

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**  
**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**



**THESE**

*Présentée à*

L'Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem

Option : **Nutrition humaine.**



Pour l'obtention du titre de  
**DOCTEUR EN SCIENCES**

De l'université de Mostaganem

*Par*

**KEDDARI SOUMIA**

**Substances prébiotiques et aptitudes fermentaires des  
bifidobactéries.**

*Soutenu le ....Décembre 2014 devant le jury d'examen composé de*

:

**Président :** Mr Lotmani Brahim, Professeur à l'univ. Mostaganem.

**Rapporteur :** Mr Riazi Ali, Professeur à l'univ. Mostaganem.

**Examineurs :** Mr Benali Mohamed, Professeur à l'univ. Sidi-Bel-abbès.

Mr Slimani Miloud, Professeur à l'univ. Saida.

Mr Abbouni Bouziane, Professeur à l'univ. Sidi-Bel-abbès.

Mme Merzouk Hafida, Professeur à l'univ. Tlemcen.

.

**Année Universitaire : 2013/2014**

### ***Avant propos***

*Cette thèse a été réalisée dans sa plus grande part au sein du laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem dirigé par le Pr Ali Riazi. L'analyse quantitative et qualitative des acides organiques a été réalisée au niveau du laboratoire de la police scientifique de la sûreté de la wilaya d'Oran. L'étude histologique a été effectuée au niveau du laboratoire vétérinaire de Mostaganem.*

*Tout d'abord, J'adresse une profonde reconnaissance au Pr. **A. Riazi** de l'université de Mostaganem pour la formation qu'il m'a assuré depuis le magister. Je le remercie pour ses enseignements pédagogiques et scientifiques, son écoute, son ouverture d'esprit et sa vision de la recherche scientifique, qui m'ont beaucoup aidé à me construire intellectuellement. Un grand merci pour tous les coups de pouce, sans vous cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour.*

*Je souhaite témoigner mes remerciements tout aussi sincères aux membres de mon jury:*

*A Monsieur **Brahim Lotmani**, professeur à l'université de Mostaganem, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse, hommages respectueux.*

*A Monsieur **Mohamed Benali**, Professeur à l'université Djillali Liabès de Sidi bel Abbès, pour l'intérêt porté à mon travail, pour sa disponibilité et son enthousiasme, je vous témoigne ma profonde reconnaissance.*

*A Monsieur **Miloud Slimani**, professeur à l'université Moulay Tahar de Saida, qui m'a honoré de sa présence à mon jury, recevez mes sincères remerciements.*

*A Monsieur **Bouziane Abbouni**, Professeur à l'université Djillali Liabès de Sidi-Bel-Abbès, d'avoir accepté aimablement de faire partie de mon jury.*

*Je suis honorée par la participation de Madame **H. Merzouk**, professeur à l'université Abou bakr Belkaid de Tlemcen, à mon jury de soutenance et dont les critiques scientifiques valoriseront certainement ce travail.*

*Ma gratitude s'adresse également à Monsieur M. **Benmehdi**, docteur vétérinaire et directeur de laboratoire vétérinaire de Mostaganem qui m'a initié dans le domaine de l'histologie. Sa rigueur, sa passion m'ont permis d'évoluer et ont participé grandement à ma formation. Je le remercie pour sa confiance, son soutien, son aide, et ses encouragements.*

*Je remercie chaleureusement, Les directeurs de laboratoire Scientifique d'Oran et du Centre de développement des techniques avancées d'Alger pour m'avoir autorisé à effectuer des manipulations dans leurs structures.*

*Je tiens à présenter mes intenses remerciements à Monsieur H. Tlamci, gérant de la société Nutrimost de Mostaganem (Fabricant Aliment Animal), pour sa patience, et sa rigueur.*

*Un grand merci à tous mes collègues du **LMBAFS** et à son personnel pour cette ambiance de travail extrêmement agréable.*

*Je ne peux oublier les efforts de mon époux, **Mohamed Benmehdi**, qui m'a beaucoup épaulé pour finaliser cette thèse malgré ma grande responsabilité familiale, je lui suis très reconnaissante ; et je n'oublie pas aussi les encouragements de ma chère mère.*

**Mostaganem, Octobre 2014,**

**Soumia**

## Résumé

Cette étude porte sur l'effet prébiotique *in vitro* et *vivo* de différents substrats glucidiques sur le développement de souches bénéfiques du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*. L'expérience *in vitro* a consisté à tester l'effet prébiotique de cinq substrats (son entier de blé et d'avoine, chicorée, lactulose et pectine) et, des extraits en fibres insolubles et solubles de son de blé et d'avoine, utilisés comme seule source de carbone au taux de 2% (P/V) sur la cinétique de croissance et d'acidification de ces souches. Le score d'activité prébiotique des cinq substrats a été comparé à celui du glucose. Les résultats de cette première expérience indiquent que le lactulose est le substrat le plus métabolisé ; alors que la pectine et le son entier d'avoine le sont le moins, par toutes les souches testées. Le son entier de blé a manifesté le score d'activité prébiotique le plus élevé ; alors que le plus faible a été celui de la pectine, et ceci quelque soit la souche considérée. Mis à part les pectines et, dans une moindre mesure, le son entier d'avoine, tous les autres substrats prébiotiques arrivent à générer de l'acide lactique à des niveaux représentant 20 à 70% ceux enregistrés pour le glucose selon les souches. La croissance de l'ensemble des souches testées est 30% meilleure sur fibres de son de blé que sur son entier de blé ; alors qu'elle est très faible, aussi bien, sur fibres de son d'avoine que sur son entier d'avoine. Ces observations ont conduit au choix du son entier de blé comme substrat prébiotique à tester *in vivo* chez des souris conventionnelles Swiss, chez lesquelles ont été implantées séparément 4 souches bénéfiques (*B. animalis* subsp *lactis* Bb12, *B. bifidum* Bb443, *Lb. acidophilus* LbA-CECT478 et *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS). Une série de paramètres (poids des souris, implantation des souches bénéfiques, retombées sur la flore intestinale des souris, formulation et numération sanguine, glycémie, protéinémie, cholestérolémie, albuminémie, indice prébiotique, translocation bactérienne, histologie des reins, foie et rate) ont été évalués après les 4 semaines d'expérience. Les résultats obtenus ont montré que le son entier de blé favorise l'implantation des souches bénéfiques, induit une réduction des aérobies et une augmentation des anaérobies dans le tube digestif des souris. Il n'y a aucune modification des paramètres biochimiques et hématologiques au cours de cette expérience. Les examens histologiques révèlent la présence d'inflammation et de nécrose chez les souris gavées avec *Lb. acidophilus*. Le système immunitaire digestif est légèrement modulé par la présence des autres 3 souches bénéfiques.

**Mots clés** : Probiotiques- prébiotiques-Fermentescibilité- *Lactobacillus*-*Bifidobacterium*- *in vitro*- *in vivo*- -Souris Swiss conventionnelles.

## Summary

This study focused on the *in vitro* and *vivo* prebiotic effect of different carbohydrate substrates on the development of beneficial strains such as *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*. The *in vitro* experiment was run in order to test the prebiotic effect of five substrates (a whole wheat and oat bran, chicory, lactulose and pectin) and, insoluble and soluble fiber extracts of wheat and oat bran, used at 2% (P/V) as the only source of carbon on the kinetics of growth and acidification of these strains. Prebiotic activity score of the five substrates was compared to that of glucose. Results of this first experience indicate that the lactulose is the more metabolized substrate; whereas the pectin and the entire oat bran are the less metabolized, by all the tested strains. Whatever the strain used, the highest and the lowest prebiotic activity scores were those of the entire wheat bran and pectine. With an exception of pectin and, to a lesser extent, the entire oat bran, all other prebiotic substrates were able to generate lactic acid at levels varying with the used bacteria and representing 20 to 70% those registered with glucose. Growth performance of all strains on insoluble and soluble fiber extracts of wheat bran was 30% better than that on the whole wheat bran ; whereas there is no marked or improved growth registered with oat bran fiber extract or whole oat bran.

These observations have led to use the whole wheat bran as prebiotic substrate for the *in vivo* experiment with conventional Swiss mice who, separately, received 4 beneficial strains (*B.animalis* subsp. *lactis* Bb12, *B. Bifidum* Bb443, *Lb. acidophilus* LbA-CECT478 and *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS). A series of parameters (weight of mice, implantation of the beneficial strains, impact on the intestinal flora of mice, formulation and blood counts, glycemia, proteinemia, cholesterolemia, albuminemia, prebiotic index, bacterial translocation, histology of the kidneys, liver and spleen) were evaluated after 4 weeks of experiment. The results obtained have shown that the entire wheat bran stimulates the implantation of beneficial strains, induces a reduction of aerobic and an increase of the anaerobic bacteria in the digestive tract of the mouse. There are no changes in the biochemical and haematological parameters during this experience. Histological examinations reveal the presence of inflammation and necrosis in mice fed up with *Lb. Acidophilus*. The immune system of the digestive tract is slightly modulated by the presence of the 3 other beneficial strains.

**Key words:** probiotics - prebiotics- fermentability- *Lactobacillus*- *Bifidobacterium*- *in vitro*- *in vivo*- -conventional Swiss mouse.

## Liste des abréviations

ADN: Acide Désoxyribonucléique

AGCC : Acide gras à courtes chaînes

B.:Bifidobacterium

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

H : heure.

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Acide sulfurique.

**Hb : Hémoglobine**

HCl: Chlorure d'hydrogène.

IP: Indice prébiotique

kg : kilogramme

*Lb.* :*Lactobacillus*

LER. : Lait écrémé reconstitué

log : Logarithme.

mg : milligramme

min : minute

ml : millilitre

mM : milimolaire

mmol : milimole

MnCl<sub>2</sub> : chlorure de manganèse

nm: nanomètre.

Na : sodium

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

P/P : Poids/poids.

P/V : poids / volume.

pH : potentiel d'hydrogène.

ppm : Particules Par Million.

Qsp : Quantité suffisante pour

rpm: Rotation Par Minute.

SEBN-SBN : Régime témoin son entier de blé négatif- souche bénéfique négatif

SEBN-LbACECT4529P : Régime son entier de blé négatif- souche LbA-CECT4529 positif

SEBN-LBRE-LSASP : Régime son entier de blé négatif- souche LBRE-LSAS positif

SEBN-Bb12P : Régime son entier de blé négatif- souche Bb12 positif

SEBN-Bb443P : Régime son entier de blé négatif- souche Bb443 positif

SEBP-SBN : Lot témoin son entier de blé positif- souche bénéfique négatif

SEBP-LbACECT4529P : Régime son entier de blé positif- souche LbA-CECT4529 positif

SEBP-LBRE-LSASP : Régime son entier de blé positif- souche LBRE-LSAS positif

SEBP-Bb12P : Régime son entier de blé positif- souche Bb12 positif

SEBP-Bb443P : Régime son entier de blé positif- souche Bb443 positif

SP : Score d'activité prébiotique

UFC : Unité Formant Colonie

v/v: volume / volume.

## **Liste des tableaux et figures**

### **Liste des tableaux**

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Principaux critères d'acquisition du statut « prébiotique » par les glucides végétaux (Wang, 2009).	05
<b>Figure 2</b> : Fleurs et racines de <i>Cichorium intybus</i>	12
<b>Tableau 1</b> : Contenu (en %, P/P) en fibres prébiotiques de quelques végétaux à consommation courante	08
<b>Figure 3</b> : Les différents mécanismes des symbiotiques promoteurs d'effets santé (Saad et al., 2013) (Alanna et al., 1999).	14
<b>Figure 4</b> : Action des symbiotiques sur le système immunitaire de l'intestin (Ouwehand et al., 2002).	40
<b>Tableau 2</b> : Composition des milieux de cultures utilisés.	18
<b>Figure 5</b> : Composition bactérienne quantitative et qualitative en fonction de la région du tube digestif	42
<b>Tableau 3</b> : Nature et origine des différents milieux de culture utilisés dans l'expérimentation <i>in vivo</i> (Gibson & Rastall, 2004).	22
<b>Figure 6</b> : Son de blé, produit Bio	43
<b>Tableau 4</b> : Constituants de l'aliment témoin	31
<b>Figure 7</b> : Son d'avoine, produit Bio	45
<b>Tableau 5</b> : Différents types de régimes alimentaires administrés aux souris.	62
<b>Figure 8</b> : La chicorée, racine de <i>Cichorium Intybus</i>	69
<b>Tableau 6</b> : Concentration (mg/mL) en acides gras volatils à chaîne courte (AGCC) des milieux de culture fermentés pendant 48h par les différentes souches bénéfiques en présence des différents substrats prébiotiques (A : acétate, P : propionate, B : butyrate)	44
<b>Figure 10</b> : L'excision des échantillons de différents tissus de l'intestin (hépat, cœcum et colon).	48
<b>Tableau 7</b> : Biomasse (log UFC/mL) générée après 24 h de fermentation en présence de différentes sources de carbone. Les valeurs représentent la moyenne de trois déterminations ± écart type	49
<b>Figure 12</b> : Cinétique de croissance de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LbA- CECT 4529) monocultivée en présence d'un sucre monomère référentiel, le glucose ou de différents substrats glucidiques prébiotiques dimères ou polymères : lactulose, pectine, chicorée, son entier de blé ou d'avoine utilisés à un taux de 2% (P/V) dans le milieu MRS inoculé à 1% (V/V), soit une charge initiale de $1.10^7$ cellules/mL. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SEM.	54
<b>Tableau 8</b> : L'impact de la consommation de son entier de blé sur la microflore fécale des souris (log UFC/g crottes) après 28 jours d'administration quotidienne de souches bénéfiques.	107
<b>Tableau 9</b> : Les scores de l'indice prébiotique de son entier de blé dans les différents groupes de souris après 28 jours de traitement symbiotique (régime à base de son entier de blé + administration quotidienne de souche bénéfique).	111
<b>Figure 13</b> : cinétique de croissance de <i>Lactobacillus reuterus</i> LBRE-LSAS monocultivée en présence d'un sucre monomère référentiel, le glucose ou de différents substrats glucidiques prébiotiques dimères ou polymères : lactulose, pectine, chicorée, son entier de blé ou d'avoine utilisés à un taux de 2% (P/V) dans le milieu MRS inoculé à 1% (V/V), soit une charge initiale de $1.10^7$ cellules/mL. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SEM.	54
<b>Tableau 10</b> : Translocation bactérienne des souches administrées aux souris (exprimée en Tissue positif/Total des tissus examinés) dans le foie, les reins, la rate et le sang.	112
<b>Tableau 11</b> : Effets de l'administration de son entier de blé dur et de souches bénéfiques sur les paramètres hématologiques et biochimiques sanguins des souris après une administration orale des souches lactiques et bifides pendant 4 semaines.	114
<b>Figure 14</b> : cinétique de croissance de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb12 monocultivée en présence d'un sucre monomère référentiel, le glucose ou de différents substrats glucidiques prébiotiques dimères ou polymères : lactulose, pectine, chicorée, son entier de blé ou d'avoine utilisés à un taux de 2% (P/V) dans le milieu MRS inoculé à 1% (V/V), soit une charge initiale de $1.10^7$ cellules/mL. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SEM.	56
<b>Figure 15</b> : Cinétique de croissance de <i>Bifidobacterium bifidum</i> Bb443 monocultivée en présence d'un sucre monomère référentiel, le glucose ou de différents substrats glucidiques prébiotiques dimères ou polymères : lactulose, pectine, chicorée, son entier de blé ou d'avoine utilisés à un taux de 2% (P/V) dans le milieu MRS inoculé à 1% (V/V), soit une charge initiale de $1.10^7$ cellules/mL. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SEM.	58
<b>Figure 16</b> : Cinétique de croissance de <i>Lactobacillus plantarum</i> LbP CECT748 monocultivée en présence d'un sucre monomère référentiel, le glucose ou de différents substrats glucidiques prébiotiques dimères ou polymères : lactulose, pectine, chicorée, son entier de blé ou d'avoine utilisés à un taux de 2% (P/V) dans le milieu MRS inoculé à 1% (V/V), soit une charge	58

initiale de  $1.10^7$  cellules/mL. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM.

- Figure 17:** Cinétique d'acidification de *Lactobacillus acidophilus* (LbA-CECT 4529) (A), *Lactobacillus rhamnosus* (LBRE-LSAS) (B) et de *Lactobacillus plantarum* (Lbp-CECT748) (C) monocultivées en présence d'un sucre monomère référentiel, le glucose ou de différents substrats glucidiques prébiotiques dimères ou polymères : lactulose, pectine, chicorée, son entier de blé ou-d'avoine utilisés à un taux de 2% (P/V) dans le milieu MRS inoculé à 1% (V/V), soit une charge initiale de  $1.10^7$  cellules/mL. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM. **62**
- Figure 18:** Cinétique d'acidification de *Bifidobacterium bifidum* Bb 443 (A) et de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (B) monocultivées en présence d'un sucre monomère référentiel, le glucose ou de différents substrats glucidiques prébiotiques dimères ou polymères : lactulose, pectine, chicorée, son entier de blé ou son d'avoine utilisés à un taux de 2% (P/V) dans le milieu MRS inoculé à 1% (V/V), soit une charge initiale de  $1.10^7$  cellules/mL. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM. **64**
- Figure 19 :** Effet des différents substrats prébiotiques sur la production d'acide lactique (mg/mL) après 24 et 48h de fermentation par *Lb. Plantarum* (A), *Lb. acidophilus* (B), *Lb. rhamnosus* (C), *B. animalis* subsp *lactis* (D), *B. bifidum* (E). Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations (n=3)  $\pm$  SD. **68**
- Figure 20:** Scores d'activité prébiotique de cinq substrats (lactulose, son entier de blé, son entier d'avoine, chicorée et pectines) enregistrés après 24h de culture de la souche bénéfique *Lactobacillus acidophilus* LbA-CECT 4529. Les valeurs représentent la moyenne de trois déterminations  $\pm$  SEM (n=3). **73**
- Figure 21 :** Scores d'activité prébiotique de cinq substrats (lactulose, son entier de blé, son entier d'avoine, chicorée et pectines) enregistrés après 24h de culture de la souche bénéfique *Lactobacillus plantarum* LbP-CECT 748. Les valeurs représentent la moyenne de trois déterminations  $\pm$ SEM (n=3). **73**
- Figure 22 :** Score d'activité prébiotique de cinq substrats (lactulose, son entier de blé, son entier d'avoine, chicorée et pectines) enregistrés après 24h de culture de la souche bénéfique *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS. Les valeurs représentent la moyenne de trois déterminations  $\pm$ SEM (n=3). **74**
- Figure 23 :** Score d'activité prébiotique de cinq substrats (lactulose, son entier de blé, son entier d'avoine, chicorée et pectines) enregistrés après 24h de culture de la souche bénéfique *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12. Les valeurs représentent la moyenne de trois déterminations  $\pm$ SEM (n=3). **75**
- Figure 24 :** Scores d'activité prébiotique de cinq substrats (lactulose, son entier de blé, son entier d'avoine, chicorée et pectines) enregistrés après 24h de culture de la souche bénéfique *Bifidobacterium bifidum* Bb 443. Les valeurs représentent la moyenne de trois déterminations  $\pm$ SEM (n=3). **75**
- Figure 25 :** Cinétique de croissance (densité optique à 600 nm) des cinq différentes souches bénéfiques monocultivées pendant 30h en présence d'extraits de fibres insolubles (A) et solubles (B) de son de blé et inoculées à 1% (V/V), soit une charge initiale de  $1.10^7$  cellules/mL. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM. **80**
- Figures 26:** Cinétique d'acidification des milieux de culture contenant les fibres insolubles (A) ou **86**

**solubles (B) de son de blé** fermentés séparément par *Lb. plantarum* LbP-CECT748, *L. acidophilus* LbA-CECT4529, *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS, *B. animalis* subsp *lactis* Bb12 ou *B. bifidum* Bb443 inoculées à 1% (V/V). Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM.

- Figure 27:** Teneurs en acides organiques produits par les cinq différentes souches bénéfiques cultivées séparément en présence de fibres insolubles (A) ou solubles (B) de son de blé. Les milieux de culture ont été inoculés à 1% (V/V) par chacune des souches. Les valeurs représentent la moyenne de 2 déterminations  $\pm$  SEM. **88**
- Figure 28:** Cinétique de croissance (densité optique à 600 nm) des cinq différentes souches bénéfiques monocultivées pendant 30h en présence d'extraits de fibres insolubles (A) et solubles (B) de son d'avoine et inoculées à 1% (V/V), soit une charge initiale de  $1.10^7$  cellules/mL. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM. **93**
- Figure 29:** Cinétique d'acidification des milieux de culture contenant les fibres insolubles (A) ou solubles (B) de son d'avoine fermentés séparément par *Lb. plantarum* LbP-CECT748, *Lb. acidophilus* LbA-CECT4529, *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS, *B. animalis* subsp *lactis* Bb12 ou *B. bifidum* Bb443 inoculées à 1% (V/V). Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM. **95**
- Figure 30:** Teneurs en acides organiques produits par les cinq différentes souches bénéfiques cultivées séparément en présence de fibres insolubles (A) ou solubles (B) de son d'avoine. Les milieux de culture ont été inoculés à 1% (V/V) par chacune des souches. Les valeurs représentent la moyenne de 2 déterminations  $\pm$  SEM. **96**
- Figure 31:** Evolution du degré de prolifération (logUFC/g crottes) des différentes souches bénéfiques bifides dans le tube digestif des souris Swiss gavées à raison de 9 logUFC/mL par ces souches et recevant le régime dépourvu de son entier de blé dur. Le témoin (SEBN-SBN) représente, ici, le lot de souris n'ayant reçu ni souches bénéfiques, ni son entier de blé dur ; mais seulement le régime additionné de lait écrémé reconstitué (LER). Les valeurs représentent la moyenne de 6 déterminations  $\pm$  SEM (n=6) **99**
- Figure 32:** Evolution du degré de prolifération (logUFC/g crottes) des différentes souches bénéfiques lactiques dans le tube digestif des souris Swiss conventionnelles gavées par ces souches à raison de 9 logUFC/mL et nourries avec un régime dépourvu de son entier de blé dur. Les valeurs représentent la moyenne de six déterminations  $\pm$  SEM (n = 6). **99**
- Figure 33:** Evolution du degré de prolifération (logUFC/g crottes) des souches bénéfiques bifides dans le tube digestif des souris Swiss conventionnelles gavées par ces souches à raison de 9log UFC/mL et nourries avec un régime à base de son entier de blé dur. Les valeurs représentent la moyenne de six déterminations  $\pm$  SEM (n = 6). **103**
- Figure 34:** Evolution du degré d'implantation (logUFC/g crottes) des souches bénéfiques lactiques dans le tube digestif des souris Swiss conventionnelles gavées par ces souches à raison de 9log UFC/mL et nourries avec un régime à base de son entier de blé dur. Les valeurs représentent la moyenne de six déterminations  $\pm$  SEM (n = 6) **103**
- Figure 35:** Dissection des souris et prélèvement du foie, des reins et de la rate pour évaluation de la translocation bactérienne dans ces organes. **112**
- Figure 36:** Nécrose au niveau de l'iléon chez les souris conventionnelles recevant la souche *Lb. acidophilus* LbA CECT-4529 après un traitement de 28 jours. T : témoin sain, A, B,C : même échantillon à différent grossissement (40X et 100X) **118**
- Figure 37:** Inflammation (présence de neutrophiles périphériques :N) au niveau des tissus du colon des souris traitées par la souche lactique *Lactobacillus acidophilus* LbA CECT 4529 pendant 28 **119**

jours.

**Figure 38:** Stimulation du système immunitaire digestif des souris au niveau du colon (présence de plaque de peyer :PP), après un traitement orogastrique de 28 jours par la souche *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et un régime supplémenté de son ; T : colon normale ; B, C, D : même échantillon respectivement au grossissement, 10X, 40X et 100X. **120**

**Figure 39:** La modulation du système immunitaire de la souris par infiltration des lymphocytes après un traitement de 28 jours par les souches bénéfiques (*Lb.rhamnosus* LBRE-LSAS ou *B.bifidum* Bb12). **T** : tissus à l'état normal, **A** : Stimulation au niveau du caecum, **B** : Stimulation au niveau de l'iléon ; **C** : Stimulation à la base au niveau du colon. Grossissement 40X. **121**

## Table des matières

Avant propos

Résumé

Summary

Liste des abréviations

Liste des tableaux et figures

Table des matières

### Partie bibliographique

**Introduction**..... **01**

#### **CHAPITRE I : Substrats à potentiel prébiotique**

I.1. Définition du concept « prébiotique »..... **04**

I.2. Critères de sélection des prébiotiques..... **04**

I.2.1. L'indigestibilité..... **06**

I.2.2. Fermentescibilité des prébiotiques..... **06**

I.3. Diversité naturelle des prébiotiques..... **07**

I.3.1. Les glucides..... **07**

I.3.1.1. Les fructooligosaccharides..... **07**

I.3.1.2. L'inuline..... **08**

I.3.1.3. Les pectines..... **09**

I.3.1.4. Le Lactulose..... **09**

I.3.1.5. Galactooligosaccharides..... **09**

I.3.1.6. Les xylooligosaccharides (XOS)..... **10**

I.3.2. Les lipides et les protéines..... **10**

I.3.3. Les sons de céréales..... **10**

I.3.4. Les légumes comme source de prébiotiques.....	11
I.4. Les effets bénéfiques des prébiotiques.....	13
1.4.1. Effet sur la flore intestinale.....	13
1.4.2. Effets sur les fonctions physiologiques.....	15
1.4.3. Effets immuno-modulateurs des prébiotiques.....	15
I.4.4. Rôle des prébiotiques dans la prévention du cancer.....	16
1.4.5. Effets des prébiotiques sur le métabolisme des lipides.....	17
1.4.6. Effets des prébiotiques sur la gestion du poids.....	17

## **CHAPITRE II: physiologie du tube digestif et composition du microbiote intestinal**

II.1 Généralités sur l'appareil digestif.....	19
II.2. Composition et développement de la microflore.....	20
II.3. Rôle de la flore intestinale.....	21
II.3.1. Rôle métabolique.....	21
II.3.1.1. Métabolisme des glucides.....	21
II.3.1.2. Métabolisme des lipides.....	22
II.3.1.3. Métabolisme azoté.....	23
II.3.1.4. Production d'acides gras volatils à chaîne courte (AGCC).....	23
II.3.1.5. Métabolisme minéral et vitaminique.....	23
II.3.2. Rôle de défense.....	24
II.3.2.1. Effet barrière.....	24
II.3.2.2. Immuno-modulation.....	24
II.4. Rôle des probiotiques dans le maintien de l'équilibre de l'écosystème intestinal.....	25
II.4.1. Principales fonctions des probiotiques.....	25
II.4.1.1. L'effet barrière.....	25
II.4.1.2. L'immuno-modulation.....	26
II.4.1.3. Protection de l'épithélium.....	26
II.5. Effet des prébiotiques sur la flore intestinale.....	26
II.5.1. Prébiotiques et composition de la flore intestinale.....	26
II.5.2. Prébiotiques et fonctions intestinales.....	27
II.5.2.1. Prébiotiques, trophicité de l'épithélium intestinal et renouvellement cellulaire.....	27
II.6. Tolérance intestinale des probiotiques.....	28

## **Partie expérimentale**

### **CHAPITRE III : Matériels et Méthodes**

III.1. Expérimentation <i>in vitro</i> de la fermentation des substrats prébiotiques ...	<b>29</b>
III.1.1. Nature et origine des souches. ....	<b>29</b>
III.1.2. Substrats prébiotiques.....	<b>29</b>
III.1.2.1. Le son entier de blé.....	<b>29</b>
III.1.2.2. Le son entier d'avoine.....	<b>30</b>
III.1.2.3. La chicorée.....	<b>30</b>
III.1.2.4. Le Lactulose et la pectine.....	<b>30</b>
III.1.3. Choix des milieux de culture.....	<b>30</b>
III.1.3.1. Composition des milieux de cultures utilisés dans cette étude.....	<b>31</b>
III.1.4. Préparation des inoculas.....	<b>34</b>
III.1.5. Procédure de fermentation des différents substrats prébiotiques.....	<b>34</b>
III.1.6. Détermination de la cinétique de croissance et suivi du Ph. ....	<b>34</b>
III.1.7.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) des acides gras à chaîne courte (AGCC).....	<b>34</b>
III.1.7.1.1. Préparation de l'échantillon.....	<b>35</b>
III.1.7.1.2. Analyse des échantillons.....	<b>33</b>
III.1.7.2. Dosage colorimétrique de l'acide lactique.....	<b>34</b>
III.1.8. Détermination du score de l'activité prébiotique.....	<b>34</b>
III.1.9. Extraction des fibres solubles et insolubles à partir du son.....	<b>35</b>
III.1.9.1. La digestion enzymatique des sons de blé et d'avoine.....	<b>35</b>
III.1.9.2. La séparation des fibres solubles et insolubles.....	<b>36</b>
III.1.10. Fermentescibilité <i>in vitro</i> des extraits de fibres de son entier de blé et d'avoine.....	<b>36</b>
III.2. Expérimentation <i>in vivo</i> sur les souris swiss albinos conventionnelles....	<b>37</b>
III.2.1. Matériel biologique.....	<b>37</b>
III.2.1.1. Nature des souches.....	<b>37</b>
III.2.1.2. Les souris de l'expérimentation.....	<b>37</b>
III.2.2. Choix et composition des milieux de culture.....	<b>37</b>

III.2.3. Protocole expérimental d'étude <i>in-vivo</i> .....	41
III.2.3.1. Les conditions d'élevage des souris.....	41
III.2.3.2. Préparation des inoculas.....	42
III.2.3.3. Traitements des souris au prébiotique son entier de blé dur et aux souches bénéfiques.....	42
III.2.3.4. Inoculation oro-gastrique des souris par les souches bénéfiques .....	42
III.2.4. Techniques de mesure des paramètres microbiologiques, de l'indice prébiotique, de translocation bactérienne et des constantes hématologiques, biochimiques et histologiques.....	44
III.2.4. 1. Evaluation de la microflore intestinale des souris .....	44
III.2.4.2. Indice prébiotique (IP).....	45
III.2.4.3. Translocation bactérienne .....	45
III.2.4.4. Analyse hématologique et biochimique.....	45
III.2.4. 5. Analyse histologique.....	46
III.3. Validation Statistique.....	49

#### **CHAPITRE IV : Résultats et Discussion**

IV.1. La fermentescibilité <i>in vitro</i> des substrats prébiotique.....	50
IV. 1.1. Effet prébiotique des différents substrats sur la croissance bactérienne..	50
IV.1. 2. Effet prébiotique des différents substrats sur le pouvoir acidifiant des souches bactériennes.....	60
IV.1.2.1. Evolution du pH des milieux fermentés par les souches bénéfiques... 61	
IV.1.2.2. Production d'acides organiques au cours de la fermentation.....	64
IV.1. 3. Activité du score prébiotique.....	70
IV.1.4.1. Fermentescibilité <i>in vitro</i> des fibres de son de blé.....	78
IV.1.4.1.1. Cinétique de croissance des souches sur fibres de son de blé....	78
IV.1.4.1.2. Cinétique d'acidification des milieux à fibres de son de blé par les souches bénéfiques.....	83
IV.1.4.2. Fermentescibilité <i>in vitro</i> des fibres de son d'avoine.....	90
IV.1.4.2.1. Cinétique de croissance des souches sur fibres de son d'avoine..	90
IV.1.4.2.2. Cinétique d'acidification des milieux à fibres de son d'avoine par les souches bénéfiques.....	93
IV.2. Effet prébiotique <i>in vivo</i> du son de blé sur le microbiote intestinal des souris Swiss.....	97
IV.2.1. Implantation des souches bénéfiques en absence de son de blé.....	97

IV.2.2. Effet <i>in vivo</i> du son entier de blé sur la prolifération des souches bénéfiques .....	<b>101</b>
IV.2. 3. . Modification de la composition de la flore bactérienne intestinale.	<b>105</b>
IV.2.4. Indice prébiotique (IP).....	<b>110</b>
IV.2.5. La translocation bactérienne .....	<b>111</b>
IV.2.6. Résultats d’analyse hématologique et biochimique.....	<b>113</b>
IV.2. 7. Résultats d’analyse histologique.....	<b>115</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>122</b>

## Références bibliographiques

### Article

## INTRODUCTION

L'alimentation joue un rôle primordial dans l'état de santé de chacun ; mais demeure, cependant, un facteur très largement sous estimé dans notre pays où il n'est que dérisoirement pris en compte. Le système digestif est l'interface entre le monde extérieur et le monde intérieur. Tout aliment non digéré se comporte comme une toxine pour l'organisme « l'intestin est le moteur des maladies ». De ce fait, Il est, non seulement, l'organe clé de l'immunité du système digestif, mais aussi, celui de notre défense immunitaire globale. En effet, le tissu lymphoïde intestinal (GALT) représente la plus grande masse lymphoïde de l'organisme. Il contient plus de lymphocytes que tous les organes lymphoïdes secondaires. C'est l'acteur principal du système immunitaire acquis (Saad *et al.*, 2013) ; autant dire qu'il n'y a pas de bonne immunité sans intestins en bon état!

Il est surprenant de réaliser qu'il y a 100 fois plus de bactéries abritées par notre tractus digestif que de cellules qui forment la totalité de notre organisme ! C'est pourquoi, depuis une décennie, une attention particulière est portée sur les fonctions du côlon qui affectent la santé de l'hôte et la nutrition. De ce point de vue, la flore microbienne est la plus importante. Avec plus de  $10^{12}$  bactéries par gramme de contenu intestinal et plus de 500 espèces bactériennes différentes, le côlon est de loin la région du corps la plus riche en microorganismes.

C'est par le biais des fermentations que les bactéries du côlon produisent une très grande variété de composés pouvant avoir des effets néfastes ou bénéfiques sur la santé. Parmi eux, les acides gras à chaîne courte (AGCC) font partie des substances bénéfiques les mieux identifiées. On peut donc penser pouvoir moduler les effets sur la santé de l'hôte en modifiant la composition de cette flore intestinale de façon à en optimiser les fonctions bénéfiques à l'hôte.

Deux concepts ont alors émergé : celui des bactéries probiotiques et celui des substances prébiotiques. Un probiotique est un « organisme vivant qui, apporté comme complément alimentaire, affecte de façon bénéfique la santé de l'hôte en optimisant l'équilibre de sa flore intestinale » (Fuller *et al.*, 1989 ; Bergonzelli *et al.*, 2005). Quatre critères sont associés à cette définition: un probiotique doit pouvoir être produit à l'état viable et à grande échelle en vue d'applications industrielles, il doit rester viable et stable respectivement pendant son utilisation et durant son stockage, il doit être capable de survivre dans les conditions de l'écosystème digestif, et l'hôte doit en tirer un bénéfice santé.

Les bifidobactéries et les lactobacilles sont des bactéries potentiellement candidates au statut « probiotique » à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé de l'homme incluant la prévention et/ou le traitement des gastro-entérites, intolérance au lactose, cancer, hypercholestérolémie, etc... (Wickens *et al.*, 2008). Une des propriétés intéressantes de ces bactéries est leur capacité à moduler certaines fonctions du système immunitaire et remédier à certaines pathologies immunologiques.

Une autre approche qui permet, au moins en partie, d'éviter ces problèmes, est celle qui consiste à fournir des nutriments spécifiques à la flore bactérienne bénéfique déjà implantée ; et c'est ainsi que la notion de substance prébiotique est apparue. C'est à Gibson et Roberfroid (1995) que revient la définition d'une substance prébiotique «une substance prébiotique est un ingrédient alimentaire non digestible qui affecte de façon bénéfique la croissance et/ou l'activité d'un nombre limité de genres bactériens, améliorant ainsi la santé de l'hôte ».

