

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

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

Présenté par :

ZITOUNI Nedjla Djannat

SAID BEKKOUCH Nour El Houda

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN NUTRITION ET PATHOLOGIE

Spécialité : Alimentation, Nutrition et Pathologie

Thème :

**Activité anti-inflammatoire de certaines bactéries
probiotiques isolées du poisson**

Devant le Jury :

- | | | | |
|-----------------|-----------------------|-----|---------------|
| - Président : | Dr CHAALEL Abdelmalek | MCA | U. Mostaganem |
| - Encadrante: | Dr YAHLA Imène | MCB | U. Mostaganem |
| - Examinatrice: | Dr BOUKAZZOULA Nawel | MAA | U. Mostaganem |

Année universitaire : 2019/2020



Remerciements

Le début de notre travail a été réalisé équitablement dans laboratoire des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS ,site 3(ex :INES)).

Nos vifs remerciements vont d'abord à notre encadrante

Dr YAHLA IMENE

Votre compétence, votre encadrement ont toujours suscité notre profond respect. Nous vous remercions pour votre accueil et vos conseils. Veuillez trouver ici, l'expression de nos gratitudee et de notre grande estime.

Nous remercions Dr CHAALEL Abd El Malek MCA à l'Université de Mostaganem qui a accepté de présider ce jury et qui trouve ici notre haute considération.

Nos sincères remerciements vont aussi à Mme BOUKAZOULA N MAA à l'Université de Mostaganem pour avoir accepté d'examiner la qualité de ce travail.

A Nos Enseignants

Nous avons eu l'honneur d'être parmi vos étudiants et de bénéficier de votre riche enseignement. Vos qualités pédagogiques et humaines sont pour nous un modèle, votre gentillesse, et votre disponibilité permanente ont toujours suscité notre admiration.

Merci à vous tous ...





Dédicace...

*A mes chers grands parents, à qui je leurs dois beaucoup de choses
et qui m'ont tout appris,*

A la personne qui n'a jamais perdu espoir

*A mon frère le Docteur Abdeli Mokhtar et à mes parents ainsi qu'à
mes petits frères : Fatima Zohra, Mohamed, Maroua et Omar,
Hebib et Belkiss,*

A mon deuxième grand frère Abeli Chafik,

*A Mon encadrante Mademoiselle I.YAHLA pour sa compréhension
son soutien et sa sagesse,*

*A meilleures amies Soumia et Meriem, à mes amies : Houda,
Wisseem, kaouther, Sara, Siham, Lamia,*

*A mes camarades en master (nutrition et pathologies) avec qui j'ai
partagé tous les moments et les souvenirs (les beaux et les
mauvais),*

A la famille Zitouni,

A tout le monde.



Zitouni Nadjla Djenat



Dédicace...



Merci Allah de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir.

La force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire.

" Ya Karim Ya Rahim "

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie mon travail à mes très chers, respectueux et magnifiques parents Kouider et Ramdane Latifa qui m'ont soutenus tout au long de ma vie ainsi à mon frère

Abd Essamed, et mes sœurs Aya, Douaa et mes meilleures amies

Kaouther, Sara, Wissem et Soulef, et mes amis Sihem ,Nadjla ,Soumia et Meriem .

A Mon encadreur DR yahlla IMEN .

A toute personnes qui m'ont encouragé ou aidé au long de mes études.



Said Bekkouch Nour El Houda



Résumé

Les bactéries probiotiques ont la capacité de modifier la réponse immunitaire en conférant un traitement aux maladies inflammatoires. Dans la présente étude nous avons étudié plusieurs articles réalisés dans le but d'explorer le potentiel anti-inflammatoire des bactéries probiotiques afin d'étudier le maximums de paramètres ; la première étude réalisée *in vitro* s'est focalisée sur la réponse immunitaire au niveau génétique des cellules Caco-2 ayant subi une inflammation induite par la lipopolysaccharide et traitées par des probiotiques du genre *Lactobacillus plantarum* subsp. Par la suite, l'expression génique des gènes pro-et anti-inflammatoires a été étudiée par PCR.

Concernant le second article des propriétés fonctionnelles comme supplément durable à long terme pour l'inflammation ainsi que l'effet des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont été explorés sur des souches de bactérie lactiques dont le potentiel anti-inflammatoire était déjà étudiée ainsi qu'une formulation probiotique multi-souches (*L. rhamnosus*, *b. Lactis* et *b. Longum*).

Les résultats de ces recherches ont démontré le pouvoir anti-inflammatoire des bactéries probiotiques sur le plan génétiques, les souches étudiées avaient induit la baisse de l'expression génique de cytokines pro-inflammatoires et régulé à l'augmentation de celle des Cytokines anti-inflammatoires. Ainsi que sur la diminution d'œdème inflammatoire ou les *Lactobacillus* spp ont montré une capacité anti-inflammatoire par une réduction significative de l'épaisseur des pattes ($P < 0,05$) montrant un pourcentage d'inhibition de 15,67%, 14,72% et 14,84% respectivement 24h après induction par la carragénine quant à la formulation étudiée une augmentation significative de la production de cytokine anti-inflammatoire IL-10a pu diminuer la sécrétion des principales cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-6 de 70% et 80% respectivement.

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

Mots clés : Bactéries -probiotiques- effet anti-inflammatoire-inflammation.

Summary

Probiotic bacteria have the ability to alter the immune response by providing treatment for inflammatory diseases. In the present study we have studied several articles carried out in order to explore the anti-inflammatory potential of probiotic bacteria in order to study the maximum of parameters; the first study carried out *in vitro* focused on the immune response at the genetic level of Caco-2 cells having undergone inflammation induced by lipopolysaccharide and treated with probiotics of the genus *Lactobacillus plantarum* subsp. Subsequently, the gene expression of the pro-and anti-inflammatory genes was studied by PCR.

Regarding the second article, functional properties as a long-term sustainable supplement for inflammation As well as the effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) were explored on strains of lactic acid bacteria whose anti-inflammatory potential was already studied as well as 'a multi-strain probiotic formulation (*L. rhamnosus*, *b. Lactis* and *b. Longum*).

The results of this research demonstrated the anti-inflammatory power of probiotic bacteria at the genetic level, the strains studied had downregulated the gene expression of pro-inflammatory cytokines and up-regulated anti-inflammatory cytokines. As well as on the reduction of inflammatory edema or *Lactobacillus* spp showed an anti-inflammatory capacity by a significant reduction in the thickness of the legs ($P < 0.05$) showing a percentage of inhibition of 15.67%, 14 , 72% and 14.84% respectively 24 hours after induction of carrageenan as regards the formulation studied, a significant increase in the production of anti-inflammatory cytokine IL-10a could decrease the secretion of the main pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 by 70% and 80% respectively.

Finally, we have demonstrated anti-inflammatory properties on various models of inflammation *in vitro* / *in vivo*, but all of these results suggest further studies to promote the health benefits of probiotic bacteria.

Keywords : Bacteria -probiotics- anti-inflammatory effect-inflammation.

ملخص

تتمتع بكتيريا البروبيوتيك بالقدرة على تغيير الاستجابة المناعية من خلال توفير العلاج للأمراض الالتهابية. في هذه الدراسة ، قمنا بدراسة العديد من المقالات التي تم إجراؤها لاستكشاف الإمكانيات المضادة للالتهابات لبكتيريا البروبيوتيك من أجل دراسة الحد الأقصى من المعلمات ؛ ركزت الدراسة الأولى في المختبر على الاستجابة المناعية على المستوى الجيني لخلايا Caco-2 التي تعرضت للالتهاب الناجم عن عديد السكاريد الشحمي وعولجت بالبروبيوتيك من جنس *Lactobacillus plantarum* subsp. بعد ذلك ، تمت دراسة التعبير الجيني للجينات المؤيدة والمضادة للالتهابات بواسطة PCR.

فيما يتعلق بالمقال الثاني ، تم استكشاف الخصائص الوظيفية كمكمل مستدام طويل الأمد للالتهابات بالإضافة إلى تأثير العقاقير غير الستيرويدية المضادة للالتهابات (NSAIDs) على سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك التي تمت دراسة إمكانياتها المضادة للالتهابات بالفعل وكذلك "تركيبية بروبيوتيك متعددة السلالات (*L. rhamnosus* ، *b. ob. Lactis* ، *Longum*)".

أظهرت نتائج هذا البحث القوة المضادة للالتهابات لبكتيريا البروبيوتيك على المستوى الجيني ، وقد أدت السلالات المدروسة إلى تقليل تنظيم التعبير الجيني لل سيتوكينات المؤيدة للالتهابات والسيتوكينات المضادة للالتهابات. وكذلك على الحد من الوذمة الالتهابية أو *Lactobacillus spp* أظهر قدرة مضادة للالتهابات عن طريق انخفاض معنوي في سمك الساقين ($P < 0.05$) مما أظهر نسبة تثبيط 15.67% ، 14 ، و 72% و 14.84% على التوالي بعد 24 ساعة من تحريض الكاراجينان بالنسبة للتركيبية المدروسة ، يمكن أن تؤدي الزيادة الكبيرة في إنتاج السيتوكين المضاد للالتهابات IL-10a إلى تقليل إفراز السيتوكينات الرئيسية المؤيدة للالتهابات IL-1 β و IL-6 و 70% و 80% على التوالي.

أخيرًا ، أظهرنا خصائص مضادة للالتهابات في نماذج مختلفة من الالتهاب في المختبر / في الجسم الحي ، ولكن هذه النتائج معًا تشير إلى مزيد من الدراسات لتعزيز الفوائد الصحية لبكتيريا البروبيوتيك.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا - بروبيوتيك - تأثير مضاد للالتهابات - التهاب.

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : L'acide arachidonique

ACTH : Adreno Cortico Tropic Hormone

ADP : Adénosine diphosphate

AINS : Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

AIS : Les anti-inflammatoires stéroïdiens

ATP : Adénosine triphosphate

CD31 : Platelet endothelial cell adhesion molecule

CEAS : Comitato Etico AziendeSanitarie

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CRF : Corticotropin-releasing hormone

CRP : La créative protéine

DBO : Demande Biochimique en Oxygène

ELISA : Anglais Enzyme-linked.

GAP : Glycéraldéhyde phosphate

GRAS : Generally recognised as safe

HSP : Heat shock proteins.

HRBC : Human red blood cell

IgA : Immunoglobulines A

LMBAFS : Microorganismes Bénéfiques des Aliments Fonctionnels et de la Santé

Liste des abréviations

LPG : Le groupe Lactobacillus plantarum

LPS : lipopolysaccharide

MICI : Maladie inflammatoires chroniques de l'intestin

MRS : Milieu Man Rogosa Sharpe

NAD⁺/ NADH, H⁺ : Couple oxydant/réducteur du nicotinamide/ adénine dinucléotide

NO : Oxyde d'azote

PAF : Facteur d'activation plaquettaire

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphériques humaines

PBS : Phosphate buffered saline

PGE : Prostaglandines

PGE₂ : La prostaglandine E₂

Pi : Phosphate inorganique

PNN : Les polynucléaires neutrophiles

SEM : Scanning electron microscopy

TIMP : Tissue inhibitors of metalloproteinases

TNF : Les facteurs de nécrose tumorale

VS : La vitesse de sédimentation

α -MSH : α -Melanocyte-stimulating hormone

LISTE DES FIGURES

Figure (01) : Etapes de l'inflammation aigue.....	07
Figure (02) : Recrutement de cellules immunitaires au cours de l'inflammation.....	08
Figure (03) : Les principaux bienfaits des probiotiques.....	24
Figure (04) : Test de la catalase.....	34
Figure (05) : Résultats de croissance dans un milieu MRS a pH = 6.2.....	40
Figure (06) : Observation macroscopique de la souche S4.....	40
Figure (07) : Observation macroscopique de la souche S5.....	40
Figure (08) : Observation macroscopique des souches S1CH et S2CH.....	40
Figure (09) : Observation macroscopique de la souche S1.....	41
Figure (10) : Observation macroscopique de la souche S2.....	41
Figure (11) : Résultats négatif du test catalase souche S1CH.....	41
Figure (12) : Résultats négatif du test catalase souche S1Y.....	41
Figure (13) : Résultats négatif du test catalase souche S1.....	41
Figure (14) : Résultats négatif du test catalase souche S2Y.....	41
Figure (15) : Résultats négatif du test catalase souche S2CH.....	41
Figure (16) : Résultats négatif du test catalase souche S4.....	41
Figure (17) : Observation microscopique après coloration de gram.....	42
Figure (18) : Observation microscopique après coloration de gram.....	42
Figure (19) : Observation microscopique après coloration de gram.....	42

Liste des figures

Figure (20) : Expression génique de pro-inflammatoire et cytokines anti-inflammatoires dans le LPS induit Cellules Caco-2 et suivi d'un traitement avec des bactéries probiotiques.	43
Figure (21) : Activité anti-inflammatoire de Serobioma dans les PBMC humaines avec stimulation LPS.....	45
Figure (22) : Activité anti-inflammatoire de Serobioma sur la production de cytokines de MDM dans un modèle de co-culture avec HT-29 lignée cellulaire épithéliale.....	46
Figure (23) : Effets de la consommation de la souche probiotique <i>Weissella Cibaria</i> JW15 pendant 8 semaines sur l'activité des cellules NK. Moyenne \pm SE.....	48

LISTE DES TABLEAUX

Tableau (01) : Liste des microorganismes considérés comme des probiotiques.....	19
Tableau (02) : Critères de sélection des probiotiques.....	20
Tableau (03) : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques.....	23
Tableau (04) : Souches bactériennes étudiées.....	30
Tableau (05) : Caractéristiques cliniques et biochimiques après 8 semaines de consommation d'une souche probiotique, <i>Weissella Cibaria</i> JW15.....	47

SOMMAIRE

Introduction générale.....	01
Chapitre I : Généralités sur l'inflammation.	
I.1.Définition de l'inflammation.....	03
I.2. Etiologie.....	03
I.3. Symptômes.....	03
I.4. Les pathologies liées à l'inflammation.....	04
I.5. Cellules et médiateurs de l'inflammation.....	04
I.5.1 Les cellules de l'inflammation.....	04
I.5.2. Les médiateurs de l'inflammation.....	05
I.6. Les types de l'inflammation.....	06
I.6.1. Inflammation aiguë.....	06
I.6.2. Inflammation chronique.....	07
I.7. Les phases de l'inflammation.....	07
I.7.1. La phase vasculaire (initiation).....	07
I.7.2. La phase cellulaire (amplification).....	08
I.7.3. La phase de réparation (résolution).....	08
I.8. Mécanismes de régulation de la réaction inflammatoire.....	09
I.9. Exploration biologique de l'inflammation.....	09
I.10. Les conséquences de l'inflammation.....	11

Sommaire

I.10.1. La dénaturation protéique.....	11
I.10.2. La lyse du lysosome.....	12
I.11. Traitement de l'inflammation.....	12
I.11.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens(AINS).....	12
I.11.2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS).....	12
Chapitre II : Les probiotiques.	
II.1. Historique.....	15
II.2. Probiotique.....	16
II.3. Classification des probiotiques.....	17
II.4. Propriétés et Critères de sélection des souches probiotiques.....	19
II.5. La résistance à l'acidité gastrique.....	20
II.6. La résistance aux sels biliaires.....	21
II.7. L'adhésion aux cellules épithéliales.....	21
II.8. La production de substances antimicrobiennes.....	21
II.9. Résistance aux antibiotiques.....	21
II.10. Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé.....	22
II.11. Rôle des Probiotiques.....	24
II.12. Applications des Probiotiques.....	25
II.13. Mécanismes d'actions des Probiotiques.....	25
II.14. Inhibition de l'adhésion des pathogènes : phénomène de compétition/exclusion.....	25

II.15. Production de substances antimicrobiennes.....26

II.16. Allégations santé associées à la consommation des probiotiques.....27

Chapitre III : Partie expérimentale.

