvedt, T., and Gordon, J. I. (1996)**. A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science* **273**, 1380-1383.
- **Burgain J., Gaiani C., Jeandel C., Cailliez-grimal C., Revol A.-N., Scher J.** « Maldigestion du lactose : formes cliniques et solutions thérapeutiques ». *Cahier de Nutrition et de Diététique*. **septembre 2012**. Vol. 47, n°4, p.201-209.
- **Burns P, Vinderola G, Binetti A, Quiberoni A, Gavilan CG et Reinheime RJ. (2008)**. Bil-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. *Int J Dairy*. **18**, 377-385.
- **Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K (1998)**., Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract, *J. Appl. Microbiol.* **84** 759- 768.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Christine Brooker (1999)** Le corps humain : Etude, structure et fonction) Le tube digestif
- **Christine Brooker (1999)** Le corps humain : Etude, structure et fonction) image L'estomac
- **Colado M.C., Hernandez M. & Sanz Y.** Production of bacteriocine-like inhibitory compounds by human fecal Bifidobacterium strains. *Journal of Food Protection* **2005**. 68:1034-1040.
- **Corrieu, G. & Luquet, F. M.** Bactéries lactiques : De la génétique au ferment. Paris : Édition Tec et Doc **2008**, p.849.
- **Dalmaso G, Cottrez F et al.** Saccharomyces boulardii inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymph nodes. *Gastroenterology*. **2006** Dec; 131(6):1812-25.
- **De Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., and Schrezenmeir, J. (2001).** Probiotics--compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* 73, 421S- 429S.
- **Dunne, C.L., L.M. O'Mahony, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. O'Sullivan, F. Shanahan and J.K. Collins, (2001).** *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr*, 73: 386- 392.
- **Dupin H. (1992)** Alimentation et nutrition humaines (Editions : ESF).
- **FAO/WHO (2002)** Report of a Joint FAO-WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
- **Felis G. E., Dellaglio F.** « Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria ». Current issues in intestinal microbiology. **septembre 2007**. Vol. 8, n°2, p.44-61.
- **Flourie B., Nancey S.** « Propriétés fonctionnelles des probiotiques ». Cahiers de Nutrition et de Diététique. **avril 2007**. Vol. 42, n°HS2, p.38-44.
- **Griffin-Sobel J. P. (2007).** "Gastrointestinal cancers." Pittsburg, PA: Oncology Nursing Society.
- **Huether S. E. and McCance K. (2006).** "Structure and function of the digestive system in pathophysiology: The biologic basis for disease in adults and children." St. Louis, MO: Elsevier Mosby: 1353-1383.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Leahy, S. C., Higgins, D. G., Fitzgerald, G. F. & van Sinderen, D.** Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* **2005**. Vol. 98 (6):1303-1315.
- **Lebeer, S., J.Vanderleyden, and S. C. J. Keersmaecker. (2008).** Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 728-764.
- **Christine Brooker (1999)** Le corps humain : Etude, structure et fonction) Le tube digestif
- **Christine Brooker (1999)** Le corps humain : Etude, structure et fonction) image L'estomac
- **Leveau J.-Y., Bouix M.** Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel. Paris : Tec & Doc - Lavoisier, **1993**. 612p.
- **Lilly D. M. and Stillwell R. H. (1965).** "Probiotics : growth-promoting factors produced by microorganisms." *Science* 147(3659): 747-748.
- **Marteau P., Minekus M., Havebaar R., Huis in't Veld J.H., (1997) ;** Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and effects of bile, *J. Dairy Sci.* 80 1031-1037.
- **Marteau P.** « Facteurs de contrôle de la flore. Définitions et mode d'action des probiotiques et prébiotiques ». In : Flore microbienne intestinale : physiologie et pathologie digestive. Montrouge : John Libbey Eurotext, **2004**. p.37-58.
- **Melle Mathilde BIGO, 2017,** La micronutrition dans le traitement des troubles digestifs : Rôles et conseils du pharmacien d'officine, THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE, Université de Lille 2, p160.
- **Metchnikoff E. (1907).** Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. *In: The prolongation of life: Optimistic studies.* W. Heinemann, London: 161-183.
- **Ninane V., Mukandayambaje R., Berben G.** Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir : le point sur la situation réglementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir . *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement.* **2009**. Vol. 13, n°3, p.8.
- **Palomares, C., Pérez-Morales, R., Acedo-Félix, E. (2007).** Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. Vol. 49, Nos. 3-4 July - September. 2007 pp. 46 – 54.
- **Parker R. B. (1974).** "Probiotics: the other half of the antibiotic story." *Animal nutrition and health* 29: 4-8.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Quevrain E., Seksik P.** « Microbiote intestinal : de la diarrhée post-antibiotiques aux maladies inflammatoires intestinales ». La Presse Médicale. **janvier 2013**. Vol. 42, n°1, p. 45-51.
- **Rahli F, Saidi N et Kihal M. (2013)**. Evaluation of the factors affecting the variation of the physicochemical composition of Algerian camel's raw milk during different seasons. *Adv Environ Biol.* 7 Suppl 14 : 4879-4884.
- **Rambaud JC. (2004)** Flore microbienne intestinale : physiologies et pathologies digestives (Editions : Libbey)
- **Rampal P.** « Les levures : classification, propriétés, utilisations technologiques et thérapeutiques ». *Journal de Pédiatrie et de Puériculture.* **1996**. Vol. 9, n°3, p.185-186.
- **Reed K. . and Wickam R. (2009)**. "Review of the gastrointestinal tract: from macro to micro." *Seminars in oncology nursing* 25(1): 3-14.
- **Reid G., Jass J., Sebulsky M. T. and McCormick J. K. (2003)**. "Potential uses of probiotics in clinical practice." *Clinical microbiology reviews* 16(4): 658-672.
- **Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** Cordoba (Argentina) : FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization),**2001**.
- **Ruseler-van Embden, J. G., van Lieshout, L. M., Gosselink, M. J., and Marteau, P.(1995)**. Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *L. acidophilus*, and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. *Scand J Gastroenterol* 30, 675-680.
- **Sommer F, Backhed F.** The gut microbiota masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* **2013**;11:227—38.
- **Sukumar G et Ghosh AR. (2010)**. *Pediococcus* spp a potential probiotic isolated from Khadi (an Indian fermented food) and identified by 16S rDNA sequence analysis. *Af J of Food Science* 4 Suppl 9: 597–602.
- **Stéphanie DA SILVA , 2013**, Conséquences d'un stress chronique sur la barrière de mucus intestinal chez le rat : effet du probiotique *Lactobacillus farciminis* DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE ,p 300
- **Tannock, G.W., (1997)**. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends Biotechnol*, 15, 270-74.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Wallace, T. D., Bradley, S., Buckley, N. D. & Green-Jonhson, J. H.** Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: Effects on cytokine production. *Journal of Food Protection* **2003**. Vol. 66 (3) : 466-472
- **Site internet** : http://physiologie.envt.fr/spip/IMG/pdf/Phys_digest_9.pdf (Article consulté le **26/05/16**)