Les glucides indigestes chez l'homme comprennent l'amidon résistant, les polysaccharides de la paroi cellulaire, les hémicelluloses, les pectines et les gommés. Or les produits céréaliers contiennent ces polymères végétaux. L'intérêt porté aux céréales quant à leurs potentialités d'utilisation en alimentation fonctionnalisée est très récent. Les céréales assurent 60% de la production alimentaire mondiale, fournissant des protéines, des fibres diététiques, de l'énergie, des minéraux et des vitamines nécessaires à la santé humaine.

On peut résumer les applications potentielles des céréales ou de leurs constituants à l'alimentation fonctionnalisée en quatre points représentés par leur contenu en: substances fermentescibles pour la croissance des microorganismes probiotiques, notamment les lactobacilles et les bifidobactéries, fibres diététiques capables d'engendrer des effets physiologiques bénéfiques, substances prébiotiques riches en glucides indigestes pour l'homme, matériaux d'encapsulation pour les microorganismes probiotiques afin d'en assurer la protection lors du transit.

L'ingestion de fibres, particulièrement celle de son de blé, est réputée capable de modifier la digestion et l'absorption intestinale chez l'homme et même de réparer certains troubles métaboliques dus à une alimentation sans fibres.

En observant que, d'une part, de nombreuses bactéries du tube digestif étaient capables de métaboliser le son de blé *in-vitro* et, d'autre part, de nombreux métabolites du tube digestif apparaissaient, disparaissaient ou se sont trouvés quantitativement modifiés quand un régime alimentaire est additionné de son de blé ; certains auteurs (Costabile *et al.*, 2007) ont pensé, à juste titre, que l'ingestion de son est à même capable de moduler la composition de la flore microbienne du tube digestif.

Ces nouveaux concepts (synbiotique, probiotique, prébiotique) ont été rapidement assimilés par le consommateur. Ainsi, bien que les connaissances en nutrition restent du domaine des spécialistes, la prise de conscience sur la relation nutrition-santé est toutefois en train de croître notablement (Rodrigues *et al.*, 2011).

C'est dans cette optique que la problématique de la présente thèse a été réfléchi. Dans un premier temps, il s'agit d'étudier l'effet prébiotique *in vitro* de divers substrats glucidiques de différents degrés de polymérisation (lactulose, chicorée, pectine, son entier de blé et d'avoine, extraits de fibres de son de blé et d'avoine) sur la cinétique de croissance et

d'acidification de certaines souches bénéfiques comme les bifidobactéries et les lactobacilles ; ainsi que sur la nature des acides gras à chaîne courte qu'elles sont capables de produire.

Dans un second temps, le même protocole expérimental a été réalisé avec du son entier de blé *in vivo* chez des souris Swiss conventionnelles gavées, séparément avec des souches bifides (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 ou *Bifidobacterium bifidum* Bb443) et des souches lactiques (*Lactobacillus acidophilus* LbA-CECT478 ou *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS). Les retombées physiologiques (paramètres microbiologiques, biochimiques, hématologiques et histologiques) de l'administration de son de blé dur à des souris gavées aux souches bénéfiques ont, également, été évaluées dans cette seconde partie de la thèse.

## **CHAPITRE I : Substrats à potentiel prébiotique**

### **I.1. Définition du concept « prébiotique »**

Le concept « prébiotique » fut introduit pour la première fois par [Gibson](#) et [Roberfroid](#) en 1995, pour désigner «des ingrédients alimentaires qui influencent de façon bénéfique l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'un nombre limité de groupes bactériens dans le côlon et qui améliorent ainsi la santé de l'hôte ».

Une décennie plus tard, cette définition a été actualisée par ces mêmes auteurs ([Gibson et al., 2004](#) ; [Roberfroid, 2007](#)) qui stipulent que, désormais, « le prébiotique est un ingrédient dont la fermentation sélective conduit à des changements spécifiques, à la fois dans la composition et l'activité du microbiote gastro-intestinal, et procurant des bénéfices santé chez l'hôte ».

[Lim et al. \(2005\)](#) font remarquer que cette définition met l'accent sur la relation nécessaire entre l'effet bénéfique du prébiotique et son impact sur les bactéries de l'écosystème colique, en particulier les Lactobacilles et les bifidobactéries.

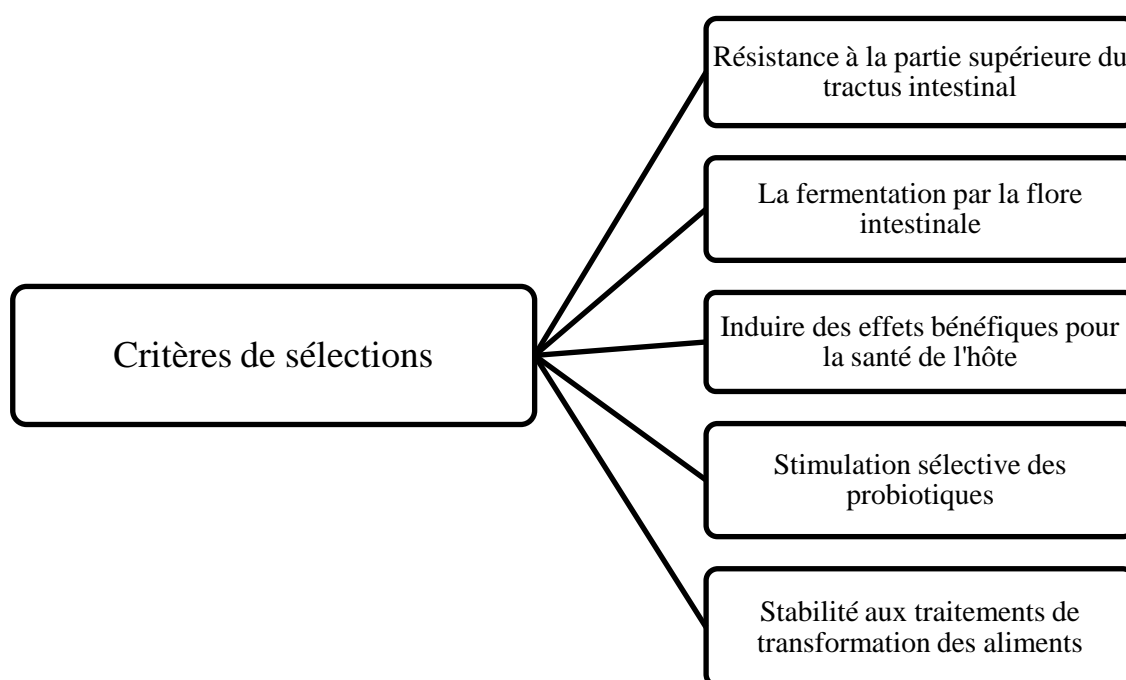
### **I.2. Critères de sélection des prébiotiques**

Les prébiotiques agissent par des voies dont le principal carrefour est un effet sur la flore intestinale endogène. Ils sont en cela spécifiques et différents, bien que complémentaires, des fibres alimentaires et des probiotiques.

Néanmoins, les concepts de fibres alimentaires et de prébiotiques se recouvrent partiellement. Les deux types de substances ont en commun leur indigestibilité dans l'intestin grêle et leurs effets sur la flore colique.

Elles diffèrent selon leur spécificité à n'être utilisées que par certaines populations microbiennes de la flore colique considérées comme bénéfiques, pour en favoriser la croissance et l'activité dans le cas des prébiotiques; alors que la fermentation de la majorité des fibres alimentaires est non spécifique et implique la totalité des bactéries dominantes

(Cherbut, 2003). Les critères de sélection des prébiotiques sont reportés sur la figure 1 (Wang, 2009).



**Figure 1** : Principaux critères d'acquisition du statut « prébiotique » par les glucides végétaux (Wang, 2009).

### I.2.1. L'indigestibilité

Compte tenu de leur structure chimique, de nombreux oligosaccharides répondent au premier critère d'indigestibilité. L'indigestibilité des fructooligosaccharides (FOS) et de l'inuline, les mieux connus parmi les prébiotiques, a été vérifiée *in vivo* (Chonan *et al.*, 2001 ; Bouhnik *et al.*, 2004 ; Cani, 2009 ; Saad *et al.*, 2013) et *in vitro* (Gilliland, 2001 ; Gibson *et al.*, 2004 ; Ricardo *et al.*, 2009 ; Morais *et al.*, 2014). Les xylooligosaccharides (XOS) sont également indigestes, car aucune enzyme digestive ne peut les dégrader (Madhukumar & Muralikrishna, 2010).

Ces observations sont en accord avec la spécificité connue des enzymes digestives des mammifères ( $\alpha$  amylase, enzyme pancréatique et différentes hydrolases du tube digestif) qui sont incapables de digérer les fructanes (Carabin & Flamm, 1999; Cummings *et al.*, 2001). Tout nouveau prébiotique supposé devrait en fait être testé au moins *in vitro* quant à sa résistance au jus gastrique, aux enzymes pancréatiques et à celles de la bordure en brosse (Saad *et al.*, 2013).

### I.2.2. Fermentescibilité des prébiotiques.

Tout glucide qui atteint le caecum est un substrat de fermentation potentiel pour la microflore du gros intestin. De nombreux résultats confirment que c'est, en effet, le cas des substances à statut prébiotique reconnu telles que l'inuline et les FOS (Kleessen *et al.*, 2001 ; Gibson *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2014).

Les premières études menées sur des FOS de 2 à 4 résidus de fructose ont montré qu'ils étaient fermentés par les bifidobactéries; alors qu'à l'inverse, *E. Coli* et *Clostridium perfringens* utilisent peu les FOS (Hidaka, 1986 ; Mitsuoka *et al.*, 1987).

Les *bacteroides* sont capables de fermenter différents prébiotiques. Gibson (1994) a mis en évidence un phénomène de compétition pour la fermentation d'oligofructoses par *Bifidobacterium infantis*, *E. Coli*, et *Clostridium perfringens* en coculture. Les bifidobactéries manifestent un effet inhibiteur à l'égard des deux autres.

Les fructo- et les xylooligosaccharides sont fermentescibles par de nombreuses espèces bactériennes; alors que très peu d'entre elles sont capables de dégrader les

arabinoxylanes. Ce même auteur rapporte que les oligosaccharides linéaires sont mieux catabolisés que ceux à chaîne ramifiée.

Les bifidobactéries utilisent préférentiellement les oligosaccharides de faible degré de polymérisation (DP), alors que les *Bacteroides* utilisent ceux à fort DP. Une «symbiose» métabolique liée à la structure de ces glucides existe certainement entre ces deux genres bactériens. Dans le même esprit, en 2001, [Rycroft et Gibson](#) ont publié une étude comparée de l'évaluation *in vitro* des propriétés fermentescibles de différents oligosaccharides commerciaux à statut prébiotique en utilisant des bactéries fécales. Cette étude présente l'intérêt de pouvoir identifier le meilleur prébiotique pour une modulation souhaitée du profil de la microflore.

Ainsi, d'après ces auteurs, si l'on souhaite accroître le nombre de bifidobactéries, il faut faire appel à des XOS ou au lactulose comme prébiotique.

### **I.3. Diversité naturelle des prébiotiques**

Au cours des deux dernières décennies, beaucoup d'études ont porté sur la production d'oligosaccharides comme ingrédients alimentaires pouvant procurer un état de bien-être et de santé chez le consommateur. C'est pourquoi, une attention particulière est attribuée à des types spécifiques de prébiotiques qui sont non carcinogène, indigestibles, de faible pouvoir calorique et stimulateur du développement du microbiote gastro-intestinal ([Mussamatto & Mancilha, 2007](#)). Il existe de nombreux composés candidats au statut « prébiotique ». Ils sont abondants, largement répandus dans la nature et font partie de notre alimentation quotidienne (tableau 1).

#### **I.3.1. Les glucides**

Tous les prébiotiques sont des glucides d'origine végétale ou synthétique.

##### **I.3.1.1. Les fructooligosaccharides**

Les termes de fructooligosaccharides (FOS) et d'oligofructose sont utilisés pour désigner des inulines de faible poids moléculaire. Les FOS sont des oligomères de D-fructose associés par des liaisons  $\beta$ -(2→1) avec un résidu D-glucose en bout de chaîne lié en  $\alpha$ -(1→2). Ils sont obtenus soit par réaction d'hydrolyse enzymatique de l'inuline, soit par biosynthèse à partir de saccharose et fructose ([Wang et al., 2009](#)).

Les FOS existent à l'état naturel chez un certain nombre de plantes dont l'oignon, la chicorée, l'artichaut, l'ail, le topinambour et l'endive (Cherbut, 2003).

**Tableau 1** : Contenu (en % : P/P) en fibres prébiotiques de quelques végétaux à consommation courante (Alanna et al., 1999).

Alimentation	Fibres en % (P/P)
chicorée crue	64,6
topinambour cru	31,5
pissenlit vert cru	24,3
ail cru	17,5
poireaux crus	11,7
oignon cru	8,6
oignon cuit	5
asperges crus	5
Le son de blé cru	5
Le total de la farine de blé	4,8
Banane	1

### I.3.1.2. L'inuline

L'inuline est le plus important des polysaccharides naturels et abondamment présente dans les racines de chicorée à partir desquelles elle est extraite industriellement.

On la trouve aussi dans les artichauts, les asperges, les topinambours, le blé, les oignons, l'ail, le poireau et la banane.

L'inuline est un mélange d'oligo- et de polysaccharides essentiellement composés de fructose. C'est un fructane dont la liaison  $\beta$  (2-1) qui unit les radicaux fructosyl entre eux n'est pas hydrolysable par les enzymes digestives de l'homme. Elle l'est, au contraire, par l'enzyme  $\beta$  fructosidase, présente chez les bifidobactéries (Quigley, 2010).

### I. 3.1.3. Les pectines

Les substances pectiques sont des polysaccharides complexes présents en grande quantité dans les pépins et les zestes de groseilles, pommes, coings et agrumes (Alkorta et al., 1998 ; Blanco et al., 1999).

La structure des pectines comporte une chaîne principale d'unités acide uronique liées en 1-4 et régulièrement intercalées (liaisons 1-2 et 1-4) par des unités rhamnose pour former des coudes. Cet agencement donne des propriétés particulières aux pectines telles que la stabilité chimique et la résistance à des températures supérieures à 100°C. Certains microorganismes producteurs de pectine lyase sont pectinolytiques.

#### **I.3.1.4. Le Lactulose**

C'est un disaccharide synthétique formé de galactose et de fructose liés en  $\beta$ -(1→4) dérivé du lactose. Il est connu pour ses effets laxatifs lorsqu'il est pris à fortes doses (supérieures à 20g par jour). En revanche, à plus faibles doses, il agit en tant que prébiotique en augmentant le nombre de bifidobactéries et en diminuant le nombre de *Clostridium perfringens*, de *Bacteroides*, de streptocoques et d'enterobactéries (Salminen & Salminen, 1997). Il est utilisé dans divers produits alimentaires (lait maternisé, aliments pour bébés, confiserie, boissons gazeuses, produits laitiers) et pharmaceutiques (traitement des hémorroïdes, la constipation chronique, l'encéphalopathie hépatique) (Paik et al., 2005).

#### **I.3.1.5. Galactooligosaccharides**

Également connus sous les noms d'oligogalactosyllactose, oligogalactose, oligolactose ou de transgalactooligosaccharide (TOS). Les galactooligosaccharides sont produits par la conversion enzymatique du lactose et leur composition varie selon la longueur de la chaîne et le type de liaison entre les unités monomères (Gibson, 1998 ; Roberfoid, 2000).

Chez les nourrissons, l'utilisation des galactooligosaccharides a montré qu'ils ont un rôle potentiel dans la prévention des allergies et la réduction des maladies infectieuses (Arslanoglu et al., 2008 ; Bruzzese et al., 2009), des symptômes de dysfonctionnement gastro-intestinal et de la durée de l'état grippal (Hughes et al., 2011).

#### **I.3.1.6. Les xylooligosaccharides (XOS).**

Les XOS sont constitués de formes oligomériques de résidus xylose liés en  $\beta$ -(1-4), et comportent également les arabinoxylanes (AXOS). Les XOS sont essentiellement obtenus par hydrolyse des hétéroxylanes constituant les parois cellulaires végétales, en particulier celles des céréales comme les sons d'avoine et de blé (Madhukumar & Muralikrishna, 2010). L'une des activités les plus importantes des XOS est leur effet bifidogène.

### I.3.2. Les lipides et les protéines

Certains peptides ou protéines ainsi que des lipides sont parfois considérés comme des prébiotiques étant donné que leur structure chimique empêche leur absorption intestinale, leur conférant, ainsi, le caractère «indigestible» (Cherbut, 2003).

Les peptides courts sont des candidats prébiotiques hydrosolubles pouvant former des structures plus ou moins stables avec les ions  $Mg^{2+}$  (Gulik *et al.*, 2009 ; Garcia *et al.*, 2014).

### I. 3.3. Les sons de céréales

Les sons de céréales sont des coproduits de minoterie représentant avec la farine et le germe, l'une des trois fractions de la mouture. Selon les conditions de broyage, le son représente 10% à 20% du grain. D'un point de vue tissulaire, alors que le germe et la farine proviennent respectivement de l'embryon et de l'endosperme amylicé, le son est issu des parties externes du grain.

Le son est constitué du péricarpe, du tégument séminal et de la couche à aleurone. Le péricarpe regroupe les enveloppes périphériques: le tégument séminal qui correspond à l'enveloppe de la graine et la couche à aleurone qui se situe entre l'endosperme et les enveloppes périphériques. Le son est de plus généralement contaminé par des fragments d'endosperme qui ne se sont pas détachés lors du broyage. On retrouve les gros sons et les sons fins.

Le son de blé contient de nombreux éléments nutritifs (vitamines et minéraux). Il est riche en fibres alimentaires (hémicellulose, cellulose), protéines, vitamines (surtout du groupe B) et sels minéraux (calcium, magnésium, phosphore) (Gullon *et al.*, 2014).

Le son de blé, essentiellement constitué de fibres cellulosiques insolubles, facilite la digestion ainsi que la perte de poids, comme il peut entraîner une baisse de la cholestérolémie et de la glycémie.

Les aliments à base de son d'avoine ont fait l'objet de plusieurs investigations, particulièrement en raison de leur contenu en  $\beta$ -glucanes, éléments structuraux d'une fibre soluble présente en grande quantité dans cette céréale. Ces fibres favorisent l'excrétion fécale du cholestérol en diminuant sa synthèse hépatique, ce qui contribue à une réduction significative, de la cholestérolémie par un mécanisme d'action probablement lié à la viscosité du  $\beta$ -glucane, qui interférerait avec la réabsorption des acides biliaires (Truswell, 2002).

Le son d'avoine renferme également des protéines et des minéraux comme le manganèse, le magnésium, le fer et le sélénium, et il est considéré comme une bonne source de vitamines (vitamine B1 et B5) (Marlett et al., 2002).

### **I.3.4. Les légumes comme source de prébiotiques.**

#### **- La chicorée**

La chicorée est un légume appartenant à la grande famille des astéracées. Le genre *Cichorium* comprend deux espèces cultivées : *Cichorium intybus* et *Cichorium endivia* (fig.2).

Le terme « chicorée » est un terme générique qui fait référence à toutes les plantes comestibles appartenant à ces deux espèces et, qu'au fil des ans, les êtres humains ont sélectionné et amélioré pour nous offrir les multiples formes qui sont aujourd'hui présentes dans le commerce : chicorée frisée et chicorée scarole, mais aussi endive, radicchio, trévis, etc...

Ces légumes ont tous en commun de posséder une amertume plus ou moins prononcée, selon la variété, mais se distinguent les uns des autres, en plus de la forme, par la couleur de leurs feuilles, qui va du blanc au rouge en passant par les diverses nuances du vert.

La chicorée est un légume couramment consommé dans certains pays comme les Pays-Bas et l'Italie. Il en est de même pour l'endive, le radicchio, la scarole et d'autres variétés de chicorée moins souvent utilisées dans notre cuisine traditionnelle.

Les principes actifs d'intérêt présents dans ces légumes sont les composés phénoliques, les caroténoïdes et les fructanes. Les phénols et les caroténoïdes sont de puissants antioxydants. La quercétine et le kaempférol sont les principaux flavonoïdes de la chicorée. Elle contient aussi des acides phénoliques (les acides férulique et caftarique) (Arabbi et al., 2004).

La consommation d'aliments riches en caroténoïdes serait reliée à un risque moindre de développer certains cancers. La chicorée sauvage, crue ou cuite, contient des quantités intéressantes de lutéine et de bêta-carotène (Stahl & Sies, 2005).



**Figure 2 :** Fleurs et racines de *Cichorium intybus* (Anonyme, 2005).

### - L'artichaut

L'artichaut (*Cynara scolymus*) est également un légume riche en polyphénols. Il renferme aussi de l'inuline; ce qui lui confère un rôle favorable sur le plan de la santé intestinale, du système immunitaire et de la synthèse ou l'absorption de plusieurs nutriments (Lopez-Molina & Navarro-Martinez, 2005 ; Schutz & Persike, 2006).

#### I.4. Les effets bénéfiques des prébiotiques.

La majorité des effets revendiqués par les prébiotiques sont associés à la fonction et au métabolisme du côlon optimisé, telle que l'augmentation du poids fécal, la diminution du pH luminal du côlon et la modulation du système immunitaire (Saad et al., 2014). L'ensemble des effets étudiés sur la flore du côlon, sur la biochimie et l'histologie de l'intestin de l'hôte révèlent l'importance de l'utilisation des prébiotiques pour promouvoir les bienfaits pour la santé (fig. 3).

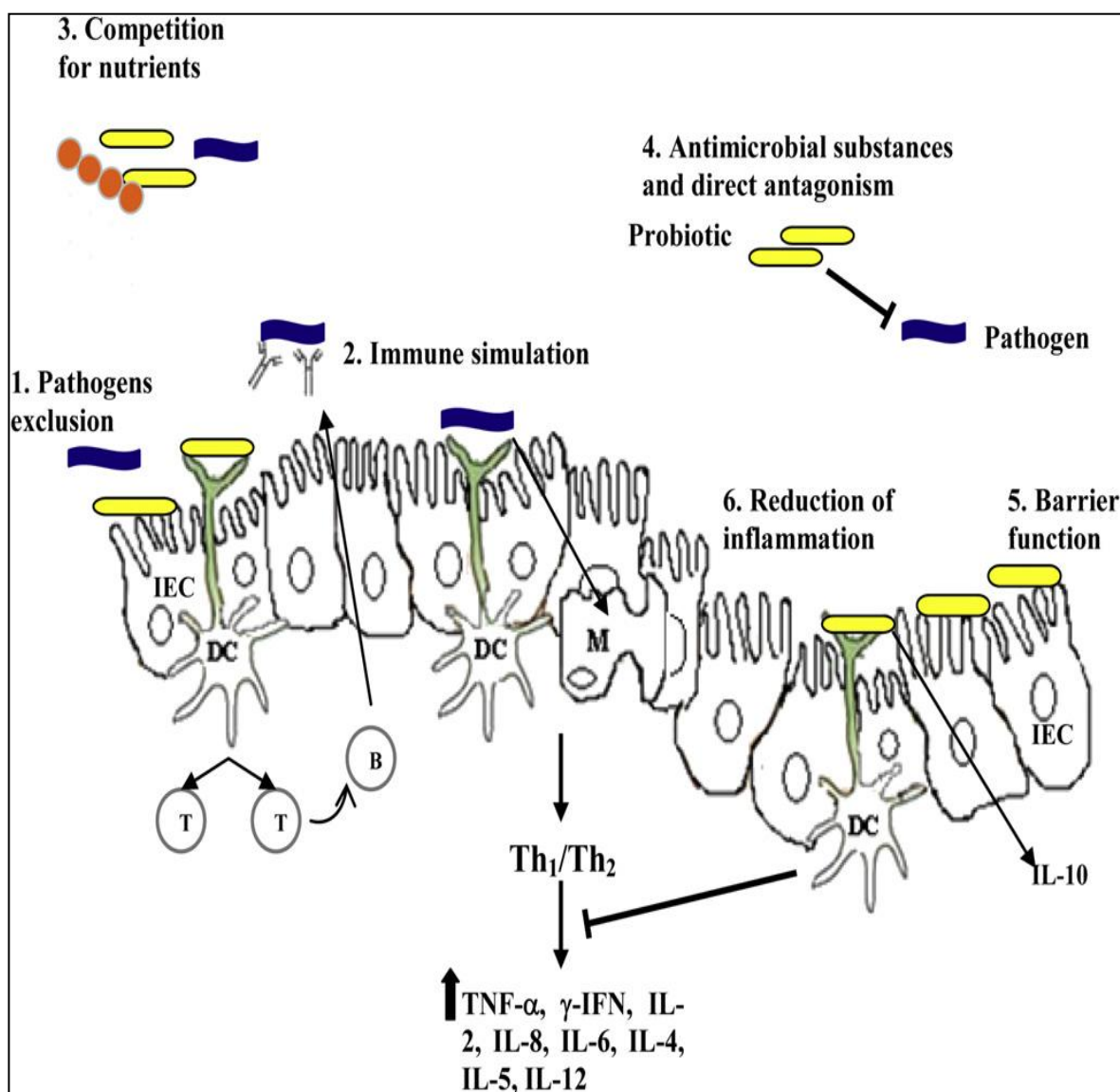
##### 1.4.1. Effet sur la flore intestinale

Les prébiotiques tels que les FOS, TGOS, XOS et l'inuline ainsi que leur combinaison symbiotique avec les bactéries probiotiques modulent le microbiote intestinal en augmentant le nombre de bactéries bénéfiques comme les bifidobactéries et les lactobacilles ou en inhibant divers germes pathogènes (*Clostridium sp*, *E. coli*, *Enterobacter sp*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis* ou *S. typhimurium*) chez la souris (Asahara et al., 2001), chez le porcelet (Bomba et al., 2002), et chez l'homme (Caselato et al., 2011).

Les prébiotiques modulent l'équilibre entre les populations bactériennes dominantes chez l'enfant et chez l'adulte, ce qui accroît les effets métaboliques de la flore et influence les

activités enzymatiques impliquées dans le fonctionnement des bactéries coliques. Ils agissent en augmentant sélectivement la concentration fécale des bactéries produisant de l'acide lactique : les bifidobactéries chez l'homme. Cet effet perdure pendant toute la période d'ingestion du prébiotique, puis diminue progressivement à son arrêt (Cherbut, 2003).

La diminution du pH intestinal qui découle de l'activité bactérienne de synthèse d'acides organiques entraîne la solubilisation des minéraux en particulier le calcium; ce qui améliore leur absorption par la muqueuse colique. Par ailleurs, le pH acide insolubilise les sels biliaires réduisant leur absorption par augmentation de leur excrétion fécale. L'acidité inhibe la conversion fécale des acides biliaires primaires en acides secondaires, acteurs de risque du cancer colorectal (Cherbut, 2003).



**Figure 3** : Les différents mécanismes des synbiotiques promoteurs d'effets santé (Saad et al., 2013).

#### 1.4.2. Effets sur les fonctions physiologiques

Un des tous premiers effets établi par la consommation des prébiotiques est l'accroissement de la masse fécale par la biomasse formée, ce qui a comme impact, l'amélioration du péristaltisme intestinal qui augmente la fréquence d'excrétion fécale, paramètre essentiel dans la lutte contre la constipation (Alli et al., 2007).

Sur le plan fonctionnel, les prébiotiques agissent sur l'absorption du calcium et du magnésium ce qui améliorerait la minéralisation osseuse et diminuerait donc le risque d'ostéoporose (Démigné et al., 2008).

Chez le porcelet anémique, une alimentation riche en inuline déclenche une régulation des gènes codant pour des transporteurs de fer dans les entérocytes. De plus, les populations de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* ont augmenté significativement dans le contenu fécal (Tako et al., 2008).

Les prébiotiques agissent sur la diminution des facteurs de risques associés à l'obésité et sur la perte du poids (Roberfroid et al., 2010); ils réduisent également la glycémie (Johnston et al., 2010).

#### 1.4.3. Effets immuno-modulateurs des prébiotiques

Les prébiotiques sont réputés renforcer l'immunité des consommateurs. En effet, les constituants alimentaires et leurs métabolites de fermentation sont en contact étroit avec le système lymphoïde intestinal (GALT), qui est une partie primordiale du système immunitaire intestinal.

Les réactions immunitaires peuvent être stimulées par l'interaction des fragments de sucres prébiotiques (inuline et FOS) avec des récepteurs sur la membrane plasmique des cellules hôtes, en particulier dans les macrophages et cellules dendritiques (Arnold et al., 2006 ; Date et al., 2014).

L'administration orale d'inuline et d'oligofructose module différents paramètres du système immunitaire, comme la sécrétion de l'IL-10 et l'interféron (IFN-g) par les plaques de

Peyer (Hosono *et al.*, 2003), l'activité des cellules NK, la prolifération des lymphocytes (Hoentjen *et al.*, 2005), la régulation immunitaire de l'intestin par les IgA, à la fois dans

l'intestin grêle et du côlon chez les souris (Nakamura *et al.*, 2004) et le développement de GALT (Pierre *et al.*, 1997).

En effet, la consommation des fibres prébiotiques induit une variation de la microflore intestinale, qui peut potentiellement provoquer un changement immunitaire, par les acides gras à chaîne courte provenant de la fermentation des fibres, une interaction directe des bactéries lactiques ou constituants cytoplasmiques des cellules du système immunitaire dans l'intestin et, enfin, par la modulation de la production du mucine (fig.4).

#### **I.4.4. Rôle des prébiotiques dans la prévention du cancer**

Des études épidémiologiques ont montré une corrélation positive entre une forte consommation de fruits et légumes ainsi que de céréales complètes et une diminution du risque de cancer colorectal et d'adénomes. La fermentation des prébiotiques conduit à la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC) qui fournissent plusieurs effets sur la muqueuse colique. En effet, ils affectent directement ou indirectement la prolifération des entérocytes, l'inflammation de l'intestin, la carcinogenèse, la disponibilité minérale, et la colonisation par des agents pathogènes, les activités enzymatiques et la production de métabolites azotés.

L'acide butyrique est utilisé par les cellules épithéliales de la muqueuse du côlon comme source d'énergie et comme facteur de croissance (Bugaut & Bentéjac, 1993). Des études précliniques ont rapporté que le butyrate pourrait avoir un effet chimio-préventif dans la carcinogenèse en servant d'agent protecteur contre le cancer du côlon par la promotion de la différenciation des cellules. Il favoriserait la multiplication des cellules normales et inhiberait celle des cellules anormales ou cellules malignes (Papillon *et al.*, 1999). En plus du butyrate, le propionate pourrait avoir un effet anti-inflammatoire sur les cellules coliques cancéreuses.

Dans l'étude *in vitro* de Munjal *et al.* (2009) sur des cellules des lignés HT29 et L97 du côlon humain (représentant des stades précoce et tardif du cancer du côlon), le surnageant de fermentation de l'inuline a montré une forte inhibition de la croissance des

cellules tumorales du côlon humain, avec une plus grande sensibilité des cellules cancéreuses de stade précoce.

Un régime supplémenté d'inuline ou d'oligofructose abaisse l'incidence des tumeurs du sein chez les rates et les souris et inhibe les métastases dans le poumon (Taper & Roberfroid, 2002). En outre, la combinaison des probiotiques *Lb. rhamnosus* et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* avec de l'inuline enrichie en oligofructose s'est révélée anti-tumorigène au niveau du côlon chez le rat (Femia et al., 2002).

#### **1.4.5. Effets des prébiotiques sur le métabolisme des lipides**

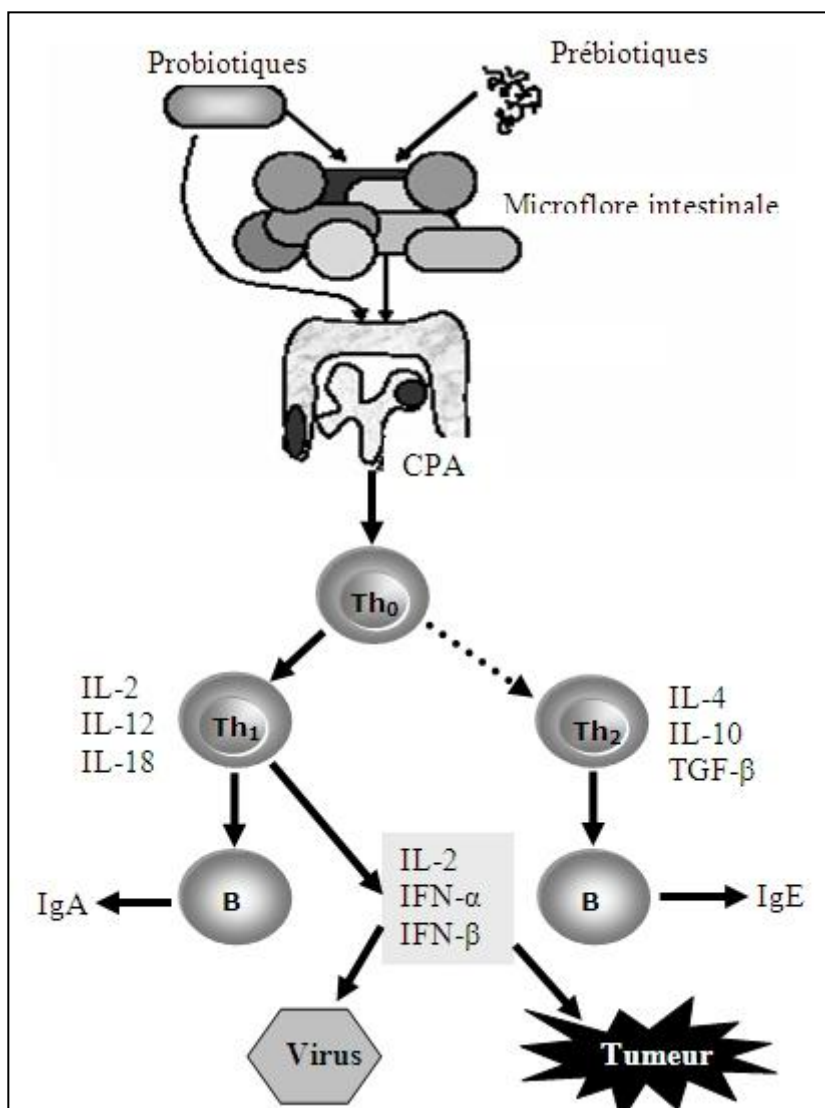
L'alimentation influence plusieurs facteurs de risque des maladies cardiovasculaires comme la cholestérolémie, le cholestérol-LDL, la triglycéridémie et l'hypertension artérielle. Les prébiotiques modulent positivement le métabolisme hépatique des lipides. Chez le rat, l'inuline et l'oligofructose réduisent la cholestérolémie et la triglycéridémie postprandiale de 15 et 50 %, respectivement (Delzenne et al., 2002).

#### **1.4.6. Effets des prébiotiques sur la gestion du poids**

L'intérêt des hydrates de carbone indigestes dans le contrôle de l'obésité et des troubles du métabolisme qui y sont liés a été évoqué par plusieurs chercheurs. Roberfroid et al. (2010) ont rapporté plusieurs données expérimentales qui appuient les effets des prébiotiques sur la masse grasse et la perte de poids chez certains modèles animaux.

La plupart des résultats obtenus sur les rongeurs ont montré une diminution de la masse grasse sous l'effet de différents prébiotiques. En effet, une plus longue mastication d'aliments riches en fibres ralentirait le rythme d'ingurgitation et par conséquent le volume de la prise alimentaire.

Par ailleurs, les fibres ont un effet satiétogène dû à un séjour gastrique prolongé du bol alimentaire (Cani et al., 2006 ; Parnell & Reimer, 2009 ; Delzenne et al., 2011).



**Figure 4:** Action des synbiotiques sur le système immunitaire de l'intestin (Ouwehand *et al.*, 2002).

## **CHAPITRE II : physiologie du tube digestif et composition du microbiote intestinal**

### **II.1 Généralités sur l'appareil digestif**

Une alimentation appropriée et une assimilation correcte des nutriments sont indispensables à une bonne santé. Sans une bonne absorption, même l'alimentation la plus équilibrée génère des déficiences dans le développement de l'organisme.