III.1. Objectif du travail.....29

III.2. Matériel du laboratoire utilisé.....29

III.3. Les Milieux de culture.....29

III.4. Les souches bactériennes.....30

III.4.1. Les souches de bactéries lactiques testées.....30

III.4.2. Souches de références (témoin).....30

III.5. Réactivation des Souches.....31

III.5.1. Ensemencement et purification des isolats.....31

III.5.2. Identification des souches bactériennes.....32

III.6. Exploration de l'activité anti-inflammatoire in vitro.....35

III.6.1. Méthode de stabilisation des membranes HRBC.....35

III.6.2. Test de l'inhibition des protéines.....36

III.6.3. Test de l'inhibition de l'albumine.....36

Chapitre IV : Résultats et Discussion.

IV.1. Identification des souches bactériennes.....39

IV.1.1. Pré-identification des souches.....39

IV.1.2. Résultats relatifs aux tests physiologiques.....39

Sommaire

IV.2. Activité anti-inflammatoire.....	42
IV.2.1. Résultats de L'exposition des cellules Caco-2 aux lipopolysaccharides (LPS) et traitement probiotique.....	42
IV.2.2. Activité anti-inflammatoire du sérobiome dans les cellules mononuclées du sang périphériques humaines.....	43
IV.3. Discussion des résultats.....	49
Conclusion générale.....	54
Références bibliographiques.....	55
Annexes.....	61



Introduction Générale



INTRODUCTION GENERALE

L'inflammation est un phénomène biologique lié à la régénération tissulaire, la protection contre les agents pathogènes et la réponse immunitaire, entre autres. Ça 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.

La cascade inflammatoire a été largement étudiée et plusieurs médicaments ont été conçus pour cibler ces événements, y compris les anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens.

Bien qu'ils soient très efficaces, ces composés anti-inflammatoires sont associés à un grand nombre d'effets.

Pour dépasser les effets secondaires de ces composés commerciaux, les chercheurs se sont engagés dans le développement de nouveaux composés thérapeutiques d'origine naturelle à moins d'effets secondaires indésirables. À cette fin, les probiotiques sont étudiées en tant que source potentielle de traitement anti-inflammatoire.

L'utilisation des probiotiques a considérablement augmenté en raison de leurs avantages pour la santé. Bien que la consommation de probiotiques remonte à l'Égypte ancienne, les études modernes ont commencé en 1908, quand Eli Metchnikoff a remarqué pour la première fois l'effet de ce qu'on appelle maintenant un probiotique. Aujourd'hui, L'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture et l'organisation mondiale de la santé (**FAO/OMS**) définissent les probiotiques comme «des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes, confèrent un avantage sanitaire à l'hôte ». (**FAO/OMS, 2002**)

Les probiotiques les plus couramment utilisés sont des souches de bactéries lactiques, comme *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus*. En outre, de nouvelles souches probiotiques d'autres espèces et genres sont de plus en plus étudiés. Il est bien établi que différentes souches probiotiques induisent des effets, et par conséquent, certaines souches peuvent être particulièrement bien adaptées au traitement maladies humaines spécifiques.

L'objectif du présent mémoire est d'explorer l'effet anti-inflammatoire des souches probiotiques afin d'évaluer leur profil probiotique.



Chapitre I



CHAPITRE I : GENERALITES SUR L'INFLAMMATION

I.1. Définition de l'inflammation

C'est un mécanisme immunologique de défense de l'organisme en réponse à des dommages mécaniques, brûlures, infections microbiennes, produits chimiques toxiques, allergènes et tout autre stimulus nocif. (Masresha *et al.*, 2012)

C'est un processus biologique fortement réglé par le système immunitaire qui permet la neutralisation des stimuli nuisibles et le lancement du processus curatif. (Masresha *et al.*, 2012)

I.2. Etiologie

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme à diverses agressions qui peuvent être d'origine physique, chimique, biologique ou infectieuse. Les principales causes de l'inflammation sont : (Ndiaye *et al.*, 2006)

- **L'infection par des agents pathogènes** : toxines bactériennes, virus, parasites et champignons. (Revillard, 2001 ; Rousselet *et al.*, 2005)
- **Les agents physiques** : chaleur, froid, traumatisme et l'irradiation par les rayons UV, X ou Y. (Revillard, 2001 ; Rousselet *et al.*, 2005)
- **Les agents chimiques et métaboliques** : minérales, organiques ou biologiques (Revillard, 2001). Parmi eux, on peut citer le carraghénane.

I.3. Symptômes

Il existe des différents symptômes de l'inflammation :

- ✓ Les symptômes locaux (rougeur, chaleur, tumeur, douleur).
- ✓ Les symptômes généraux (fièvre, asthénie, anorexie, myalgies, torpeur (Muster, 2005).

I.4. Les pathologies liées à l'inflammation

L'inflammation fait partie des critères de l'évolutivité de certaines maladies, parmi elles :

- **La rhumatologie** : est une pathologie qui peut donner une inflammation de la membrane synoviale (arthrite), des muscles (myosite), des anghèses et des vaisseaux (vascularités). (Saraux, 2005)
- **La dermatite de contact** : est une affection inflammatoire cutanée due à une hypersensibilité qui dépend des cellules TH1 (Chapel *et al.*, 2004).
- **L'insuffisance (partielle) surrénalienne** : résulte après un traitement stéroïdien de brève durée, elle peut provoquer une crise d'Addison fatale (anorexie, nausée, douleurs abdominales, état fébrile, hypoglycémie, hypotension et état de choc) (Henzen, 2003) .

Il existe d'autres pathologies inflammatoires, telle que : l'inflammation pulmonaire (Fayon *et al.*, 2007), les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), (Bannwarth *et al.*, 2016) le lupus érythémateux, (Saraux, 2005) l'inflammation périnatale (Chhor *et al.*, 2012)...etc.

I.5. Cellules et médiateurs de l'inflammation

I.5.1 Les cellules de l'inflammation

* Les polynucléaires neutrophiles (PNN)

Représentent 60 à 75 % des globules blancs totaux. (Demareta *et al.*, 2014) Elles sont un des pivots de l'immunité innée et constituent un puissant système de défense de l'homme contre les agents pathogènes. (Gougeront et Pocardalo, 2102)

* Phagocytes mononucléaires

Sont le groupe le plus important des cellules phagocytaires, leur fonction est de capter les particules, y compris les agents infectieux, de les ingérer et de les détruire (Roit *et al.*, 2002).

*** Les lymphocytes**

Sont des cellules qui arrivent dans un foyer inflammatoire ou infectieux, ils peuvent libérer des médiateurs qui contrôlent l'apport ultérieur et l'activation des autres cellules. Ils lancent ainsi le processus de l'immunité adaptative. **(Roit et al., 2002)**

*** Les mastocytes**

Sont des cellules résidentes des tissus, notamment d'interface **(Blank et Vitte, 2014)**. Elles jouent un rôle important dans l'homéostasie et la régulation immunitaire. **(Frenzel et Hermine, 2013)**

*** Les basophiles**

Libèrent un grand nombre de médiateurs pro-inflammatoires influençant profondément l'orchestration de l'inflammation. **(Rostan et al., 2014)**

*** Les cellules endothéliales**

Sont des cellules aplatis constituées à des organites particuliers qui expriment CD31. **(Revillard, 2001)**

*** Les fibroblastes**

Sont des cellules cibles à des cytokines secrétés par Th2 (l'IL-4 et l'IL-13) qui induisent leur prolifération et stimulent leur différenciation myofibroblastique. **(Létuvé, 2013)**

*** Les plaquettes**

Sont des cellules auxiliaires importantes dans le déclenchement et le développement de l'inflammation **(Revillard, 2001)**, par la libération des médiateurs de l'inflammation comme la sérotonine lorsqu'elles sont activées au cours de la coagulation ou au contact de complexe antigène- anticorps. **(Roit et al., 2002)**

I.1.5.2. Les médiateurs de l'inflammation

La libération des médiateurs inflammatoires augmentent la contraction du muscle lisse et le flux sanguin. **(Lydyard et al, 2002)** Ces médiateurs peuvent être des :

*** Cytokines**

Sont des médiateurs de la communication intercellulaire, (**Rousselet, 2005**) libérés par les monocytes, les macrophages et les lymphocytes. (**Henrotin et al., 2001**) Ils peuvent être pro-inflammatoires (TNF α , IL-1, IL-8), et anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-12, IL-13). (**Le Bars, 2002**)

*** Neuropeptides**

Régulent la réaction inflammatoire dont la substance P est le principale neuropeptide impliqué dans le remodelage des tissus enflammés, elle stimule la prolifération des kératinocytes, des cellules endothéliales, des fibroblastes et des cellules musculaire lisse. (**Henrotin et al., 2001**)

*** Médiateurs lipidiques**

L'acide arachidonique (AA) est libéré principalement par l'action de la phospholipase A2 et sa transformation enzymatique conduit à la libération des prostanoïdes par la voie de cyclo-oxygénase, les leucotriènes par la voie de lipo-oxygénase et le PAF par les deux voies (**Henrotin et al., 2001**). Le PGE2 et leucotriène B4 sont les deux médiateurs lipidiques majeurs. (**Raymondjean, 2007**)

*** Autre médiateurs de l'inflammation**

Plusieurs telle que les fractions du complément, les facteurs de la coagulation, les métallo-protéases et les formes activées de l'oxygène et de l'azote. (**Henrotin et al., 2001**)

I.6. Les types de l'inflammation

I.6.1. Inflammation aiguë

Une réaction inflammatoire immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours ou semaines), caractérisée par l'adhérence des plaquettes, de neutrophiles puis les monocytes à l'endothélium. (**Revillard, 2001**) Elle est la réponse typique du système immunitaire inné, (**Espinosa et chillet, 2006**) résidente à la guérison complète de la lésion initiale. (**Genetet, 1997**)

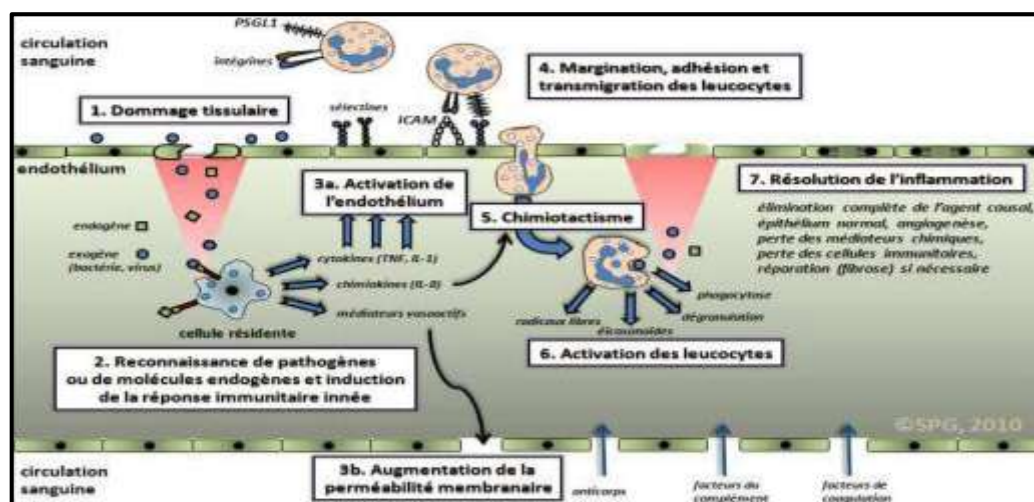


Figure (01) : Etapes de l'inflammation aigue. (Chobanian ,1990)

I.6.2. Inflammation chronique

Est une inflammation aiguë persistante, conduit à la formation de lésions focalisées, (Cavaillon, 1993) formées par les cellules endothéliales, les fibroblastes et les macrophages (Révillard, 2001) où la production accrue des médiateurs qui maintient le processus inflammatoire. (Genetet, 1997)

I.7. Les phases de l'inflammation

I.7.1. La phase vasculaire (initiation)

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 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 chimiques, un œdème inflammatoire (l'exsudat) ; résulte d'une augmentation de la pression hydro statique et de la perméabilité de la paroi des petits 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)

I.7.2. La phase cellulaire (amplification)

Elle se caractérise par la formation du granulome inflammatoire. (Rousselet *et al.*, 2005) Cette étape implique un recrutement cellulaire, avec un afflux de leucocytes polymorphonucléaires, une activation des cellules résidentes des tissus agressés et une libération de nombreux médiateurs pro-inflammatoires. (Barnig, 2016 ; Ravat *et al.*, 2011) Elle dépend largement de la production locale de cytokines possédant une activité chimio-attractante et les chimiokines qui exercent leur activité sur les PNN (IL-8) ou les monocytes-macrophages et les lymphocytes, ce qui rend difficile l'identification des propriétés de chacune *in vivo*. Ceci explique également la variabilité de la réponse inflammatoire selon le type d'agression. (Cynober, 2000)

I.7.3. La phase de réparation (résolution)

La résolution de l'inflammation est un processus actif, qui n'est pas uniquement médié par la décroissance des médiateurs pro-inflammatoires, mais qui dépend également de voies de signalisations précoces et de la production précoce de médiateurs anti-inflammatoires, pro-résolvant et contra-régulateurs, (Barnig, 2016) pour réguler les proliférations et biosynthèses cellulaires. (Rousselet *et al.*, 2005)

La réparation passe par la constitution d'un nouveau tissu conjonctif appelé bourgeon charnu qui va remplacer les tissus détruits au cours de l'inflammation, puis par la constitution d'une cicatrice ; est la marque définitive laissée par le foyer inflammatoire après la phase de bourgeon charnu. En fin les cellules épithéliales détruites sont remplacées par la prolifération des cellules épithéliales saines situées autour du foyer inflammatoire. (Rousselet *et al.*, 2005)