Annexes

ANNEXE

La composition des milieux de culture ci-après, est calculée pour un litre de milieu de culture. Tous les milieux préparés (bouillons ou gélosés) sont autoclavés à 121 C/15min.

***Milieu MRS (de man, rogosa et sharpe) (de man et al, 1960) :**

Glucose	20g
Peptone	10g
Extraits de viande de bœuf	8g
Acétate de sodium, 3H ₂ O.....	5g
Extraits de levure.....	4g
K ₂ HPO ₄	2g
Citrate d'ammonium.....	2g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,2g
MnSO ₄ .4H ₂ O.....	0,05g
H ₂ O.....	1000 ml
Tween 80.....	1 ml
PH.....	6,5

***Milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)**

Peptone trypsine de caséine.....	10g
Peptone trypsine de viande	2,5g
Peptone papaique de soja.....	5g
Extrait de levure.....	2,5g
Extraits de viande.....	5g

ANNEXES

D-glycérophosphate de sodium.....	13g
MgSO ₄	0,25g
Lactose.....	5g
Acide ascorbique.....	0,5g
H ₂ O.....	1000 ml
PH.....	7,1.

Tampon citrate de sodium :

Component	Mass	Molarity
Sodium Citrate dihydrate (mw: 294 g/mol)	21.238 g	0.0722 M
Citric Acid (mw: 192.1 g/mol)	5.333 g	0.0278 M

1. Préparer 800 ml d'eau distillée.
2. Ajouter 21.238 g de Sodium Citrate dihydrate à la solution.
3. Ajouter 5.333 g de Citric Acide à la solution.
4. Ajuster le pH à 5,6 avec HCl ou NaOH.
5. Compléter à 1 litre avec l'eau distillée.

Tampon Hcl Kcl:

Component	Mass	Molarity
Potassium chloride (mw: 74.5 g/mol)	7.45 g	0.1 M
Hydrochloric acid (mw: 36.46 g/mol)	772 mg	0.02 M

1. Préparer 800 ml d'eau distillée.
2. Ajouter 7.45 g of K CL.
3. Ajouter 772 mg de Hcl.
4. Ajuster le Ph final à 2
5. Completer à 1 litre avec l'eau distillée.

ANNEXES

***Tamponphosphate (PBS):**

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