Sur le plan anatomique, le tube digestif proprement dit comporte successivement l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) puis le gros intestin (cæcum, appendice, côlon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde) puis le rectum.

Le tube digestif possède deux fonctions essentielles, d'une part, absorber les nutriments, d'autre part, constituer une barrière physique, microbiologique et immunologique sélective vis à vis d'agents potentiellement néfastes pour l'organisme.

L'intestin grêle contient peu de bactéries. Il est le siège essentiel de la digestion enzymatique des aliments et de l'absorption des nutriments. Ces activités sont quantitativement considérables étant donné la très grande surface d'échange de l'intestin (plus de 200 m<sup>2</sup>), assurée grâce aux villosités et microvillosités (Fawcett, 1994).

Le côlon est l'hôte de nombreuses espèces de bactéries commensales. Ces dernières ont essentiellement pour rôle de métaboliser des substrats non digérées dans l'intestin grêle. Cette dégradation conduit à la production d'acides gras à chaîne courte, substrats des cellules épithéliales du côlon et des bactéries saprophytes non pathogènes (Van de Wiele et al., 2004).

L'intestin d'un individu est un écosystème complexe renfermant près de 300 à 500 espèces bactériennes différentes et le nombre de cellules bactériennes dans la lumière intestinale est 10 fois supérieur au nombre de cellules eucaryotes du corps humain (Quigley, 2010). La plupart ont un rôle extrêmement bénéfique dans le côlon. Certaines ont un rôle potentiellement pathogène comme *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, mais leur multiplication est contrôlée et leur petit nombre ne leur permet pas d'exprimer

leur pouvoir pathogène. Leur développement dans les conditions normales d'équilibre de la flore intestinale est limité par la compétition avec les autres bactéries saprophytes. De tout un ensemble de conditions physiologiques résulte un équilibre particulier de la microflore intestinale (Kelly & LaMont, 2008).

## II.2. Composition et développement de la microflore

La colonisation de l'appareil gastro-intestinal des nouveau-nés commence immédiatement après la naissance et se produit dans les quelques jours suivant la naissance (Guarner, 2003). Le mode d'accouchement (voie naturelle ou césarienne), la nature du régime alimentaire (sein ou lait maternisé) pourraient affecter le modèle de colonisation (Gronlund,

1999). D'autres facteurs environnementaux ont également un rôle important puisque des différences notables existent entre des enfants en bas âge nés dans les pays développés et ceux nés dans les pays en voie de développement (Simhon, 1982). Les bactéries pionnières peuvent moduler l'expression des gènes des cellules épithéliales de l'hôte, créant de ce fait un habitat favorable pour elles-mêmes et peuvent empêcher la croissance d'autres bactéries introduites plus tard dans l'écosystème (Ducluzeau, 1993).

La colonisation initiale est donc très déterminante dans la composition finale de la microflore permanente des adultes. L'estomac contient seulement quelques espèces de bactéries adhérant à l'épithélium et des germes en transit. La pénurie de bactéries dans la région supérieure s'explique par l'acidité du milieu, qui tue la plupart des microorganismes ingérés et par l'activité motrice intestinale, limitant la colonisation stable de l'épithélium gastrique (Guarner, 2003).

En revanche, l'intestin grêle et le gros intestin contiennent un écosystème microbien complexe et dynamique avec de fortes concentrations de bactéries vivantes : jusqu'à  $10^{11}$  ou  $10^{12}$  CFU /g (De Roissart & Luquet, 1994).

Les bactéries anaérobies sont 100 à 1000 fois plus nombreuses que les bactéries aérobies (Simon & Gorbach, 1984). Les genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* et *Ruminococcus* sont prédominants chez l'être humain. Les bifidobactéries, bactéries anaérobies gram +, sont les microorganismes les plus nombreux. Les aérobies et les anaérobies facultatifs comme

*Echerichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Proteus* sont parmi les genres subdominants (O'Hara & Shanahan, 2006). La localisation prédominante dans le tube digestif de chaque espèce bactérienne est précisée à la figure 5 (Gibson & Rastall, 2004).

Le plus grand facteur de variabilité de la composition de la flore intestinale est l'individu lui-même (Eckburg et al., 2005). Chez un individu donné, la flore peut varier selon l'alimentation et l'âge. Le microbiote comporte  $10^{14}$  microorganismes vivant en symbiose avec l'hôte soit plus de 100 fois le nombre de cellules de l'organisme humain (Gill et al., 2006).

La composition de la microflore peut aussi varier selon certaines circonstances (diarrhée, traitement antibiotique, intoxication alimentaire, modification du régime alimentaire) au cours de la vie d'un sujet. Cependant, après rééquilibrage, la composition de la microflore pour un individu demeure sensiblement constante.

### **II.3. Rôle de la flore intestinale**

La flore intestinale joue deux rôles essentiels : un rôle métabolique et un rôle de défense.

#### **II.3.1. Rôle métabolique**

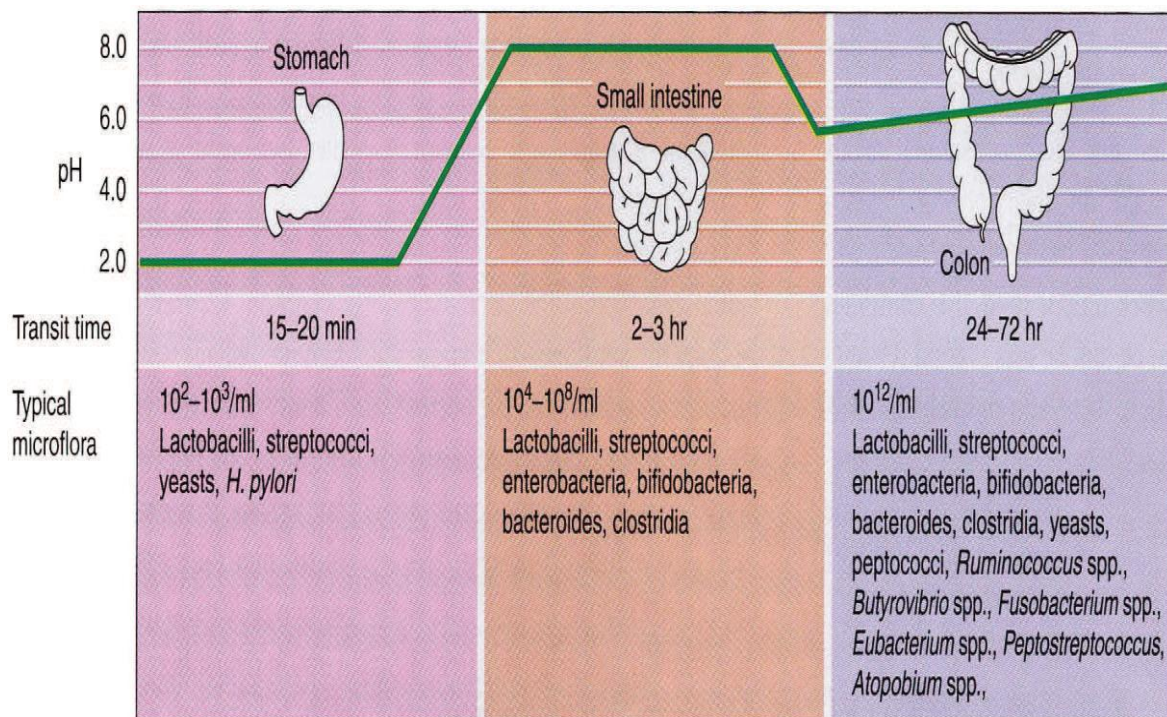
Grâce à leur équipement enzymatique, les bactéries de la flore intestinale ont un impact considérable sur les composants intraluminaux. Elles interviennent dans l'ensemble des métabolismes.

##### **II.3.1.1. Métabolisme des glucides**

De nombreux résidus glucidiques parviennent au côlon ; des résidus endogènes (glycoprotéines, mucines, résidus de cellules desquamées) et des résidus exogènes alimentaires ; sucres simples (lactose) pour lesquels l'intestin grêle n'a pas l'équipement enzymatique nécessaire, soit des résidus d'amidon, des fibres (pectines, cellulose et hémicellulose) non dégradés par les enzymes digestives.

Ces glucides « résiduels » sont hydrolysés en sucres simples, une partie est utilisée par les bactéries comme substrat énergétique et l'autre partie transformée par fermentation par les enzymes bactérienne, aboutissant à la production de CO<sub>2</sub> d'hydrogène, de méthane et

d'acides organiques (acide pyruvique puis acide acétique, lactique, propionique et butyrique) (Gostner *et al.*, 2006).



**Figure 5 :** Composition bactérienne quantitative et qualitative en fonction de la région du tube digestif (Gibson & Rastall, 2004).

### II.3.1.2.Métabolisme des lipides

L'essentiel des triglycérides est normalement absorbé au niveau du grêle, mais une faible partie de graisses neutres peut atteindre le côlon. L'effet de la flore semble s'exercer surtout sur les acides gras insaturés qui une fois hydroxylés ont un effet laxatif.

Les effets de la flore sur les stéroïdes sont plus complexes, les acides biliaires sécrétés par la vésicule et non réabsorbés au niveau du grêle vont être dé-conjugués par la flore, cette activité aboutit à la perte de taurine et de glycine. La flore est aussi capable de transformer les acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires, une partie de ces acides biliaires est réabsorbée (cycle entéro-hépathique), le rôle des acides biliaires résiduels est encore mal connu ; ils ont un effet sur la motricité intestinale et ils joueraient un rôle dans la régulation de la flore comme facteurs d'inhibition (Hamson & Yolken, 1999).

### **II.3.1.3. Métabolisme azoté**

Les résidus protidiques d'origine exogène (urée, protéines alimentaires non digérées) et endogène (enzymes digestives, cellules desquamées, bactéries mortes), sont dégradés par les bactéries de la flore. Ce processus de putréfaction qui aboutit à la production de CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, d'amines biologiquement actives (histamine, tyramine), de polyamines notamment l'ornithine qui semble jouer un rôle trophique majeur sur la muqueuse intestinale (stimulation de la synthèse d'ADN, développement des enzymes des microvillosités, augmentation du nombre de récepteurs des immunoglobulines polymériques observés chez l'animal nouveau-né) (Bigard, 1994).

### **II.3.1.4. Production d'acides gras volatils à chaîne courte (AGCC)**

Les AGCC produits lors de la fermentation, participent à la trophicité de l'épithélium intestinal, ils sont utilisés directement par les cellules épithéliales (notamment le butyrate qui fournit 70% de l'énergie des cellules coliques et intervient comme facteur important de différenciation cellulaire.

Les AGCC contribuent également à la modulation de l'hydrations des selles, la concentration en AGCC détermine le pH de la lumière colique ce qui influence l'activation de diverses enzymes bactériennes jouant un rôle dans la production d'ammoniac, de nitrosamines, ils jouent également un rôle sur la motricité intestinale (Saad *et al.*, 2013).

### **II.3.1.5. Métabolisme minéral et vitaminique**

Les microorganismes du côlon jouent aussi un rôle dans la synthèse des vitamines (Hill, 1997) et dans l'absorption du calcium, du magnésium et du fer (Guarner, 2003). En effet, certaines bactéries ont la capacité de synthétiser les vitamines K, B12, B2 (riboflavine), B5 (acide pantothénique), B8 (biotine) et la B9 (acide folique). L'absorption des ions dans le caecum est améliorée par la fermentation des hydrates de carbone et la production d'acides gras à courte chaîne, particulièrement l'acétate, le propionate et le butyrate (Demigné *et al.*, 2008).

## **II.3.2. Rôle de défense**

### **II.3.2.1. Effet barrière**

L'effet barrière correspond à l'ensemble des mécanismes mis en œuvre par la flore digestive et l'épithélium intestinal dans le but d'éliminer les bactéries indésirables potentiellement dangereuses. Ces mécanismes participent à la protection de la muqueuse intestinale (et à celle de l'organisme) contre des agents entéro-pathogènes, et à la régulation de la flore elle-même. Trois mécanismes sont utilisés :

- **compétition** sur les sites situés sur les parois des cellules épithéliales.
- **production** de toxines (bactériocines), peroxyde d'hydrogène et d'acide lactique
- **neutralisation** des toxines produites par les germes pathogènes.

Ces mécanismes sont propres à certaines espèces microbiennes (bifidobactéries, lactobacilles, bactéroïdes, *peptostreptococcus*, *Enterocoques*...) de la flore dominante et sous dominante; ils s'exercent à tous les niveaux du tube digestif, mais surtout au niveau du grêle et du côlon (Corthier & Raiband, 1993).

### II.3.2.2. Immuno-modulation

Le tissu lymphoïde intestinal ou GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue), représente la masse lymphoïde la plus importante de l'organisme. Il est constitué de cellules immunitaires très hétérogènes: lymphocytes T, lymphocytes B, plasmocytes, polynucléaires neutrophiles, macrophages, cellules M, qui sont « enchâssées » dans la muqueuse et associées aux plaques de Peyer (Cerf-Bensussan et al., 1991).

Les études réalisées avec des animaux axéniques (sans germes) ont montré le rôle décisif de la colonisation bactérienne du tube digestif sur le système immunitaire intestinal (SII). C'est en effet, par son implantation à la naissance que la flore digestive, notamment certaines bactéries comme les bifidobactéries, induit puis entretient le bon fonctionnement du SII. L'activation du SII par les bactéries de la flore permet la tolérance orale, c'est à dire le développement de réponses immunes de type « suppressif », empêchant l'induction au niveau intestinal et systémique de réponses immunes contre les protéines étrangères des aliments et des bactéries de la flore résidente.

Cette importante fonction permet d'empêcher le développement des hypersensibilités alimentaires dont l'allergie, ainsi que les réactions inflammatoires du tube digestif envers les bactéries intestinales (Bernier, 1988).

Par ailleurs, la défense de l'organisme contre les germes pathogènes, l'activation des fonctions des macrophages (phagocytose, synthèse de cytokines) et des plasmocytes

(synthèse et sécrétion d'immunoglobulines (IgA)), permet de protéger l'hôte contre les microorganismes pathogènes en bloquant leur adhésion, en empêchant la translocation vers le compartiment systémique, en bloquant la multiplication virale, en neutralisant les entérotoxines ou en bloquant le passage de macromolécules par formation de complexes immunes (Berg *et al.*, 1991).

#### **II.4. Rôle des probiotiques dans le maintien de l'équilibre de l'écosystème intestinal**

Les probiotiques sont des microorganismes vivants (bactéries, levures) qui, ingérés en quantités suffisantes, ont des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale (Fuller, 1989 ; FAO, 2001).

##### **II.4.1. Principales fonctions des probiotiques.**

Les probiotiques remplissent trois principales fonctions. Il s'agit de l'effet barrière, de l'effet immuno-modulateur et de l'effet protecteur de l'épithélium.

###### **II.4.1.1. L'effet barrière**

L'effet barrière des probiotiques est identique à celui décrit précédemment et qui constitue une stratégie très efficace contre la colonisation du tube digestif par des bactéries étrangères, qu'elles soient inoffensives ou bien dangereuses. Cette fonction protectrice permet également le maintien de l'équilibre de la flore intestinale.

###### **II.4.1.2. L'immuno-modulation**

Les probiotiques stimulent les fonctions immunitaires intestinales et la multiplication des cellules macrophages au niveau intestinal.

###### **II.4.1.3. Protection de l'épithélium**

Les probiotiques participent à la protection de l'épithélium en synthétisant de nombreux enzymes et métabolites. Ils vont agir sur de nombreux paramètres physiologiques, sur la vitesse de renouvellement des cellules de l'épithélium colique, évitant le développement de cellules cancéreuses, diminuant le temps de contact avec des substances potentiellement dangereuses (nitrosamines, etc.) et produits toxiques.

Toutes ces fonctions sont dues non pas à une seule bactérie probiotique mais à un ensemble de bactéries probiotiques. Les conséquences des perturbations de l'écosystème digestif peuvent se résumer à court terme par des désordres intestinaux, un mal être, de la fatigue et peuvent à long terme engendrer des pathologies plus graves: maladies inflammatoires du tube digestif, cancers du colon.

Il est donc important de pouvoir pallier à toutes les insuffisances fonctionnelles de la flore digestive et l'ajout de probiotiques constitue un moyen très efficace.

## **II.5. Effet des prébiotiques sur la flore intestinale**

### **II.5.1. Prébiotiques et composition de la flore intestinale.**

La définition des prébiotiques est basée sur leurs effets sur la flore intestinale. On a longtemps cru qu'à partir du moment où la composition bactérienne de la flore intestinale était fixée dès le plus jeune âge pour chaque individu, l'alimentation ne l'influencerait plus.

L'apparition des prébiotiques a montré que cette vision n'était pas exacte et qu'il était possible de moduler l'équilibre entre les populations bactériennes dominantes chez l'enfant et l'adulte, au moins pendant un certain temps. Cette modulation a plusieurs conséquences sur l'activité métabolique de la flore intestinale et influence à la fois la fermentation et d'autres activités enzymatiques impliquées dans les nombreuses fonctions des bactéries coliques.

L'effet le plus connu et généralement utilisé pour démontrer les propriétés prébiotiques d'un ingrédient est l'augmentation sélective de la concentration fécale des populations dominantes de bactéries produisant de l'acide lactique, c'est-à-dire les bifidobactéries chez l'homme, ou les lactobacilles chez le rat et la souris. Chez l'homme adulte, la concentration fécale de bifidobactéries est comprise entre  $10^9$  et  $10^{10}$  unités/g de selles (Kumira *et al.*, 1997), mais est plus basse chez le sujet âgé (Saunier & Dore, 2002).

Cette augmentation de la proportion de bifidobactéries induite par les prébiotiques est accompagnée par une diminution relative de la quantité d'autres populations bactériennes dominantes, telles que les *Bacteroides*, les fusobactéries ou les clostridies. (Gibson *et al.*, 1995).

## **II.5.2. Prébiotiques et fonctions intestinales.**

L'intestin a trois principales missions : digérer et absorber, empêcher le passage de micro-organismes pathogènes et réduire la disponibilité, carcinogénicité et toxicité de substances chimiques nocives, et éliminer les résidus. Pour assurer ces missions, de nombreux mécanismes agissent de façon coordonnée.

Des effets potentiels des prébiotiques sont observés uniquement sur deux fonctions intestinales : le transit et l'excrétion fécale, et la barrière épithéliale.

### **II.5.2.1. Prébiotiques, trophicité de l'épithélium intestinal et renouvellement cellulaire**

L'épithélium intestinal est un tissu qui se renouvelle rapidement, dans lequel l'équilibre entre croissance et élimination cellulaire est maintenu par une série de processus cellulaires incluant la prolifération, l'arrêt de croissance, la différenciation et l'apoptose. Des facteurs luminaux (par exemple le butyrate), intestinaux paracrines (facteurs de croissance, peptides, etc.) et systémiques (neurohormonaux) contrôlent l'homéostasie épithéliale ([Cherbut, 2003](#)).

Une dérégulation de ces processus peut conduire, d'un extrême à l'autre, soit à une atrophie de la muqueuse fragilisant la barrière intestinale, soit à une hyper-prolifération anarchique favorisant la formation d'adénomes et pouvant représenter une première étape de la cancérogenèse.

À travers la fermentation, les prébiotiques pourraient influencer ces processus. Ainsi, les effets positifs des AGCC, en particulier du butyrate, sur la prolifération, différenciation et apoptose des cellules épithéliales coliques ont été largement établis *in vitro*.

Par ailleurs, [Cherbut \(2002\)](#) avait suggéré que certaines bactéries lactiques pourraient aussi directement influencer ces processus. D'autre part, quelques études ont suggéré que certaines bactéries lactiques pourraient aussi directement influencer ces processus.

## **II.6. Tolérance intestinale des prébiotiques**

Des symptômes d'inconfort intestinal, principalement des flatulences, quelquefois accompagnées de ballonnements et de crampes abdominales, peuvent survenir chez certains sujets lors de la consommation de certains prébiotiques (Bouhnik *et al.*, 1997).

L'origine de ces symptômes est probablement liée à la production de gaz lors de la fermentation des prébiotiques.

Bien que les bifidobactéries ne produisent pas de gaz, ceux-ci sont augmentés lors de la fermentation de la majorité des prébiotiques connus, provenant soit de la fermentation des prébiotiques par d'autres bactéries de la flore, soit du métabolisme des acides produits par les bifidobactéries.

La tolérance intestinale des prébiotiques dépend en grande partie de leur structure chimique (Cherbut, 2003). Les oligosides à chaîne courte sont moins bien tolérés que ceux à chaîne longue parce qu'ils sont probablement plus rapidement fermentés ; ce qui augmente leur contribution à la production de gaz.

La quantité de prébiotiques ingérée et le mode de leur consommation influencent aussi la fréquence des symptômes. Par ailleurs, la susceptibilité à ressentir ces symptômes est très variable d'un sujet à l'autre. Cela pourrait s'expliquer par une sensibilité viscérale différente, et aussi par des différences du profil bactérien de la flore colique des individus. Chez les patients souffrant de troubles digestifs fonctionnels, l'ingestion de prébiotiques pourrait aggraver leurs symptômes.

## **CHAPITRE III : Matériels et Méthodes**

### **III.1. Expérimentation *in vitro* de la fermentation des substrats prébiotiques**

#### **III.1.1. Nature et origine des souches.**

Les souches utilisées dans cette première partie comportent des souches bénéfiques et une souche pathogène.

- Les souches bénéfiques : il s'agit de *Bifidobacterium animalis subsp lactis*, codée Bb12 et *Bifidobacterium bifidum* codée Bb 443 fournies par les laboratoires Chr-Hansen (Danemark), de *Lactobacillus acidophilus* LbA-CECT 4529, *Lb. plantarum* LbP-CECT 748 qui ont été aimablement fournies par notre laboratoire partenaire espagnol de sécurité des aliments par l'utilisation des bactéries lactiques et des probiotiques, (SEGABALP, université de

complutense, Madrid, Espagne) et d'une souche expérimentale *Lactobacillus rhamnosus* codée LBRE-LSAS, isolée dans notre laboratoire à partir de selles de bébé sain allaité exclusivement au sein et ne recevant aucune antibiothérapie.

- La souche pathogène est représentée par une entérobactérie de référence, *Escherichia coli* ATCC 25922.

### **III.1.2. Substrats prébiotiques**

Cinq substrats ont été testés pour leur pouvoir prébiotique

#### **III.1.2.1. Le son entier de blé**

Le son de blé entier correspond à l'ensemble des enveloppes externes des grains de blé dur du label « bio » (*Triticum durum*). C'est un produit MARKAL (Grenoble, France), issu de l'Agriculture Biologique, conformément au Règlement CE N° 2092/91. La composition moyenne en g pour 100 g est : glucides 68.5 - 70.5, protéines 11 -13, lipides 2.5 - 4.5, fibres 28 - 31, matières minérales totales 2 - 3, valeur énergétique moyenne 350-390 Kcal, 1540-1580 KJ (fig.6).

#### **III.1.2.2. Le son entier d'avoine**

Il correspond à l'ensemble des enveloppes de l'avoine (*Avena Sativa*), C'est un produit MARKAL (Finlande), est issu de l'Agriculture Biologique, conformément au

Règlement CE N° 2092/91. La composition moyenne en g pour 100 g est : glucides 44 – 47, protéines 16 – 18, lipides 6.6 – 8.6, fibres 17 – 19, sodium  $2.4 \cdot 10^{-3}$ , valeur énergétique moyenne 1330 – 1370 KJ, 300 – 340 Kcal (fig.7).

#### **III.1. 2. 3. La chicorée**

La chicorée est un produit fabriqué à partir de racine de *Cichorium Intybus* et commercialisé par la société Leroux (France). Sa composition moyenne en g pour 100 g est : protéines 6.4, glucides 51.2, lipides 0.7, fibres alimentaires 34.1, sodium  $109 \cdot 10^{-3}$ , calcium  $207 \cdot 10^{-3}$ , magnésium  $68 \cdot 10^{-3}$ , phosphore  $178 \cdot 10^{-3}$ , fer  $22 \cdot 10^{-3}$ , valeur énergétique 253 Kcal (fig. 8).

#### **III.1.2. 4. Le Lactulose et la pectine.**

Le Lactulose utilisé est un laxatif osmotique acheté en pharmacie (duphalac) de concentration de 667 g/L. La pectine est un produit extrait de pomme, hautement méthylé et commercialisé par la firme Herbstreith & Fox (Danemark).

### III.1.3. Choix des milieux de culture

Dans le présent travail, les milieux de cultures sont utilisés liquides ou solides après addition de 2% d'agar-agar et stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 15min. La composition des milieux est donnée en g/L.

Le milieu bouillon MRS supplémenté avec 0.05 % (P/V) de chlorydrate de cystéine pH 6.5 additionné de 2% (P/V) de différents substrats prébiotiques comme seule source de carbone, a été utilisé comme milieu de fermentation pour tester le pouvoir prébiotique de ces substrats.

Afin de valider les conditions de culture propre à chaque souche, leur croissance est testée d'une part sur un milieu où le glucose constitue la source carbonée (témoin positif) et d'autre part sur milieu sans apport complémentaire de source carbonée glucidique (témoin négatif). Ce même milieu solidifié par l'addition de l'agar-agar est utilisé pour le dénombrement des bifidobactéries et des Lactobacilles.



**Figure 6 :** Son de blé, produit Bio.



**Figure 7 :** Son d'avoine, produit Bio.



**Figure 8 :** La chicorée, racine de *Cichorium Intybus*

Le milieu M9 à base de glucose ou de différents substrats prébiotiques est utilisé pour la culture d'*E-coli* et le milieu TSA agar est utilisé pour son dénombrement. La dilution simple (DS) a été utilisée pour l'obtention des différentes dilutions décimales.

### III.1.3. 1. Composition des milieux de cultures utilisés dans cette étude.

- **La composition du milieu MRS** (De Man, Rogosa et Sharpe) (De Man et al., 1960) :

Le milieu MRS est constitué de 10 g.L<sup>-1</sup> de peptone, 5 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure, 10 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de viande, 5 g.L<sup>-1</sup> d'acétate de sodium, 2 g.L<sup>-1</sup> de citrate de sodium, 5g.L<sup>-1</sup> de glucose, 2 g.L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.25 g.L<sup>-1</sup> Mg SO<sub>4</sub>, 0.005 g.L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>, 0.5 g.L<sup>-1</sup> de cystéine chloridrique, 1mL de Tween 80, 1000 ml d'eau distillée, le pH final est de 6.5 ±0.2.

- **La composition de milieu M9**

Le milieu M9 contient 0.5 g.L<sup>-1</sup> chlorure de sodium, 1 g.L<sup>-1</sup> de chlorure d'ammonium, 3 g.L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 17 g.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 H<sub>2</sub>O, 0.5 g.L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.015 g.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0.1 g.L<sup>-1</sup> thiamine, 20 g.L<sup>-1</sup> de glucose, le pH étant de 7.

- **La composition de milieu TSA (Tryptophane de Soja Gélosé)**

Le milieu TSA est constitué de 15 g.L<sup>-1</sup> de tryptone, 5 g.L<sup>-1</sup> de peptone papainique de soja, 5 g.L<sup>-1</sup> de chlorure de sodium, 15 g.L<sup>-1</sup> d'agar- agar bactériologique ; le pH est ajusté à 7.3±0.2.

- **Dilution simple (DS)** (Nebra et Blanch, 1999)

La dilution simple est un milieu constitué de 1 g de peptone, 8.5 g de NaCl, 0.5 g de cystéine chloridrique, 1000 ml d'Eau distillée, le pH final est de 7.0±0.2.

### III.1.4. Préparation des inoculas

Les souches conservées à - 20°C dans du glycérol, ont été réactivées sur des milieux MRS cystéinés ou non et incubées en anaérobiose à 37°C pendant trois jours successifs.

Par la suite, 200µL ont été prélevés de cultures jeunes (de 18 à 24h) des différentes souches etensemencés dans 10ml de MRS liquide pendant trois jours successifs, afin d'obtenir une concentration initiale de 1.10<sup>9</sup> UFC/mL. Les tubesensemencés par des monocultures ont été incubés en anaérobiose. La souche pathogène, a été repiquée dans le

milieu BHIB et incubée en aérobiose. Ces pré-cultures sont utilisées comme inoculum par la suite.

### **III.1.5. Procédure de fermentation des différents substrats prébiotiques**

Les milieux MRS en présence (contrôle positif) ou en absence (contrôle négatif) de glucose, additionnés de différents substrats prébiotiques (effet prébiotique) sont répartis chacun dans des flacons à raison de 100 mL/flacon puisensemencés en monoculture par les différentes souches bénéfiques à raison de 1% (V/V) de façon à avoir une concentration finale de  $1 \cdot 10^7$  UFC/mL. Les flacons sont incubés en anaérobiose à 37°C pendant 48 h (Su et al., 2007).

Le milieu M9 (à base de différents substrats prébiotiques ou de glucose) est réparti dans des tubes à raison de 10 mL/tube, etensemencé par la souche pathogène dans les mêmes conditions mais incubé en aérobiose à 37°C (Huebner et al., 2007).

### **III. 1.6. Détermination de la cinétique de croissance et suivi du pH**

La cinétique de croissance des souches bénéfiques du genre *Lactobacillus sp* et *Bifidobacterium sp* a été déterminée par la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm au spectrophotomètre (Spectrophotometer, JENWAY 6715 UV/V.S., England). L'acidité développée dans les milieux de cultures a été suivie par la mesure du pH à l'aide d'un pH mètre (WTW pH 330).

Un échantillon est recueilli au démarrage de la fermentation (0h); puis des prélèvements sont effectués régulièrement (après 3h, 6h, 9h, 12h, 24h et 48h) pour suivre la biomasse produite et mesurer le pH (Su et al., 2007).

### **III.1.7. Analyse des acides organiques.**

#### **III.1.7.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) des acides gras à chaîne courte (AGCC).**

L'analyse qualitative et quantitative des AGCC a été effectuée par CPG couplée à la spectrométrie de masse des esters méthyliques d'AGCC extraits des surnageants de cultures des microorganismes bénéfiques réalisées en présence de différentes sources carbonées.

Le dispositif est constitué d'un chromatographe gaz modèle Perkin Elmer clarus 500, couplé à un détecteur de type spectromètre de masse modèle MD 800 (Fison Instruments,

Italie). L'hélium est utilisé comme gaz vecteur. L'acquisition et le traitement des données sont assurés par le logiciel TurboMass version 5.4.

### **III.1.7.1.1. Préparation de l'échantillon**

1mL de milieu de culture est centrifugé 5min à 10 000 tours/min. 500µL de surnageant, exempt de corps bactériens, sont acidifiés par addition de 500µl d'acide chlorhydrique à 38% (V/V) et de 50µl d'acide 3-méthylvalérique, servant d'étalon interne.

L'extraction des AGCC, en phase liquide, est réalisée par addition de 1ml d'éther diéthylique à la solution précédente. Après agitation au vortex, le mélange est centrifugé 2min à 10 000 tours/min et la phase organique est prélevée puis stockée à 4°C. L'opération d'extraction à l'éther diéthylique est renouvelée une fois supplémentaire sur la phase aqueuse résiduelle.

Les phases organiques recueillies au cours de deux extractions sont regroupées et 200µL sont prélevés, mis en tube à dérivation en verre de 1.5mL et les acides gras méthylés par addition de 20µL de N-tert-butyldiméthylsilyl-N-méthyltrifluoroacétamide (MTBSTFA) contenant 1% de tertbutyldiméthylchlorosilane (TBDMCS). Après 20min d'incubation du mélange homogène à 80°C, le milieu réactionnel est centrifugé 2min à 10 000 tours/min. 1µL de surnageant contenant les esters méthyliques des AGCC est injecté dans la colonne du système CPG. Acétate, propionate et butyrate (10µmol/mL d'éther diéthylique) sont utilisés comme des standards ([Madhukumar & Muralikrishna, 2010](#)).

### **III.1.7.1.2. Analyse des échantillons**

L'analyse est réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG/SM). La colonne capillaire en silice fondue, 30m x 25mm x 0.25µm, mise en œuvre est de type DB-17 MS (J&W Scientific, USA). Le débit de gaz vecteur (hélium) est réglé à 3 mL.min<sup>-1</sup>. L'injecteur, maintenu à 250°C, fonctionne en mode split, la détection des acides gras volatils se fait à une température de 280°C.

Au niveau qualitatif, chaque AGCC est identifié, d'une part par comparaison de son temps de rétention relatif, par rapport à ceux de AGCC étalons dans les mêmes conditions et d'autre part par comparaison des spectres de masse obtenus, avec ceux contenus dans la base de données du logiciel. Au niveau quantitatif, la méthode de l'étalonnage interne, est utilisée. Le résultat est exprimé en mg d'acide par mL de milieu de culture.

### III.1.7.2. Dosage colorimétrique de l'acide lactique

Le milieu de culture fermenté est centrifugé, pendant 5min à 10 000 tours/min et 50mL de surnageant, exempt de corps bactérien, sont additionnés de 100mL d'éther diéthylique pendant 3h. La phase organique contenant l'acide lactique est récupérée puis colorée par l'ajout de quelques gouttes du réactif de chlorure de fer. L'absorbance de la solution jaune obtenue est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 440nm (Yang & Choong, 2001).

### III.1.8. Détermination du score de l'activité prébiotique

Le score de l'activité prébiotique (SP) a été déterminé, après une série de dilutions, sur la base du dénombrement sur milieu solide des cellules de souches lactiques et de celles de la souche pathogène après 24h de fermentation (Huebner *et al.*, 2007). Il est exprimé selon l'équation suivante :

$$SP = \frac{[\text{probiot.}]_{\text{prébiot.}}^{24h} - [\text{probiot.}]_{\text{prébiot.}}^{0h}}{[\text{probiot.}]_{\text{gluc.}}^{24h} - [\text{probiot.}]_{\text{gluc.}}^{0h}} - \frac{[\text{pathog.}]_{\text{prébiot.}}^{24h} - [\text{pathog.}]_{\text{prébiot.}}^{0h}}{[\text{pathog.}]_{\text{gluc.}}^{24h} - [\text{pathog.}]_{\text{gluc.}}^{0h}}$$

$[\text{probiot.}]_{\text{prébiot.}}$ : Concentration en probiotique en log UFC.mL<sup>-1</sup> en présence de prébiotique à 0h et après 24h de fermentation.

$[\text{probiot.}]_{\text{gluc.}}$ : Concentration en probiotique en log UFC.mL<sup>-1</sup> en présence de glucose à 0h et après 24h de fermentation.

$[\text{pathog.}]_{\text{prébiot.}}$  : Concentration en pathogène en log UFC.mL<sup>-1</sup> en présence de prébiotique à 0h et après 24h de fermentation.

$[\text{pathog.}]_{\text{gluc.}}$ : Concentration en pathogène en log UFC.mL<sup>-1</sup> en présence de glucose à 0h et après 24h de fermentation.

Par définition, la souche qui présente le score prébiotique le plus élevé est celle qui se développe parfaitement en présence du substrat prébiotique en comparaison avec l'entérobactérie qui, théoriquement, se développe mal en présence du prébiotique par rapport à sa croissance en présence du glucose (Huebner *et al.*, 2007).

### III.1.9. Extraction des fibres solubles et insolubles à partir du son

Nous avons retenu deux espèces de céréales comme source de son: le blé et l'avoine.

#### III.1.9.1. La digestion enzymatique des sons de blé et d'avoine

Le protocole mis au point par [Prosky et al. \(1984\)](#) est devenu la méthode officielle AOAC pour l'extraction et la détermination des prébiotiques. Toutes les enzymes utilisées

dans cette étude sont des produits lyophilisés Sigma (Aldrich, Suisse) misent en suspension (1mg/ml) dans l'eau distillée.