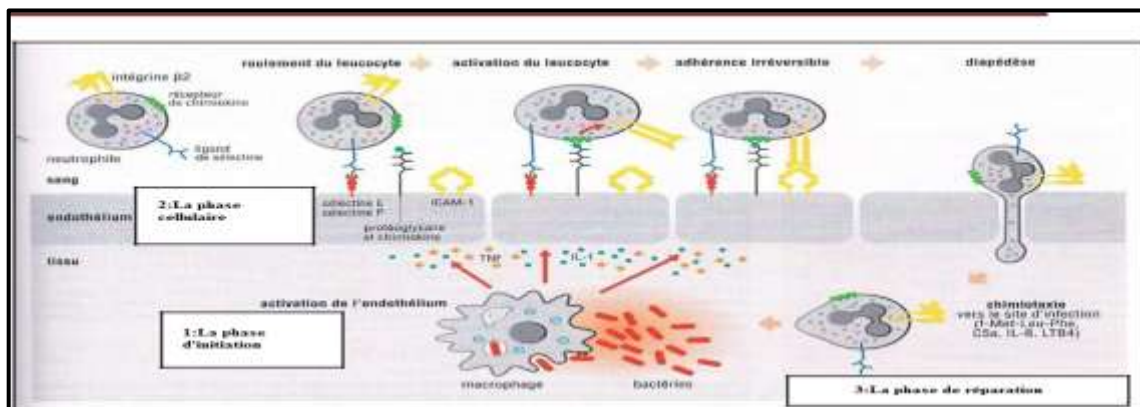


Figure (02) : Recrutement de cellules immunitaires au cours de l'inflammation. (De Franco *et al.*, 2009)

I.8. Mécanismes de régulation de la réaction inflammatoire

Il existe des mécanismes de rétrocontrôle négative pour éviter les risques nocifs de la réponse inflammatoire et limiter les dégâts survenues aux tissus, assurant un retour au silence de la réponse inflammatoire et préparant aussi la phase de réparation des tissus. Les principales sont :

- ✓ La sécrétion des cytokines anti-inflammatoires : IL10, IL-1ra et TGF- β (antagonistes du récepteur de l'IL-1). L'IL-10 inhibe les mécanismes cellulaires par la production des cytokines inflammatoires. L'IL-1ra bloque l'action de l'IL-1 par la fixation sur les récepteurs de l'IL-1 mais n'induit pas de signal. Le TGF- β bloque l'action des protéases cellulaires en dégradant la matrice extracellulaire et en induisant la réparation et la régénération tissulaires. Il est inhibiteur pour les mastocytes et les lymphocytes T.
- ✓ La production d'hormones anti-inflammatoires comme le cortisol et les dérivés de la pro-opiomélanocortine (ACTH, α -MSH).
- ✓ La production d'anti-protéases comme certaines protéines de la phase aiguë (α -1 antitrypsines), les inhibiteurs de métallo-protéases (TIMP) et les inhibiteurs de sérine protéases (serpines). (Espinosa et Chillet, 2006)

I.9. Exploration biologique de l'inflammation

Les marqueurs biologiques de l'inflammation ont un intérêt diagnostique et de suivi évolutif dans les situations graves et/ou urgentes. (Emile, 2012) Ils reflètent beaucoup plus les conséquences de l'inflammation. (Saraux, 2005) Parmi eux :

- La vitesse de sédimentation (VS)

Elle mesure par la sédimentation des globules rouges à travers une colonne verticale de 200 mm et d'un diamètre interne de 2,5 mm, placée à température ambiante dans un endroit stable. Après 60 minutes, la distance de migration des globules rouges à travers le plasma est enregistrée en mm par heure, donc, elle mesure de façon indirecte l'élévation des protéines inflammatoires de la phase aiguë induite par un stimulus. (Gervais, 2005)

- La C-réactive protéine (CRP)

C'est la première protéine de la phase aiguë de l'inflammation. C'est un marqueur très sensible de l'inflammation systémique. Elle est produite par les hépatocytes en réponse à l'interleukine-6. Sa cinétique est rapide, sa concentration sanguine (ou sérique) augmente à la sixième heure du processus inflammatoire, sa demi-vie plasmatique est de 19 heures, elle augmente au cours des pathologies inflammatoires, auto-inflammatoires et au cours des infections bactériennes ou virales. **(Emile, 2012)**

- La procalcitonine

Polypeptide pro-hormone de calcitonine. Elle s'élève tôt, comme la CRP, selon une cinétique encore plus rapide, excellente pour le diagnostic d'infection bactérienne et un guide pour la prise en charge des patients septiques graves. **(Emile, 2012)**

- Le fibrinogène

Il s'élève à la phase tardive de l'inflammation. Il est plutôt utile dans les sepsis graves. **(Emile, 2012)**

- L'orosomucoïde et l'haptoglobine

Ces deux protéines s'élèvent également à la phase tardive de l'inflammation, mais aussi dans d'autres circonstances : prise d'œstrogènes, syndrome néphrotique. **(Emile, 2012)**

- L'électrophorèse des protéines plasmatiques

Elle montre 5 fractions protéiques qui interviennent dans les mécanismes de l'inflammation. Une hypo-albuminémie est présentée lors des syndromes inflammatoires sévères. L'élévation des α -1globulines est observée au début d'un processus inflammatoire, tandis que l'augmentation des α -2 évoque un syndrome inflammatoire constitué. **(Emile, 2012)**

- Cytokines

Une production accrue de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1b, l'IL-6, IFN γ , l'IL-8 et anti-inflammatoires (IL-10, IL-1Ra, TGF β) dans la circulation reflètent davantage la sévérité du processus inflammatoire et son évolution. **(Adib-Conquy et Cavaillon, 2012)**

I.10. Les conséquences de l'inflammation

I.10.1. La dénaturation protéique

Une réaction inflammatoire non immune peut conduire à une inflammation immune après dénaturation des protéines endogènes devenues auto-antigéniques. (Clos, 2012)

L'exposition d'une cellule au choc thermique provoque : l'altération des protéines, la réponse au choc thermique et enfin la récupération ou l'élimination des protéines altérées. (Nguyen *et al.*, 1989)

- La première étape (altération des protéines)

L'albumine subit des changements structuraux avec perte de sa forme tridimensionnelle et exposition de certains sites hydrophobes (comme le résidu cystéine 34) qui sont inaccessibles dans le cas physiologique normal (protéine native fonctionnelle). Ces zones hydrophobes peuvent interagir et former des agrégats qui sont délétères pour la cellule. (Arrigo, 2005)

- La seconde étape (réponse au choc thermique)

Il y'aura l'intervention des protéines de choc thermique (HSP ou heat shock proteins) qui vont reconnaître les régions normalement enfouies dans la molécule (l'albumine) et qui deviennent accessibles après dénaturation ou dégradation. (Jacquier-sarlin et Polla, 1994)

L'interaction HSP-protéines dénaturées favorise soit leur dégradation, soit leur transport dans les différents organites et leur assemblage, et l'activation des lymphocytes T après présentation des auto-antigènes en présence des molécules de CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) et la différenciation des monocytes en macrophages. (Jacquier-sarlin et Polla, 1994)

- Phase d'élimination

Elle consiste à éliminer les protéines anormales et empêcher la formation d'agrégats, ou permet la renaturation des protéines si les possibilités de réparation de la cellule le permettent. (Arrigo, 2005)

I.10.2. La lyse du lysosome

Au cours de l'inflammation, la lyse des lysosomes induit la libération des enzymes qui provoquent un désordre. L'exposition des globules rouges à des substances nocives telles que la chaleur provoque la lyse des membranes accompagnée de l'hémolyse et l'oxydation de l'hémoglobine. La membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale, la stabilisation de la membrane érythrocytaire par l'extrait implique qu'il y'a la capacité de stabiliser la membrane lysosomale. (Chou, 1997) Les composés avec la propriété stabilisante des membranes sont bien connus avec leur capacité d'interférer dans la réponse inflammatoire précoce, surtout l'empêchement du dégagement des phospholipases qui déclenchent la formation des médiateurs inflammatoires. (Ait adafoun *et al.*, 1996)

I.11. Traitement de l'inflammation

Le terme anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens et connue comme traitement actuel de l'inflammation. Ces molécules bien qu'étant efficaces présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent gêner leur utilisation au long terme. (Rahmani *et al.*, 2016)

I.11.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens(AINS)

Constituent une classe médicamenteuse hétérogène du point de vue chimique où l'aspirine est le chef de ces anti-inflammatoires, sont utilisés en médecine ambulatoire pour leur action antalgique et antipyrétique et antiagrégant plaquettaire (Pillon, 2014). Leur efficacité comme leurs principaux effets secondaires sont liés à leur mécanisme d'action principal qui est l'inhibition des cyclo-oxygénases, enzymes responsables de la synthèse des prostaglandines (notamment la PGE2 et la PGI2) et du thromboxane à partir de l'acide arachidonique. (Orliaguet *et al.*, 2013)

I.11.2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Constituent une grande famille de médicaments dérivés du cortisol, ont une fonction vitale dans la régulation du tonus des vaisseaux et aussi pour maintenir toute une série de systèmes homéostatiques (Henzen, 2003 ; Dejean et Richard, 2013). Les glucocorticoïdes inhibent l'action de phospholipase A2 responsable à la synthèse des prostaglandines à partir du métabolisme de l'acide arachidonique par la cyclo-oxygénase,

(Guilpain et Le Jeune, 2012 ; Orliaguet *et al.*, 2013) comme ils ont une action à la fois cytoplasmique et génomique, ayant pour conséquences une modulation de la transcription et de l'expression des médiateurs (bradykinine, histamine...), des cytokines (interleukine 1 et 2, TNF ...) et de divers neuropeptides (CRF, ACTH, bêta endorphine) **(Orliaguet *et al.*, 2013)** .



Chapitre II



CHAPITRE II : LES PROBIOTIQUES

II.1. Historique

Il y a un siècle, Elie Metchnikoff (scientifique russe, lauréat du prix Nobel et professeur à l'Institut Pasteur à Paris) a affirmé que les bactéries de l'acide lactique offraient des bénéfices pour la santé conduisant à une plus grande longévité. Il suggéra que "l'auto intoxication intestinale et que le vieillissement en résultant pouvait être supprimé en modifiant la flore microbienne de l'intestin et en remplaçant des microbes protéolytiques tels que *Clostridium* qui produit des substances toxiques comme les phénols, les indoles et l'ammonium à partir des protéines de la digestion par des microbes utiles. Il développa un régime alimentaire avec du lait fermenté par une bactérie appelée "Bacille bulgare".

Au début du XX^e siècle le Professeur Alfred Nissle d'origine allemande durant la propagation de shigellose a isolé une tension d'*Eschericia coli* d'un soldat qui n'a pas été affecté par la maladie. Il avait l'habitude alors ceci pour traiter des gens souffrant de la shigellose et de la salmonellose gastro-intestinale aiguë.

Précédemment, et exactement en 1906, le pédiatre de l'Institut Pasteur Henry Tissier isola une bifidobactérie à partir des selles d'un nourrisson allaité au sein, et lui donna le nom *Bacillus bifidus communis*. Par cette expérience Tissier démontra qu'une fois la bifidobactérie administrait aux enfants souffrants de diarrhée cela réduira le taux de bactérie protéolytique, il recommanda l'administration de bifidobactérie aux enfants souffrant de ce symptôme.

Le terme "probiotiques" fut d'abord introduit en 1965 par Lilly et Stillwell, par contraste avec les antibiotiques, et les probiotiques furent définis comme facteurs microbiologiquement dérivés stimulant la croissance des autres organismes. Le terme probiotique provient de deux mots grecs, *pro* et *bios*, qui signifient littéralement « pour la vie ».

En 1989, Roy Fuller a mis l'accent sur la demande de viabilité des probiotiques et introduisit l'idée qu'ils avaient un effet bénéfique sur l'hôte. Il a défini les probiotiques par «suppléments alimentaires constitués de microorganismes vivants qui influent de façon favorable sur l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale».

Chapitre II : Les probiotiques.

Il existe d'autres définitions des probiotiques ; elles reprennent pour la plupart l'image de «bactéries amies» vivantes utilisées pour améliorer de façon non spécifique la santé consommateur.

Le terme « probiotique » désigne des microorganismes vivants qui, ingérés en quantité appropriée, ont sur la santé des humains et des animaux des effets bénéfiques qui vont au-delà des fonctions nutritionnelles de base.

Les souches ayant des bienfaits documentés sur la santé comprennent des bactéries du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, mais il faut aussi mentionner des souches de *Enterococcus* et *Propionibacterium* ainsi que la levure *Saccharomyces*.

Il semble aussi que les levains lactiques comme *Lactobacillus delbrueckii* spp, *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* et *Lactococcus*, couramment utilisés par l'industrie pour leur capacité de produire rapidement les qualités organoleptiques voulues dans les produits laitiers de culture, ont un effet positif sur la santé humaine, même s'ils ne peuvent pas croître dans l'intestin.

II.2. Probiotique

En 1989, Fuller a défini les probiotiques par « suppléments alimentaires constitués de microorganismes vivants qui influent de façon favorable sur l'animal hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale ».

Il existe d'autres définitions des probiotiques ; elles reprennent pour la plupart l'image de « Bactéries amies » vivantes utilisées pour améliorer de façon non spécifique la santé du consommateur.

Les probiotiques doivent être génétiquement stables, et ne doivent pas présenter de danger pour leur hôte. Ils doivent également être capables de résister au passage dans les portions antérieures du tube digestif. (Lindi *et al.*, 2006)

Initialement, les probiotiques sont des micro-organismes vivants (bactérie ou levures) qui, ajoutés comme compléments à certains produits alimentaires comme les yaourts ou les céréales, auraient un effet bénéfique sur la santé de l'hôte.

Chapitre II : Les probiotiques.

Il Existe quatre grands groupes de Probiotiques :

A) Les ferments lactiques

Ils sont capables de produire de l'acide par la fermentation de certains sucres comme le lactose.

B) Les bifidobactérie

D'origine humaine ou animale, ils appartiennent à la flore intestinale normale. Ils sont regroupés en deux catégories selon leur morphologie : Les lactobacilles et les coques.

C) Les différentes levures de type saccharomyces

Elles sont principalement utilisées dans l'industrie agroalimentaire.

D) Les autres sporules dont *Bacillus subtilis* et *cereus*

Le concept de probiotique fait appel à quatre notions importantes :

- Un probiotique est un microorganisme vivant.
- Un probiotique est ingéré par voie oral.
- Un probiotique exerce un effet bénéfique.
- Un probiotique exerce son action en l'équilibre de la flore intestinale, les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de véhiculer des principes actifs qu'ils contiennent (enzymes, composants de paroi, peptides immuno-modulateurs, substances antibactériennes) jusqu' 'à leur cibles d'action dans le tractus digestif. (Marteau *et al.*, 1993 et 1998)

II.3. Classification des probiotiques

Les probiotiques peuvent être classés en quatre catégories (**Tableau 01**). La première catégorie renferme les espèces du genre *Lactobacillus*. Les lactobacilles sont des bactéries Gram-positif, classées dans le phylum des Firmicutes et appartenant à la famille de Lactobacillaceae. (Hammes et Vogel, 1995)

Chapitre II : Les probiotiques.