100g de son de céréale broyé (Avoine ou blé) sont autoclavés à 121°C pendant 45mn pour détruire toute activité enzymatique endogène éventuelle. Les sons sont mis en suspension dans un erlenmeyer contenant 1L d'eau puis macérés pendant 6 h à 60°C avec agitation continue dans un bain marie ([Wang et al., 2009](#)).

L'échantillon est digéré avec l'ajout de 7.5 mL d' $\alpha$ -amylase (10 unités/mg) thermostable (E.C. 3.2.1.1) issue du pancréas de porc. Le milieu réactionnel est amené à ébullition pendant 40min avec agitation toutes les 5 min afin de dégrader les liaisons  $\alpha$  (1-4) des polysaccharides en sucres plus simples de 3 unités glucose au plus (élimination de l'amidon résiduel).

Après refroidissement, la déprotéinisation de l'échantillon est réalisée en ajustant son pH à 7.5 avec NaOH 275 mM, et en l'incubant 30 min à 60°C sous agitation en présence de 3mL de protéase (9 unités/mg) produite par *Bacillus licheniformis*, enzyme capable de dégrader aussi bien des protéines que des oligopeptides. Cette étape a été poursuivie par l'acidification du milieu à pH 4,5 avec du HCl 325mM et l'ajout de 3,5 mL d'amyloglucosidase (70 unités/mg) fongique produite par *Aspergillus niger* afin de dégrader les liaisons  $\alpha$  (1-6) et  $\alpha$  (1-4) des polysaccharides en sucres plus simples (malto-oligosaccharides en glucose), enfin le mélange est incubé à 60°C pendant 30 min et le milieu est agité continuellement ([Prosky et al., 1992](#)).

#### III.1.9.2. La séparation des fibres solubles et insolubles

Les échantillons de sons hydrolysés par les différentes enzymes sont filtrés pour procéder à la séparation des fibres solubles (surnageant) et les fibres insolubles (résidu). Pour l'obtention des fibres solubles, 4 volumes d'éthanol à 96% ont été ajoutés au surnageant qui est

laissé à température ambiante pendant 1h pour la précipitation des protéines et résidus. Le surnageant issu de cette décantation est filtré et séché à 103°C pendant une nuit. Les fibres insolubles sont lavées avec de l'eau chaude et séchées à l'air libre (Proskey *et al.*, 1992; Kedia *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009).

### **III.1.10. Fermentescibilité *in vitro* des extraits de fibres de son entier de blé et d'avoine.**

#### **III.1.10.1. Préparation des milieux de culture.**

Des milieux de culture à base des différents extraits de fibres sont préparés comme suit :

500 mL d'un milieu de culture contenant l'eau distillée (qsp 500 mL), 2% peptone, 2% extrait de levure et fibre soluble (surnageant traité) ou insoluble (résidu) du son d'avoine et du son de blé. Le pH du milieu est ajusté à 6,5 et le milieu est stérilisé à 121°C pendant 15min (Kedia *et al.*, 2008).

#### **III.1.10.2. Conduite des fermentations.**

Les milieux de culture préparés précédemment sont inoculés par les différentes souches lactiques à une concentration de 1% (V/V) puis incubés en anaérobiose à 37°C pendant 30h (Kedia *et al.*, 2008).

La biomasse des échantillons est régulièrement contrôlée et mesurée aux intervalles 3, 6, 9, 12, 24 et 30h comme décrit précédemment au II.6., et les surnageants des milieux fermentés sont recueillis et stockés à -20°C pour des analyses ultérieures. Toutes les fermentations sont répétées deux fois.

## **III.2. Expérimentation *in vivo* sur les souris Swiss albinos conventionnelles.**

### **III.2.1. Matériel biologique**

#### **III.2.1.1. Nature des souches**

Deux souches bifides, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 et *B. bifidum* Bb443 et deux souches lactobacilles, *Lactobacillus acidophilus* LbA-CECT 4529 et *Lb.rhamnosus* LBRE-LSAS, ont été retenues pour cette étude *in vivo*.

#### **III.2.1.2. Les souris de l'expérimentation**

La souris, *Mus musculus* sous ordre des myomorphes, est l'animal de laboratoire le plus utilisé en raison de sa petite taille, sa prolificité et sa polyvalence. Les animaux albinos sont beaucoup moins nerveux que les animaux à pelage coloré.

Les souris utilisées dans ce travail sont des souris femelles albinos conventionnelles de souche NMRI SWISS âgées de 4-5 semaines. Elles ont été fournies par le service d'animalerie de l'institut Pasteur d'Alger.

### **III.2. 2. Choix et composition des milieux de culture**

Dans le présent travail, les milieux de cultures ont été utilisés à l'état liquide ou solide après addition de 2% d'agar-agar. La composition des différents milieux de culture est reportée au tableau 2.

L'activation des souches a été réalisée sur le milieu MRS liquide cystéiné ou non, mais le dénombrement de la flore intestinale a été effectué sur des milieux solides. La flore aérobie totale a été dénombrée sur le milieu infusion de cœur et cerveau (BHI) et la flore anaérobie sur le milieu viande de foie supplémenté par l'alun de fer et le sulfite de sodium.

Le milieu Columbia supplémenté de 0.5mL d'acide propionique et le milieu MRS supplémenté de 1.32 ml/L d'acide acétique ont été utilisés pour le dénombrement des germes *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, respectivement.

Les genres *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterococcus* et *Enterobacter* ont été cultivés respectivement sur Mueller Hilton (MH) à base de sang de mouton, Tryptose sulfite Cycloserine agar (TSC), Bile Esculine et Mc. Konkey agar N°3 (Tableau 3). Tous les milieux de cultures préparés sont autoclavés à 121°C pendant 15 min.

### **III.2.3. Protocole expérimental d'étude *in-vivo***

#### **III.2.3.1. Les conditions d'élevage des souris**

Les souris femelles sont maintenues dans des isolateurs en plastique et divisées en lot de 6 par cage d'une surface de sol de 180 cm<sup>2</sup> et une hauteur de 12 cm. Ces cages sont mises dans une chambre à environnement contrôlé (12h de lumière et 12h d'obscurité, température 22 ± 2 °C, humidité 56 ± 5%).

Les souris sont nourries *ad libitum* avec de l'eau stérilisée par autoclavage et un aliment fourni par la société de Monsieur H. Tlamsi fabricant d'aliment animal (NutriMost, Mostaganem, Algérie), conditionné dans des sachets de congélation, stérilisé par rayonnement gamma (40kgray) au centre de développement des techniques avancées (CDTA) d'Alger, et dont la composition est indiquée au tableau 4.

Les souris ont été pesées tous les 2 jours pour les alimenter juste après selon leur poids respectifs (4 à 6g d'aliment pour une souris de 10 à 20g et 6 à 10g d'aliment pour une souris de 20 à 50g).

**Tableau 2 :** Composition des milieux de cultures utilisés.

Constituants des milieux en g/L	Milieux de cultures							
	MRS	Columbia	Cœur cervelle	Tryptone sulfite cyclosérine	Mueller Helton	Gélose viande foie	Mc Conkey	Bile Esculine
Acétate de Na trihydraté	5	-	-	-	-	-	-	-
Agar	20	15	15	18	17.5	11	13.5	15
Amidon de maïs	-	1	-	-	-	-	-	-
Amidon soluble	-	-	-	-	1.5	0.75	-	-
Azide de Na	-	-	-	-	-	-	-	0.15
Bile de bœuf	-	-	-	-	-	-	-	10
Bisulfite de Na	-	-	-	1	-	-	-	-
Citrate d'ammonium	2	-	-	-	-	-	-	-
Citrate ferrique ammoniacal	-	-	-	-	-	0.5	-	0.5
Chlorure de Na	-	5	5	-	-	-	5	5
Cristal violet	-	-	-	-	-	-	0.001	-
Digestion de cœur de bœuf	-	3	-	-	-	-	-	-
Digestion pancréatique de caséine	-	10	-	-	-	-	-	-
Esculine	-	-	-	-	-	-	-	1
Extrait de viande	8	-	-	-	-	-	-	-
Extrait de levure	4	5	-	5	-	-	-	-

Extrait de cœur de bœuf	-	-	5	-	-	-	-	-
Extrait de cervelle de veau	-	-	12.5	-	-	-	-	-
Infusion de bœuf	-	-	-	-	300	-	-	-
Glucose	20	-	2	-	-	0.75	-	-
Hydrogénophosphate de potassium	2	-	-	-	-	-	-	-
Phosphate disodique	-	-	2.5	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	10	-
Peptone	10	-	10	-	-	-	-	-
Peptone de caséines	-	-	-	-	17.5	-	-	-
Peptone de soja	-	-	-	5	-	-	-	-
Peptone-viande-foie	-	-	-	-	-	20	-	-
Rouge neutre	-	-	-	-	-	-	0.03	-
Protéase peptone	-	5	-	-	-	-	3	3
Sels biliaires	-	-	-	-	-	-	1.5	-
Sulfate de Mg heptahydraté	0.2	-	-	-	-	-	-	-
Sulfate de Mn tétrahydraté	0.05	-	-	-	-	-	-	-
Sulfite de Na	-	-	-	-	-	1.2	-	-
Tryptone	-	-	-	5	-	-	-	-
pH à 25°C	6.2 ± 0.2	7.3±0.2	7.4 ± 0.2	7.6 ± 0.2	7.3 ± 0.2	7.6 ± 0.2	7.1 ± 0.2	7.1 ± 0.2

**Tableau 3** : Nature et origine des différents milieux de dénombrement des bactéries utilisés dans cette étude

Groupes bactériens	Milieux de dénombrement	Origine du milieu	Conditions d'incubation (T °C et Temps d'incubation)
--------------------	-------------------------	-------------------	--

Aérobies totaux	Cœur-cervelle infusion agar (BHIA)	Oxoid, Biomérieux France	37°C/24-48h Aérobiose
Anaérobies totaux	Viande-Foie (VF)	Oxoid, Biomérieux France	37°C/72h Anaérobiose
Bifidobactéries	Gélose Columbia, supplémentée de 0,5 ml/L d'acide propionique	DIFCO-USA	37°C/72h Anaérobiose
Lactobacilles	MRS agar, supplémenté de 1,32 ml/L d'acide acétique	BIOCHEM CHEMOPHARMA United kingdom	37°C/72h Anaérobiose
Entérobactéries	Mc. Konkey agar N°3	Institue de Pasteur, Algérie	37°C/24-48h Aérobiose
Entérocoques	Bile esculine agar	Institue de Pasteur, Algérie	37°C/24-48h Aérobiose
<i>Clostridium</i>	Tryptose sulfite Cycloserine agar (TSC)	Oxoid, Biomérieux France	37°C/24-48h Anaérobiose
Bactéroides	Mueller Hinton à base de sang de mouton	Institue de Pasteur, Algérie	37°C/24h Anaérobiose

**Tableau 4** : Constituants de l'aliment témoin

Constituants de l'aliment témoin en g/100g						
Caséines	Maïs	Farine de soja	Calcaire	Composé minéral Vitaminique brut (CMV)	Saccharose	Huile acide
15	38	40	1.5	2	14.5	4

Le son entier de blé dur standard est ajouté à un taux de 10% (P/P) à cet aliment témoin pour représenter l'aliment expérimental.

### III.2.3.2. Préparation des inoculas

Les bifidobactéries et les Lactobacilles ont été réactivées trois fois successivement sur milieu MRS liquide, par la suite 200µl de ces cultures ont servi à inoculer 10ml de MRS. Cette opération est répétée 3 fois de suite afin d'obtenir une culture à une concentration de

$1.10^9$  UFC/ mL. L'incubation est effectuée en anaérobiose à 37°C pour l'ensemble des souches.

Des cultures jeunes (de 18h d'âge) ont été préparées chaque jour pendant les 4 semaines d'expérimentation sur bouillon MRS et incubées en anaérobiose pendant 24h à 37°C. Le culot bactérien a été obtenu par centrifugation de 10 min à 12000 tours/-min ; le surnageant a été écarté et remplacé par le même volume du lait écrémé reconstitué (LER) à 10% (P/V) et pasteurisé à 90°C pendant 10 min..

### **III.2.3.3. Traitements des souris au prébiotique son entier de blé dur et aux souches bénéfiques.**

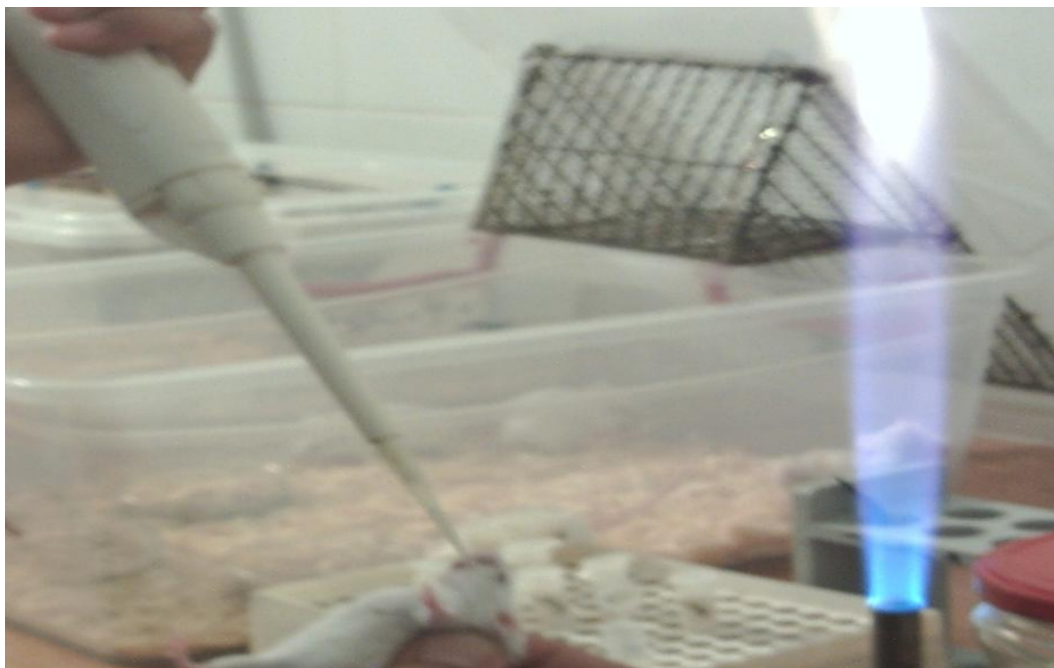
Dix lots de souris femelles comportant chacun 6 sujets ont été traités au prébiotique son de blé dur et aux différentes bactéries bénéfiques tel que c'est reporté au tableau 5.

Après la phase d'adaptation, cinq lots d'animaux ont reçu une dose quotidienne de la souche à tester 24h après avoir commencé à recevoir l'aliment supplémenté par le prébiotique son entier de blé dur, pendant 4 semaines. Les autres 5 lots de souris ont reçu les souches bénéfiques et l'aliment ne contenant pas de prébiotique son entier de blé dur.

### **II.2.3.4. Inoculation oro-gastrique des souris par les souches bénéfiques**

Après une période d'adaptation à l'environnement d'une semaine, les souris conventionnelles sont soumises à une phase d'implantation des souches bifides, *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 ou *B. bifidum* Bb443 et souches lactiques, *Lb. acidophilus* LbA-CECT 4529 ou *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS pendant 28 jours.

Pour ce faire, les souris reçoivent une dose quotidienne orogastrique d'une souche (soit 200 µl de lait reconstitué et pasteurisé contenant  $1.10^9$  UFC/mL) par expérience à la fois à l'aide d'une micropipette dans des conditions stériles (fig.9).



**Figure 9 : Traitement oral des souris par les souches bénéfiques**

**Tableau 5 :** Différents types de régimes alimentaires administrés aux souris.

Lot N°	Type de régime alimentaire	Inoculation oro-gastrique
1	Régime témoin son entier de blé négatif- souche bénéfique négatif (SEBN-SBN)	200ml L.E.R (Lait Ecrémé Reconstitué)
2	Régime son entier de blé négatif- souche LbA-CECT4529 positif (SEBN-LbACECT4529P)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LbA-CECT 4529
3	Régime son entier de blé négatif- souche LBRE-LSAS positif (SEBN-LBRE-LSASP)	<i>L.rhamnosus</i> . LBRE-LSAS
4	Régime son entier de blé négatif- souche Bb443 positif (SEBN-Bb443P)	<i>Bifidobacterium Bifidum</i> Bb443
5	Régime son entier de blé négatif- souche Bb12 positif (SEBN-Bb12P)	<i>B. animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb12
6	Lot témoin son entier de blé positif- souche bénéfique négatif (SEBP-SBN)	200 ml L.E.R

7	Régime son entier de blé positif- souche LbA-CECT4529 positif (SEBP- LbA-CECT4529P).	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LbA CECT 4529
8	Régime son entier de blé positif- souche LBRE-LSAS positif (SEBP-LBRE-LSASP).	<i>L.rhamnosus</i> LbRE-LSAS
9	Régime son entier de blé positif- souche Bb443 positif (SEBP-Bb443P).	<i>B.bifidum</i> Bb443
10	Régime son entier de blé positif- souche Bb443 positif  (SEBP-Bb12P).	<i>B.animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb12

### III.2.4. Techniques de mesure des paramètres microbiologiques, de l'indice prébiotique, de translocation bactérienne et des constantes hématologiques, biochimiques et histologiques.

#### III.2.4. 1. Evaluation de la microflore intestinale des souris

Le contrôle de la flore intestinale a été effectué vis-à-vis des anaérobies totaux, des aérobies totaux, des bifidobactéries, des Lactobacilles, des Entérocoques, des Bactéroides et des clostridies par analyse microbiologique des crottes avant la prise des probiotiques, et chaque 7 jours pendant tout le mois d'administration des souches bénéfiques.

De chaque trois souris d'un même lot d'une même cage, deux échantillons de crottes ont été prélevés juste au moment de leur émission et un pellet de chaque est prélevée dans un tube stérile avant de rassembler 3 pellets dans un même tube. Ces échantillons étaient dilués par 1 ml de dilution simple.

Après agitation au vortex, des dilutions décimales ont été effectuées ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ). Par la suite, On étale 20  $\mu$ L des dilutions choisies à la surface des milieux solides répartis dans des boites de Pétri, coulées une journée à l'avance.

#### III.2.4.2. Indice prébiotique (IP).

Le pouvoir prébiotique du son de blé a été estimé en calculant l'indice prébiotique (IP) *in vivo* par la formule proposée par [Parfalman et al. \(2003\)](#)

$$IP = (Bif/Total) + (Lac/Total) - (Bac/Total) - (Clos/Total)$$

Bif, Lac, Bac, Clos, et Total sont le nombre des bifidobactéries, lactobacilles, bacteroides, Clostridium, et le nombre total des bactéries, respectivement, à la fin de l'expérimentation.

#### **III.2.4.3. Translocation bactérienne**

Une goutte de sang (10-15 µL) a été inoculée directement sur la surface du milieu MRS gélosé et sur milieu BHI. La rate, le foie, et le rein ont été broyés. La moitié de chaque suspension de tissu a été étalée sur gélose MRS et l'autre moitié a été étalée sur gélose BHI. Les boîtes ont été incubées en anaérobie (MRS) ou aérobie (BHI) à 37°C

pendant 48h (Zhou *et al.*, 2000). Un test positif qui représente une translocation positive a été défini par un tissu à partir duquel au moins une colonie de cellules bactériennes viables a été récupérée.

#### **III.2.4.4. Analyse hématologique et biochimique**

Les échantillons de sang ont été obtenus par ponction cardiaque et recueillis dans des tubes EDTA. Un frottis sanguin a été fait pour chaque échantillon afin d'énumérer les lymphocytes, les globules rouges (RBC), les plaquettes sanguines, la concentration d'hémoglobine (HB); le volume globulaire moyen (VGM), concentration globulaire moyenne en hémoglobine (CGMH). Les analyses hématologiques ont été réalisées par un automate d'analyse hématologique (BIMEX3 Hematology analyzer, France).

Les paramètres biochimiques ont été déterminés sur le plasma. Les constantes biologiques sériques ont été déterminées par un automate d'analyse (Chemistry system RA 50 Auto-analyzer, Bayer, Germany) en utilisant des Kit de diagnostic du type BCA Protein Assay, Spinreact (Spain) pour la protéinémie, BCG Réactif albumine, Spinreact, Girona (Spain) pour l'albuminémie, glucose 100 Trinder (Sigma, France) pour la glycémie et cholestérol Spinreact (Spain) pour la cholestérolémie.

#### **III.2.4. 5. Analyse histologique.**

L'anatomie des organes viscéraux de chaque souris a été vérifiée et enregistrée. Des échantillons de tissus d'environ 0.5cm de longueur ont été excisés de l'iléon (2cm en amont du cæcum), cæcum (portion moyenne) et du côlon (2cm en aval du cæcum) (fig. 10), puis fixés

dans du liquide de Bouin pendant 5 jours (fig.11), avant d'être transférés dans l'éthanol à 70%. Les échantillons ont ensuite été intégrés dans de la paraffine et des coupes de tissus ont été faites à 6  $\mu\text{m}$  et colorées à l'hématoxyline et l'éosine (H & E).

### III.2.4. 5. 1. Préparation des échantillons.

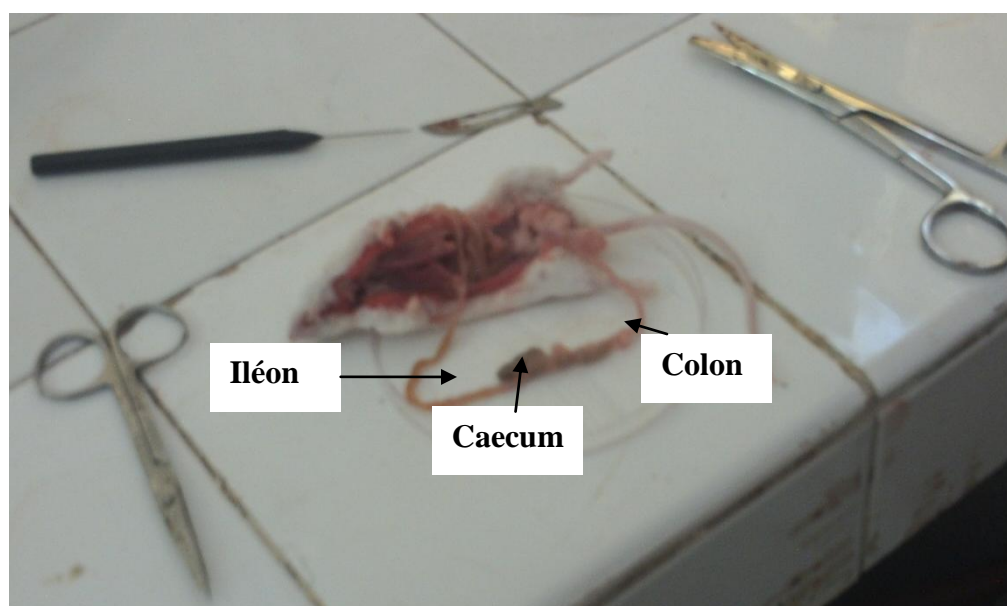
La préparation des échantillons comporte plusieurs opérations : fixation, mise en cassettes, déshydratation, clarification et inclusion.

#### - Fixation et mise en cassette.

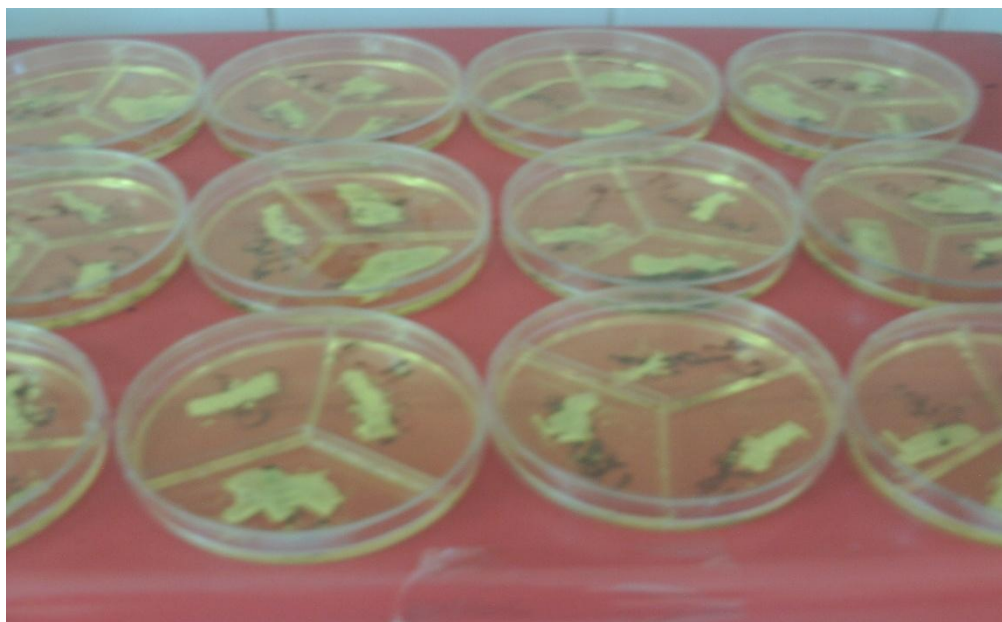
La fixation a pour but de conserver les structures tissulaires et de durcir les pièces. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement, par immersion du matériel dans un grand volume de liquide fixateur qui est le bouin. La durée de la fixation varie selon le volume des prélèvements. Elle consiste à figer à un moment donné les cellules, tissus, organes ou les fragments d'organes dans un état aussi proche que possible à l'état vivant (Coujard, 1980).

Dans notre cas, les organes sont fixés dans du bouin. Cette technique nous a permis de conserver nos pièces pendant plusieurs semaines.

Il est recommandé de placer un échantillon par cassette. Les cassettes sont plongées 1h au minimum dans un volume de formol à 10% (V/V) représentant 10 fois celui du prélèvement.



**Figure 10:** Excision des échantillons de tissus de l'intestin.



**Figure 11:** Fixation des échantillons (iléon, Caecum et colon) dans le bouin.

#### **- Déshydratation, clarification et inclusion.**

Après fixation, les tissus ont été déshydratés en mettant les cassettes dans 4 bains successifs d'acétone à une température de 56° C, chaque bain dure 30 min. L'opération clarification s'effectue après la déshydratation en plaçant les cassettes dans trois bains de xylène à 40° C, chaque bain dure 2 h. L'inclusion est effectuée dans de la paraffine. A l'aide d'un automate (Leica, Allemagne), placer les cassettes dans des moules métalliques, puis verser au dessus de ces cassettes de la paraffine liquide qu'on laisse solidifier avant de congeler.

#### **III.2.4. 5. 2. La microtomie**

On récupère les cassettes congelées pour réaliser des coupes de 5 à 6  $\mu\text{m}$  à l'aide d'un microtome (Leica, Allemagne) que l'on étale sur des lames propres avant de les déparaffiner par 2 bains successifs de 10 min dans du xylène. Ensuite, on procède à la réhydratation qui consiste à éliminer le xylène pour le remplacer par l'eau. Pour ce faire, les lames sont passées 2 min dans 2 bains successifs d'alcool éthylique de degré décroissant (100, 95, 90 et 70°). Le dernier bain est suivi d'un rinçage à l'eau courante pendant 5 min.

La coloration des lames a été effectuée comme suit :

- Bleuir le noyau avec l' hémateïne pendant 3 à 4 min ;
- Laver les lames avec de l'eau de robinet jusqu'au virage de la couleur au bleu-noir ;
- Les tremper dans l'éosine 1% (P/V) pendant 2 min ;
- Les mettre dans deux bains successifs d'alcool éthylique à 70° puis à 96° pendant 5 min chacun pour alléger la sur-coloration ;

Mettre les lames dans du xylène à deux reprises pendant 5 min.

Les lames sont montées pour préserver les colorations, on colle des lamelles de verre par-dessus grâce à une goutte de baume de Canada. Les lames préparées sont laissées sécher avant d'être observées sous microscope.

### **III.3. Validation Statistique.**

Toutes les mesures sont répétées 3 fois et exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  l'écart type. La comparaison des moyennes est effectuée par le logiciel STAT BOX 6,4. Une différence statistique est considérée si  $P < 0.05$ .

## **CHAPITRE IV : Résultats et Discussion**

### **IV.1. La fermentescibilité *in vitro* des substrats prébiotique**

#### **IV. 1.1. Effet prébiotique des différents substrats sur la croissance bactérienne**

Pour que les substrats aient un statut prébiotique, il faudrait que les souches bactériennes bénéfiques soient capables de produire les enzymes nécessaires à leur hydrolyse et leur dégradation en tant qu'unique source de carbone pour générer une biomasse plus au moins importante et, en même temps, ils ne doivent pas être fermentés ni par la flore commensale ni par les bactéries pathogènes.

Les monocultures des cinq souches, dont trois souches lactiques et deux souches bifides en présence de six différentes sources de carbone ont été inoculées à des concentrations finales de 1% à  $1. 10^7$  UFC/ mL.

La fermentescibilité de cinq substrats prébiotiques (son entier de blé ou d'avoine, chicorée, pectine et lactulose), utilisés comme seule source de carbone à une concentration de 2% (P/V), a été étudiée *in vitro* en comparaison à celle du glucose. [Li et al. \(2008\)](#) avaient

utilisé différents prébiotiques à la concentration de 1% (P/V) pour obtenir une stimulation de la croissance de bactéries bénéfiques sur milieu MRS.

L'effet de l'addition d'un substrat prébiotique dans le milieu de culture d'une souche bénéfique est évalué par son pouvoir de croissance cellulaire et par sa capacité à produire des acides gras à chaînes courtes (AGCC).

Les résultats relatifs à la cinétique de croissance des cinq souches lactiques retenues dans cette expérience sont illustrés par les figures 12 à 16 qui montrent que le lactulose est le prébiotique le plus dégradé par l'ensemble de ces souches ( $p < 0.05$ ). La pectine, polymère hautement méthylé, ne répond pas aux critères d'un substrat prébiotique, étant donné la faible croissance cellulaire observée en sa présence, toutes souches confondues.

Cette croissance des souches en présence des différents prébiotiques est appréciée par rapport à celle en présence du glucose qui n'est, certes, pas un prébiotique, mais représente un substrat préférentiel universel pouvant servir de référence en matière de développement cellulaire *in vitro*.

Cette nécessité de dépolymérisation microbienne des prébiotiques pour qu'ils soient assimilés, ralentit quelque peu la croissance *in vitro* des souches qui, évidemment, lorsqu'elles disposent d'une source de carbone assimilable directement (i.e. le glucose) croissent mieux et donnent une biomasse plus importante.

La souche *Lactobacillus acidophilus* LbA-CECT 4529 a la capacité de dégrader les cinq substrats glucidiques explorés pour leur pouvoir prébiotique, mais à des degrés différents (fig.12). Le lactulose est le substrat prébiotique ayant généré la plus forte biomasse (équivalente à une DO de 4.16) après 48h de fermentation ; ce qui représente plus de 78% de la croissance assurée par le substrat référentiel glucose (équivalente à une DO de 5.33).

*Lactobacillus acidophilus* LbA-CECT 4529 affiche moins de performances de croissance en présence des autres substrats testés. Sa courbe de croissance n'est pas exponentielle comme cela est le cas en présence du lactulose ou du glucose. Ces observations se rapprochent de la vérité qui stipule que la vitesse de croissance des microorganismes est inversement proportionnelle au degré de polymérisation du substrat qu'ils consomment.

*Lactobacillus acidophilus* LbA-CECT 4529 fermente très peu les sons entiers de blé et d'avoine car la courbe de croissance s'affiche en « plateau » (fig.12) et le pic de biomasse

accumulée a été observé après 9 et 24h de fermentation en présence du son entier de blé (biomasse équivalente à une DO de 2.55) et de son entier d'avoine (biomasse équivalente à une DO de 1.71), respectivement.

C'est pratiquement le même résultat que l'on obtient après 24h de fermentation en présence de chicorée (biomasse équivalente à une DO de 2.21) ou de pectine (biomasse équivalente à une DO de 1.08).

Ces faibles performances de croissance de la souche espagnole *Lactobacillus acidophilus* LbA-CECT 4529 sur des substrats prébiotiques, situées bien en dessous du niveau de croissance sur glucose, laissent penser, que cette souche ne possède pas d'aptitudes fermentaires d'intérêt digestif observables *in vitro*. Il faudrait signaler que pour une même souche bactérienne, peuvent exister plusieurs variétés présentant chacune des spécificités intrinsèques de prédisposition métabolique.

En revanche, une autre espèce du genre *Lactobacillus*, en l'occurrence *rhamnosus* (LBRE-LSAS), est la souche qui métabolise le mieux le substrat son entier de blé, même si la courbe de croissance n'est pas très régulière durant les 48h de fermentation (fig. 13).

En effet, un premier pic de croissance est enregistré après la 9<sup>ème</sup> heure de fermentation (biomasse équivalente à une DO de 4.1 versus 4.59 sur glucose), suivi d'une chute de biomasse à la 12<sup>ème</sup> heure et un deuxième pic à la 24<sup>ème</sup> heure (biomasse équivalente à une DO de 4.23 versus 5.06 sur glucose).

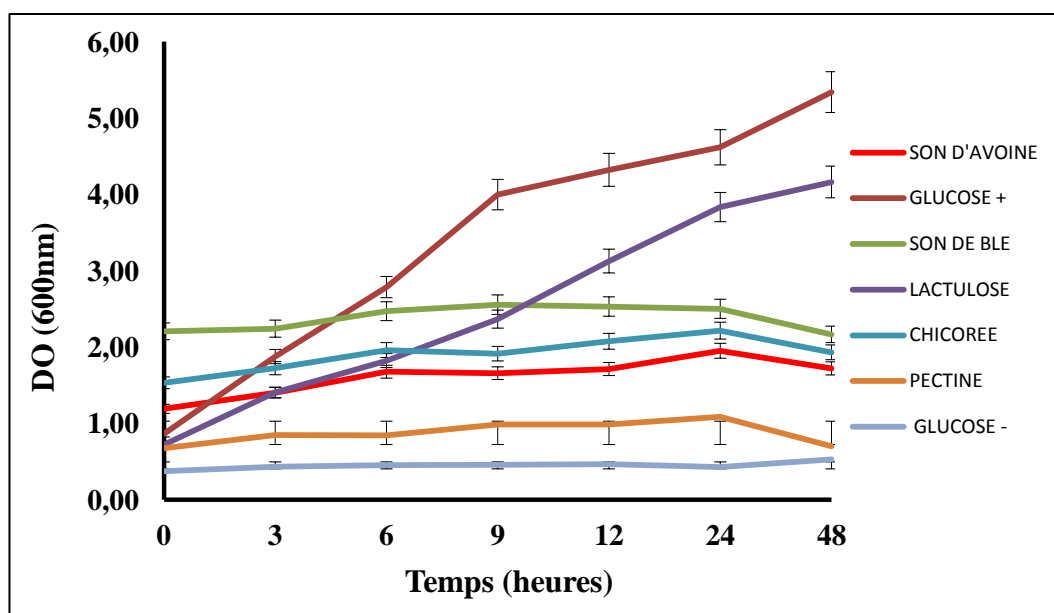
La croissance de cette souche sur son de blé entier s'arrête à 24h ; pendant que celle sur glucose se poursuit pour atteindre un maximum après 48h de fermentation (biomasse équivalente à une DO de 5,20) (fig.13). La souche expérimentale *Lactobacillus rhamnosus* (LBRE-LSAS) affiche une croissance exponentielle régulière en présence du prébiotique « lactulose » qui génère un maximum de biomasse après 48h de fermentation (biomasse équivalente à une DO de 4.32). Cette souche ne fermente pas la chicorée, le son d'avoine et la pectine (fig.13).

Le comportement de la souche à statut probiotique établi, *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* ou Bb12, est quelque peu similaire à celui de *Lactobacillus rhamnosus* (LBRE-

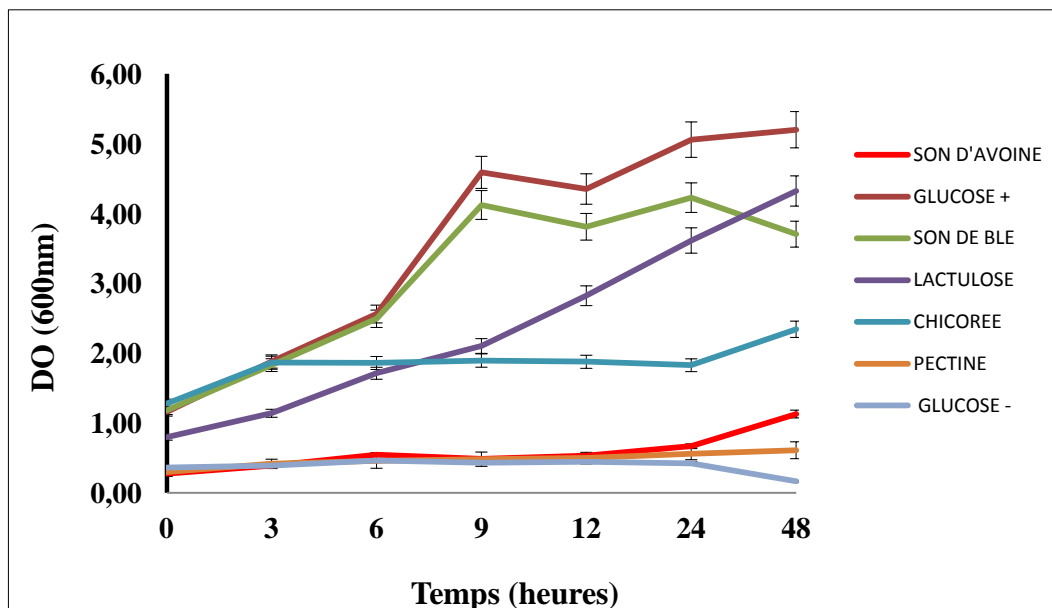
LSAS) dans la mesure où les substrats prébiotiques sur lesquels elle se développe le mieux sont, dans un ordre décroissant le lactulose, le son de blé et la chicorée (fig. 14).

Le son d'avoine et la pectine ne sont pas métabolisés par cette bactérie qui, sans surprise et comme la plupart des souches testées, affiche une croissance typiquement exponentielle en présence du substrat monomère référentiel, le glucose.

La souche bifide Bb12 ne montre pas une croissance durable sur son de blé au-delà des 9 premières heures de fermentation (biomasse maximale enregistrée équivalente à une DO de 3.38), comme c'est le cas du lactulose (pic de biomasse observé à la 24<sup>ème</sup> heure équivalent à une DO de 4.45) ou du glucose (pic de biomasse observé à la 48<sup>ème</sup> heure équivalent à une DO de 5.57).



**Figure 12 :** Cinétique de croissance de *Lactobacillus acidophilus* (LbA- CECT 4529) monocultivée en présence d'un sucre monomère référentiel, le glucose ou de différents substrats glucidiques prébiotiques dimères ou polymères : lactulose, pectine, chicorée, son entier de blé ou d'avoine utilisés à un taux de 2% (P/V) dans le milieu MRS inoculé à 1% (V/V), soit une charge initiale de  $1.10^7$  cellules/mL. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM.



**Figure 13** : Cinétique de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS monocultivée en présence d'un sucre monomère référentiel, le glucose ou de différents substrats glucidiques prébiotiques dimères ou polymères : lactulose, pectine, chicorée, son entier de blé ou d'avoine utilisés à un taux de 2% (P/V) dans le milieu MRS inoculé à 1% (V/V), soit une charge initiale de  $1.10^7$  cellules/mL. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM.

Cette souche ne croît plus sur son de blé après la 9<sup>ème</sup> heure de fermentation car elle entame sa phase stationnaire (fig.14). Ainsi, les performances maximales de croissance de la Bb12 enregistrées à la 9<sup>ème</sup> heure de fermentation sur son de blé représentent 66 et presque 61% celles sur glucose observées, respectivement, à la 9<sup>ème</sup> et la 48<sup>ème</sup> heure de fermentation.

La chicorée n'apparaît pas comme un substrat prébiotique pleinement assimilable par la souche bifide Bb12 étant donné la très faible croissance qu'elle réalise au bout de 48h de fermentation. La seule croissance mesurable est celle qui a eut lieu après 12h de fermentation où la biomasse augmente d'environ 15%.

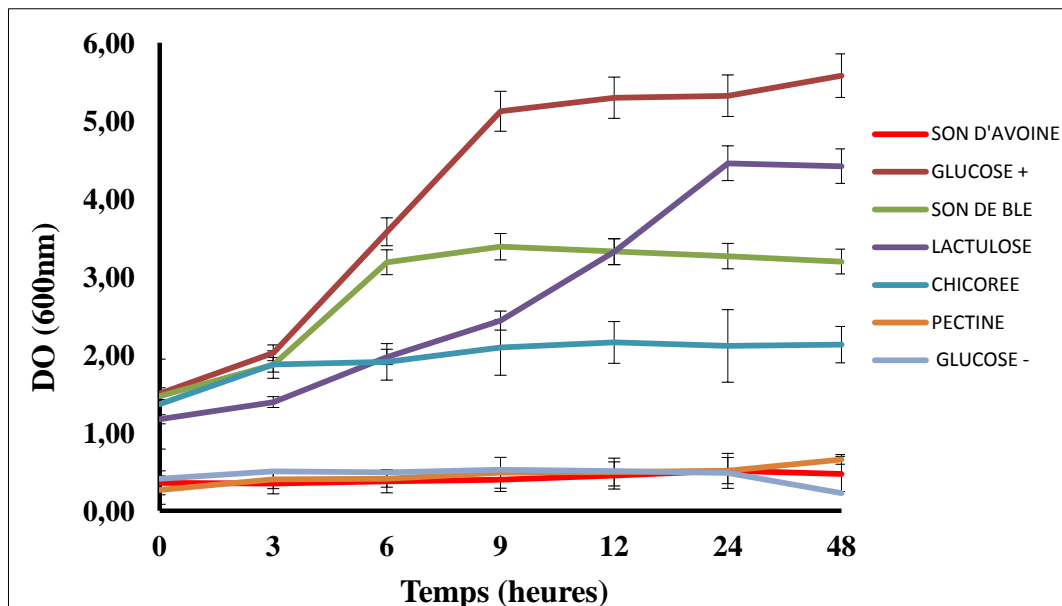
La souche bifide *Bifidobacterium bifidum* Bb443 et la souche lactique *Lactobacillus plantarum* LbP-CECT 748 ont manifesté, quasiment, le même comportement fermentaire vis-à-vis des différents substrats testés, caractérisé par une très faible dégradation des prébiotiques polymères (fig.15 et 16).

En effet, seuls les substrats les moins polymérisés ont été métabolisés et il s'agit du substrat référentiel, le glucose et du prébiotique dimère, le lactulose. La souche bifide *B.*

*bifidum* Bb443 se développe relativement bien sur lactulose durant les 24h de fermentation où elle affiche un pic de biomasse équivalent à une DO de 3.65 qui représente légèrement plus de 70% la biomasse générée par sa croissance sur le glucose et qui est équivalente à une DO de 5.16 (fig.15). Cette souche n'a pas été performante quand elle a été cultivée sur son de blé ou d'avoine, sur pectine ou encore sur chicorée. Par conséquent, elle ne présente pas un grand intérêt digestif.

La souche lactique de collection espagnole, *Lactobacillus plantarum* LbP-CECT 748, ne présente également pas de performances notables de croissance sur des substrats polymérisés comme les fibres de son de céréales qui bénéficient d'une attention particulière dans ce travail.

La chicorée et la pectine ne sont pas dégradées par cette souche. Seuls le prébiotique lactulose et le substrat monomère référentiel, le glucose, permettent à ce lactobacille d'accomplir une croissance exponentielle typique qui s'étale sur 48h de fermentation pour accumuler une biomasse équivalente à des DO de 3.75 et 5.96, respectivement (fig.16).



**Figure 14 :** Cinétique de croissance de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 monocultivée en présence d'un sucre monomère référentiel, le glucose ou de différents substrats glucidiques prébiotiques dimères ou polymères : lactulose, pectine, chicorée, son entier de blé ou d'avoine utilisés à un taux de 2% (P/V) dans le milieu MRS inoculé à 1% (V/V), soit une charge initiale de  $1.10^7$  cellules/mL. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM.

Ainsi, ses performances de croissance sur lactulose représentent environ 63% celles sur glucose.

Selon Huebner et al. (2007), l'aptitude des deux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* à dégrader les glucides prébiotiques, est en étroite relation avec les caractéristiques intrinsèques des souches, voire de variétés de souches, et les substrats spécifiques dont le degré de polymérisation conditionne l'ampleur de leur dégradation.

En effet, l'utilisation des prébiotiques par les souches bénéfiques nécessite la présence d'un système enzymatique d'hydrolyse et de transport spécifique aux molécules prébiotiques

(Barre gar et al., 2003). Les bifidobactéries et les lactobacilles sont capables d'utiliser et fermenter une large variété de glucides (Yuan et al., 2005).

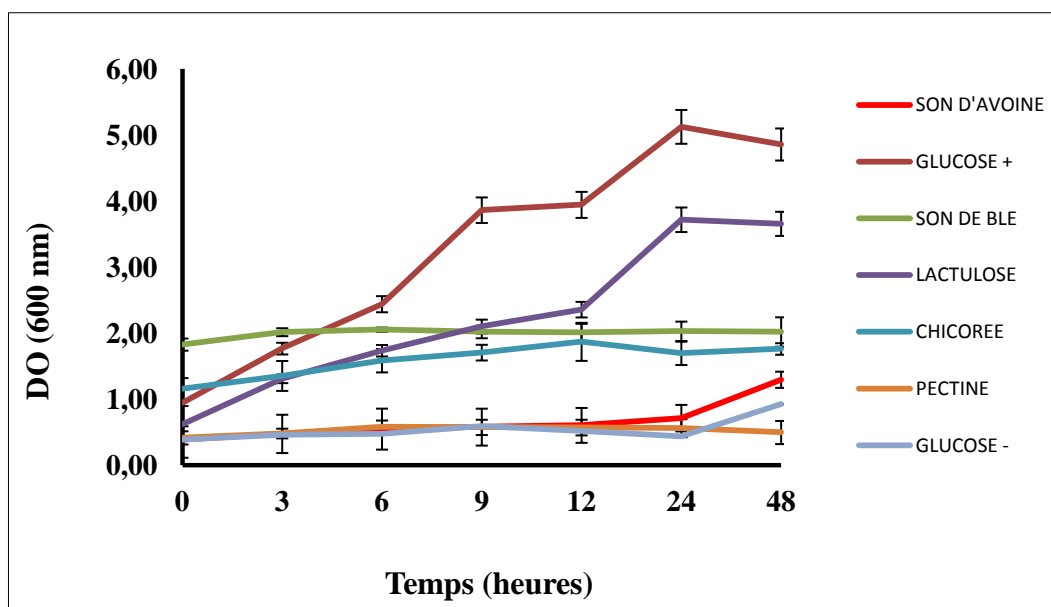
Le pouvoir prébiotique du lactulose ( $\beta$ -galacto-fructose) sur des souches bifides et lactiques a été largement discuté et prouvé, grâce, notamment, aux travaux d'Oliveira et al. (2011) qui ont montré que le lactulose stimule la croissance des souches de *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, et *Bifidobactérium lactis* en culture pure sur du lait fermenté.

Les résultats auxquels nous sommes parvenus concordent avec ceux observés par Gibson et Robertfroid (1999), qui rapportèrent le pouvoir bifidogène du lactulose ; ainsi qu'avec ceux de Salminen et Salminen (1997), qui ont observé l'effet prébiotique du lactulose sur des souches lactiques.

Selon les travaux menés par Souza et al. (2011), la croissance bactérienne des souches *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus* et *B. lactis* est stimulée en présence du lactulose comme substrat prébiotique dans le milieu de fermentation.

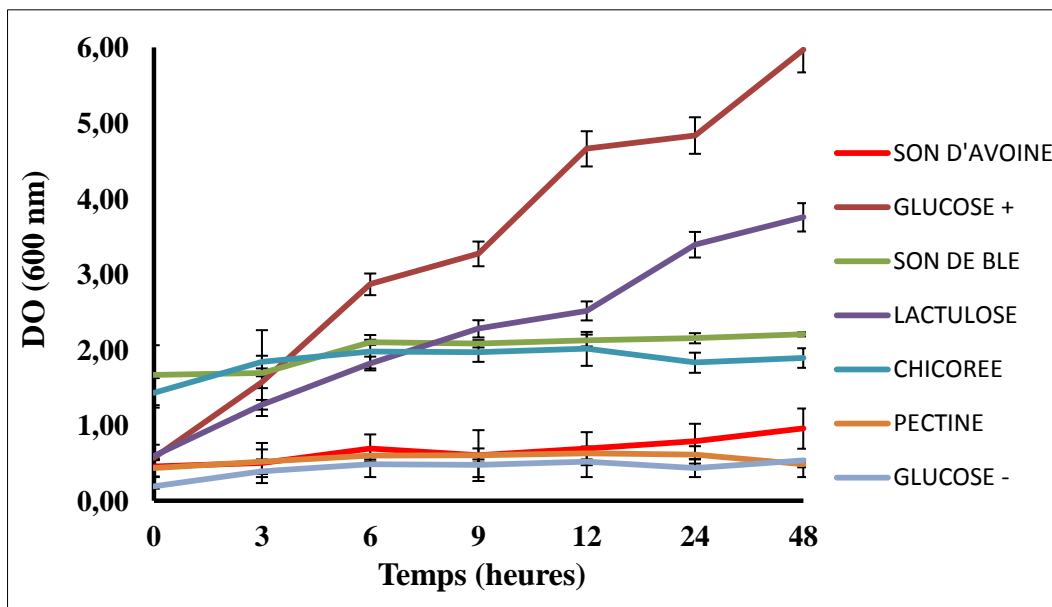
Par ailleurs, l'inuline est une substance sélective des bifidobactéries. Une administration prolongée de faibles doses d'inuline permet le développement de la biomasse bifide (Bouhnik et al., 2007).

Selon les travaux d'Ozer et Akim (2011), la croissance de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 et *Bifidobacterium bifidum* Bb-02 est mieux stimulée par le lactulose que par l'inuline.



**Figure 15 :** Cinétique de croissance de *Bifidobacterium bifidum* Bb443 monocultivée en présence d'un sucre monomère référentiel, le glucose ou de différents substrats glucidiques prébiotiques dimères ou polymères : lactulose, pectine, chicorée, son entier de blé ou d'avoine utilisés à un taux de 2% (P/V) dans le milieu MRS inoculé à 1% (V/V), soit une charge initiale de  $1.10^7$  cellules/mL. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM.

**Figure 16:** Cinétique de croissance de *Lactobacillus plantarum* LbP CECT748 monocultivée en présence d'un sucre monomère référentiel, le glucose ou de différents substrats glucidiques prébiotiques dimères



ou polymères : lactulose, pectine, chicorée, son entier de blé ou d'avoine utilisés à un taux de 2% (P/V) dans le milieu MRS inoculé à 1% (V/V), soit une charge initiale de  $1.10^7$  cellules/mL. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM.

Cette discréditation récente de l'inuline face au lactulose est quelque peu en contradiction avec la tendance scientifique il y a quelques années (Menne *et al.*, 2000 ; Van de Wiele *et al.*, 2004 ; Pompei *et al.*, 2008) qui présentait l'inuline comme le prébiotique favori dans la stimulation de la croissance des bifidobactéries.

Dans le présent travail, cet effet prébiotique n'est pas observé lorsque la chicorée, dont 70% du poids sec est de l'inuline, est utilisée brute. Ceci pourrait être dû à l'absence des enzymes spécifiques d'hydrolyse de ce substrat et/ou à la complexité de sa composition.

D'autres travaux (Su *et al.*, 2007) ont fait la même observation sur l'inefficacité de l'inuline à stimuler la croissance des deux souches *Bifidobacterium animalis lactis* B94 et *Lactobacillus acidophilus* L10.

Une grosse partie de la problématique développée dans cette thèse revient à l'étude de l'effet prébiotique des sons entiers de blé et d'avoine sur la croissance et l'implantation de souches d'intérêt digestif, car il a été rapporté que les céréales et leurs constituants stimulent la croissance des souches lactiques probiotiques (Manisseri et Guidipati, 2010).

L'utilisation du son entier de blé ou d'avoine comme substrat favorise la croissance de *Lactobacillus plantarum* (Kedia et al., 2008). De même les xylooligosaccharides et les féruloyl oligosaccharides de son de blé stimulent sélectivement la croissance des souches du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Yuan et al., 2005; Madhukumar & Muralikrishna, 2010).

Vardakou et al. (2007) rapportent que le son entier de blé qui contient une concentration élevée en  $\beta$ -Dglucane et en arabinoxylane stimule sélectivement la croissance des souches bifides et lactiques.

Les mêmes observations ont été faites par Moura et al. (2007) sur des souches lactiques incluant le genre *Bifidobacterium*. Selon ces mêmes auteurs, les bactéries lactiques ont la capacité de fermenter les bases de xylose, des oligo- et polysaccharides et peuvent ainsi stimuler leur croissance.

Su et al. (2007), observent une faible croissance des souches probiotiques bifides et lactiques lorsque la concentration du  $\beta$ - glucane dépasse 0.5%.

Dans le présent travail, l'inefficacité du son entier d'avoine, utilisé à un taux de 2%, à stimuler la croissance de toutes les souches lactiques testées pourrait être liée à sa forte teneur en  $\beta$ -glucane.

Les pectines sont des substances prébiotiques dégradables par la flore bénéfique colique et, en principe, elles sont capables de stimuler la croissance des souches lactiques et bifides (Baylis et Houston, 1984). Néanmoins, il existe une relation inverse entre le degré de méthylation des pectines et leur fermentescibilité par les bactéries lactiques.

Les travaux de [Dongouski et Lorenz \(1998\)](#) rapportent que les pectines méthylées à 34% stimulent mieux la croissance de différentes bactéries intestinales que celles méthylées à 95%.

Cet effet modulateur du degré de méthylation (DM) des pectines sur la croissance bactérienne fut également rapporté par [Olano et al. \(2002\)](#). Ces auteurs observent que les pectines de DM de 8% stimulent plus la croissance d'espèces bifides comme *B. angulatum*, *B. infantis* et *B. adolescentis* que celles de DM de 66%.

#### **IV.1. 2. Effet prébiotique des différents substrats sur le pouvoir acidifiant des souches bactériennes.**

##### **IV.1.2.1. Evolution du pH des milieux fermentés par les souches bénéfiques.**

L'évolution du pH des milieux de culture est un indice de fermentation des différents glucides en culture pure. C'est également le résultat de la production d'acides organiques (acide lactique) et des acides gras à courte chaîne par les souches bactériennes.

En principe, l'activité de synthèse d'acides organiques par des bactéries lactiques va de pair avec leur vitesse de croissance. C'est pourquoi que, globalement, les résultats obtenus montrent que les plus fortes activités de synthèse d'acides organiques sont celles des milieux à glucose, d'abord, et à lactulose ensuite ; c'est ceux là même où il y a eut forte croissance des souches (fig.17 et 18).

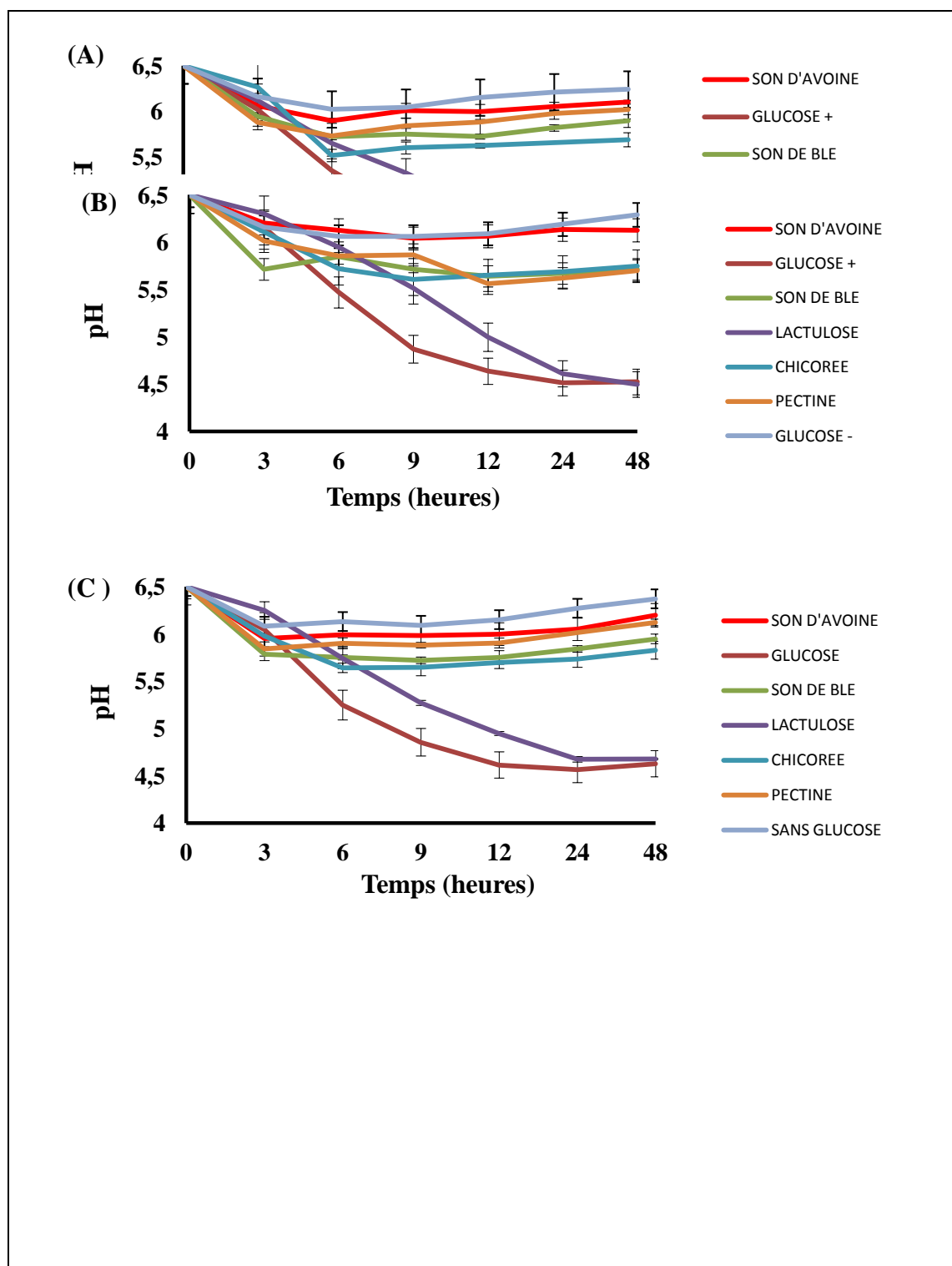
En revanche, mis à part ces deux substrats (l'un non prébiotique monomère et l'autre prébiotique dimère), tous les autres substrats prébiotiques polymères ne permettent pas aux différentes souches d'avoir une activité de synthèse d'acides organiques régulière s'étendant sur les 24 ou 48h de fermentation.

En effet, dans le cas du lactobacille *Lb acidophilus* CECT 4529, la faible diminution du pH a lieu au cours des six premières heures de fermentation où il passe d'une valeur initiale de 6.5 à  $5,89 \pm 0,03$  dans le cas du son entier de blé, à  $5,72 \pm 0,03$  pour la pectine et  $5,89 \pm 0,03$  pour le son entier d'avoine; après quoi ce pH remonte pour se rapprocher de sa valeur initiale dans certains cas de substrats (son d'avoine et pectine, surtout) (fig. 17A).

Ainsi, sur les 48h de fermentation réalisées, on note que le pH des milieux additionnés de 2% de pectine, de son entier de blé ou d'avoine ne diminue que de 0.4 unité ; alors qu'en présence de lactulose ou du substrat référentiel, le glucose, cette chute du pH est de 2 unités.

Concernant le cas de la souche expérimentale *Lb rhamnosus* LBRE-LSAS, l'activité acidifiante est irrégulière pour certains substrats comme les pectines et le son entier de blé pour lesquels le pH baisse d'abord, remonte légèrement ensuite pour rechuter de nouveau (fig. 17B).

Pour ce qui est de la cinétique d'acidification de *Lb plantarum* Lbp-CECT748, l'essentiel de l'activité de synthèse d'acides organiques se passe pendant les 3 premières heures de fermentation pour le son entier de blé ou d'avoine et la pectine ; alors que pour la chicorée, c'est au bout de la 6<sup>ème</sup> heure qu'est notée la plus forte diminution de pH (fig.17C). Comme pour toutes les autres souches testées dans cette expérience, *Lb plantarum* Lbp-CECT748 ne montre pas d'activité intense de synthèse d'acides organiques qui soit étalée pendant tout le processus fermentaire en présence des substrats prébiotiques utilisés, excepté le cas du lactulose sur lequel le comportement de ces bactéries se rapprochent de celui sur glucose.



**Figure 17:** Cinétique d'acidification de *Lactobacillus acidophilus* (LbA-CECT 4529) (A), *Lactobacillus rhamnosus* (LBRE-LSAS) (B) et de *Lactobacillus plantarum* (Lbp-CECT748) (C) monocultivées en présence d'un sucre monomère référentiel, le glucose ou de différents substrats glucidiques prébiotiques dimères ou polymères : lactulose, pectine, chicorée, son entier de blé ou-d'avoine utilisés à un taux de 2% (P/V) dans le milieu MRS inoculé à 1% (V/V), soit une charge initiale de  $1.10^7$  cellules/mL. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM.

L'activité de synthèse d'acides organiques par la souche *Bifidobacterium bifidum* Bb443 ne fait pas exception quant à l'allure de la cinétique d'acidification dont l'essentiel

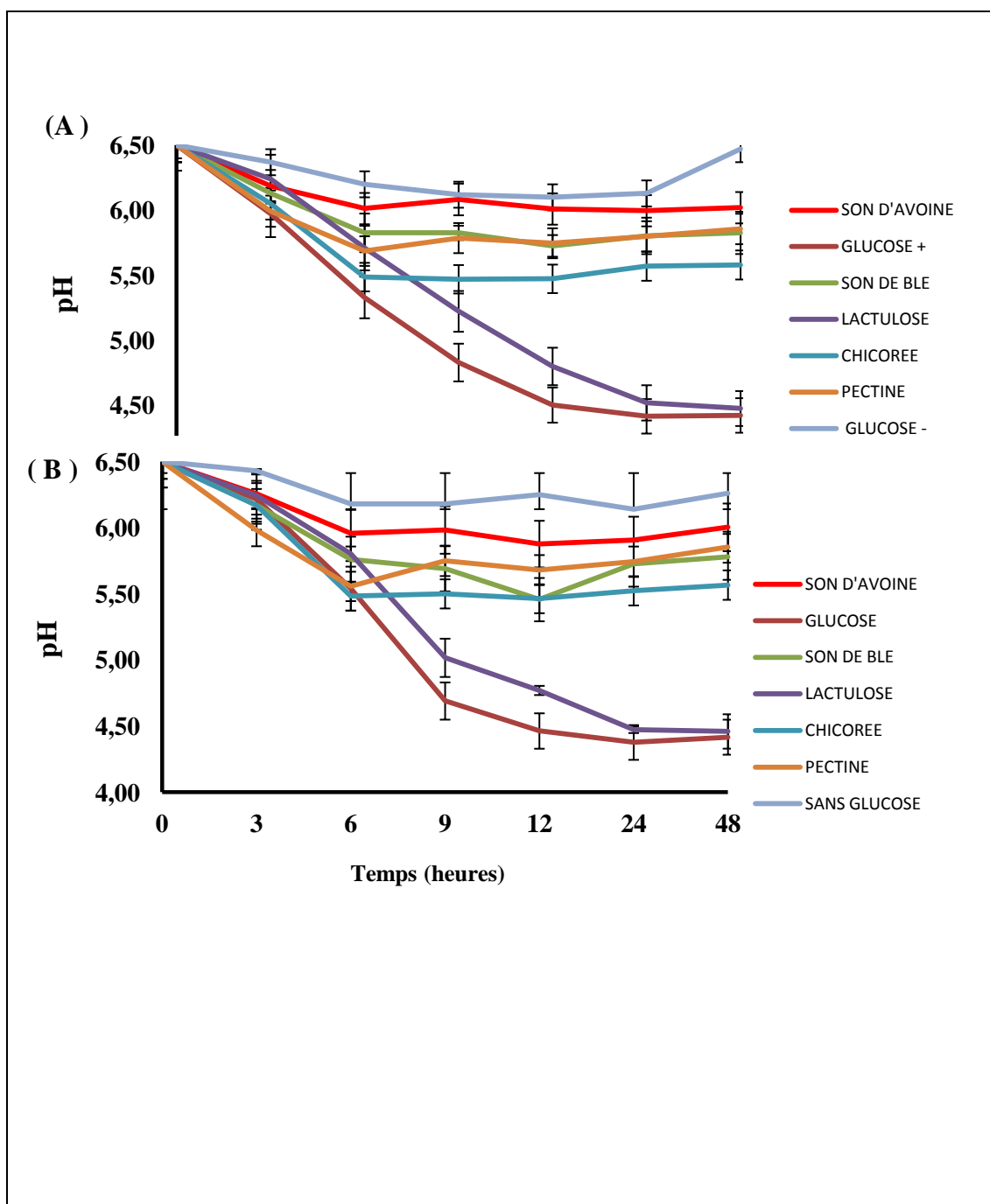
s'effectue durant les 6 premières heures de fermentation avec une intensité variable selon le substrat dans un ordre décroissant pour la chicorée, la pectine, le son de blé et le son d'avoine.

Au-delà de ces 6 heures, *B. bifidum* B443 ne synthétise plus d'acides et le pH du milieu reste presque invariable pour les substrats cités sauf une légère inflexion, mais insignifiante, de la courbe pour le son entier de blé. La régularité métabolique de cette souche bifide vis-à-vis du lactulose ressemble à celle observée pour les mêmes substrats avec les autres souches étudiées, car le pH diminue au cours des 24 premières heures de fermentation (fig.18A).

La cinétique d'acidification des milieux de culture contenant les différents substrats prébiotiques par la souche probiotique *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 est similaire à celle de *B. bifidum* Bb443 dans la mesure où la chute du pH se fait dans les 6 premières heures de fermentation sur chicorée, pectine et son entier d'avoine ; alors que celle sur son entier de blé se poursuit jusqu'à 12h (fig.18B). En dehors de ces durées de fermentation, la Bb12 n'acidifie plus les milieux contenant ces substrats. L'exception du lactulose à ce comportement confirme la règle de sa bonne assimilation par toutes les souches testées.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par les plusieurs chercheurs, en présence des substrats prébiotiques complexes, le pH du milieu de fermentation ne régresse généralement que d'une unité pH ((Manisseri & Gudipati, 2010 ; Madhukumar & Muralikrishna, 2010). En effet, le milieu fermenté par la souche *Bifidobacterium adolescentis* NDRI en présence d'oligosaccharides, présente un pH de 5.09 en fin de fermentation (Madhukumar & Muralikrishna, 2010).

La dégradation de deux molécules de glucose par la voie bifide Shunt aboutit à la formation par les souches bifides de deux molécules d'acide lactique et trois molécules d'acide acétique (Tamime et al., 1995). Les lactobacilles produisent 2 moles d'acide lactique à partir d'une mole de glucose dégradée.



**Figure 18:** Cinétique d'acidification de *Bifidobacterium bifidum* Bb 443 (A) et de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (B) monocultivées en présence d'un sucre monomère référentiel, le glucose ou de différents substrats glucidiques prébiotiques dimères ou polymères : lactulose, pectine, chicorée, son entier de blé ou son d'avoine utilisés à un taux de 2% (P/V) dans le milieu MRS inoculé à 1% (V/V), soit une charge initiale de  $1 \cdot 10^7$  cellules/mL. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM.

La production d'acides organiques permet la consommation de l'ammoniaque, substance cancérigène, comme source d'azote pour la croissance microbienne (Steward *et al.*, 1993).

La diminution du pH du milieu est en étroite relation avec la production d'acides gras volatils (acétate, butyrate, propionate) par les souches probiotiques (Manisseri & Gudipati, 2010).

L'indisponibilité des substrats simples fermentescibles favorise la protéolyse qui libère les acides aminés dans le milieu, induisant une augmentation de l'acidité (Macfaron *et al.*, 1992).

#### **IV.1.2.2. Production d'acides organiques au cours de la fermentation**

Les fermentations sont contrôlées par la mesure de l'assimilation des sources de carbone, l'accumulation des acides gras à chaîne courte (acétate, propionate et butyrate) et la production de lactate dans le milieu de culture. Ce sont les indices clés des fermentations car ils reflètent le comportement métabolique des microorganismes impliqués vis-à-vis d'un environnement biotique et abiotique donné (Gullon *et al.*, 2014).

L'acide lactique a été quantifié après 24 et 48h de fermentation (fig.19) ; tandis que les acides gras à chaîne courte l'ont été après 48h (tableau 6).

On peut noter, une accumulation continue d'acide lactique dans les milieux de fermentation inoculés par les souches lactiques du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* après 24 et 48h de fermentation.

Cette concentration en lactate varie selon la source de carbone présente dans le milieu de culture. C'est sur substrat référentiel monomère et non prébiotique (i.e. le glucose) fermenté par *Lb. plantarum* Lbp-CECT748 que la production d'acide lactique a été la plus élevée dans le milieu (soit 1.9 mg/mL après 48h), suivie par celle sur lactulose (soit 1.7 mg/mL après 48h de culture). Il est à noter que le lactulose génère presque autant de lactate que le glucose chez toutes les souches testées (fig.19).

Mis à part les pectines et, dans une moindre mesure, le son entier d'avoine, tous les autres substrats prébiotiques arrivent à générer de l'acide lactique à des niveaux représentant 20 à 70% ceux enregistrés pour le glucose selon la souche lactique considérée (fig.19).

Les trois lactobacilles (*Lb. plantarum* Lbp-CECT748, *Lb. acidophilus* LbA-CECT 4529 et *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS) produisent presque la même quantité d'acide lactique d'une moyenne de 1,76 mg/ml après 48h ( $P=0.05$ ).

En ce qui concerne les souches bifides, *B. bifidum* Bb 443 produit 25% d'acide lactique de plus que *B. animalis* subsp *lactis* après 24h de fermentation.

Par ailleurs, la production de lactate sur chicorée et son entier de blé s'est révélée médiocre à moyenne par rapport à celle sur glucose, car elle en représente, respectivement, 38 et 48%.