Elles se présentent sous forme de bacilles ou de coques et sont anaérobies facultatives, immobiles, non flagellés et non sporogènes. Les lactobacilles forment une grande partie des bactéries lactiques qui sont capables de produire de l'acide lactique par la fermentation de certains sucres comme le lactose. Ces espèces colonisent l'être humain et sont généralement présentes dans le tractus gastro-intestinal, les muqueuses vaginales et la cavité buccale. **(Rousteret *al.*, 2005)** Les lactobacilles sont parmi les probiotiques les plus utilisés chez l'humain avec plus d'applications connues notamment la fabrication des produits laitiers fermentés tel que le yogourt. **(Klaenhammer, 1998)** Parmi les souches commerciales les plus utilisées, on retrouve les souches d'*acidophilus*. L, *casei*. L, *paracasei*. L et de *johnsonii*. L. **(Holzapfelet Schillinger, 2002)**

La deuxième catégorie est composée des espèces de *Bifidobacterium*. Ce sont des bacilles à Gram-positif, anaérobies strictes, immobiles et forment le groupe bactérien prédominant de la flore intestinale humaine. **(Mitsuoka, 1990)**

Les bifidobactéries sont majoritairement utilisées comme probiotiques surtout par l'industrie agroalimentaire en raison de leurs nombreux bienfaits sur la santé. C'est le cas de la souche commerciale *B. animalis* ssp. *LactisBb12*. **(Mohan *et al.*, 2006; Kabeerdoss *et al.*, 2011)**

Le troisième groupe de probiotiques comprend d'autres bactéries lactiques en forme de coques telles que les *Enterococcus* et les *Streptococcus*. Quant au quatrième groupe, il est constitué de micro-organismes non-lactiques notamment les bactéries sporulées (*Bacillus cereus*), les bactéries appartenant à l'espèce *Propionibacterium freudenreichii* ainsi que certaines levures de type *Saccharomyces* principalement utilisées par l'industrie agroalimentaire.

Chapitre II : Les probiotiques.

Tableau (01) : Liste des microorganismes considérés comme des probiotiques. (Holzapfel et al, 2001)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres bactéries lactiques	Bactéries lactiques	non
<i>L.acidophilus</i>	<i>B.adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus spp,</i>	
<i>L.amylovirus</i>	<i>B.animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Saccaromyces cerevisae</i>	
<i>L.brevis</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccaromyces</i>	
			<i>boulardii</i>	
<i>L.casei</i>	<i>B.breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		
<i>L.cellobius</i>	<i>B.infatis</i>	<i>Pedicoccus acidilactici</i>		
<i>L.cripatus</i>	<i>B.lactis</i>	<i>sporolactobcillus</i>		
<i>L.curvatus</i>	<i>B.longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>		
<i>L.delbrueckii</i>	<i>B.thermophilum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>		
<i>L.faciminis</i>		<i>Streptococcus intermedius</i>		
<i>L.fermentum</i>				
<i>L.gallinarum</i>				
<i>L.gasseri</i>				
<i>L.jhonsonii</i>				
<i>L.paracasei</i>				
<i>L.plantarum</i>				
<i>L.reuteri</i>				
<i>L.rhamnosus</i>				

II.4. Propriétés et Critères de sélection des souches probiotiques

Afin qu'un microorganisme puisse être reconnu en tant que potentiel probiotique, il lui faut répondre à certains critères. Tout d'abord, il doit être non pathogène et être reconnu comme sécuritaire. Il doit avoir la capacité de survivre et de croître dans les conditions physiologique du tube digestif, ainsi qu'avoir une bonne tolérance au pH acide rencontré au niveau de l'estomac et sels biliaires rencontrés au niveau du duodénum. (Dunne et al., 2001)

Chapitre II : Les probiotiques.

L'adhérence aux cellules épithéliales de l'intestin est souvent citée comme un critère de sélection. (Guarner et Schaafsma, 1998) L'importance de cette caractéristique est mise en évidence par le fait que beaucoup de probiotique ne colonisent pas l'intestin et ont donc besoin de se fixer pour avoir leur effet bénéfique. Par exemple, les bactéries du genre *Lactobacillus* sont plus à même d'adhérer aux lignées cellulaires intestinales HT-29 et Caco-2 que les *Bifidobacterium*. (Thornton, 1996)

Le tableau (02) rapporte les critères les plus utilisés pour la sélection des probiotiques.

Tableau (02) : Critères de sélection des probiotiques. (Nousiainen et al, 2004)

Critères	But recherché
Résistance à l'acidité gastrique	Survie pendant le passage par l'estomac et Duodénum
Résistance aux sels biliaires	Survie pendant le passage par l'intestin grêle
Production d'acide (à partir de glucose et lactose)	Production (de barrière acide) efficace dans l'intestin
Adhésion au mucus et /ou aux cellules épithéliales humaines	Colonisation efficace, réduction des sites d'adhésion des pathogènes à la surface
Production de substance antimicrobienne	Inhibition du développement des germes Pathogènes
Résistance à la chaleur	Survie pendant le processus de transformation
Bonnes propriétés technologiques	Stabilité, croissance sur une large échelle, survie dans le produit, résistance aux bactériophages

II.5. 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 pH de 2,5 dans un milieu de culture pendant quatre heures. (Ammor et Mayo, 2007)

II.6. 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 en les hydrolysant avec des hydrolases, de ce fait diminuant leur solubilité. (Ammor et Mayo, 2007 ; Guet *et al.*, 2008)

II.7. L'adhésion 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 entailles. L'adhésion 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)

En plus du pouvoir d'adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin, les probiotiques peuvent se fixer au mucus qui recouvre les entérocytes ou aux divers microorganismes que l'on retrouve dans le tractus gastro-intestinal. (Lamoureux, 2000)

II.8. 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. (Titieket *et al.*, 1996 ; Labioui *et al.*, 2005)

II.9. 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 d'*Enterococcus faecium* ont été trouvés résistants à la vancomycine.

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 manquantes du potentiel de transfert de résistance. (Denohue, 2004)

II.10. Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé

Plusieurs études ont démontré les multiples effets bénéfiques des probiotiques, en effet, les probiotiques interviennent dans la prévention et le traitement de plusieurs diarrhées, notamment la diarrhée du voyageur et la diarrhée associée à la prise d'antibiotiques. (Beausoleil *et al.*, 2007 ; McFarland, 2007) Ils sont aussi impliqués dans la réduction et le traitement de certaines infections gastro-intestinales. (Salminen *et al.*, 2005) Ils contribuent également à la modulation du système immunitaire et au renforcement de la muqueuse intestinale (Tableau (03), Figure (03)). (Matsuzaki et Chin 2000 ; Madsen, Cornish *et al.*, 2001)

Les probiotiques améliorent aussi la digestion des aliments et jouent un rôle dans la réduction des symptômes de l'intolérance au lactose. (Nagpal *et al.*, 2007) Les probiotiques possèdent aussi une action antimicrobienne grâce à la production des bactériocines. (Klaenhammer, 1988)

Certains probiotiques ont démontré leur capacité à prévenir certaines maladies chroniques telles que la maladie de Crohn, l'obésité et le diabète (Schultz *et al.*, 2004; Yadav *et al.*, 2007). D'autres travaux laissent présager qu'ils pourraient également jouer un rôle important dans la prévention du cancer du côlon. (Wollowski *et al.*, 2001)

Tableau (03) : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques. (Salminen *et al.*, 2004 ; Patterson, 2008)

Effets intestinaux	Effets sur le système immunitaire	Autres effets
<p>Contrôle des troubles suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Mauvaise digestion du lactose. -Diarrhée due aux rota virus et Diarrhée-associée aux antibiotiques. -Syndrome du côlon irritable -Constipation. -Infection par <i>Helicobacter pylore</i>. -Prolifération bactérienne dans l'intestin grêle. -Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin Prévention de l'entérocolite Nécrosante du nouveau-né. 	<ul style="list-style-type: none"> -Modulation immunitaire -Répression des réactions allergiques par réduction de l'inflammation. -Réduction des risques d'infection par des agents pathogènes courants (<i>Salmonella, Shigella</i>) 	<p>Réduction du risque de :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Certains cancers (colorectal, vessie, col utérin, sein) -Coronaropathie. -Maladie des voies Urinaires -Infection des voies respiratoires supérieures et infections connexes Réduction du cholestérol sérique et de la pression artérielle.

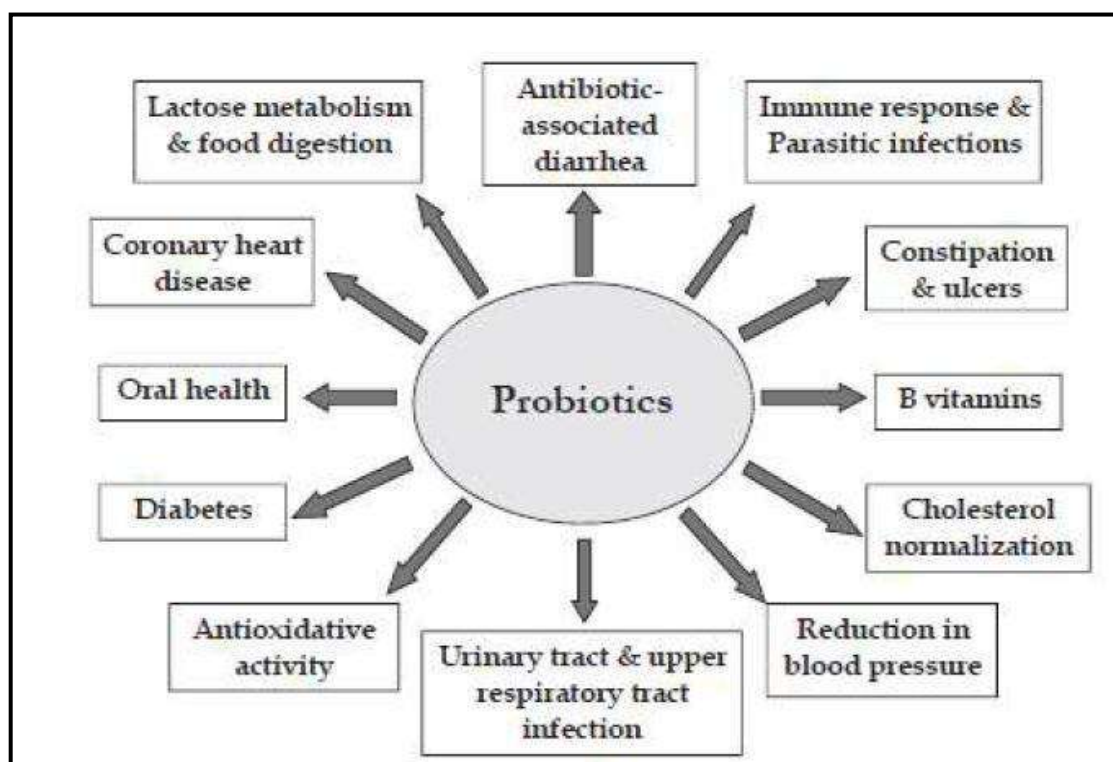


Figure (03) : Les principaux bienfaits des probiotiques. (Nagpal *et al.*, 2012)

II.11. Rôle des Probiotiques

- Ils participent à l'activation de l'immunité et à la réduction d'allergies chez les sujets à risque.
- La résistance à l'acide gastrique et à la bile, permet aux probiotiques de survivre dans le tube digestif où réside une partie de l'immunité.
- Les probiotiques participent au développement du système immunitaire chez le nourrisson et l'améliorent chez la personne âgée en augmentant le nombre de phagocytes et de lymphocytes Natural killer, premières défenses contre un agent exogène.
- Ils agissent également sur l'immunité en colonisant le tractus intestinal, réalisant ainsi « un effet barrière » empêche d'une part la colonisation de l'épithélium par des pathogènes et renforce d'autre part l'immunité au niveau des muqueuses intestinales
- en augmentant la production d'IgA et de mucus, défenses locales au niveau des muqueuses. (Makhloufi, 2012)

II.12. Applications des Probiotiques

Les différents produits commercialisés en tant que probiotiques humains ou animaux sont constitués soit d'un seul microorganisme (produits dits mono-souches) ou d'une association de plusieurs espèces (produits dits pluri-souches). De nos jours, les produits probiotiques sont commercialisés sous trois formes : **(Patterson, 2008)**

-Un concentré de culture ajouté à des aliments et boissons à base de produits laitiers, de fruits et de céréales.

-Un ingrédient ajouté à un aliment à base de lait ou de soja et auquel on permet d'atteindre une concentration élevée par fermentation.

-Des cellules séchées, concentrées, en poudre, en capsule ou en comprimés.

Les probiotiques sont généralement associés aux produits laitiers de culture la gamme de produits probiotiques comprend maintenant des fromages, des crèmes glacées et des yogourts glacés de même que des aliments et boissons non laitiers. **(Patterson, 2008)**

II.13. Mécanismes d'actions des Probiotiques

Les probiotiques font actuellement l'objet d'un certain consensus dans la communauté scientifique grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. Plusieurs mécanismes par lesquels certains probiotiques exercent des effets protecteurs ou thérapeutiques ont été proposés. Toutefois, ces modes d'action ne sont pas encore complètement élucidés. Parmi ces principaux mécanismes d'action, on retrouve le renforcement de la barrière intestinale, l'inhibition de l'adhésion des pathogènes à la muqueuse intestinale, la production de substances antimicrobienne et la modulation du système immunitaire.

II.14. Inhibition de l'adhésion des pathogènes : phénomène de compétition/exclusion

Les probiotiques exercent une action antimicrobienne directe en s'opposant à l'invasion des microorganismes pathogènes dans le tube digestif tout en empêchant leur adhésion aux parois intestinales. **(Vanderpoollet al., 2008)**

En effet, il existe une compétition directe entre les souches probiotiques et les germes infectieux pour occuper les sites d'adhésion aux parois de l'intestin. Certains probiotiques ont une capacité d'adhérence au tube digestif et peuvent le coloniser de manière prolongée. Cette propriété pourrait constituer un avantage écologique favorisant leur implantation au niveau des parois intestinales et par conséquent, l'inhibition de la fixation des germes pathogènes. Ainsi, les probiotiques jouent un rôle de barrière physique contre les microorganismes pathogènes. Ce phénomène a été observé chez certains lactobacilles qui adhèrent aux villosités intestinales et inhibent la fixation d'*Escherichia coli* entéropathogènes. (Roselli, Finamore *et al.*, 2006 ; Collado Meriluoto *et al.*, 2007)

II.15. Production de substances antimicrobiennes

Les probiotiques pourraient également limiter la croissance des pathogènes en exercent une action antimicrobienne indirecte. Cette dernière se réalise grâce à la production de différents composés antimicrobiens.

a- Les bactériocines

Ce sont des composés protéiques qui ralentissent respectivement les invasions des souches bactériennes. (Klaenhammer, 1993) Ces substances nocives produites par les probiotiques sont dirigées contre des bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice. Elles agissent principalement sur la membrane externe des bactéries cibles en formant des pores qui mènent à la libération du contenu intracellulaire et à la mort de la bactérie affectée. Les lactobacilles et les lactocoques, contrairement aux souches de bifidobactéries, sont le plus souvent associés à la production de bactériocines. (Fooks et Gibson, 2002) La nisine, qui est produite par la bactérie *Lactococcus lactis*, est la bactériocine la plus documentée.

b- Les acides organiques

Les bactéries probiotiques ont la capacité de produire des acides organiques qui contribuent à l'inhibition de la croissance des microorganismes entérovirulants (Servin, 2004). Il s'agit de l'acide lactique et l'acide acétique, qui sont produits respectivement par les lactobacilles et les bifidobactéries via la fermentation des hexoses. Ces acides organiques, produits à partir de glucides ingérés lors de la prise alimentaire,

Chapitre II : Les probiotiques.

contribuent à faire baisser le pH intestinal. Leur diffusion passive à travers la membrane bactérienne sous leur forme non dissociée permet, après leur dissociation, d'acidifier le cytoplasme et donc d'inhiber la propagation, la croissance et la survie des agents pathogènes acido-sensibles.

c- Le peroxyde d'hydrogène

Certaines bactéries lactiques produisent, en milieu humide, du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui inhibe de nombreuses souches bactériennes pathogènes. (**Ouwehet Vesterlund, 2004**) La production du peroxyde d'hydrogène accompagnée par celle d'acide lactique permet l'inhibition du développement de certaines espèces pathogènes comme certains virus tel que le virus de la fièvre aphteuse, certains champignons comme *Candidaalbicans*, ou encore certaines bactéries comme *Escherichia coli*, etc.

* Stimulation de l'activité du système immunitaire intestinale

L'interaction des probiotiques avec le système immunitaire permet d'accroître la réponse immune de l'hôte contre les agents entéropathogènes. En effet, les probiotiques interviennent dans la stimulation de l'immunité adaptative, tel que la production des anticorps de type IgA, (**Shu et Gill, 2002**) ainsi que l'immunité innée tel que la production des macrophages, des monocytes etc. (**Oelschlaeger, 2010**) Par conséquent, les 33 probiotiques agissent comme des adjuvants en modulant une réponse rapide de la muqueuse intestinale et renforçant ainsi le système immunitaire intestinal.

II.16. Allégations santé associées à la consommation des probiotiques

Connus depuis des centaines d'années, notamment à travers les produits laitiers fermentés traditionnels, les probiotiques font l'objet d'un véritable regain d'intérêt de la part des industriels. Ces derniers insistent d'ailleurs sur leur action bénéfique notamment sur le système digestif et l'équilibre de la flore intestinale. En outre, l'intérêt des consommateurs pour ces produits bénéfiques pour la santé est également l'un des moteurs de la croissance du marché des probiotiques. Mais, l'arrivée de nouvelles règles sur les allégations a freiné la croissance des probiotiques. Récemment, Santé Canada a mis au point une nouvelle réglementation concernant les allégations génériques relatives à la consommation des probiotiques. (**Santé Canada, 2009**)



Chapitre III



CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

III.1. Objectif du travail

Le but de ce travail est d'explorer le potentiel de certaines souches lactiques a développé un effet anti-inflammatoire.

Le début de notre travail a été réalisé au sein du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid ibn Badis de Mostaganem, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie.

III.2. Matériel du laboratoire utilisé

- **Verrerie** : erlenmeyer, entonnoir, becher, verre de montre, pipette Pasteur, flacons et tubes a essais.
- **Autres matériel** : bec Bunsen, agitateur magnétique, spatule, portoir, barreau (agiter les milieux), pince, micropipette.
- **Appareil utilisé** : balance, étuve à **37°C**, spectrophotomètre, autoclave, réfrigérateur, bain-marie, pH-mètre.
- **L'anti-inflammatoire**: Diclofénac.

III.3. Les 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=5.4) sont utilisé pour la culture des Lactobacilles.
- **Milieu M17 (pH=6.5)** : Gélosé ou bouillon pour réactivation et culture des streptocoques.
- **Milieu M17** : Gélosé ou bouillon acidifiés (pH=5.4) sont utilisés pour réactivation et culture des streptocoques.

III.4. Les souches bactériennes

III.4.1. Les souches de bactéries lactiques testées

Les souches utilisées au cours de cette étude sont des isolats à partir des poissons (sardines et crevettes). Les souches sont indiquées ainsi que leurs milieux de culture dans le tableau (05).

III.4.2. Souches de références (témoin)

La souche *Bifidobacterium animalis subsp lactis Bb12* est une souche probiotique de référence (Charles Hensen, Danemark) et la souche *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS isolée et identifié au niveau du laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid ibn Badis de Mostaganem.

Tableau (04) : Souches bactériennes étudiées.

Souche	Milieu de Culture
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LBRE-LSAS	MRS
<i>Bifidobacterium animalis subsp lactis</i> Bb12	MRS
S1	MRS
S2	M17
S3	MRS
S4	M17
S5	M17
S6	MRS
S7	MRS
S1Y	MRS
S2Y	MRS
S3Y	MRS

S4Y	MRS
S1CH	MRS
S2CH	MRS
S1R	MRS acidifié
S2R	MRS
S3R	M17
S4R	MRS

III.5. Réactivation des Souches

Les souches utilisées étaient conservées dans des Eppendorf à une température de -70°C. Elles sont réactivées et maintenues vivantes par un repiquage d'un inoculum de 1% dans les milieux MRS et M17 bouillon, incubées à 37°C pendant 24 h et sont ensuite conservées à 4°C.

III.5.1. Ensemencement et purification des isolats

Un volume de 0.1 ml de chacune des souches bactériennes réactivées précédemment, a été déposé sur milieu gélosé adéquat soit Man de Rogosa Sharpe (MRS) ou M17 a PH correspondant (PH=5.4 et 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 de rotation sur l'ensemble de la surface de la gélose. Enfin, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 à 48h en condition anaérobie dans une boîte.

Après le développement des colonies, les isolats ont été purifiés par la méthode rétro repiquage en stries sur les surfaces gélosées en MRS et M17 neuves en boîtes de Pétri suivi d'incubation à 37°C dans les mêmes conditions précédemment citées. Les colonies parfaitement isolées, ont été réensemencées et conservées.

III.5.2. Identification des souches bactériennes

III.5.2.1. Critère morphologique

III.5.2.1.1. 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)

III.5.2.1.2. Observation microscopique

III.5.2.1.2.1. Coloration différentielle de gram

C'est la coloration de base en bactériologie qui permet de distinguer les bactéries en Gram positif et en 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 à 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.

* 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 le 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 passée 3 ou 4 fois dans la flamme du bec Bunsen. Laisser refroidir avant d'entreprendre une coloration.
- 2- Verser le Violet de Gentiane sur la lame ; laisser en contact 1 minute
- 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 Safranine, laisser agir environ 1 min. lavé abondamment.
- 6- Sécher au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen.

A l'issue de cette coloration, on peut distinguer :

- Des bactéries colorées 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.5.2.2. Critères biochimiques et physiologiques

III.5.2.2.1. 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 (04)**).

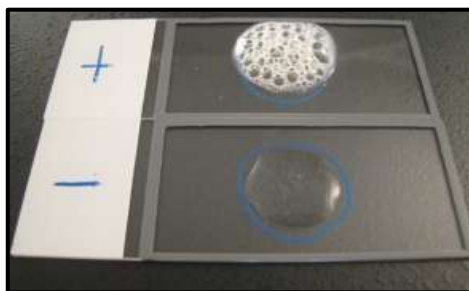


Figure (04) : Test de la catalase.

* 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 CO₂ (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.

* Préparation des dilutions décimales

La dilution est un processus qui consiste à réduire la concentration d'une substance dans une solution. Dans ce but, des dilutions décimales sont ensuite réalisées en cascade jusqu'à 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.

III.6.1.2. Hémolyse induite par la chaleur

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

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 Diclofénac-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 doivent être incubés à 37 ± 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 Diclofénac 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.

La suspension bactérienne ou la concentration de médicament pour une inhibition de 50% (IC50) est déterminée à partir de la courbe dose-réponse en traçant le pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle par rapport à la concentration de traitement.

III.6.3. Test de l'inhibition de l'albumine

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines. La méthode consiste à préparer trois solutions.

- **La solution d'échantillon** : (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de sérum bovine albumine (SBA) 5 % et 0,05 ml de souche bactérienne

- **La solution témoin** : (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml d'eau distillé.

- **La solution standard** : (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml de la solution de standard Diclofénac sodium avec une concentration de 100mg.

Toutes les solutions ont été ajustées à un pH de 6,3 par une solution d'HCl (1N). Les échantillons ont été incubés à 37 ° C pendant 20 min, ensuite la température était augmentée pour garder les échantillons à 57° pendant 3 min, après refroidissement des tubes, 2,5mL de la solution tampon phosphate saline (PBS) à (pH=6,3) ont été ajoutés aux solutions préparées. L'absorbance a été lue par le spectrophotomètre à 660 nm. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - [(D.O \text{ de l'échantillon} - D.O \text{ du témoin} / D.O \text{ du témoin})] \times 100$$



Chapitre IV



CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Identification des souches bactériennes

IV.1.1. Pré-identification des souches

L'identification des souches purifiées sur Milieu MRS et MRS acidifié et sur M17 et M17 acidifié en surface, est basée sur des observations macroscopiques, microscopiques et sur des tests physicochimiques.

IV.1.1.1. Caractères macroscopiques

Les cultures obtenues sur les boîtes de pétri sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille, l'aspect ainsi que la couleur des colonies. (**Badis et al., 2006**)

L'étude de l'aspect macroscopique des souches sur milieux MRS et MRS acidifié et sur M17-a révélé des colonies petites, moyennes et parfois grosses, rondes, blanchâtres avec un aspect lisse (**figures 06, 07, 08, 09 et 10**).

IV.1.1.2. Caractères microscopique

L'aspect microscopique a révélé que les cellules sont Gram positif apparaissant sous différentes formes (coques et bacilles) avec différentes modes d'association, associées en paires ou en chaînes courtes et incurvées (**Figures 17, 18 et 19**). *Bifidobacterium* est un bacille à gram positif, immobile, avec une morphologie ramifiée. Elles peuvent être isolées, associées en longues chaînes ou en amas. Elles peuvent être courtes, régulières, fines avec des extrémités effilées, ovoïdes ou longues et légèrement courbées. Elles peuvent aussi former des protubérances et toutes sortes de ramifications.

IV.1.2. Résultats relatifs aux tests physiologiques

IV.1.2.1. Présence de la catalase

Pour l'identification des bactéries lactiques il est nécessaire d'appliquer le test de recherche d'enzyme catalase, généralement les bactéries lactiques sont dépourvues de cette enzyme, mais certaines souches peuvent donner des résultats aléatoire puisque certaines

d'entre elles possèdent des pseudos catalase qui rendent la réaction positive. (**Desmazeaud et De Roissart, 1994**)

Cette activité catalytique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau, par la mise en contact des colonies avec quelques gouttes d'eau oxygénée. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester. (**Guiraud, 2003**)

Après avoir effectué les examens de la recherche de la catalase et de la coloration de Gram, toutes les bactéries Gram positives et catalase négatives sont présumées comme bactéries lactiques. (**kihal, 1996 ; Carr et al, 2002**)

Les isolats Gram positif, catalase négatifs sont retenus pour la suite de l'étude.

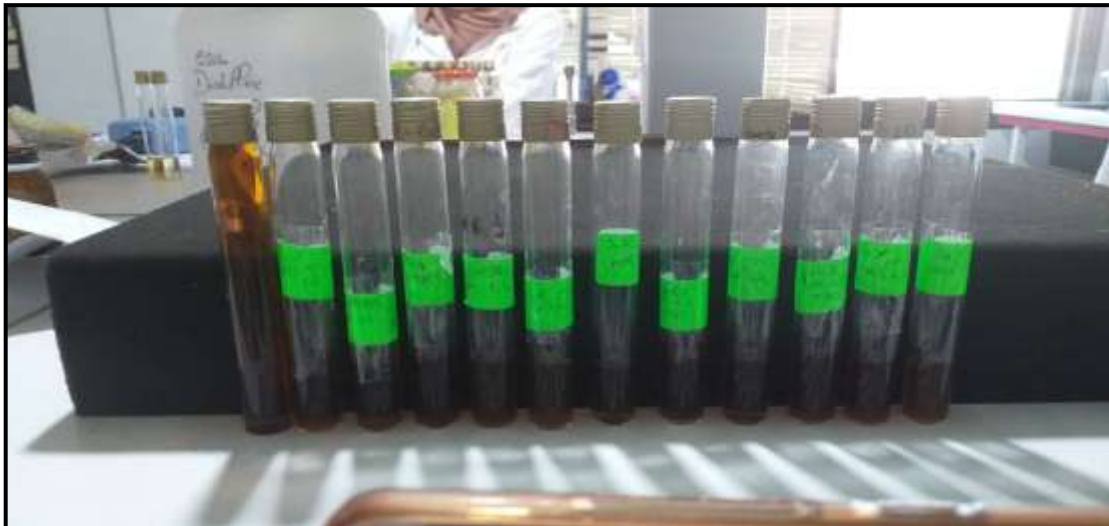


Figure (05) : Résultats de croissance dans un milieu MRS à pH = 6.2.



Figure (06) :
Observation
macroscopique de la
souche S4.



Figure (07) :
Observation
macroscopique de la
souche S5.



Figure (08) :
Observation
macroscopique des
souches S1CH et S2CH.



Figure (09) : Observation macroscopique de la souche S1.



Figure (10) : Observation macroscopique de la souche S2.

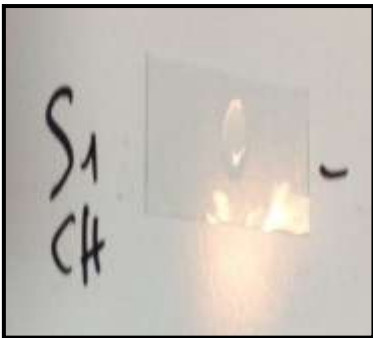


Figure (11) : Résultats négatif du test catalase souche S1CH.



Figure (12) : Résultats négatif du test catalase souche S1Y.

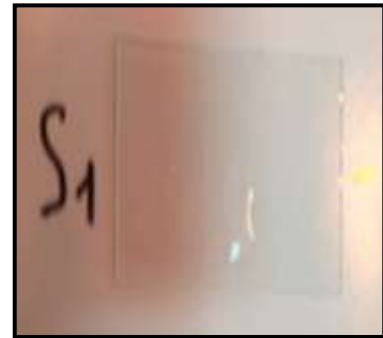


Figure (13) : Résultats négatif du test catalase souche S1.

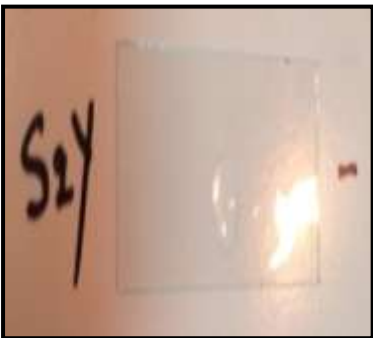


Figure (14) : Résultats négatif du test catalase souche S2Y.

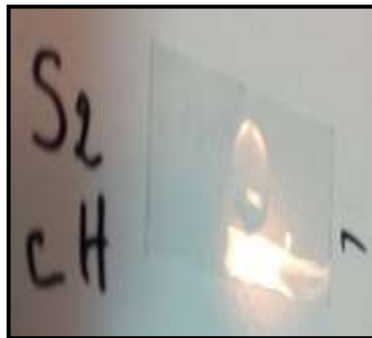


Figure (15) : Résultats négatif du test catalase souche S2CH.



Figure (16) : Résultats négatif du test catalase souche S4.

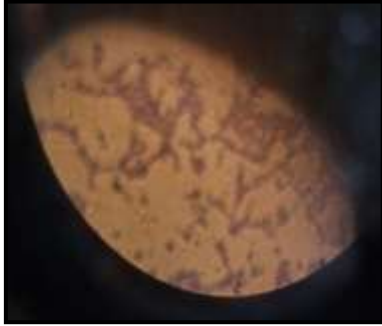


Figure (17) :
Observation
microscopique après
coloration de gram.