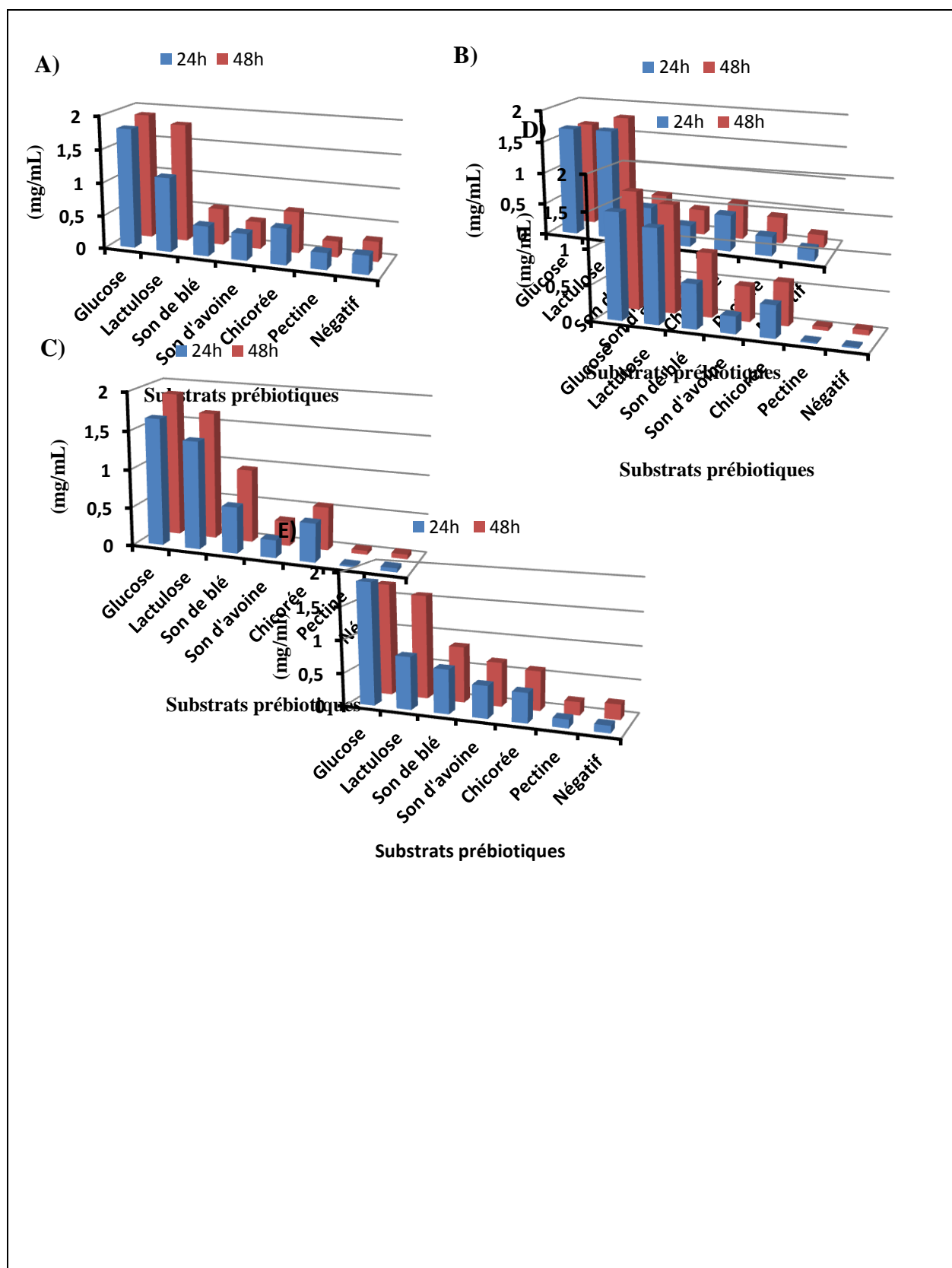
On enregistre également une production très faible d'acide lactique, en présence des autres substrats prébiotiques utilisés (son entier d'avoine et pectine) (Fig.19)

Comme on pouvait s'y attendre, l'accumulation des acides gras volatils à chaîne courte (AGCC) était beaucoup plus élevée dans les cultures conduites en présence des glucides monomères ou dimères (glucose et lactulose) que dans celles contenant des substrats complexes plus polymérisés (Chicorée, son de blé) (Tableau 6).

Dans ce travail, il n'y a aucune synthèse d'AGCC par les souches bactériennes en présence de son entier d'avoine et de pectines ; ce qui corrobore avec l'absence de leur croissance sur de tels substrats prébiotiques.

[Hartemink et al. \(1999\)](#) avaient attribué la production bactérienne d'AGCC en présence de prébiotiques polymérisés à la dégradation des protéines.

Les résultats de dosage des acides organiques produits par les fermentations en présence de substrats non polymérisés (monomère comme le glucose), peu polymérisés (dimère comme le lactulose) ou hautement polymérisés (comme la pectine, les sons entier de céréales ou la chicorée) montre que le profil de leurs concentrations correspond à celui des courbes d'acidification des milieux de culture fermentés dans ces mêmes conditions.



**Figure 19 :** Effet des différents substrats prébiotiques sur la production d'acide lactique (mg/mL) après 24 et 48h de fermentation par *Lb. Plantarum* (A), *Lb. acidophilus* (B), *Lb. rhamnosus* (C), *B. animalis subsp. lactis* (D), *B. bifidum* (E). Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM.

L'acide acétique était le principal acide gras volatil à courte chaîne (AGCC) dans toutes les expériences, atteignant les concentrations les plus élevées dans les milieux contenant le lactulose (tableau 6).

Il faut noter que les souches bifides produisent plus d'acide acétique que les autres souches lactiques. Les mêmes observations ont, également, été rapportés par [Moura et al. \(2008\)](#), qui ont évalué le potentiel acétogène de divers types de xylooligosaccharides (XOS) dans des milieux inoculés avec une microflore intestinale porcine.

Par ailleurs, dans une expérience *in vitro*, [Connolly et al. \(2010\)](#) ont observé que l'acide acétique, produit par des fermentations de matières fécales en présence de glucomannanes en tant que source de carbone, était l'AGCC dominant.

Dans les expériences de fermentation des différents substrats prébiotiques par les souches bifides, *Bifidobacterium lactis* Bb12 et *Bifidobacterium bifidum* Bb443, les concentrations totales en AGCC après 48h étaient plus élevées pour les échantillons contenant le prébiotique lactulose, et statistiquement différentes pour les échantillons contenant du glucose, son de blé ou de la chicorée (Tableau 6).

Il n'y a pas de différences significatives dans les faibles quantités d'AGCC synthétisées par les cinq souches (à l'exception de *Lb. acidophilus* LbA-CECT 4529) lorsqu'elles sont cultivées sur des milieux additionnés de son entier de blé ou de chicorée. L'acide acétique étant le seul acide organique synthétisé par l'ensemble des souches testées sur glucose, son entier de blé et chicorée.

Selon [Hu et al. \(2013\)](#) et [Vardakou et al. \(2007\)](#), les acides gras volatils à chaîne courte (Acétate, propionate et butyrate) sont produits par les souches lactiques en quantités plus importantes *in vivo* ou dans des conditions *in vivo* simulées en présence de prébiotiques.

L'acide propionique est synthétisé à de faibles quantités par *B. lactis* Bb12 (0.25 mg/mL) et *B. bifidum* Bb 443 (0,12 mg/mL) seulement. *B. lactis* Bb12 est la seule souche capable de synthétiser l'acide butyrique dans le milieu contenant le lactulose.

**Tableau 6** : Concentration (mg/mL) en acides gras volatils à chaîne courte (AGCC) des milieux de culture fermentés pendant 48h par les différentes souches bénéfiques en présence des différents substrats prébiotiques. (A : acétate ; P : propionate ; B : butyrate).

Source de carbone Souches bactérienne	Glucose			Lactulose			Chicorée			Son de blé		
	A	P	B	A	P	B	A	P	B	A	P	B
<i>Lb. acidophilus</i> (LbA-CECT 4529)	0.31 ± 0.02	/	/	0.5 ± 0.05	/	/	0.13 ± 0.01	/	/	0.23 ± 0.03	/	/
<i>Lb. rhamnosus</i> LBRE-LSAS	0.63 ± 0.13	/	/	0.86 ± 0.01	/	/	0.18 ± 0.02	/	/	0.12 ± 0.05	/	/
<i>Lb. plantarum</i> Lbp-CECT748	0.33 ± 0.03	/	/	0.30 ± 0.01	/	/	0.05 ± 0.03	/	/	0.07 ± 0.02	/	/
<i>B. animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb12	0.91 ± 0.34	/	/	1.01± 0.29	0.25 ± 0.01	0.05 ± 0.005	0.24 ± 0.1	/	/	0.35 ± 0.15	/	/
<i>B. bifidum</i> Bb 443	0.82 ± 0.22	/	/	0.97 ± 0.34	0.12 ± 0.02	/	0.17 ± 0.04	/	/	0.23± 0.09	/	/

Dans les conditions physiologiques normales, 95 à 99% des 300 à 400 mM/L d'AGCC produits quotidiennement sont rapidement absorbés, alors qu'une faible proportion est excrétée dans les selles (Cummings *et al.*, 1991).

Englyst *et al.* (1993) avaient aussi rapporté cette prédominance de l'acide acétique comme produit de fermentation lactique ou bifide-shunt en présence de substrats prébiotiques.

Dans une autre expérience, Pompei *et al.* (2008), avaient rapporté la prédominance des deux acides, acétique et lactique, dans des fermentations impliquant des souches lactiques incluant les bifidobactéries en présence d'inuline et Fructooligosaccharides (FOS).

L'acidification du milieu de fermentation et la proportion d'acides gras à chaîne courte libérés dépendent de la nature des oligosaccharides (Berggren *et al.*, 1993; Delzenne, 2003). Ainsi, les concentrations les plus élevées en propionate sont associées à la présence de xylooligosaccharides dans le milieu (Broekaert *et al.*, 2011).

Dans certains cas, les glucides polymérisés sont trop rapidement fermentés (amidon, oligosaccharides) ; ce qui aboutit à une accumulation d'acide lactique dans le côlon. Chez l'adulte, la production d'acide lactique s'effectue à pH acide ( $\approx 5$ ) dans le cas de malabsorption de certains glucides et elle peut provoquer l'apparition de diarrhée car l'absorption de l'acide lactique est moins efficace que celle des AGCC (Papillon *et al.*, 1999).

Environ 1 g de glucides fermenté dans le côlon fournit 0,6 g d'AGCC. Ces composés sont très efficacement absorbés dans le côlon, et les AGCC retrouvés dans les fèces ne représentent qu'une fraction minime de la production totale au cours de la digestion colique (Papillon *et al.*, 1999).

L'acétate est très largement métabolisé dans le foie et les muscles ; alors que le propionate est un substrat pour la néoglucogenèse hépatique et est capable d'inhiber la synthèse hépatique du cholestérol. Le butyrate est presque totalement métabolisé après son absorption dans les colonocytes et représente le principal substrat énergétique des cellules de l'épithélium colique (Mai & Morris, 2004).

Les AGCC semblent moduler la sécrétion de mucus dans le colon, permettant le maintien d'un pH constant au voisinage des cellules épithéliales (Scheppach, 1994).

### **IV.1. 3. Activité du score prébiotique**

Selon les scores d'activité- prébiotique de cinq substrats ont été calculés en fonction de la biomasse générée par les cinq souches bénéfiques et par la souche pathogène *Escherichia*

*coli* ATCC 25922, avec utilisation du glucose comme substrat monomère référentiel de croissance (tableau 7).

Il apparait que le score d'activité prébiotique le plus élevé exercé sur l'ensemble des souches est celui observé en présence du son entier de blé. Ce substrat affiche des scores de l'ordre de 0.68 pour les souches *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS et *B. animalis* subsp *lactis* Bb12, de 0.51 pour *B. bifidum* Bb 443, 0.50 pour *Lb. plantarum* LbP-CECT 748 et de 0.44 pour *Lb. acidophilus* LbA-CECT 4529.

Dans le cas de *Lb. acidophilus*, le score d'activité prébiotique le plus faible a été celui exercé par les pectines (0.12) qui représente 27% de celui du son entier de blé (0.44) qui est le plus élevé. L'effet prébiotique du lactulose sur cette souche (0.42) talonne celui du son entier de blé (fig.20), et ceci malgré la plus forte croissance affichée par cette souche en présence de lactulose qui représente plus de 1.43 fois celle sur son de blé (tableau 7).

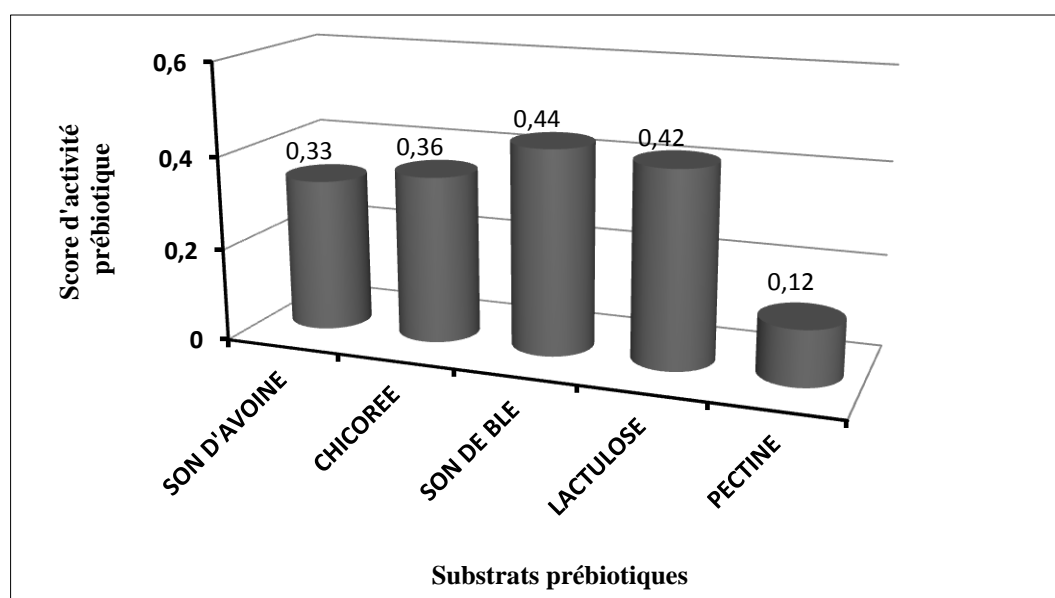
Le score d'activité prébiotique le plus faible du lactulose (0.28) a été enregistré avec la souche *Lb. plantarum* LbP-CECT 748, avec laquelle la chicorée et les pectines n'expriment aucun effet, sinon un effet prébiotique négatif (-0.03 et -0.02, respectivement) sur son développement (fig.21). Ici aussi, le son entier de blé exerce le meilleur score d'activité prébiotique (0.50), suivi du son entier d'avoine (0.45) et du lactulose (0.28) ; alors que la plus forte biomasse de 24h générée par cette souche a été celle en présence de ce dernier substrat (3.32 logUFC/mL) (tableau 7).

Dans le cas de la souche *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS, le son entier de blé demeure le substrat dont le score d'activité prébiotique est le plus élevé (0.68 avec une biomasse de 24h de l'ordre de 3.99 logUFC/mL), suivi par le lactulose (0.47 avec une biomasse de 24h égale à 4.29 logUFC/mL) (fig. 22, tableau 7).

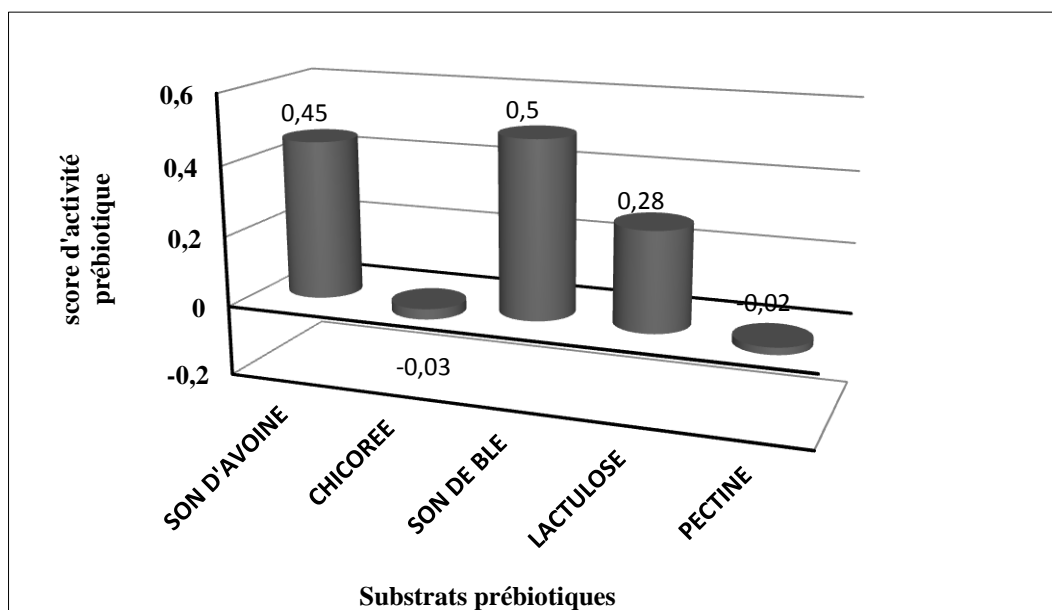
**Tableau 7** : Biomasse (log UFC/mL) générée après 24 h de fermentation en présence de différentes sources de carbone. Les valeurs représentent la moyenne de trois déterminations  $\pm$  écart type (n=3).

	Glucose	Lactulose	Chicorée	Son entier de blé	Son entier d'avoine	Pectines
<i>Lb. acidophilus</i> LbA-CECT 4529	4, 28 $\pm$	4, 02 $\pm$	3, 02 $\pm$	2, 80 $\pm$	2.31 $\pm$	1, 23 $\pm$

	0,16	0,26	0,25	0,22	0,12	0,15
<i>Lb. plantarum</i> LbP-CECT 748	4,04 ± 0,01	3,32 ± 0,04	1,26 ± 0,43	2,98 ± 0,03	2,69 ± 0,35	0,59 ± 0,23
<i>Lb. rhamnosus</i> LBRE-LSAS	4,35 ± 0,21	4,29 ± 0,13	1,98 ± 0,01	3,99 ± 0,08	2,08 ± 0,01	0,6 ± 0,03
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb12	4,32 ± 0,32	4,05 ± 0,26	1,95 ± 0,02	3,96 ± 0,12	2,17 ± 0,33	0,4 ± 0,01
<i>B. bifidum</i> Bb 443	3,79 ± 0,11	3,02 ± 0,23	2,38 ± 0,18	2,86 ± 0,01	1,69 ± 0,02	0,31 ± 0,18
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4,01 ± 0,31	2,09 ± 0,34	1,35 ± 0,32	0,98 ± 0,15	0,84 ± 0,2	0,7 ± 0,02



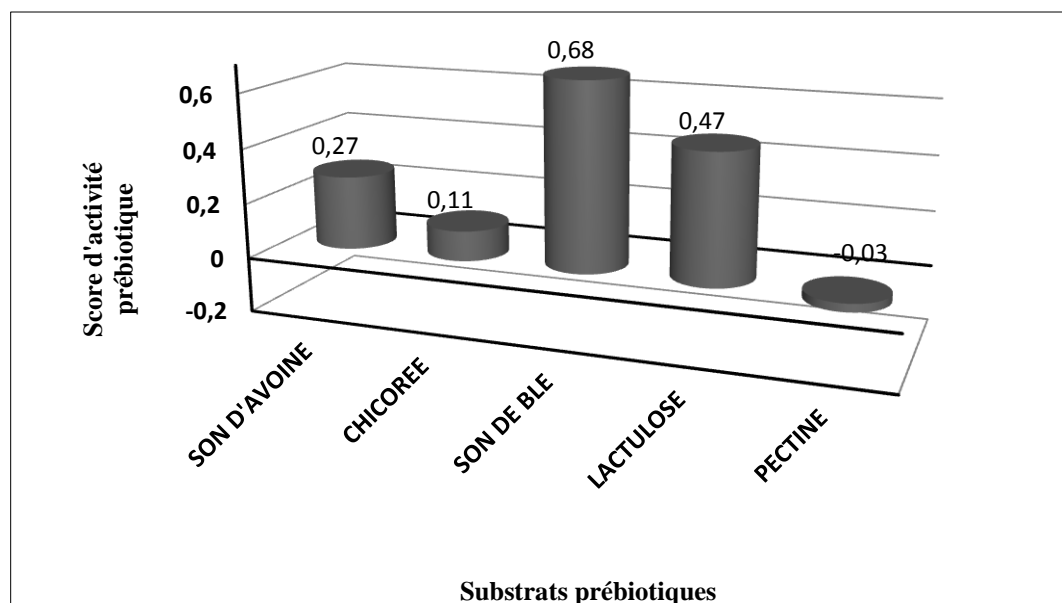
**Figure 20:** Scores d'activité prébiotique de cinq substrats (lactulose, son entier de blé, son entier d'avoine, chicorée et pectines) enregistrés après 24h de culture de la souche bénéfique *Lactobacillus acidophilus* LbA-CECT 4529. Les valeurs représentent la moyenne de trois déterminations  $\pm$  SEM (n=3).



**Figure 21:** Scores

d'activité prébiotique de cinq substrats (lactulose, son entier de blé, son entier d'avoine, chicorée et pectines) enregistrés après 24h de culture de la souche bénéfique *Lactobacillus plantarum* LbP-CECT 748. Les valeurs représentent la moyenne de trois déterminations  $\pm$ SEM (n=3).

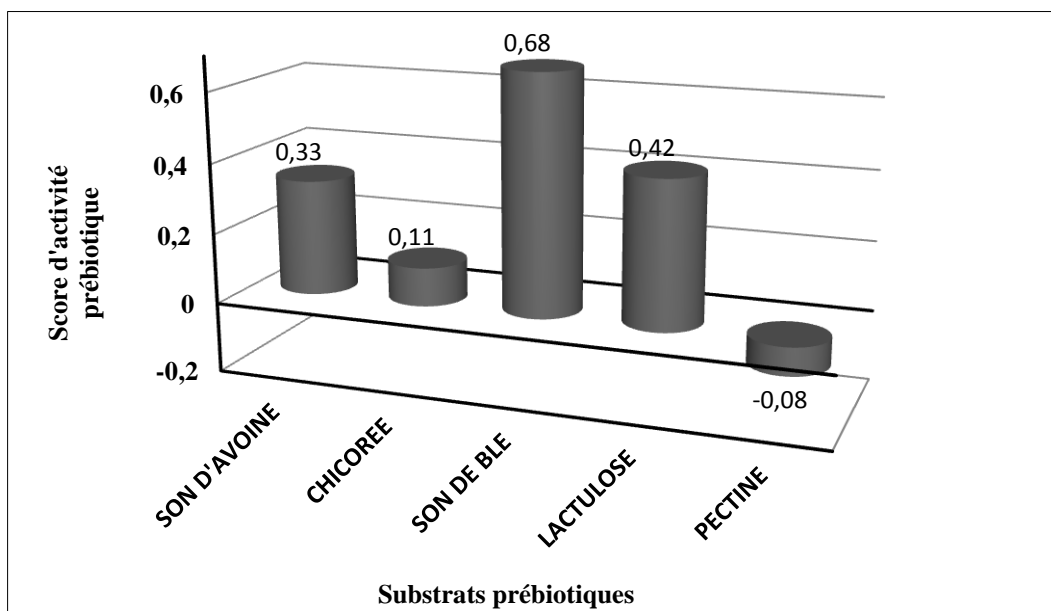
Les substrats son entier d'avoine et chicorée affichent des scores d'activité prébiotique de 0.27 (pour une biomasse de 24h de 2.08 logUFC/mL) et de 0.11 (biomasse de 24h = 1.98 logUFC/mL), respectivement ; alors que les pectines n'exercent aucun effet prébiotique, pour ne pas dire inhibent même (score d'activité prébiotique négatif égal à - 0.03 pour une biomasse de 24h égale à 0.60 logUFC/mL) *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (fig. 22, tableau 7).



**Figure 22** : Score d'activité prébiotique de cinq substrats (lactulose, son entier de blé, son entier d'avoine, chicorée et pectines) enregistrés après 24h de culture de la souche bénéfique *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS. Les valeurs représentent la moyenne de trois déterminations  $\pm$ SEM (n=3).

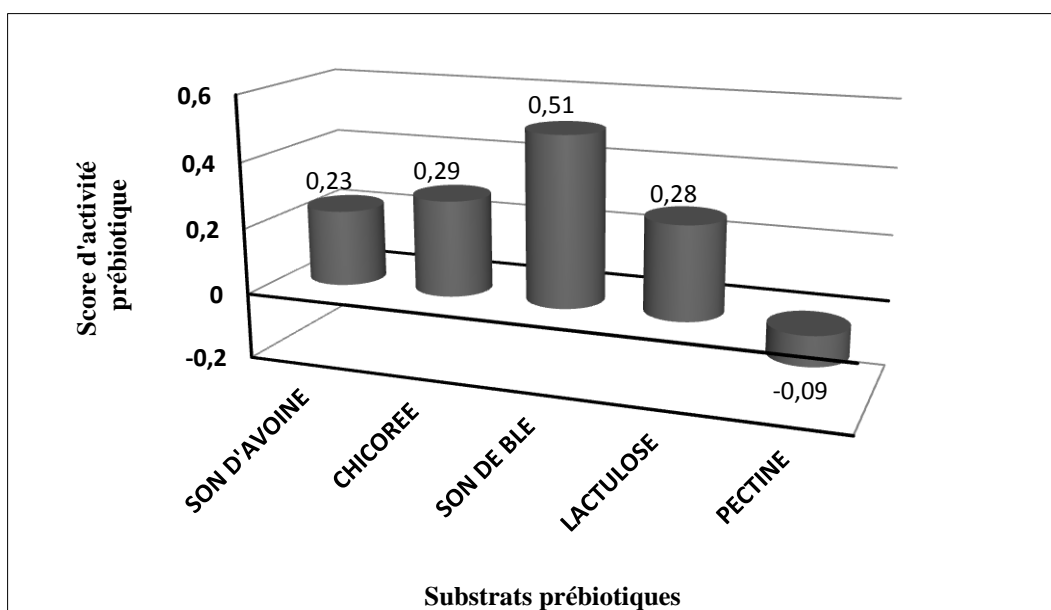
Le score de l'activité prébiotique du son entier de blé reste encore le plus élevé de tous les autres substrats en ce qui concerne *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (0.68 avec une biomasse de 24h de 3.99 logUFC/mL ; ce qui est presque pareil à ce qui a été enregistré chez la souche *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS) et *Bifidobacterium bifidum* Bb443 (0.51 avec une biomasse de 24h de 2.86 logUFC/mL) (fig.23 et 24, tableau 7).

Le lactulose fait toujours figure d'exception à la règle qui voudrait l'existence d'une proportionnalité directe entre la biomasse générée par une souche donnée et le score de l'activité prébiotique du substrat qu'elle a consommé.



**Figure**

**23** : Score d'activité prébiotique de cinq substrats (lactulose, son entier de blé, son entier d'avoine, chicorée et pectines) enregistrés après 24h de culture de la souche bénéfique *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12. Les valeurs représentent la moyenne de trois déterminations  $\pm$ SEM (n=3).



**Figure 24** : Scores d'activité prébiotique de cinq substrats (lactulose, son entier de blé, son entier d'avoine, chicorée et pectines) enregistrés après 24h de culture de la souche bénéfique *Bifidobacterium bifidum* Bb 443. Les valeurs représentent la moyenne de trois déterminations  $\pm$ SEM (n=3).

En effet, le score d'activité prébiotique du lactulose est plus faible (0.42 pour une biomasse *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 de 24h de 4.05 logUFC/mL et 0.28 pour une biomasse de 24h *B. bifidum* Bb443) que celui du son entier de blé malgré la plus forte biomasse enregistré chez ce dernier (fig. 23 et 24, tableau 7).

La réaction des souches bifides au son entier d'avoine s'exprime par des scores prébiotiques de ce substrat qui représentent un peu plus de 50% (0.33 pour *B. animalis* subsp. *lactis* et 0.23 pour *B. bifidum* Bb443) de ceux observés avec le substrat son entier de blé (fig. 23 et 24).

Le score de l'activité prébiotique de la chicorée est faible vis-à-vis de la souche bifide probiotique de référence, la Bb12, (0.11 pour une biomasse de 1.95 logUFC/mL) ; et il est moyen, mais presque identique, (0.29) à celui enregistré avec le lactulose pour la deuxième souche bifide Bb443 (0.28 pour une biomasse de 3.02 logUFC/mL) (fig. 23 et 24, tableau 7).

Les pectines n'exercent aucun effet prébiotique sur les deux souches bifides *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 et *B. bifidum* Bb443 car leurs scores d'activité prébiotique se sont révélés négatifs (fig. 19 et 20). La croissance de ces souches n'est pas assurée en présence des pectines comme seule source de carbone étant donné la faible biomasse accumulée après 24h de culture (0.01 et 0.31 log UFC/mL pour bifides *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 et *B. bifidum* Bb443, respectivement).

La différence du potentiel de l'activité prébiotique des différents substrats prébiotiques testés vis-à-vis des différentes souches bénéfiques est remarquable et atteste d'une grande variabilité inter-souches de l'activité métabolique qui a, d'ailleurs, été signalée par [Huebner et al. \(2007\)](#).

Le calcul du score de l'activité prébiotique d'un substrat donné est basé sur la différence entre le rapport de la croissance de 24h de la bactérie bénéfique en présence du prébiotique et du glucose comme source de carbone, respectivement, et de celle de 24h de l'agent pathogène en présence du même substrat et du glucose comme source de carbone, respectivement.

Plus le score est élevé, plus la croissance relative de la bactérie bénéfique ou probiotique et / ou la plus faible par rapport à la croissance de l'agent pathogène, ce qui indique une utilisation sélective des prébiotiques par rapport au glucose par le micro-

organisme probiotique et / ou une utilisation limitée des prébiotiques par rapport au glucose par le microorganisme pathogène (Rubel et al., 2014).

Selon Palfarman et al. (2003), les scores d'activité prébiotique des substrats prébiotiques sont, en général, plus élevés quand il s'agit de cultures mixtes impliquant plusieurs microorganismes dans les fermentations que dans le cas de monocultures.

L'activité prébiotique du son de blé s'exprime par la promotion sélective des souches bénéfiques et les souches qui leurs sont compétitives et incapables d'utiliser ces substances prébiotiques. Ces scores fournissent des données de base pour l'incorporation des symbiotiques dans les produits laitiers et d'autres aliments (Chow, 2002 ; Fooks & Gibson, 2002). Cependant, il faut signaler deux facteurs importants:

Le premier, a trait à la flore commensale du tube digestif dont certaines souches comme *E-coli* peuvent être capables d'utiliser les sucres prébiotiques (Hartemink et al., 1997). Effectivement, malgré la définition des prébiotiques comme étant des substrats fermentés par un nombre limité de bactéries dans le côlon, il s'est avéré récemment que les *Bactéroides* et d'autres genres du microbiote intestinal ont la capacité de métaboliser les différents substrats (Vander Meulen et al., 2006).

Le deuxième facteur, tient compte du fait que l'effet prébiotique n'est pas lié exclusivement à l'hydrolyse du substrat par les souches bactériennes, mais aussi à l'utilisation de métabolites obtenus par un groupe restreint de microorganismes (Huebner et al., 2007).

#### **IV.1.4. Fermentescibilité *in vitro* des extraits de fibres de son de céréales.**

Autrefois réservé aux équidés, les sons de blé et d'avoine sont aujourd'hui réputés pour leurs nombreuses vertus, notamment dans le domaine de la diététique pour lutter contre la surcharge pondérale. Le son de céréales renferme des fibres solubles et insolubles.

Les fibres insolubles sont représentées par la cellulose, lignine et certaines hémicelluloses ; alors que les fibres solubles regroupent certaines autres hémicelluloses, glucanes, pectines, gommés et fibres d'algues. Selon leur nature soluble ou insoluble, elles pourront exercer des effets physiologiques et métaboliques différents ayant un impact positif sur la santé de l'être humain (Esposito et al., 2005).

Ces derniers temps, l'apport en fibres alimentaires de la ration quotidienne des populations, en l'occurrence urbaines, tend à diminuer. La baisse de consommation du pain entier et l'intensification du raffinage des farines en sont les principaux responsables. L'augmentation de la consommation des fruits et légumes n'a pas permis la compensation d'une telle diminution, à cause de leur teneur limitée en fibres.

Les sons de blé et d'avoine peuvent être des sources importantes de fibres, puisqu'ils contiennent respectivement 35 et 22g de fibres totales/ 100g de matière fraîche et sont utilisés comme source de prébiotiques (Grootaert *et al.*, 2007; Martensson *et al.*, 2005).

Afin de choisir le meilleur substrat prébiotique, les fibres solubles et insolubles ont été extraites de son de blé et de son d'avoine et utilisées séparément à 2% (P/V) comme seule source de carbone dans les milieux de cultures qui ont été inoculés à 1% (V/V) en monoculture (soit  $1.10^7$  UFC/ mL) par les cinq différentes souches retenues dans ce protocole.

#### **IV.1.4.1. Fermentescibilité *in vitro* des fibres de son de blé**

##### **IV.1.4.1.1. Cinétique de croissance des souches sur fibres de son de blé**

Les résultats de la cinétique de croissance obtenus en présence des fibres insolubles ou solubles extraites de son de blé sont illustrés par la figure 25.

L'allure des courbes de croissance des cinq souches cultivées en présence de fibres insolubles de son de blé est régulière et met en évidence des différences notables en matière d'assimilation des fibres insolubles (fig. 25A).

En effet, les souches *Lb. acidophilus* LbA CECT 4529 et *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS effectuent l'essentiel de leur croissance au cours des quatre premières heures de la fermentation au cours desquelles leur biomasse est respectivement multipliée par un facteur de 2.66 et 2.53.

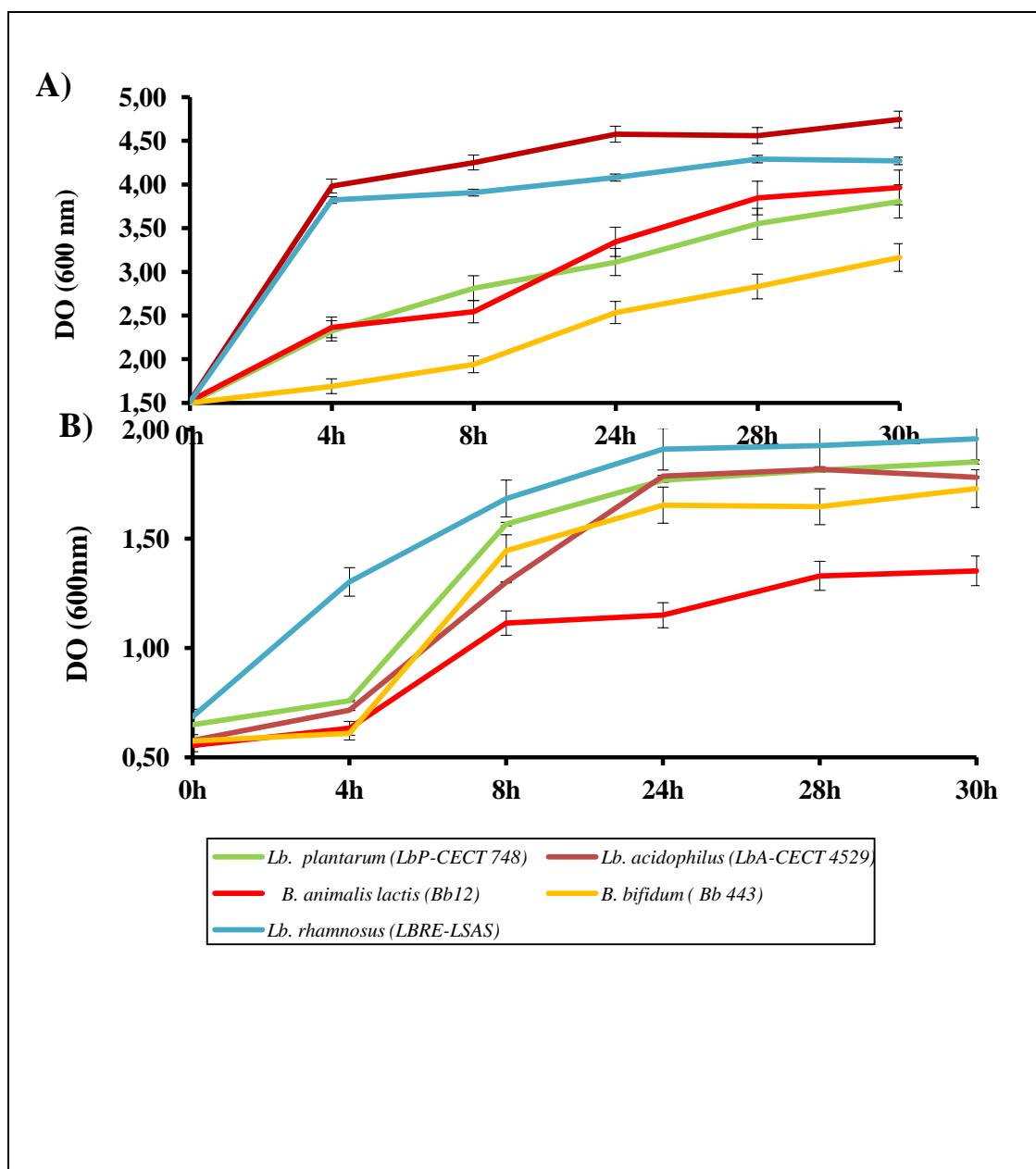
La souche *Lb. acidophilus* LbA CECT 4529 poursuit sa croissance sur fibres insolubles de son de blé d'une manière moins fulgurante après ces 4 premières heures de fermentation, puisque sa biomasse passe d'un équivalent de densité optique de 4 à 4.74 seulement entre la 4<sup>ème</sup> et la 30<sup>ème</sup> heure de culture (fig.25A).