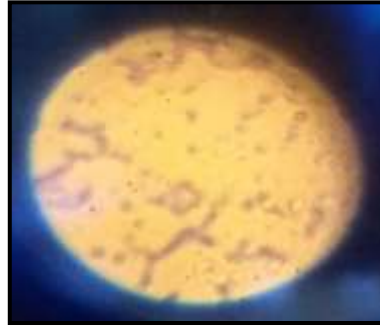


Figure (18) :
Observation
microscopique après
coloration de gram.

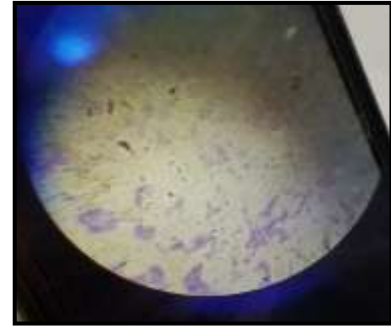


Figure (19) :
Observation
microscopique après
coloration de gram.

IV.2. Activité anti-inflammatoire

IV.2.1. Résultats de L'exposition des cellules Caco-2 aux lipopolysaccharides (LPS) et traitement probiotique

Dans cette étude de **Devi et al. (2018)**, qui consiste à exposer des lignées cellulaires Caco-2 aux lipopolysaccharides (LPS) pour induire l'inflammation afin de voir l'effet d'un traitement probiotique, on remarque d'après les résultats affichés sur la **figure 20** que pendant le traitement, le TNF- α n'a montré aucune expression significative dans les cellules stimulées par les LPS ($p > 0,05$). Tandis que les cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 α et IL-8 régulé par l'ARNm mont affiché une baisse du niveau d'expression dans les cellules traitées par les souches en post-traitement. De même, les cytokines anti-inflammatoires ont induit la hausse de l'expression génique d'IL-4 et d'IL-10 chez les cellules traitées par *Lactobacillus plantarum* MTCC 9483 et *L.rhamnosus* GG. Un signal négligeable a été remarqué pour les souches *Lactobacillus plantarum subsp.plantarum* MCC 3446 et *Lactobacillus plantarum subsp.plantarum* MTCC 5422 pour l'expression du gène IL-10. Le niveau d'expression maximum du gène de la cytokine anti-inflammatoire IL-4 a été régulé par la souche *Lactobacillus paraplantarum* MTCC 9483 par rapport à autres. Toutes les souches ont pu réguler niveaux d'expression génique des gènes anti-inflammatoires significativement.

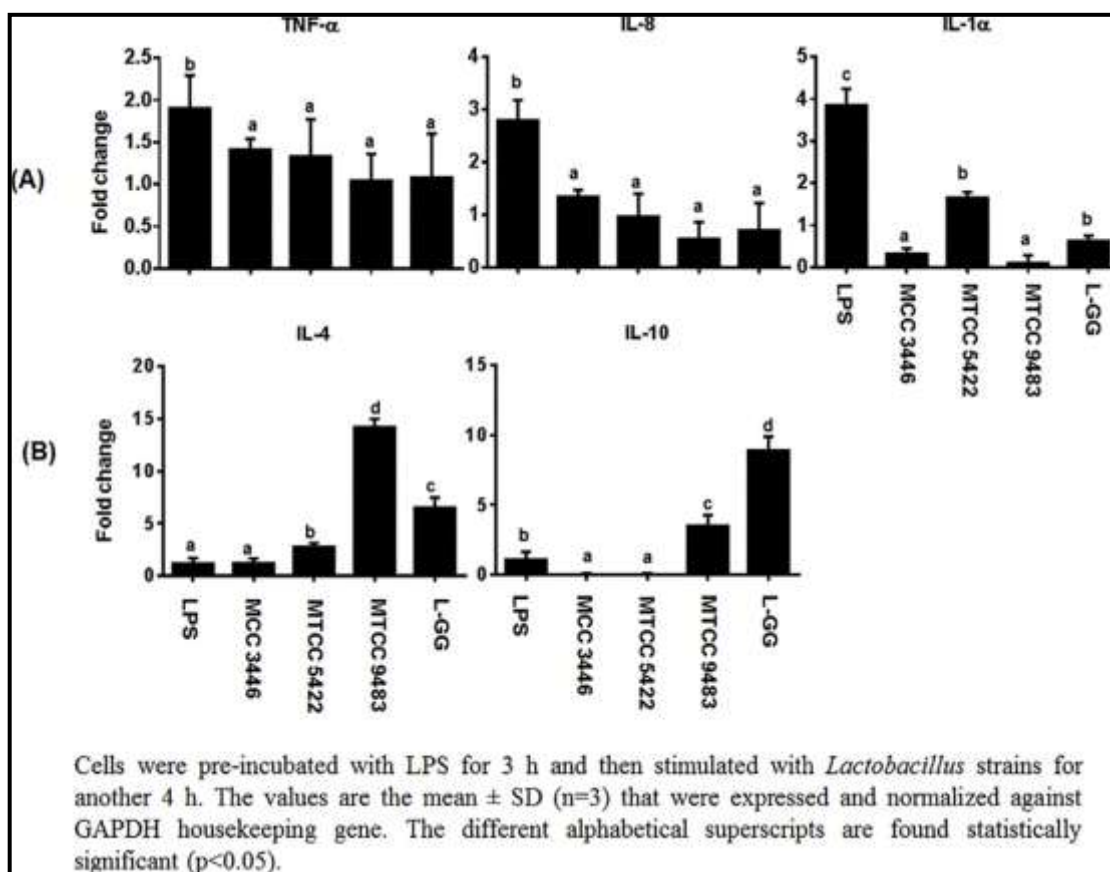


Figure (20) : Expression génique de pro-inflammatoire et cytokines anti-inflammatoires dans le LPS induit Cellules Caco-2 et suivi d'un traitement avec des bactéries probiotiques.

Les cellules ont été pré-incubées avec LPS pendant 3 h, puis stimulé avec Souches de *Lactobacillus* pendant encore 4 h. Les valeurs sont la moyenne ± ET (n = 3) exprimée et normalisé par rapport au ménage GAPDH gène. Les différents exposants alphabétiques sont trouvé statistiquement significatif (p <0,05).

IV.2.2. Activité anti-inflammatoire du sérobiome dans les cellules mononuclées du sang périphériques humaines

D'après l'étude de **Sichetti et al. (2018)**, pour étudier l'activité anti-inflammatoire d'une formulation (*Lactobacillus plantarum*, et *L.rhamnosus* GG, *Lactobacillus paraplantarum*) de bactéries probiotiques, on a testé sa capacité à stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α) et anti-inflammatoires (IL-10) *in vitro*. Les résultats obtenus sont affichés sur les figures 21 et 22 tandis que les paramètres biochimiques et inflammatoires sont affichés sur le tableau 5.

Les PBMC de volontaires sains ont été traités pendant 4 heures avec différents ratios effecteur / cible (E / C) de bactéries probiotiques. La formulation bactérienne directement en contact avec les PBMC a pu induire une quantité significative de TNF- α à un rapport E / C de 10: 1, 1: 1 et 1:10.

Un rapport de 100: 1 n'a pas stimulé la production de cytokines. Une tendance similaire a été observée pour la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire l'IL-10. Au lieu de cela, les rapports de 1:10 et 1: 100 étaient toxiques pour les PBMC avec une conséquence faible production de cytokine pro-inflammatoire. Le meilleur rapport E /C non toxique était de 1: 1 comme le suggère l'augmentation du rapport TNF- α / IL-10 de 1,6 à 2,4.

Pour approfondir les effets in vitro du sérobiome sur l'inflammation, les PBMC ont été mis au défi pour 4 heures avec du LPS avant et après le traitement probiotique, indiqué.

Le prétraitement des PBMC avec le mélange probiotique dans un rapport de 1: 1 n'a pas réduit la sécrétion du TNF- α pro-inflammatoire ; la même ration de probiotiques était capable d'induire une augmentation significative de la production de cytokine anti-inflammatoire IL-10 par rapport avec stimulation LPS. Le rapport 1:10 n'a pas influencé la production des cytokines, mais une viabilité cellulaire réduite, même si ce n'est pas de manière significative, au lieu de cela, le rapport 1: 100 était cytotoxique pour les PBMC à la fois avant et après les traitements avec une diminution significative du TNF- α .

La cytokine IL-10 n'a pas été produit lorsque les PBMC ont été prétraitées avec du sérobiome mais une sécrétion élevée de cytokine a été observée lorsque les cellules ont été traitées avec probiotiques après stimulation LPS. Ce résultat peut s'expliquer par le temps d'incubation des PBMC avec probiotiques en post-traitement (8 heures) par rapport au prétraitement (4 heures). Globalement, ces les résultats suggèrent que les pré- et post-traitements avec les bactéries probiotiques *Lactobacillus plantarum*, et *L.rhamnosus* GG, *Lactobacillus paraplantarum* sont capables de moduler la réaction inflammatoire (figures 21, 22, 23).

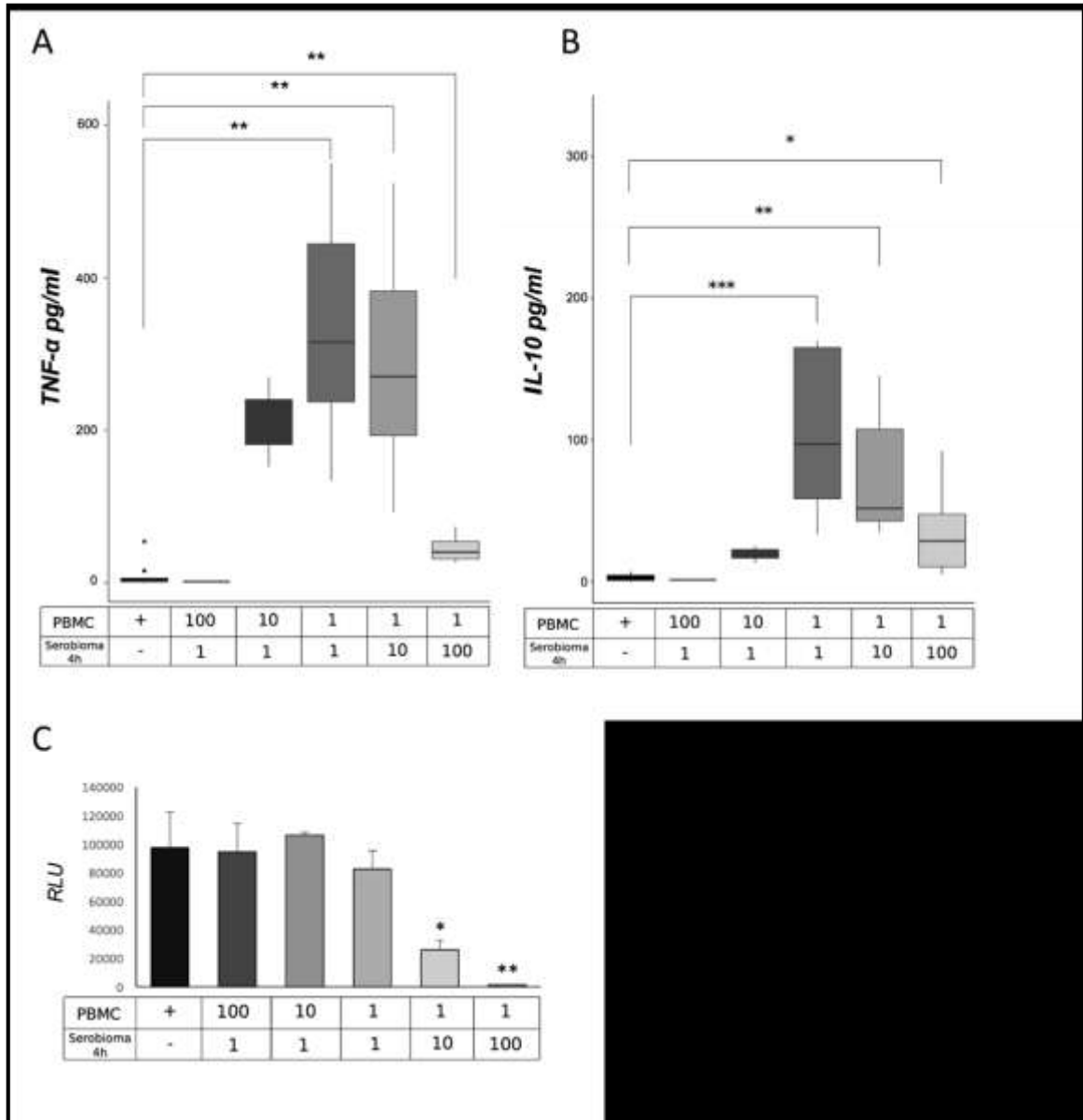


Figure (21) : Activité anti-inflammatoire de Serobioma dans les PBMC humaines avec stimulation LPS. Le rapport entre les PBMC et le sérobiome est exprimé en cellules effectrices (probiotiques) par rapport aux cellules cibles (PBMC) comme indiqué sur la figure. (A) Cytokine pro-inflammatoire TNF α et (B) Production de cytokine anti-inflammatoire IL-10 par les PBMC dans réponse du LPS en présence de différents rapports de mélange probiotique (1: 1, 1:10 et 1: 100) pendant 4 heures. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM de douze échantillons regroupés à partir de douze expériences différentes. (C) Activité de cytotoxicité du sérobiome. La luminescence des PBMC vivantes dans la culture testée avec des probiotiques est exprimée en unités de luminescence relative (RLU). La différence statistique entre les cellules non traitées et traitées a été calculée par test t * P <0,05 et ** P <0,01.