Il est à noter que ce lactobacille a été totalement incapable de croître sur milieu contenant le son entier de blé comme seule source de carbone (se référer à la fig. 12).

Le deuxième lactobacille, *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS, affiche une courbe de croissance sur fibres insolubles de son de blé (riches en hémicellulose insoluble pouvant libérer des molécules de xylose et d'arabinose) de même allure que celle de *Lb. acidophilus*, mais en accumulant légèrement moins de biomasse après 4h (équivalent en densité optique proche de 3.85) ou 30h (équivalent en densité optique égal à 4.49) (fig.25A). Cette souche avait relativement mieux dégradé le son entier de blé par rapport à *Lb. acidophilus* (se référer à la fig. 13).

Quant au troisième lactobacille de la collection espagnole, *Lb. plantarum* LbP-CECT 748, il se développe moins intensément, mais régulièrement, sur fibres insolubles de son de blé en accumulant une biomasse équivalente à une DO de 3.80 après 30h de fermentation (fig.25A). Sa biomasse initiale a été multipliée par un facteur de 2.53 en 30h de fermentation ; alors qu'en présence de son entier de blé, cette souche ne montre aucune croissance (se référer à la fig. 16).

La souche bifide au statut probiotique, *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12, affiche une croissance sur fibres insolubles de son de blé (biomasse de 30h de fermentation équivalente à une DO de 3.96) moins performante que celle de *Lb. acidophilus* LbA CECT 4529 et de *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS, mais supérieure à celle de *Lb. plantarum* LbP-CECT 748 (fig.25A). Cette souche n'avait pas montré une courbe de croissance régulière sur les 48h de fermentation du son entier de blé, car elle avait réalisé l'essentiel de sa croissance au cours des 9 premières heures du processus (se référer à la fig. 14).



**Figure 25 :** Cinétique de croissance (densité optique à 600 nm) des cinq différentes souches bénéfiques monocultivées pendant 30h en présence d'extraits de fibres insolubles (A) et solubles (B) de son de blé et inoculées à 1% (V/V), soit une charge initiale de  $1.10^7$  cellules/mL. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM.

La souche bifide expérimentale, *B. bifidum* Bb 443, s'est révélé la moins performante par rapport aux 4 autres testées sur le plan de la croissance en présence de fibres insolubles de son de blé en accumulant une biomasse équivalente à une DO à 600nm de 3.16 au bout de

30h de fermentation. Sa biomasse initiale a été multipliée par un facteur égal à 2 au cours de ces 30h de fermentation (fig.25A) ; alors que sur son entier de blé, aucune croissance n'avait été notée (se référer à la fig.15).

Lorsque les fibres solubles de son de blé sont présentes comme seule source de carbone dans les milieux de fermentation, la biomasse initiale des différentes souches bactériennes étudiées se trouve multipliée par un facteur de 2.45, 2.72, 2.78, 3.06 et de 3.09, respectivement pour *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12, *Lb. plantarum* LbP CECT 748, *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS, *Lb. acidophilus* LbA CECT4529 et *B. bifidum* Bb443 (fig. 25B).

Ainsi, en termes de performance, ce sont les souches *B. bifidum* Bb443 et *L. acidophilus* LbA CECT4529 qui ont réalisé le plus de croissance sur fibres solubles de son de blé, même si leur courbe se situe en dessous de celles de *L. rhamnosus* LBRE-LSAS et de *L. plantarum* LbP CECT 748 ; et ceci en raison des différences dans la biomasse initiale engagée dans la fermentation au départ (fig. 25B).

La comparaison des résultats de croissance des cinq souches testées sur les deux types de fibres (insolubles et solubles) de son de blé révèle qu'elles métabolisent mieux les fibres insolubles car elles génèrent plus de biomasse en les utilisant comme seule source de carbone.

Par ailleurs, ces souches se développent mieux sur les fibres de son de blé que sur son entier de blé. Ceci laisse penser que le son entier de blé renferme des substances qui ne favorisent pas la métabolisation des fibres.

La digestion bactérienne débute par l'hydrolyse des polysaccharides en hexoses et pentoses grâce à des enzymes bactériennes extracellulaires ou localisées sur les parois bactériennes. Les proportions de ces monomères hexoses et pentoses dépendent de la nature de la fibre hydrolysée, ainsi que de celle de la flore bactérienne.

L'équipement enzymatique des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* est variable car, selon les souches, il peut comporter des pectinases, glucuronidases, arabinofuranosidase, xylanases, xylosidases, amylases, glycosidases et des fructo-oligosaccharidases (Vardakou et al., 2007).

Il est, généralement, admis que la digestibilité bactérienne colique des fibres hydrosolubles est élevée; sauf si elles sont riches en lignine ou associées à une cellulose de degré de cristallinité élevé. Ainsi, une cellulose très cristalline ou un substrat riche en lignine comme le son de blé seront peu digestibles chez l'homme (Gullon *et al.*, 2014).

Par ailleurs, la digestibilité du son de blé augmente si celui-ci est broyé ou cuit. Les pectines ou les hémicelluloses seront en grande partie digérées dans le côlon humain. Le son de blé est beaucoup plus riche en fibres insolubles (32.5g/100 matière fraîche) qu'en fibres solubles (2.5 g/100 matière fraîche). Les fibres insolubles de son de blé sont pauvres en rhamnose (0.44g/100g), galactose (0.84g/100g) et glucose (19.6g/100g) ; ils sont, par contre, riches en arabinose et xylose (Manisseri & Gudipati., 2010).

Concernant la composition centésimale de la fraction soluble du son de blé (en g/100g de son frais), elle a été établie comme suit : arabinose (41.8) xylose (48.6), rhamnose (0.72), mannose (0.44), galactose (5.6) et glucose (2.9) (Dervilly *et al.*, 2002).

Une grande partie des arabinoxylanes (AX) de son de blé est signalée comme insoluble (Maes & Delcour, 2002). Les travaux de Vardakou *et al.* (2007), rapportent que le son de blé qui contient une concentration élevée d'arabinoxylanes stimule sélectivement la croissance des souches bifides et des lactobacilles.

La supplémentation alimentaire avec des prébiotiques peut aboutir à la stimulation de la croissance des bactéries bénéfiques telles que les lactobacilles et les bifidobactéries dans le tractus gastro-intestinal humain (Quigley, 2010).

Vardakou *et al.* (2008) avaient rapporté que l'ajout des fractions insolubles d'arabinoxylanes de blé (WU-AX) aux cultures discontinues d'un échantillon de fèces de volontaire humain induit des augmentations de synthèse bactérienne de deux enzymes, les xylanases et les estérases.

Les endoxylanases hydrolysent activement les arabinoxylanes de son de blé en xylooligosaccharides et féruloyloligosaccharides, qui sont reconnus comme substrats prébiotiques stimulant sélectivement la croissance des lactobacilles et des bifidobactéries (Madhukumar & Muralikrishna, 2010; Yuan *et al.*, 2005).

En plus de leur effet prébiotique, les xylooligosaccharides sont recommandés pour prévenir différentes maladies telles que le diabète, l'athérosclérose et le cancer du côlon (Swennen *et al.*, 2006).

Les effets stimulants induits par les arabinoxylooligosaccharides solubles (AXOS) du son de blé sur la population des bifidobactéries sont du même ordre que ceux obtenus avec les fructooligosaccharides (FOS) qui sont reconnus comme prébiotiques de référence (Gullon *et al.*, 2014).

Récemment, Cloetens (2009) a confirmé les effets bifidogènes des AXOS sur le microbiote de l'homme lorsqu'il est administré à une dose de 2,2 à 10 g / jour.

Des propriétés prébiotiques ont été rapportés pour les arabinoxylanes obtenues par des méthodes enzymatiques ou chimiques (Broekaert *et al.*, 2011). Une telle observation favoriserait l'utilisation du son de blé comme source d'arabinoxylanes (Rose & Inglett, 2010).

En outre, l'effet bifidogène des xylo-oligosaccharides a été confirmé par une augmentation de la biomasse sèche après 48 h de fermentation par rapport au témoin (Manisseri & Gudipati, 2010). Ces mêmes auteurs ont, également, observé que la souche *Lactobacillus plantarum* était capable d'utiliser efficacement les xylo-oligosaccharides libérés à partir de son de blé.

Les enzymes hydrolytiques produites par les microorganismes aident à la dégradation des xylo-oligosaccharides libérés à partir de fractions insolubles de son de blé qui résistent à la digestion par les enzymes gastro-intestinales. Ces fractions stimulent significativement les cultures de 24h de bifidobactéries et de lactobacilles, qui ont exprimé

une activité de  $\beta$ -D-xylanase,  $\beta$ -D-xylosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase et de  $\alpha/\beta$ -galactosidase (Madhukumar & Muralikishna, 2010).

Selon Su *et al.* (2007) les  $\beta$ -glucanes du son de blé stimulent mieux la croissance des lactobacilles que celle des bifidobactéries.

#### **IV.1.4.1.2. Cinétique d'acidification des milieux à fibres de son de blé par les souches bénéfiques.**

L'acidité des milieux de fermentation a été déterminée par la mesure du pH comme paramètre du pouvoir fermentaire des bactéries cultivées en présence de fibres insolubles ou solubles de son de blé comme unique source de carbone. L'analyse qualitative et quantitative des acides gras ayant généré cette acidité a, également, été déterminée par chromatographie en phase gazeuse.

La cinétique d'acidification de 30h de fermentation des milieux de culture contenant les fibres insolubles de son de blé par les différentes souches bactériennes montre que c'est *Lb. acidophilus* LbA-CECT 4549 qui acidifie le plus son milieu car elle fait chuter le pH de 2 unités ; suivie de *Lb. plantarum* LbP-CECT 748, *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS et de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 qui ont réduit le pH d'une unité (fig.26A).

La cinquième souche testée, *B. bifidum* Bb443, a manifesté une activité de synthèse d'acides organiques moins importante puisqu'une diminution de 0.52 unité pH seulement a été enregistrée en 30h de fermentation (fig. 26A). Il est à noter l'absence de phase de latence chez toutes les souches dans ce processus de synthèse d'acides organiques.

De telles activités de synthèse d'acides organiques à partir des fibres insolubles n'avaient pas été observées sur substrat son entier de blé, et cela laisse présager que l'utilisation de ce dernier pour remplir un rôle prébiotique serait probablement à exclure.

Par ailleurs, en présence des fibres solubles de son de blé, c'est plutôt la souche *Lb. rhamnosus* (LBRE-LSAS) qui a manifesté la meilleure activité acidifiante du milieu, par rapport autres souches testées ( $P < 0.05$ ), en diminuant le pH de 1.52 unité en 30h de fermentation (fig. 26B).

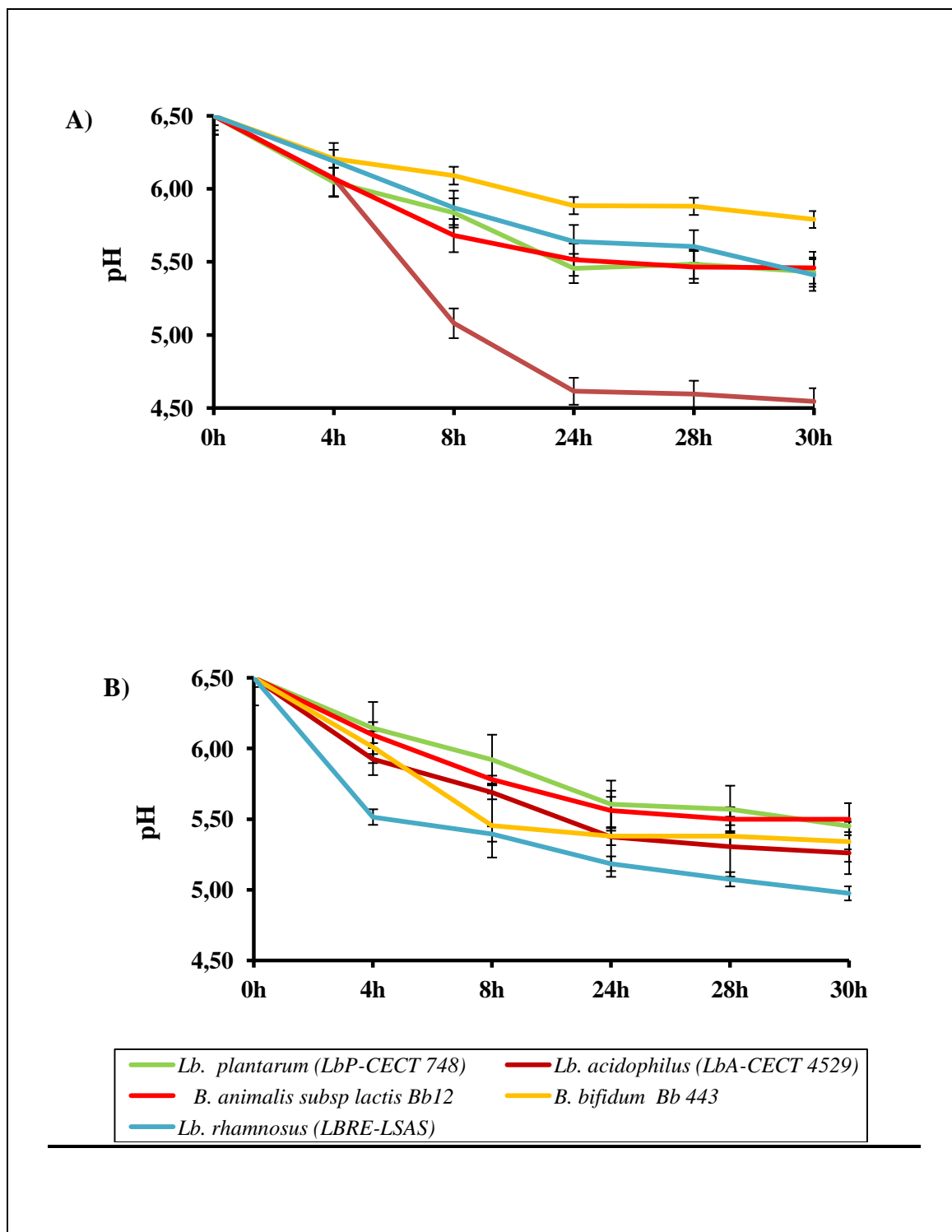
L'activité acidifiante de la souche *Lb. acidophilus* LbA-CECT 4529 sur fibres solubles de son de blé est modeste par rapport à celle notée sur fibres insolubles. En effet, la diminution de pH qu'elle induit sur fibres insolubles représente 1.6 fois celle induite sur fibres solubles (fig.26B).

La souche *B. bifidum* Bb443 a, également, assez bien acidifié le milieu contenant les fibres solubles de son de blé, où une diminution de 1.25 unité pH a été enregistrée (fig.26B) ; alors que sur fibres insolubles, cette diminution n'a été que de 0.52 unité pH (se référer à la fig. 26A). Cette souche assimile, donc, mieux les fibres solubles de son de blé.

L'activité de synthèse d'acides organiques par la souche *B. animalis* subsp *lactis* Bb12 cultivée sur fibres solubles de son de blé est identique à celle notée en présence de fibres insolubles où la chute du pH du milieu était d'une unité en 30h de fermentation (fig. 26 A et B).

La souche *Lb. plantarum* LbP-CECT 748 métabolise quasiment au même degré les fibres solubles et les fibres insolubles de son de blé, puisque la diminution du pH enregistrée au bout de 24h de fermentation (car au-delà de 24h, le pH reste stable jusqu'à la 30<sup>ème</sup> heure de fermentation) dans les deux cas de substrat tourne autour d'une unité (fig. 26 A et B).

Il apparaît, également, que si certaines souches comme *Lb. plantarum* LbP-CECT748, *B. animalis* subsp *lactis* Bb12 et *Lb. acidophilus* LbA-CECT 4529 ont une activité moins acidifiante en présence de fibres solubles qu'en présence de fibres insolubles ; d'autres, en revanche, comme *Lb. rhamnosus*, sont plus acidifiantes sur fibres solubles, ou ont une activité identique comme c'est le cas de la souche bifide *B. bifidum* Bb443 (fig.26 A et B).



**Figures 26:** Cinétique d'acidification des milieux de culture contenant les fibres **insolubles (A)** ou **solubles (B)** de son de blé fermentés séparément par *L. plantarum* LbP-CECT748, *L. acidophilus* LbA-CECT4529, *L. rhamnosus* LBRE-LSAS, *B. animalis subsp. lactis* Bb12 ou *B. bifidum* Bb443 inoculées à 1% (V/V). Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM.

La diminution du pH peut être assimilée à l'expression de l'effet prébiotique des oligosaccharides incorporés dans le bouillon de culture (Berggren *et al.*, 1993). Les produits de fermentation et la proportion des acides gras à chaîne courte libérés dépendent de la nature des oligosaccharides métabolisés (Berggren *et al.*, 1993; Delzenne, 2003).

Les résultats de dosage par CPG des acides organiques produits au cours de la fermentation des fibres insolubles et solubles de son de blé sont illustrés par la figure 27.

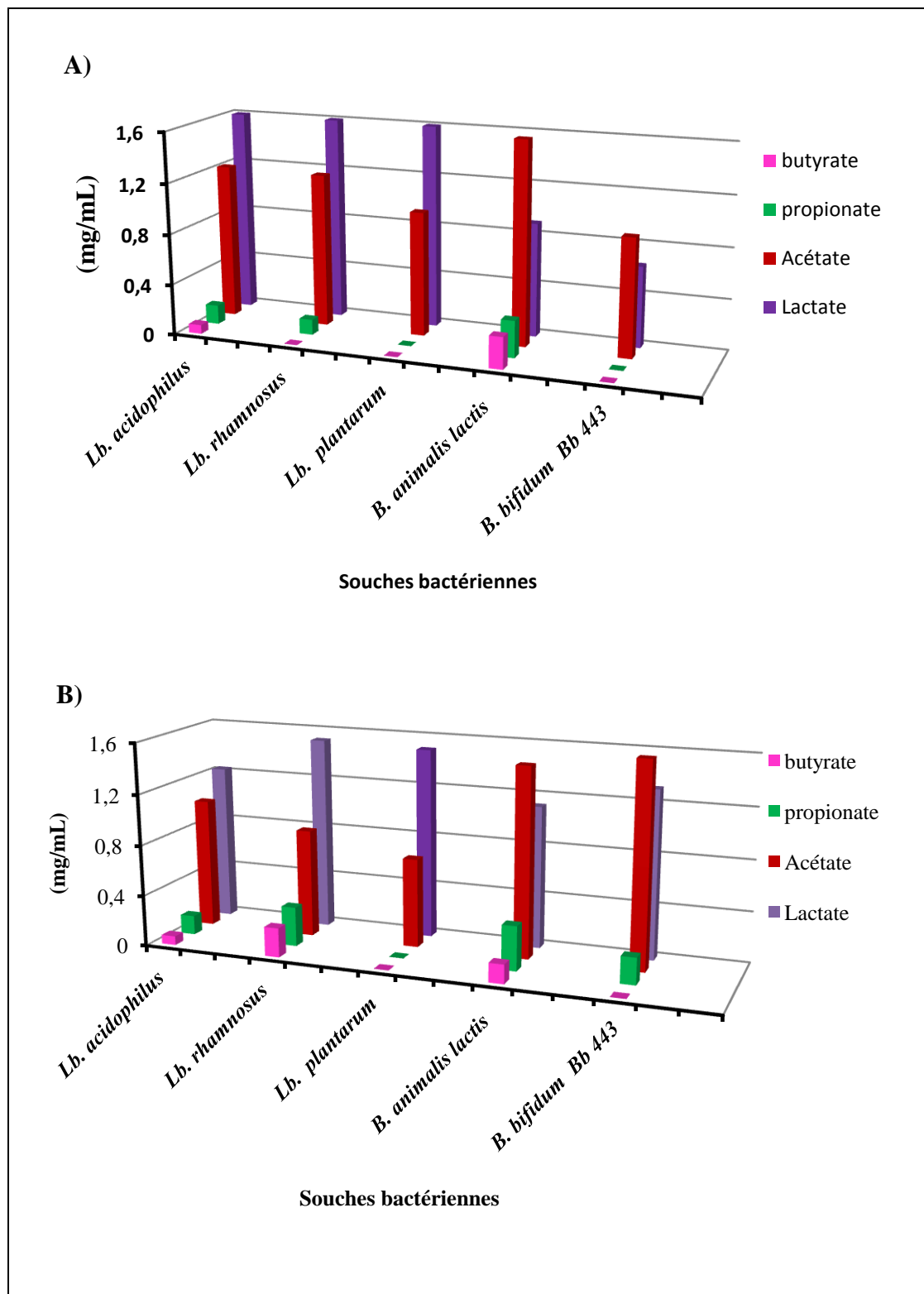
Il apparaît qu'en présence de fibres insolubles de son de blé, l'acide lactique est l'acide organique majeur produit en quantités identiques (environ 1.6 mg/mL) par les trois lactobacilles, *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS, *Lb. acidophilus* LbA-CECT 4529 et *Lb. plantarum* LbP-CECT 748 ; les souches bifides, *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 et *B. bifidum* Bb443, en produisent 2 à 2.2 fois moins (fig.27 A).

L'acide lactique reste toujours majoritairement produit par les trois lactobacilles en présence de fibres solubles de son de blé, mais à des quantités légèrement moindres (entre 1.2 et 1.4 mg/mL) (fig.27 B).

Ces lactobacilles produisent aussi de l'acide acétique en quantités appréciables légèrement supérieures en présence des fibres insolubles que des fibres solubles de son de blé (fig.27 A et B).

Chez les souches bifides, *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 et *B. bifidum* Bb443, c'est l'acide acétique qui représente l'acide organique majeur produit quelque soit le type de fibres de son de blé, insolubles (1.5 et 0.8 5mg/mL pour la Bb12 et la Bb443, respectivement) ou solubles (1.4 et 1.5 mg/mL la Bb12 et la Bb443, respectivement) (fig. 27 A et B).

Les souches bifides produisent, également, de l'acide lactique en présence de fibres de son de blé, mais en moindre quantité (0.85 et 0.65 mg/mL sur fibres insolubles et, 1.1 et 1.3 mg/mL sur fibres solubles par les souches Bb12 et Bb443, respectivement).



**Figure 27:** Teneurs en acides organiques produits par les cinq différentes souches bénéfiques cultivées séparément en présence de fibres insolubles (A) ou solubles (B) de son de blé. Les milieux de culture ont été inoculés à 1% (V/V) par chacune des souches. Les valeurs représentent la moyenne de 2 déterminations  $\pm$  SEM.

Les autres acides organiques comme les acides butyrique et propionique, restent des produits mineurs de ces fermentations en présence de fibres insolubles ou solubles de son de blé (fig.27 A et B).

Néanmoins, l'ensemble des souches étudiées à l'exception de la souche lactique *Lb. plantarum* produisent de l'acide propionique avec des concentrations différentes variables de 0.15 à 0.35 mg/mL. La souche *B.animalis* subsp. *lactis* (Bb12) synthétise la quantité de propionate la plus élevée en présence des fibres solubles ou insolubles de son de blé (fig. 27 A et B).

Il existe, selon la disponibilité en fibres, des profils fermentaires caractéristiques aboutissant à des fermentations plutôt riches en acide propionique ou en acide butyrique (sachant que l'acide acétique est en général le principal produit de fermentation des bifidobactéries et l'acide lactique celui des lactobacilles). La production d'AGCC correspond à une fermentation symbiotique bien tolérée (Papillon et al.,1999).

En ce qui concerne, l'acide butyrique, il est produit par trois souches seulement (*Lb. acidophilus* LbA-CECT 4529, *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS et *B. animalis* subsp *lactis* Bb12 lorsque le milieu est à base de fibres solubles. La meilleure production de ce métabolite est représentée par la souche *Lb. rhamnosus*. Par contre, cette même souche ne produit pas d'acide butyrique en présence de fibres insolubles de son de blé.

Grootaert et al. (2007), rapportent que les souches du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* fermentent les glucides par les mêmes enzymes que celles de la glycolyse dans laquelle les principaux produits finaux sont des acides gras à chaîne courte (AGCC).

La fermentation des prébiotiques par les bactéries du côlon est dominante par la production de lactate et d'AGCC, tels que l'acétate, le propionate et le butyrate (Al-Sheraji et al., 2013; Sarbinic et al., 2013). La production bactérienne d'AGCC dans les intestins abaisse le pH, augmente la biodisponibilité du calcium et du magnésium, et inhibe la croissance des bactéries potentiellement nuisibles. Parmi les AGCC, le butyrate est particulièrement important, car il fournit l'énergie pour les colonocytes, stimule les cellules

épithéliales du côlon (augmentation de leur capacité d'absorption), et inhibe la croissance des cellules de carcinome du côlon *in vitro* et *in vivo* (Van Craeyveld et al., 2008).

Les bifidobactéries de la flore humaine produisent des acides organiques dans des proportions différentes dans les milieux de culture inoculés en présence des oligosaccharides comme source de carbone. La concentration totale des acides produits varie selon chaque oligosaccharide métabolisé (Karppinen et al., 2000).

Madukhumar & Muralikrishna (2010) avaient montré que sur milieu contenant des xylooligosaccharides extraits de son de blé, la souche *Bifidobacterium adolescentis* NDRI 236 produisait majoritairement de l'acide acétique (98%) et des traces d'acides propinique et butyrique (1.3 et 0.9%, respectivement). Par contre, cette même souche est incapable de produire du propionate ni de l'acétate en présence des xylooligosaccharides extraits de pois chiche.

Dans le même contexte, la fermentation *in vitro* de l'inuline par les bactéries du côlon humain produit du lactate et de l'acétate (López-Molina et al., 2005). Par conséquent, le métabolisme bactérien de ces substrats entraîne une diminution marquée du pH dans le milieu de culture.

Des augmentations modérées des concentrations de butyrate ont été observées dans les milieux contenant les AXOS, les FOS ou l'inuline, fermentés par les bactéries du côlon. La fermentation des deux substrats FOS et inuline génère des concentrations de butyrate supérieures à celles obtenues avec les AXOS (Campbell et al., 1997; Rivas et al., 2012).

Selon Papillon et al. (1999), le son de blé augmente la production *in vivo* des acides organiques, et particulièrement l'acide butyrique.

Les AGCC—semblent moduler la sécrétion de mucus dans le côlon, permettant le maintien d'un pH constant au voisinage des cellules épithéliales. Ce microclimat pourrait jouer un rôle important dans l'absorption des AGCC sous forme protonée. Les AGCC réduisent également la prolifération et/ou l'adhésion à la muqueuse colique de certains germes pathogènes, comme *Clostridium difficile* (Papillon et al., 1999).

Si les AGCC sont produits en quantité suffisante pour acidifier le contenu colique, ils peuvent favoriser la croissance des bactéries endogènes, en particulier des bactéries acido-résistantes, elles-mêmes responsables de la production d'AGCC, participant donc à l'équilibre de la microflore bactérienne colique (Papillon *et al.*, 1999).

#### **IV.1.4.2. Fermentescibilité *in vitro* des fibres de son d'avoine**

##### **IV.1.4.2.1. Cinétique de croissance des souches sur fibres de son d'avoine**

Il nous a été donné de constater que toutes les souches bénéfiques retenues dans cette étude ont eut une croissance très faible à nulle sur son entier d'avoine (se référer aux figures 12 à 16) ; et c'est pourquoi nous explorons dans ce qui suit la fermentescibilité *in vitro* de ses extraits de fibres insolubles et solubles.

L'allure des courbes de croissance de toutes les souches cultivées sur des milieux à base de fibres insolubles ou solubles de son d'avoine n'est pas typiquement celle d'un développement exponentiel de microorganismes se trouvant dans un environnement nutritionnel favorable à cela. En effet, toutes les souches ont affiché une faible croissance sur fibres de son d'avoine (fig. 28 A et B).

Par ailleurs, la comparaison des résultats de croissance enregistrés en présence de chaque type de fibres de son d'avoine, montre que c'est sur fibres insolubles qu'il y a eu, relativement, le plus de biomasse accumulée.

Dans les milieux de cultures à base de fibres insolubles de son d'avoine, c'est la souche bifide *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 qui s'est le mieux développée, suivie par *Lb. plantarum* LbP-CECT 748 qui a affiché une allure de croissance atypique, puis de *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS, *B. bifidum* Bb443 et enfin de *Lb. acidophilus* LbA-CECT 4529 avec une biomasse générée équivalente à une différence de DO de l'ordre de 0.7, 0.6, 0.52, 0.45 et de 0.42 unité, respectivement.

Nous n'avons pas obtenu de meilleurs résultats de croissance en présence de fibres solubles de son d'avoine non plus (fig.28 B). Effectivement, les seules souches qui ont affiché un développement de biomasse équivalent à une différence de DO de l'ordre de

0.33 et 0.35 unité (donc très faible) sont *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS et *Lb. plantarum* LbP-CECT 748. Cette observation est à considérer avec réserve étant donné l'allure atypique de la courbe de croissance de ces deux seules souches sur fibres solubles (fig. 28 B).

En ce qui concerne le développement des trois autres souches testées sur fibres solubles de son d'avoine, il n'y a pas de performances de croissance qui méritent d'être soulignées, car la densité optique des milieux n'a pas significativement changé en 30h de fermentation.

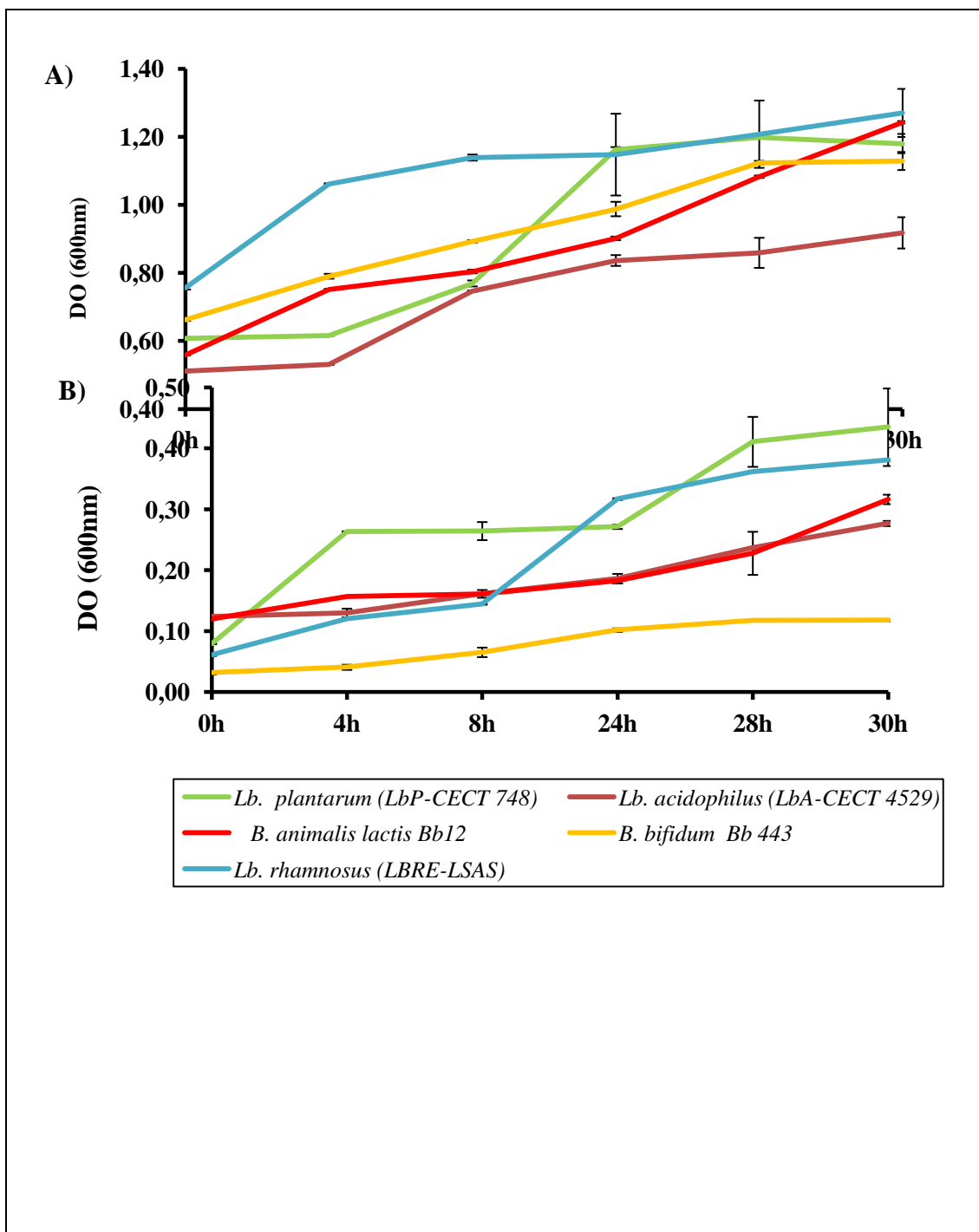
D'après les maigres résultats de croissance des souches testées sur substrat son entier d'avoine ou sur les fibres insolubles ou solubles qui en sont extraites, il semblerait que le son d'avoine ne représente pas un substrat qui pourrait faire office de « prébiotique ».

D'après Huebner et al. (2007), l'aptitude des deux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* à dégrader les glucides prébiotiques, est en étroite relation avec la nature des souches et des substrats spécifiques.

Nos résultats sont en contradiction avec ceux rapportés par Gokavi et al. (2005) à propos de la souche *Lactobacillus plantarum* qui affiche une croissance importante en présence de son d'avoine.

Ils le sont, également, avec ceux publiés par Kedia et al. (2008) qui avaient observé une forte croissance de souches du genre *Lactobacillus* en présence de fractions digestes et indigestes (sans préciser lesquelles) extraites du son d'avoine.

Cette différence dans la réponse des souches de lactobacilles à la présence dans leur milieu de culture de son entier d'avoine ou de ses extraits de fibres comme seule source de carbone pourrait être liée principalement à des facteurs intrinsèques de la souche et secondairement aux conditions précises des cultures réalisées (degré de solubilité du substrat, concentration du substrat, concentration et phase de développement de l'inoculum, etc.).



**Figure 28:** Cinétique de croissance (densité optique à 600 nm) des cinq différentes souches bénéfiques monocultivées pendant 30h en présence d'extraits de fibres insolubles (A) et solubles (B) de son d'avoine et inoculées à 1% (V/V), soit une charge initiale de  $1.10^7$  cellules/mL. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM.