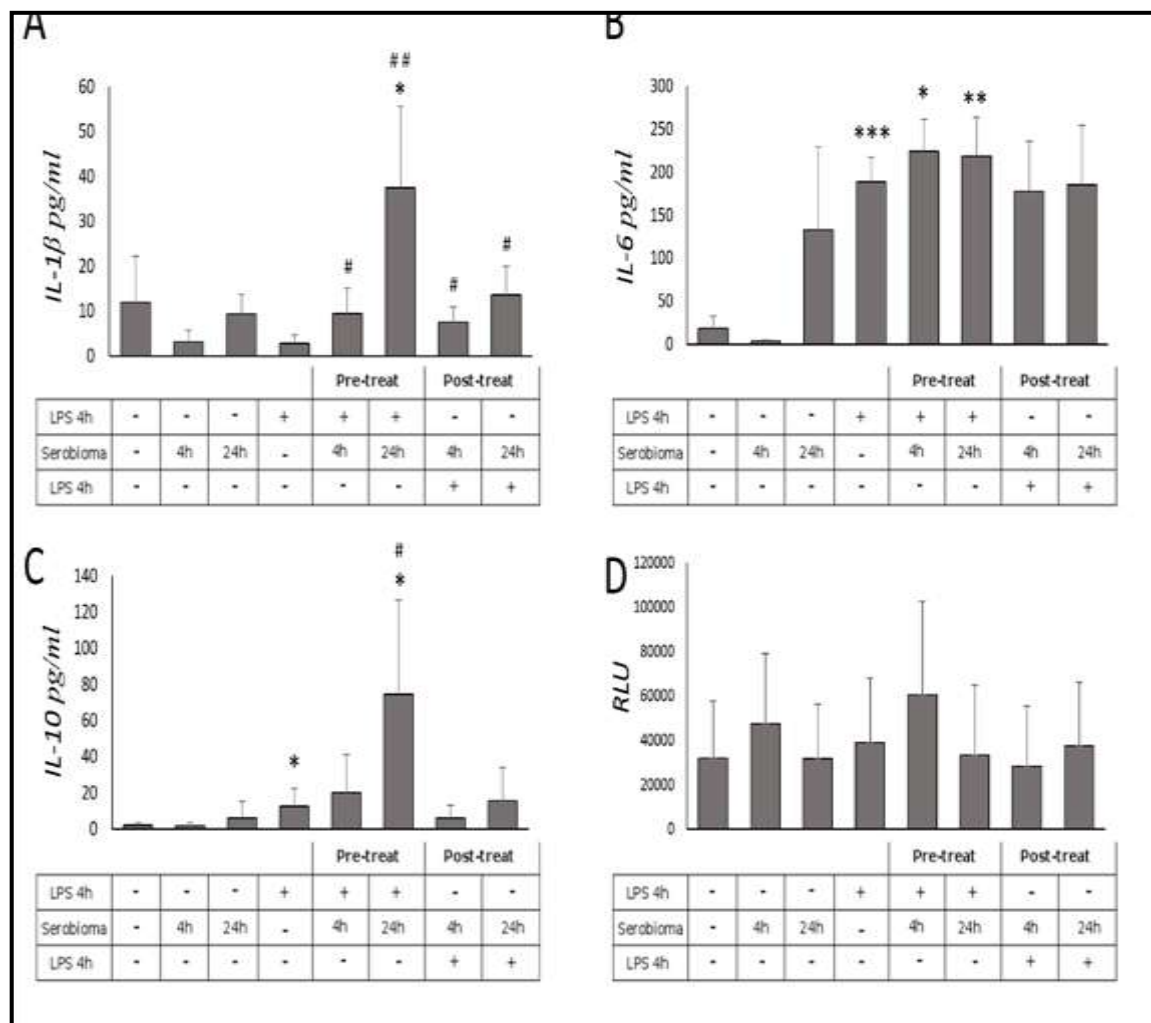


Figure (22) : Activité anti-inflammatoire de Serobioma sur la production de cytokines de MDM dans un modèle de co-culture avec HT-29 lignée cellulaire épithéliale. Les monocouches de HT-29 ont été directement provoquées avec du LPS (4 heures) et le rapport 1:10 du mélange probiotique pendant 4 ou 24 heures. Les données sont exprimées en moyenne de six expériences différentes \pm écart-type. Différences statistiques entre les cellules non traitées et traitées et le LPS ont été calculés par test t * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (cellules traitées par LPS par rapport aux cellules non traitées); # $< 0,05$, ## $< 0,01$ (cellules traitées par LPS + sérobiome versus cellules traitées par LPS).

Tableau (05) : Caractéristiques cliniques et biochimiques après 8 semaines de consommation d'une souche probiotique, WEISSELLA CIBARIA JW15.

	Placebo (n=41)	Test (n=41)	P ^a	P ^b	P ^c
BMI (kg/m ²)	22.8 ± 0.33	23.1 ± 0.52	0.641	0.735	0.831
Systolic BP (mmHg)	113.9 ± 2.34	112.9 ± 1.93	0.751	0.807	0.925
Diastolic BP (mmHg)	68.7 ± 1.52	69.6 ± 1.33	0.683	0.351	0.401
Glucose (mg/dL) [§]	87.1 ± 1.10	88.5 ± 1.30	0.421	0.568	0.431
Triglyceride (mg/dL) [§]	112.1 ± 8.25	102.0 ± 7.71	0.301	0.935	0.641
Total cholesterol (mg/dL) [§]	204.6 ± 4.90	195.4 ± 6.53	0.164	0.443	0.731
HDL-cholesterol (mg/dL) [§]	66.2 ± 2.15	62.6 ± 2.24	0.231	0.476	0.352
LDL-cholesterol (mg/dL) [§]	116.0 ± 4.86	112.4 ± 5.98	0.387	0.230	0.336
White blood cells (×103/μL) [§]	5.25 ± 0.19	5.41 ± 0.21	0.561	0.510	0.496
TNF-α (pg/mL) [§]	12.4 ± 0.88 ^{**}	14.6 ± 3.03 ^{***}	0.969	0.844	0.608
IL-6 (pg/mL) [§]	2.91 ± 0.20	4.97 ± 1.76	0.469	0.396	0.255
IL-1β (pg/mL) [§]	2.14 ± 0.34 [*]	2.38 ± 0.36	0.717	0.385	0.341
IL-12 (pg/mL) [§]	61.5 ± 9.43	54.9 ± 7.19	0.385	0.094	0.243
IFN-γ (pg/mL) [§]	14.4 ± 9.31 ^{***}	13.3 ± 3.74 [*]	0.438	0.700	0.716
Immunoglobulin G1 [§]	7276.8 ± 219.2	7306.3 ± 262.3	0.867	0.037	0.070
Immunoglobulin G2 [§]	4717.8 ± 226.0	4740.0 ± 257.4	0.874	0.214	0.254
NK cell activity 10:1 (%) [§]	21.5 ± 2.77	31.0 ± 3.09 ^{**}	0.003	0.022	0.014
NK cell activity 5:1 (%) [§]	14.2 ± 2.03	23.1 ± 2.12 ^{***}	<0.001	0.004	0.002
NK cell activity 2.5:1 (%) [§]	10.6 ± 1.67	17.9 ± 1.80 ^{***}	<0.001	0.005	0.003
NK cell activity 1.25:1 (%) [§]	7.74 ± 1.29	14.1 ± 1.72 ^{**}	<0.001	0.010	0.004

Déterminé suite à une transformation logarithmique; Valeurs PA dérivées d'un test t indépendant lors du suivi. Valeurs Pb dérivées d'un test t indépendant pour la valeur modifiée. Pc-valeurs dérivées d'une ANCOVA pour ajuster les valeurs de base pour la valeur modifiée.

* P <0,05 dérivé d'un test t apparié dans chaque groupe.

** P <0,01 dérivé d'un test t apparié dans chaque groupe.

*** P <0,001 dérivé d'un test t apparié dans chaque groupe.

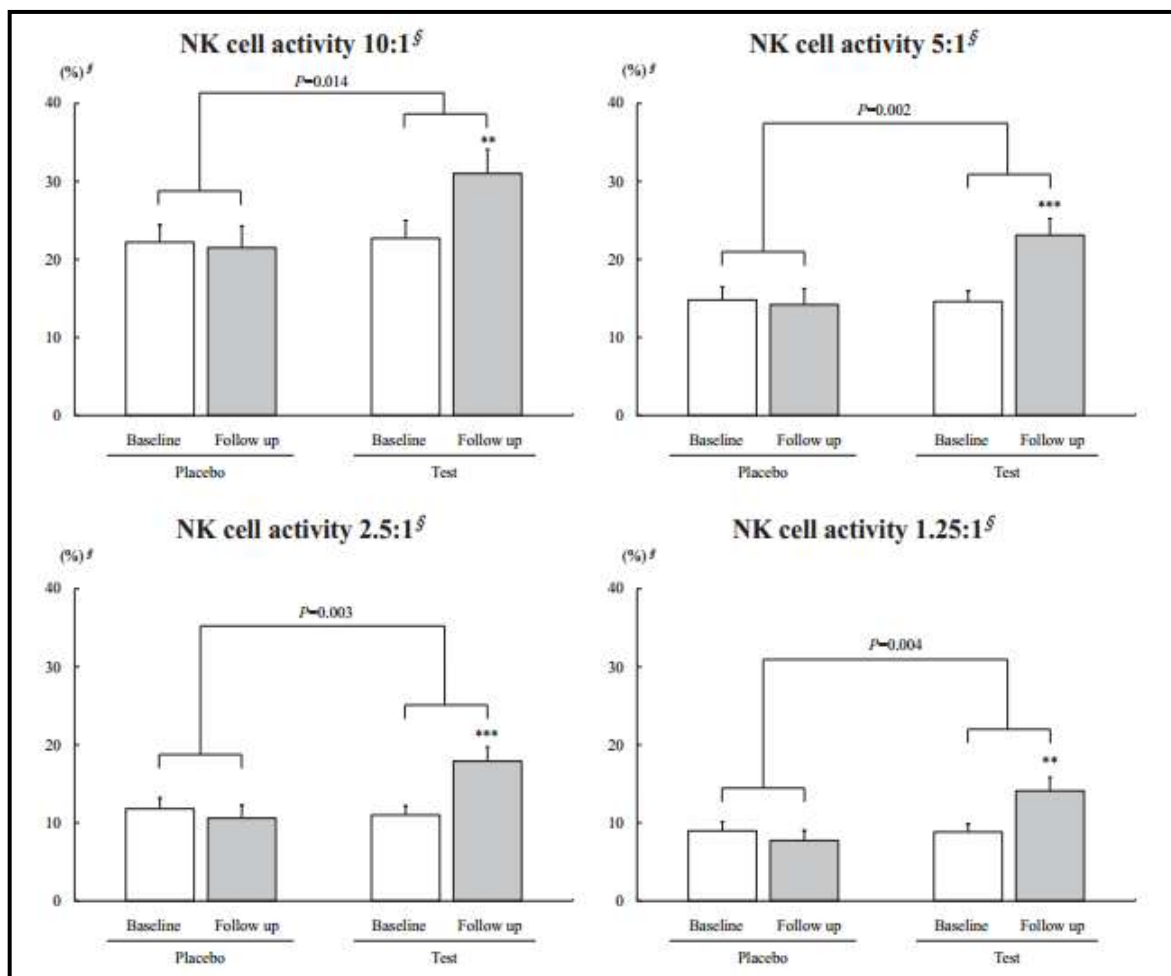


Figure (23) : Effets de la consommation de la souche probiotique WEISSELLA CIBARIA JW15 pendant 8 semaines sur l'activité des cellules NK. Moyenne \pm SE. Détermine suite à une transformation logarithmique; Les valeurs p ont été dérivées de l'ANCOVA pour ajuster les valeurs de base pour la valeur modifiée. * P <0,05, ** P <0,01 et *** P <0,001 dérivé d'un test t apparié dans chaque groupe.

IV.3. Discussion des résultats

Le but de ce travail était d'examiner l'effet anti-inflammatoire des probiotiques chez les adultes en bonne santé n'ayant pris aucun médicament anti-inflammatoire.

Il existe des preuves limitées et variées que la supplémentation en probiotiques chez l'adulte en bonne santé module les marqueurs immunitaires et inflammatoires par rapport à un médicament anti-inflammatoire de référence.

Bien que limité, cette étude s'aligne sur d'autres études examinant les facteurs connexes principalement l'activité anti-inflammatoire dans différentes pathologies y compris les maladies gastro-intestinales, les œdèmes... Cependant, l'objectif de cette étude systématique est d'examiner les marqueurs plus à proximité des mécanismes d'action des probiotiques, en examinant les marqueurs circulants dans la réponse immunitaire et inflammatoire.

Dans l'étude de (Archer et al., 2015), l'effet anti-inflammatoire du traitement probiotique a été évalué dans un modèle inflammatoire aigu induit par la carraghénane in vivo. Pour améliorer la viabilité et la stabilité, les cultures probiotiques ont été encapsulées sous forme de microémulsions et administrées à des rats ainsi que des groupes de traitement non encapsulés.

Le carraghénane est un polysaccharide linéaire d'algues sulfatées dérivé d'une espèce d'algues rouges marines.

Le carraghénane est largement utilisé comme agent phlogistique connu pour induire une inflammation aiguë et est un modèle classique appliqué dans l'étude des AINS. De plus, étant non antigénique et dépourvu d'effets systémiques, le carraghénane est connu pour produire une réponse pro-inflammatoire. L'œdème provoqué par l'injection de carraghénane est caractérisé par un gonflement de la zone localisée remplie de liquide et de leucocytes comme en témoigne l'augmentation de l'épaisseur des pattes.

La réponse inflammatoire est de nature bi phasique où la phase initiale dans les premières heures après injection est arbitrée par la libération d'histamine, de sérotonine et de kinines. Cependant, la deuxième phase, les prostaglandines sont libérées qui sont les principaux médiateurs d'inflammation. On suppose que *Lactobacillus* sp. peut stimuler la

production des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10, IL-4 et IL-13 qui inhibent la synthèse des prostaglandines. En outre, ils peuvent bloquer la voie de la cyclooxygénase d'une manière similaire à l'action de médicaments anti-inflammatoires comme le Diclofénac sodique.

Le traitement probiotique a montré une augmentation de motilité par rapport au groupe témoin carraghénane. (Archer *et al.*, 2015).

Malgré l'existence de mécanismes de base partagés pour les probiotiques, d'autres mécanismes sont probablement étroitement distribués parmi d'autres espèces probiotiques. En outre, la spécificité de la souche a procédé un potentiel probiotiques est présumée sauf si les recherches suggèrent le contraire (Sanders *et al.*, 2018). Dans les études incluses dans ce travail, les espèces des genres *Lactobacillus* étaient les plus couramment utilisées. De plus, plusieurs études eues des traitements composés de plusieurs souches. Ces formulations en font difficile d'identifier quelle souche est à l'origine d'un effet, ou si un effet additif, synergique ou antagoniste est en cours.

C'est pour cela que d'autres études récentes ont établi que les aspects fonctionnels des probiotiques sont très spécifiques à la souche et leurs effets biologiques ne peuvent pas être jugés au niveau des espèces. (Ramos *et al.*, 2013) Les chercheurs doivent donc rechercher en permanence de nouveaux probiotiques.

De plus, dans l'étude in vitro de (Devi *et al.*, 2018), le LPS a déclenché une réponse inflammatoire dans les cellules Caco-2 et inhibé la signalisation de l'IL-8, TNF- α et TLR-2 CK chez les espèces *L. plantarum* et *L. rhamnosus*.

Une tentative d'étudier la réponse immunitaire d'une infection post-bactérienne des cellules Caco-2 avec des souches probiotiques, modèle d'expression de l'ARNm pour différents gènes de production des cytokines pro et anti-inflammatoires a été réalisée. Les espèces *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* et *Bifidobacterium* ont régulé l'expression des gènes des IL-1 et TNF- α dans les cellules Caco-2 infectées par les souches *E. coli*, *Salmonella typhimurium* et *Campylobacter jejuni*. (Bahrami *et al.*, 2010)

Cependant, dans cette étude, lors de la stimulation des cellules Caco-2 avec des souches probiotiques, une importante régulation positive de l'IL-4, IL-10 et les gènes TGF β 1 ont été notés, suggérant leur fonctionnalité probiotique.

Dans des modèles animales de maladies inflammatoires, l'IL-4 s'est avéré posséder une activité anti-inflammatoire en réduisant les effets du TNF- α . (**Woodward et al., 2010**)

Diverses recherches ont démontré que les bactéries probiotiques peuvent aider notre microbiote et moduler divers maladies inflammatoires qui affectent le tractus gastro-intestinal. Aujourd'hui, un grand nombre de souches probiotiques sont disponibles dans différentes formulations commerciales destinées comme compléments alimentaires. Habituellement, ces produits sont des mélanges probiotiques multi-souches car chaque souche peut avoir un effet additif ou synergique.

Dans l'étude de (**Sichetti et al., 2018**), la formulation de *L. rhamnosus*, *B. lactis* et *B. longum* a pu induire une action pro-inflammatoire TNF- α et IL-10 anti-inflammatoire dans les PBMC de manière dose-dépendante.

Globalement, l'effet des probiotiques sur les marqueurs inflammatoires et immunitaires ont montré une grande variance entre les études incluses, Cependant, il y avait quelques similitudes, notamment des effets significatifs observés dans le système immunitaire (l'activité des cellules NK, monocytes, cellules T, immunoglobulines) (**Kim et al., 2006 ; Lee et al., 2018**), et les marqueurs inflammatoires (CRP, IL, TNF-a) (**Sierra et al., 2010 ; Rajkumar et al., 2014**).

Quatre études rapportant les effets significatifs de la supplémentation en probiotique ont signalé des marqueurs immunitaires ou inflammatoires comme principal résultat. (**West et al., 2014; Lee et al., 2018 ; Rajkumar et al., 2014 ; Rajkumar et al., 2015**).

Compte tenu de l'ensemble des recherches, il existe des preuves limitées pour les résultats visés. Ceci est en accord avec une méta-analyse par Kang et ses collègues. (**Kang et al., 2013**)

La réponse immunitaire et l'inflammation sont difficiles à démontrer chez des personnes en bonne santé ayant généralement un bon fonctionnement du système immunitaire, 3 études faites sur l'administration des probiotiques ont signalé un effet significatif sur les Marqueurs du système immunitaire (**Kim et al., 2006 ; Lee et al., 2018 ; Marcial et al., 2017**).

Par exemple, l'activité des cellules NK, du système immunitaire inné, semble être stimulé par l'ingestion de probiotiques (**figure (23)**).

Ces recherches ont plusieurs limites. Premièrement la recherche comprenait des probiotiques d'un genre commun disponibles commercialement. Et la stratégie de recherche manqué quelques études sur de nouvelles souches qui n'étaient pas encore classés comme probiotiques. Deuxièmement, la qualité des études était variée, troisièmement une combinaison de plusieurs souches était étudiée ensemble ce qui peut conduire à une disparité ainsi que l'usage de substances qui pourraient entrainer des lésions intestinales, fièvre.



Conclusion Générale



CONCLUSION GENERALE

Bien qu'ils soient étudiés depuis environ 100 ans, l'utilisation des probiotiques n'a attiré une attention croissante que récemment. Cela tient en grande partie à la difficulté d'établir un véritable mécanisme d'action pour différentes souches probiotiques.

Dans le but d'identifier les souches à effet probiotiques, une caractérisation morphologique basée sur les observations macroscopique et microscopique et des tests biochimiques ont été réalisés.

Cette approche est effectuée par les étapes suivantes :

- La purification des souches présumées probiotiques, l'identification phénotypiques par les tests usuels : coloration de Gram, catalase.
- L'exploration d'une activité anti-inflammatoire probable par ces souches nouvellement isolées.

Les résultats de l'étude anti inflammatoire n'ont élucidé que la souche *Lactobacillus* d'origine végétale à activité anti-inflammatoire. Parmi toutes les souches utilisées, *Lactobacillus paraplantarum* MTCC9483 s'est révélé posséder une forte propriété anti-inflammatoire contre l'inflammation induite par LPS, la seconde étude a prouvé les propriétés fonctionnelles en tant que complément alimentaire contre l'inflammation.

L'étude in vivo à montrer qu'à la fois libres et sous forme de microémulsions les cultures probiotiques ont montré une activité anti-inflammatoire en réduisons significativement l'épaisseur de la patte par rapport au groupe témoin induite par le carragénine.

L'Administration orale de la souche *Lactobacillus sp* pourrait inhiber la synthèse des prostaglandines via la voie cyclooxygénase et baisser la production des cytokines pro-inflammatoires simultanément et régulant les cytokines anti-inflammatoire. Quand a la dernière étude, elle a mis en évidence la capacité anti-inflammatoire d'un mélange probiotique sur un modèle transwell pour prévenir l'inflammation en induisant l'IL-10 et en réduisant la production des cytokines pro-inflammatoires.

L'ensemble de ces résultats suggèrent la réalisation d'autres études pour promouvoir les bienfaits sur la santé des bactéries probiotiques.



Références
bibliographiques



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Archer A.C., S.P. Muthukumar, P.M. Halami. (2015). Antiinflammatory potential of probiotic *Lactobacillus* spp. on carrageenan induced paw edema in Wistar rats, *International Journal of Biological Macromolecules*. 8, 937-941.

Achinto, S; Muniruddin, A. (2009). The analgesic and anti-inflammatory activities of the extract of *Albizia lebbek* in animal model. *Pak. J. Pharm. Sci*,22, 74-77.

Aguilar, J.L; Rojas, P; Marcelo, A; Plaza , A; Bauer, R; Reininger , E; Klaas, C.A; Merfort, I.(2002). Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 271-276.

Asehnoune, K ; Édouard, A.(2006). Réponse inflammatoire et polytraumatisme mise au point. *Réanimation*, 15 ,568–575.

Backhouse, N; Rosales , L; Apablaza, C; Goity, L; Erazo , S; Negrete , R;Theodoluz , C; Rodriguez , J; Delporte, C.(2008). Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 116 , 263–269

Bannwarth, B ; Berenbaum, F.(1999). Nouveaux anti-inflammatoires non stéroïdiens : donneurs de NO et inhibiteurs sélectifs de COX-2. *Rev Med Interne*; 20 :3 341-5

Burton JP, Cowley S, Simon RR, et al. Evaluation of safety and human tolerance of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12: A randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Food Chem Toxicol*.2011;49(9):2356-2364.

Childs CE, Röytiö H, Alhoniemi E, et al. Xylo-oligosaccharides alone or in synbiotic combination with *Bifidobacterium animalis* subsp.lactis induce bifidogenesis and modulate markers of immune function in healthy adults: A double-blind, placebo-controlled, randomised, factorial cross-over study. *Br J Nutr*. 2014;111(11):1945-1956.

Dayer J.M. (1994), Cytokines et anti-cytokines dans les rhumatismes inflammatoires.

Rev. Rhum. Mal. Osteoartic ; 61: 173S-180S.

Références bibliographiques

Devillier, Ph ; Millart, H ; Advenier, C. (1996). Action anti-inflammatoire des glucocorticoides. *Revue française d'Allergologie*, 36 : 8, 937-941.

Jenoure, P-J. (2004). Évaluation d'un anti-inflammatoire non stéroïdien topique dans le traitement de la douleur et de l'inflammation. *Presse Med*, 33, 3S10-3S13.

Kang EJ, Kim SY, Hwang IH, et al. The effect of probiotics on prevention of common cold: A meta-analysis of randomized controlled trial studies. *Korean J Fam Med*. 2013;34(1):2-10.

Kim HS, Park H, Cho IY, et al. Dietary Supplementation of probiotic *Bacillus polyfermenticus*, bispan strain, modulates natural killer cell and T cell subset populations and immunoglobulin G levels in humansubjects. *J Med Food*. 2006;9(3):321-327.

Langlade, A ; Bonnet, F. (1997). Efficacite Comparee des Anti-Inflammatoires Non Steroïdiens. *Mapar*.

Lee YJ, Lee A, Yoo HJ, Kim M, Noh GM, Lee JH. Supplementation withthe probiotic strain *Weissella cibaria* JW15 enhances natural killer

Martin, P.Y ; Desmeules, J. (2001).Risques rénaux des anti-inflammatoires non steroïdiens COX 2sélectifs. *Doul et Analg*, 3, 163-167

Marcial GE, Ford AL, Haller MJ, et al. *Lactobacillus johnsonii* N6.2modulates the host immune responses: A double-blind, randomized trial in healthy adults. *Front Immunol*. 2017;8:655.

Masresha, B; Makonnen, E; Debella, A. (2012). In-vivo anti-inflammatory activities of *Ocimum suave* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*.

Madsen, K., A. Cornish, et al. (2001). "Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function." *Gastroenterology*.121(3): 580-591.

Maragkoudakis, P. A., G. Zoumpopoulou, et al. (2006). "Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products." *International Dairy Journal*

.16(3): 189-199.

Marzia Sichetti, Stefania De Marco, Rita Pagiotti, Giovanna Traina, Donatella Pietrella, Anti-inflammatory effect of multi-strain probiotic formulation (*L. rhamnosus*, *b. lactis* and *b. longum*), *Nutrition* (2018)

Marteau P et Ramb J .C (1998). Probiotique en gastroentérologie, base rationnel, effets démontrés et perspectives. *Hepato-Gastro* N°4 ; Vol 5 .

Matsuzaki T. and Chin J(2000). "Modulating immune responses with probiotic bacteria." *Immunology and cell biology*. 78(1): 67-73.

McFarland, L. V. (2007). "Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea." *Travel Medicine and Infections Disease*. 5(2): 97-105.

Mikelsaar M., Türi M., Lencner H., Kolts K., Kirch R., and Lencner A. (1987).

Interrelations between mucosal and luminal microflora of gastrointestinal tract. *Nahrung*. 31, 449-56, 637-8.

Mitsuoka T. (1992). Intestinal flora and aging. *Nutr Rev.* 50(12), 438-46.

Mitsuoka, T. (1990). "Bifidobacteria and their role in human health." *Journal of Industrial Microbiology*. 6(4): 263-267.

Moumene B and Bendahmane M (2002). Etude des interactions négatives de bactéries lactiques contre des souches pathogènes et mutagenèse chez deux bactéries lactiques. *Génie biologique* p. :01-02-03.

Morishita T., Deguchi Y., Yajima M., Sakurai T and Yura T(1981). Multiple Nutritional Requirements of Lactobacilli: Genetic Lesions Affecting Amino Acid Biosynthetic Pathways. *J. Bacteriol.* 148, 64-71.

Mosilhey S H (2003). Influence of different capsule Materials on the physiological properties of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. *Doktor-Ingenieur, Institut für Lebensmittel Technologie*: 3-113.

Nagpal R., A. Kumar et al. (2012). "Probiotics, their health benefits and applications for

Références bibliographiques

developing healthier foods: a review." *FEMS microbiology letters*.**334**(1): 1-15.

Nagpal R., H. Yadav et al. (2007). "Potential of probiotics and prebiotics for symbiotic functional dairy foods: an overview." *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. **2**(2/3): 75.

Novel G. (1993). Les bactéries lactiques. In Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel, eds. *J Y. Leveau et M. Bouix*. Tec ET Doc. Lavoisier, Paris.; 1-11.

Ndiaye, M; Sy, G; Dièye, A.M, Touré, M.T; Faye, B. (2006). Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de feuilles d'*Annona reticulata* (Annonaceae) sur l'oedème aigu de la patte de rat induit par la carragénine. *Pharm. Méd. Trad. Afr. 2006, Vol. XIV, pp. 179-186*

Palomares I. C., Prérez-Morales R et Acedo-félisc E (2007). Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated froms mall intestine of piglets .*Rev. Latinoan. Microbiol.*49 (3-4):46-54.

Patterson (2008). Probiotiques : bien faits au- delà des fonctions nutritionnelles de base *AAFC*.1-4.

Rajkumar H, Mahmood N, Kumar M, et al. Effect of probiotic (VSL#3)and omega-3 on lipid profile, insulin sensitivity, inflammatory markers, and gut colonization in overweight adults: A randomized,controlled trial. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:348959.

Rajkumar H, Kumar M, Das N, et al. Effect of probiotic *Lactobacillus salivarius* UBL S22 and prebiotic fructo-oligosaccharide on serum lipids, inflammatory markers, insulin sensitivity, and gut bacteria in healthy young volunteers: A randomized controlled single-blind pilot study. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2015;20(3):289-298.

Rousselet, M.C ; Vignaud, J.M ; Hofman, P ; Chatelet, F.P. (2005). Inflammation et pathologie inflammatoire. Copyright AFECAP.

Raynaud, P. (2008). Anatomie pathologique et inflammation : Conception d'ensemble. Support de cours : Anatomie pathologique.

Salminen, S. J., M. Gueimonde, et al. (2005). "Probiotics that modify disease risk." *The*

Références bibliographiques

Journal of nutrition.135(5): 1294-1298.

Salminen S., Gorbach S., lee Y.K.et Benno Y(2004). Human studies on probiotic : Wheat is scientifically proven today .In: Lactic acid bacteria : microbiological and functional aspects (Salminen S., Wrightt.A.V.etouwehand A.).3^e Ed., *Marcel Dekker, Inc, Newyork*.515-530.

Sierra S, Lara-Villoslada F, Sempere L, et al. Intestinal and immunological effects of daily oral administration of *Lactobacillus salivarius* CECT5713 to healthy adults. *Anaerobe*. 2010;16(3):195-200.

Sundru M, K., Prakash M. et Halami(2018). In vitro anti-inflammatory activity among probiotic *Lactobacillus* species isolated from fermented foods. *Journal of Functional Foods*(47) :19.27

Tannock G.W. (1999). Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie VanLeeuwenhoek*.76:265-78.

West NP, Horn PL, Barrett S, et al. Supplementation with a single and double strain probiotic on the innate immune system for respiratory illness. *ESPEN J*. 2014;9(5):e178-e184.

White, M. (1999). Mediators of inflammation and the inflammatory process. *J Allergy Clin Immunol*, 103, 3, 2.

Winter C. A; Risley E.A. ; Nuss G.W. (1963). Carragenine-induced edema *in* ind-paw of rat as an assay for anti-inflammatory drug. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 141, 369-373.



Annexes



ANNEXES

* La composition des différents milieux d'isolement et d'indentification et des solutions utilisés :

➤ **La gélose MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)**

Composition	g/l
Peptone	10g
Extrait de viande	8g
Extrait de levure	4g
Glucose	20g
Acétate de sodium trihydraté	5g
Tween 80	1 ml
Hydrogénophosphate de potassium	2g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0.2g
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0.05g
Citrate d'ammonium	2g
Agar-agar	15g

pH = 6.5 et 5.4

Autoclavage 120°C pendant 120 min

➤ **Milieu M17**

Composition	g/l
Tryptone	2,5 g
Peptone papainique de soja	5,0 g
Peptone pepsique de viande	2,5 g
Extrait de viande	5,0 g
Extrait autolytique de levure	2,5 g
Béta-Glycérophosphate de sodium	19,0 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Lactose	5,0 g

Acide ascorbique	0,5 g
Agar-agar	15,0 g

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 5.4 et 6.5

- Autoclavage 120°C pendant 120 min

➤ **Solution d'Alsever**

Composition	g/l
Glucose	18,66g
Citrate de sodium	8g
Chlorure de sodium	4,18g
Acide citrique	0.55g

➤ **Solution du Tampon phosphate salin**

Composition	g/l
Chlorure de sodium	8g
Chlorure de Potassium	0.2g
hydrogénophosphate de sodium	1.44g
Monopotassium phosphate	0.24g

pH = 7.4