#### IV.1.4.2.2. Cinétique d'acidification des milieux à fibres de son d'avoine par les souches bénéfiques.

Selon [Morisse et al. \(1993\)](#), les enzymes hydrolytiques produites par les micro-organismes aident à la digestion des oligosaccharides non-digestibles, qui échappent à la digestion dans le tractus gastro-intestinal supérieur et produisent des acides gras à courtes chaînes qui induisent la réduction du pH du milieu de culture. La diminution du pH dans l'intestin crée un environnement acide, ce qui réduit le nombre de micro-organismes pathogènes et favorise la prolifération des microorganismes bénéfiques.

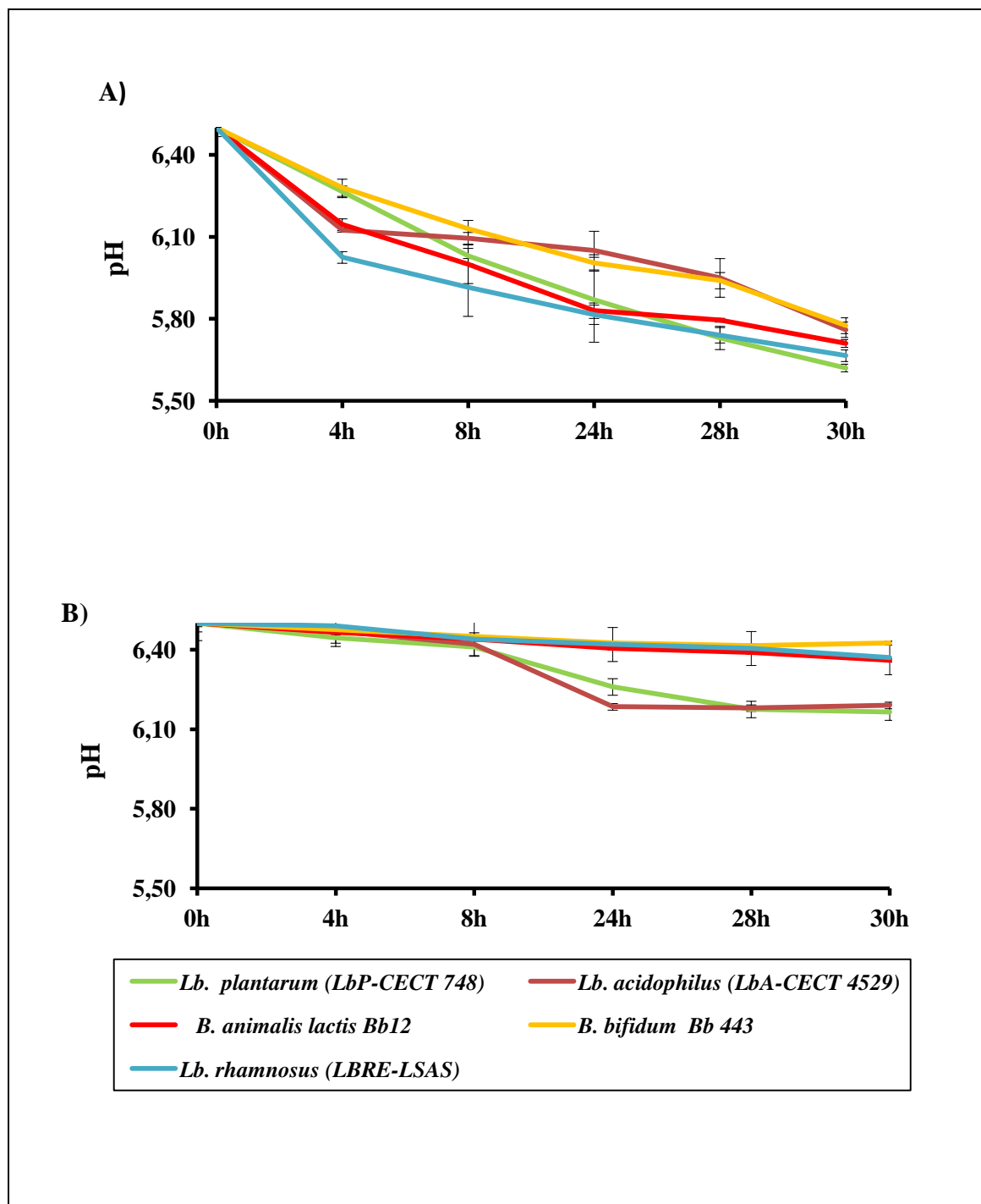
L'activité de synthèse d'acides organiques par les cinq différentes souches bénéfiques en présence de fibres insolubles ou solubles de son d'avoine est à la mesure de leurs performances de croissance sur ces substrats et auxquelles, elle corrobore assez bien (fig.29 A et B).

En effet, comme il fallait s'y attendre, les diminutions de pH enregistrées sur milieu à fibres insolubles de son d'avoine ne sont pas du tout importantes car elles sont inférieures à 1 unité pH. Elles varient d'un minimum de 0.71 chez *B. bifidum* Bb443 à un maximum de 0.85 chez *Lb. plantarum* Lbp-CECT 748 (fig. 29 A).

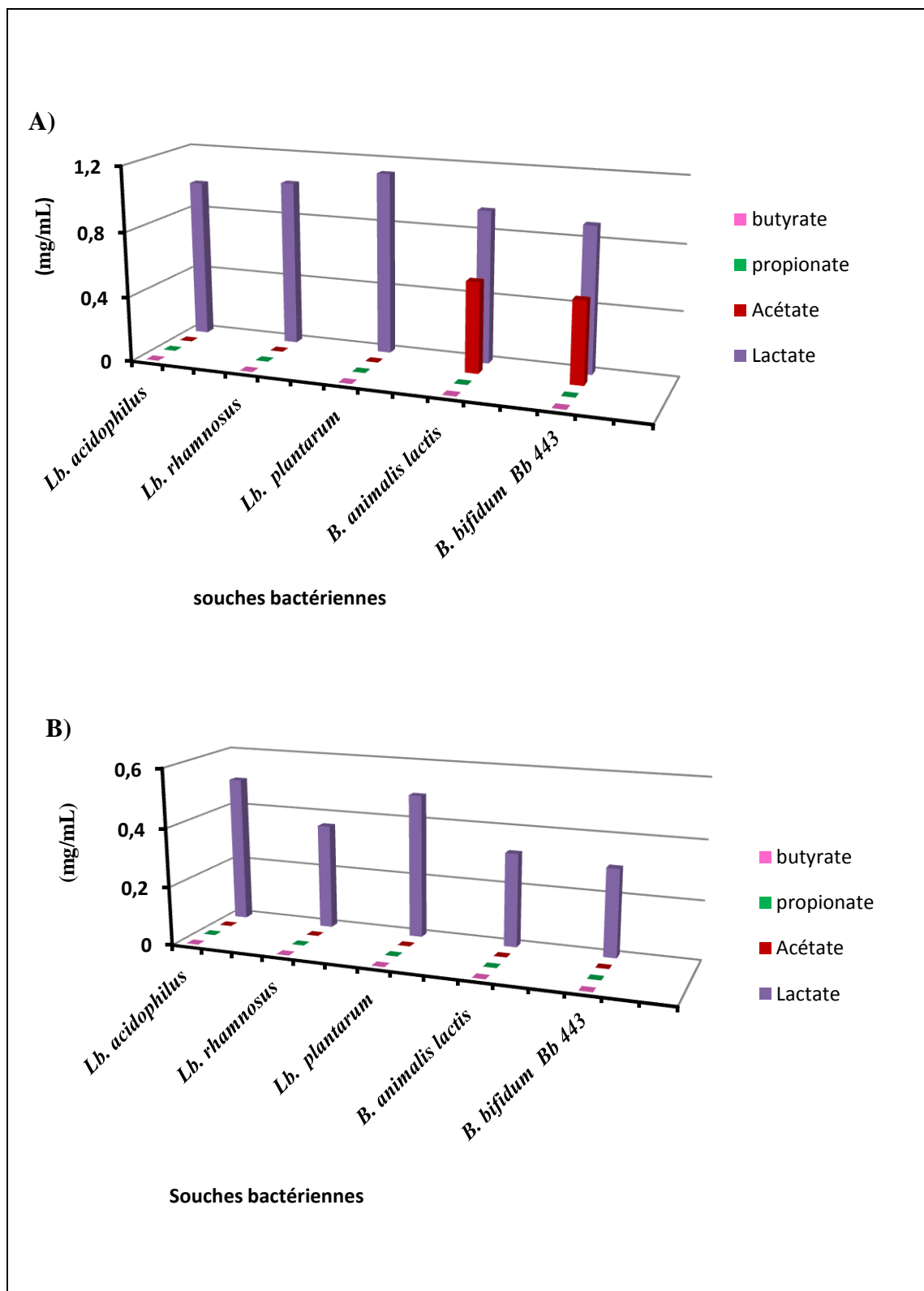
L'acidité des milieux à fibres solubles de son d'avoine n'a pas été meilleure également car les diminutions de pH sont insignifiantes dans le cas des cinq souches bénéfiques testées ; aucune n'est capable de métaboliser ce type de fibres (fig. 29 B).

L'analyse qualitative et quantitative des acides organiques par chromatographie gazeuse a montré que l'acide lactique reste l'unique métabolite acide produit par les lactobacilles en présence de fibres insolubles de son d'avoine ; alors que les deux souches bifides synthétisent à la fois de l'acide lactique comme acide majoritaire, et l'acide acétique en quantité moindre (fig. 30A).

Les résultats obtenus en présence de fibres solubles de son d'avoine sont comparables à ceux sur fibres insolubles, sauf que dans ce cas, les souches bifides ne synthétisent pas d'acide acétique comme auparavant (fig. 30B). Il est à noter l'absence de synthèse des autres acides comme le butyrate et le propionate.



**Figure 29 :** Cinétique d'acidification des milieux de culture contenant les fibres **insolubles (A)** ou **solubles (B)** de son d'avoine fermentés séparément par *L. plantarum* LbP-CECT748, *L. acidophilus* LbA-CECT4529, *L. rhamnosus* LBRE-LSAS, *B.animalis* subsp *lactis* Bb12 ou *B. bifidum* Bb443 inoculées à 1% (V/V). Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  SEM.



**Figure 30:** Teneurs en acides organiques produits par les cinq différentes souches bénéfiques cultivées séparément en présence de fibres insolubles (A) ou solubles (B) de son d'avoine. Les milieux de culture ont été inoculés à 1% (V/V) par chacune des souches. Les valeurs représentent la moyenne de 2 déterminations  $\pm$  SEM.

L'activité métabolique des cinq souches retenues dans la présente étude est quasiment inexistante sur son entier d'avoine ou des fibres extraites. Encore une fois, les observations faites ici ne sont pas en faveur d'une utilisation du son entier d'avoine ou de ses dérivés comme substrat prébiotique ; du moins pour les variétés de souches expérimentées.

## **IV.2. Effet prébiotique *in vivo* du son de blé sur le microbiote intestinal des souris Swiss**

### **IV.2.1. Implantation des souches bénéfiques en absence de son de blé :**

Pour acquérir le statut « probiotique », une souche doit remplir un certain nombre de critères, parmi lesquels, figure son pouvoir à s'implanter et à coloniser le tube digestif qui représente son futur site d'action (Oelschlaeger, 2010).

Si cette souche remplit ce critère, cela implique non seulement qu'elle est capable de survivre aux hostilités gastriques du tube digestif (acidité gastrique, sécrétions enzymatiques et biliaires), mais aussi d'adhérer à la muqueuse intestinale pour y exercer son rôle de probiotique (Bezkorovainy, 2001).

Les résultats obtenus dans le présent travail montrent que chez les souris Swiss conventionnelles gavées pendant 28 jours par les souches bifides (*Bifidobacterium bifidum* Bb443 et *B. animalis* subsp *lactis* Bb12) et lactiques (*Lactobacillus acidophilus* LbA CECT 4529 et *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS), aucun trouble anormal de comportement, ni des manifestations pathologiques (ballonnement, constipation, malaise, etc.) n'ont été observés durant toute la période expérimentale.

L'implantation des souches bénéfiques bifides et lactiques commence à devenir mesurable à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine qui a suivi le début de leur administration aux souris, et elle continue d'évoluer tout au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine de l'expérience.

Chez les souris témoins SEBN-SBN (n'ayant reçu ni souches bénéfiques, ni son entier de blé), aucune modification dans la composition de la flore intestinale n'a été observée chez les souris consommant le lait écrémé reconstitué (LER) seul.

Par ailleurs, un changement dans le taux de bifidobactéries et de lactobacilles a été observé chez les souris recevant du lait supplémenté par les monocultures de souches bénéfiques expérimentales (*Bifidobacterium bifidum* Bb443, *B. animalis* subsp *lactis* Bb12,

*Lactobacillus acidophilus* LbA CECT 4529 et *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS). En effet, une augmentation de 2% du nombre total de bifidobactéries et de 6% de lactobacilles, a été enregistrée dans les crottes (Fig.31 et 32).

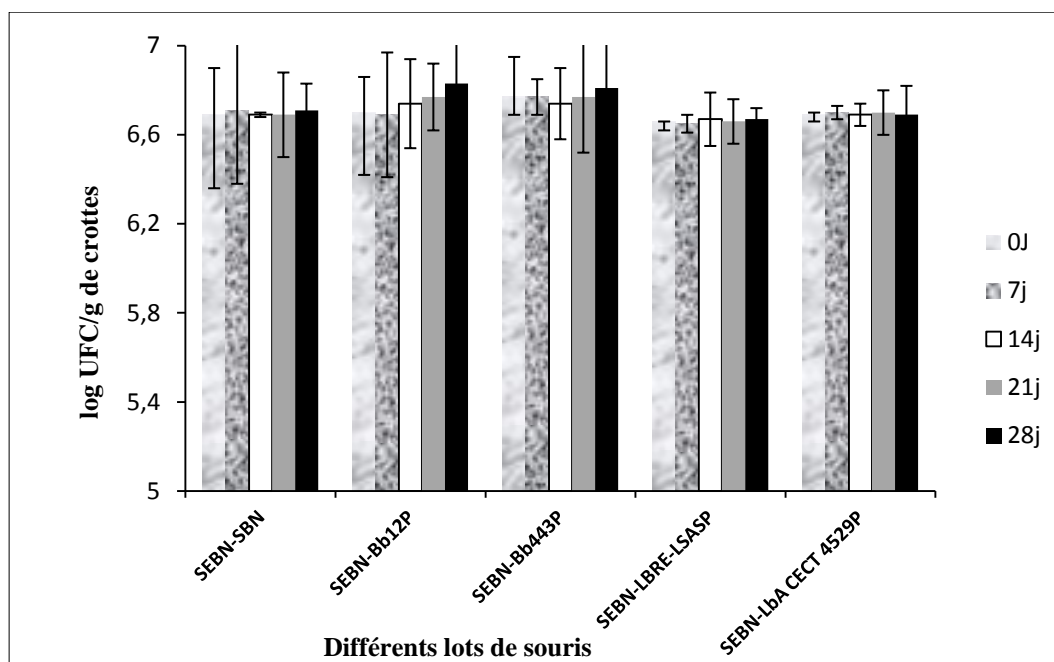
La comparaison du nombre de bifidobactéries existantes naturellement dans le côlon, représenté par celui de chez les lots témoins (SEBN-SBN) de souris n'ayant pas reçu de bifidobactéries exogène, à celui enregistré chez les lots de souris ayant reçu les souches bifides exogènes Bb12 et Bb443, confirme l'existence d'une faible implantation (2%) de ces dernières. En effet, le nombre de bactéries bifides passe de 6.7 à 6.83 logUFC/g de crottes après 28 jours d'administration de Bb12 ou de Bb443 (Fig.31).

Cette implantation semble d'autant plus vraisemblable lorsqu'on voit que le nombre de bifidobactéries reste inchangé pendant les 4 semaines d'expérimentation chez les lots de souris ayant reçu les lactobacilles exogènes SEBN-LbA-CECT4529P et SEBN-LBRE-LSASP ou chez les lots témoins SEBN-SBN (n'ayant pas reçu de souches bifides et/ou de lactobacilles exogènes).

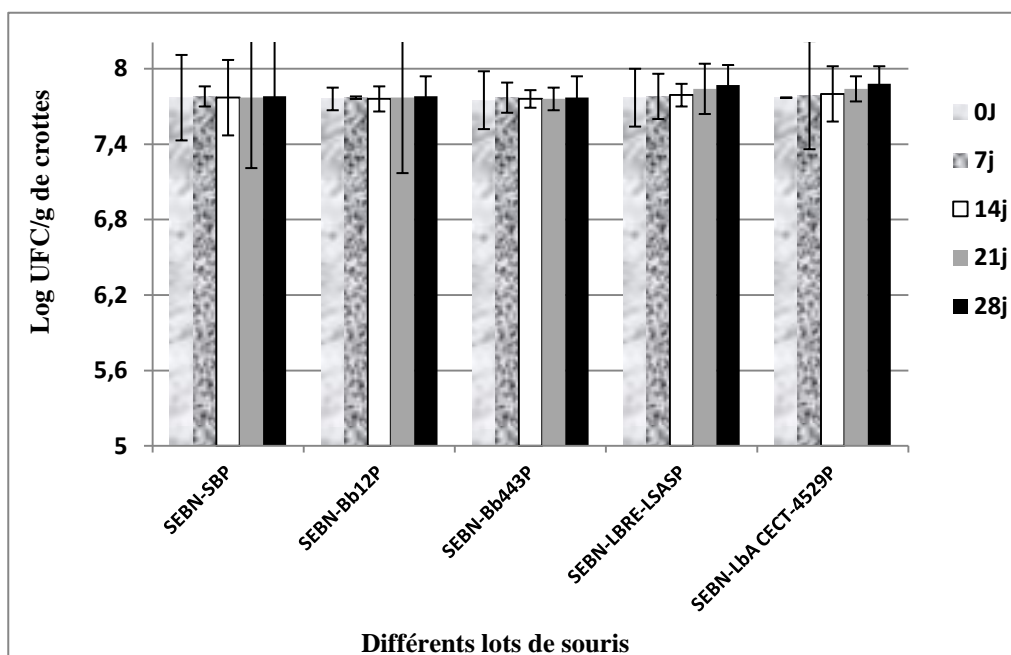
Un taux d'implantation légèrement plus élevé que celui observé avec les souches bifides a été enregistré pour les lactobacilles administrées aux lots à une dose quotidienne de  $1.10^9$  ufc/mL. En effet, dès la première semaine, on observe une augmentation de la flore lactique qui devient particulièrement significative ( $P < 0.05$ ) au cours de la dernière semaine (Fig.32).

Ces résultats mettent en évidence la capacité des souches bifides (Bb12 et Bb443) et des lactobacilles (LbA-CECT4529 et LBRE-LSAS) à transiter à l'état vivant dans le tractus gastro-intestinal de des souris et d'y proliférer.

Robinson (1990) a montré que le tube digestif de 50% des souris gavées par une souche de *Bifidobacterium* sp (à raison de  $10^9$  ufc/mL) a été colonisé pendant 14 jours de traitement par cette souche qui était retrouvée dans les crottes au taux de  $5 \log \text{UFC/mL}$ .



**Figure 31 :** Evolution du degré de prolifération (logUFC/g crottes) des différentes souches bénéfiques bifides dans le tube digestif des souris Swiss gavées à raison de 9 logUFC/mL par ces souches et recevant le régime dépourvu de son entier de blé dur. Le témoin (SEBN-SBN) représente, ici, le lot de souris n'ayant reçu ni souches bénéfiques, ni son entier de blé dur ; mais seulement le régime additionné de lait écrémé reconstitué (LER). Les valeurs représentent la moyenne de 6 déterminations  $\pm$  SEM (n=6).



**Figure 32:** Evolution du degré de prolifération (logUFC/g crottes) des différentes souches bénéfiques lactiques dans le tube digestif des souris Swiss conventionnelles gavées par ces souches à raison de 9 logUFC/mL et nourries avec un régime dépourvu de son entier de blé dur. Les valeurs représentent la moyenne de six déterminations  $\pm$  SEM (n = 6).

Gopal (2003) a mené une étude sur trente volontaires humains répartis en 3 groupes consommant, chaque jour pendant 4 semaines, 250 mL de lait supplémenté par *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (10 logUFC/mL), dans laquelle l'analyse microbiologique des selles a commencé 2 semaines avant l'expérience et se sont poursuivies une fois par semaine pendant 8 semaines durant le test. Cet auteur observe une augmentation du nombre de cellules de cette souche pendant la période de son administration aux volontaires humains et une régression dès l'arrêt de ce traitement.

Les travaux de Berrada et al. (1991), ont montré qu'une souche est dite acido-résistante lorsque 80% des bactéries qui la représentent et qui ont été consommées dans du lait fermenté (9 logUFC/mL arrivent à transiter de l'estomac vers l'intestin grêle.

Dans ce même contexte, Pochart et al. (1992) ont rapporté que la consommation élevée (10 logUFC/mL) de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* (Bb12) provoquait l'augmentation du degré d'implantation de cette souche (8logUFC/g de selles), indiquant par là, sa résistance aux hostilités gastriques de l'estomac.

La plupart des études sur l'implantation des probiotiques ont montré que certaines bifidobactéries ingérées dans les produits laitiers fermentés ; ainsi que certains lactobacilles ont un taux de survie très élevé dans le système digestif car leur concentration fécale mesurée est très importante (Marteau et al, 2004; Bouhnik et al.,2007; Jakobsdottir et al ; 2013 ; Keddari et al ; 2014). Cependant, cette implantation est corrélée avec le nombre de bactéries administrées, la durée du traitement et la souche utilisée (Quigley, 2010).

A l'issue d'une expérience chez des souris auxquelles fut administré par voie rectale *Lactobacillus reuteri* en vue de coloniser la lumière colique, Madsen et al. (1999) ont observé une diminution de l'inflammation de la muqueuse intestinale et du nombre de bactéries adhérentes à cette dernière Cette expérimentation, comme beaucoup d'autres, montre l'effet protecteur des probiotiques sur les colites expérimentales chez l'animal (Madsen et al., 1999 ; Bouhnik et al. 2007 ; Cani, 2009 ; Candéla et al., 2010). ;.

Biesebeke et al. (2004) avaient rapporté qu'une survie significative de *L. plantarum* WCFS d'origine humaine à l'hostilité gastrique était possible lorsque cette souche est administrée par voie orale.

Une nouvelle hypothèse sur l'utilisation de cocktail de souches a été explorée; il s'agit de la synergie entre les souches probiotiques (l'ingestion d'un mélange de souches) qui procure une meilleure prolifération et modulation du microbiote par rapport à l'administration d'une seule souche (Gionchetti *et al.*, 2003; Mimura *et al.*, 2004; Quigley, 2010).

#### **IV.2.2. Effet *in vivo* du son entier de blé sur la prolifération des souches bénéfiques**

Au niveau du grand public, le bon fonctionnement de l'appareil digestif est perçu comme essentiel au bien être et à la santé de l'organisme. La consommation de produits laitiers fermentés n'est pas récente (yaourt, kéfir,...) et représente, avec celle des fibres végétales une pratique alimentaire efficace pour le maintien des fonctions digestives.

Selon les résultats reportés dans les figures 33 et 34, l'effet prébiotique de son entier de blé sur l'implantation et la prolifération des souches testées est mis en évidence par le taux élevé de bifidobactéries (7.89 logUFC/g de crottes) et de lactobacilles (8.87 logUFC/g de crottes) enregistré.

En effet, il s'est avéré que les crottes des souris recevant quotidiennement la souche *B.animalis* subsp. *lactis* (Bb12) et alimentées par un régime contenant du son entier de blé pendant 28 jours (SEBP-Bb12P), renferment un taux de bifidobactéries, toutes espèces confondues, de l'ordre de 7,89 Log ufc/g, traduisant le degré d'implantation le plus élevé (soit 18%) de cette souche parmi l'ensemble des souches testés.

La prolifération de la souche *B. bifidum* dans le tube digestif des souris s'est révélée plus faible ; elle est de 4% seulement après 28 jours d'administration. Le taux de souches bifides endogènes n'augmente que très légèrement sous l'effet de l'ingestion de son entier de blé par les souris des trois lots qui n'ont pas reçu les souches bifides étudiées où il représente 1.4% seulement, du lot témoin (SEBP-SBN) et celles des deux lots ayant reçu les souches lactiques (SEBP-LBRE-LSASP et SEBP-LbACECT4529P). L'effet de son entier de blé sur la population bifide endogène n'est pas significatif ( $P>0,05$ )

En ce qui concerne les lots recevant les souches lactiques exogènes, une implantation nette est remarquée après la 3<sup>ème</sup> semaine où le nombre de lactobacilles dans les crottes passe de 7,73 au début du traitement à 8,87 logUFC/g crottes à la fin de l'expérimentation.

Les lactobacilles s'implantent légèrement mieux chez les souris qui reçoivent la souche *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS que chez celles ayant reçu la souche *Lb. acidophilus*-LbA CECT 4529.

En effet, les souches *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS et *Lb. acidophilus* LbA CECT 4529 se sont, respectivement, implantées à hauteur de 16 et 14% dans le tube digestif des souris qui les ont reçues.

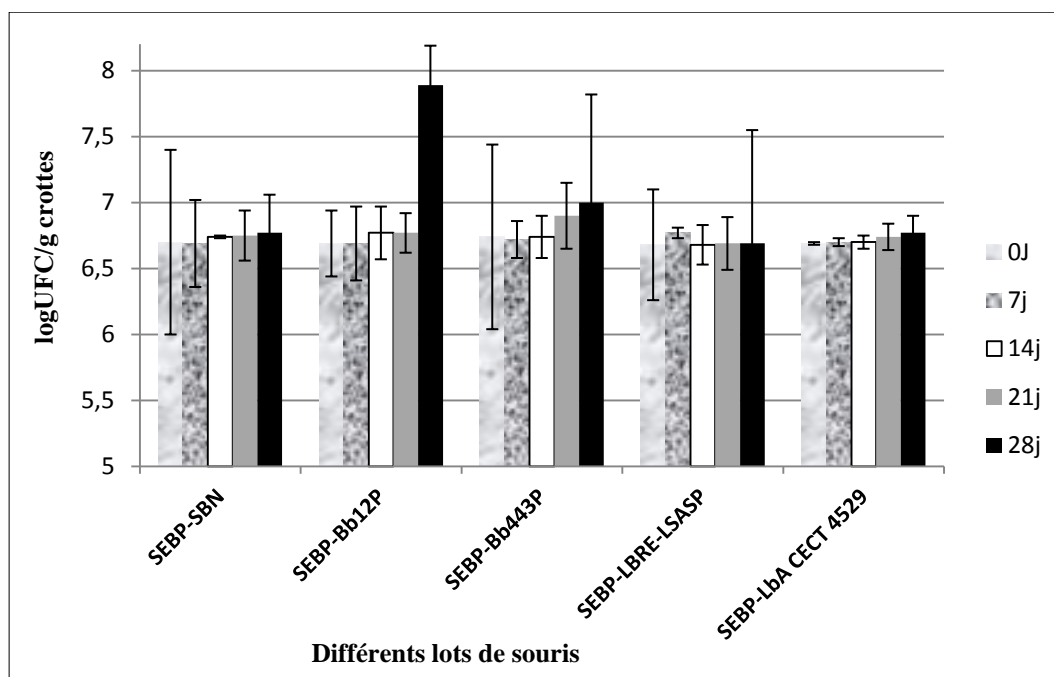
Les lactobacilles endogènes ne sont que très légèrement stimulés (à hauteur de 1,3%) par la présence de son entier de blé dans l'alimentation des souris n'ayant reçu aucun lactobacille exogène.

Le poids corporel des souris a augmenté de façon constante tout au long de l'expérience. La consommation de son de blé n'a pas causé d'inconfort intestinal comme l'éruclation ou les ballonnements.

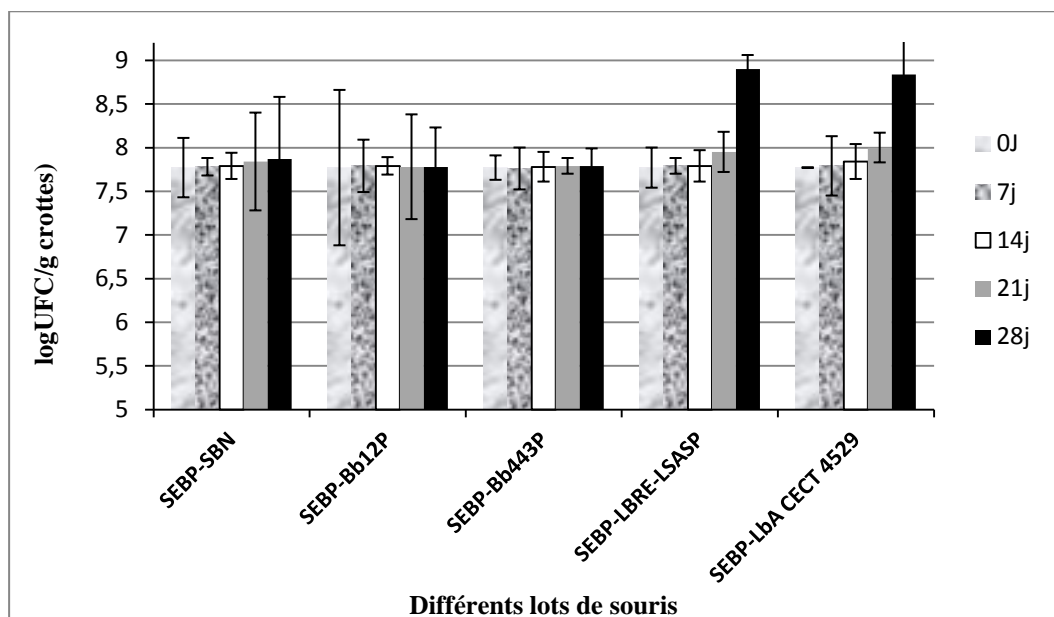
L'ingestion de fibres végétales, et en particulier celles de son de blé, peut moduler, voire modifier la digestion et l'absorption intestinale chez l'homme ; elle peut même contribuer à réparer certains troubles métaboliques attribués à une alimentation sans fibres.

En observant, d'une part, que de nombreuses bactéries du tube digestif étaient capables de métaboliser le son *in vitro* et, d'autre part, que de nombreux métabolites bactériens du tube digestif apparaissaient, disparaissaient ou étaient quantitativement modifiés quand on ajoutait du son au régime alimentaire, divers auteurs ont postulé que cette ingestion de son était capable de modifier la flore microbienne du tube digestif (Ducluzeau *et al.*, 1984 ; Gullon *et al.*, 2014).

Plusieurs études épidémiologiques ont mis en lumière une association inverse entre la consommation de céréales complètes et le risque de maladies chroniques. Cet effet pourrait être du à l'effet prébiotique de ces produits, mais à l'heure actuelle peu de travaux ont été menés à ce sujet.



**Figure 33 :** Evolution du degré de prolifération (logUFC/g crottes) des souches bénéfiques bifides dans le tube digestif des souris Swiss conventionnelles gavées par ces souches à raison de  $9 \log \text{ UFC/mL}$  et nourries avec un régime à base de son entier de blé dur. Les valeurs représentent la moyenne de six déterminations  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ).



**Figure 34 :** Evolution du degré d'implantation (logUFC/g crottes) des souches bénéfiques lactiques dans le tube digestif des souris Swiss conventionnelles gavées par ces souches à raison de  $9 \log \text{ UFC/mL}$  et nourries avec un régime à base de son entier de blé dur. Les valeurs représentent la moyenne de six déterminations  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ).

Des chercheurs de l'université de Reading en Angleterre (Costabile et al., 2007) ont examiné l'impact du blé complet sur la microflore intestinale humaine et l'ont comparé à celui du son de blé. L'étude (randomisée en double aveugle) a été menée chez 31 volontaires qui ont consommé quotidiennement 48g de céréales de petit-déjeuner fabriquées soit avec du blé complet, soit avec du son de blé pendant des périodes de 3 semaines (séparées par des lavages gastriques et intestinaux de 2 semaines).

Ces auteurs avaient constaté que le nombre des bifidobactéries et de lactobacilles fécaux était plus élevé avec les deux types de céréales ; mais avec un effet significativement plus prononcé chez les volontaires ayant reçu le blé entier.

Une relation positive directe a été mise en évidence entre le taux de substrat prébiotique et la quantité de bifidobactéries dans les selles (Bouhnik et al., 2007). Cependant, en plus que du taux de substrat prébiotique ingéré, l'amplitude de cette relation semble dépendre de la quantité initiale de bifidobactéries chez le sujet : les sujets présentant une concentration initiale inférieure à 9 logUFC/g répondent de façon plus prononcée à l'ingestion du prébiotique (Cherbut, 2003). La plupart des études chez l'homme ont montré que l'effet persistait pendant toute la durée de l'ingestion du prébiotique, puis diminuait progressivement à son arrêt. Tous ces essais ont cependant porté sur de courtes durées d'ingestion, de 1 à 4 semaines au maximum.

Chez le rat, l'ingestion de FOS pendant 2 semaines a induit l'augmentation spécifique de la concentration fécale des bactéries lactiques (de 8 à 9 logUFC/g), en particulier celle des lactobacilles; sa prolongation au-delà de 1 mois a conduit à la disparition de l'effet, qui n'était pas réapparu après 6 mois de consommation chronique (Le Blay et al., 1999).

Chez l'homme, on admet que les bactéries lactiques, les bifidobactéries et *Streptococcus thermophilus*, espèce utilisée traditionnellement dans la production du yaourt, survivent aux stress gastriques et intestinaux et transitent de manière active dans le tube digestif (Gibson et al., 2004 ; Jakobsdotti et al., 2013).

Il y a nécessité d'une administration répétée, voire continue, à taux élevé ( $>10^6$ /g d'aliment pour obtenir les effets recherchés (Gibson *et al.*, 2004 ; Bouhnik *et al.*, 2007 ; Nazzaro *et al.*, 2012).

La production des acides organiques dans le colon est conditionnée par la fermentation des prébiotiques par les souches bénéfiques. Chez l'homme, il a été estimé que la proportion relative des trois principaux acides gras à chaînes courtes (AGCC): l'acétate, le propionate et le butyrate est, respectivement, de 60/20/20. Les gaz de fermentation colique peuvent, soit servir de substrats pour les bactéries, soit absorbés puis excrétés via la respiration, ou encore excrétés par voie rectale (Papillon *et al.*, 1999).

L'acide lactique s'accumule dans certaines conditions, ou n'apparaît que de façon transitoire avant d'être métabolisé en AGCC. La majeure partie des AGCC est absorbée et seulement une petite fraction, non représentative, est retrouvée dans les selles (Papillon *et al.*, 1999).

Les principaux prébiotiques connus sont facilement et totalement fermentés, et ils augmentent la production d'acides organiques. La quantité et la proportion relative des acides organiques produits diffèrent selon la nature du substrat prébiotique, et dépendent également de la composition de la flore de l'hôte et du temps de transit. La caractérisation des profils fermentaires des différents prébiotiques est donc difficile à établir, d'autant plus que chez l'homme, seules les selles sont facilement accessibles. Or, beaucoup de prébiotiques sont fermentés dans la partie proximale du côlon ; alors que les concentrations d'AGCC mesurées dans les selles reflètent principalement celles de la partie la plus distale du côlon (Papillon *et al.*, 1999 ; Cherbut, 2003).

Les symbiotiques, combinaison d'un probiotique et d'un prébiotique a pour but d'augmenter la durée de survie du microorganisme en lui fournissant un substrat pour sa fermentation (Collins *et Gibson*, 1999).

#### **IV.3.2. Modification de la composition de la flore bactérienne intestinale.**

Dans notre expérimentation, tous les animaux étaient en bonne santé avant l'échantillonnage et au cours de l'étude. Il n'y a aucun comportement anormal notable, changement d'activité ou le déclin de l'éclat des cheveux qui a été détecté chez les souris après 4 semaines d'administration de trois souches (*Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS, *B. lactis* Bb12 et

*B.bifidum* Bb443). Ces résultats indiquent que ces souches testées n'ont pas d'effet négatif sur l'état de santé général des souris lorsqu'elles sont administrées par voie orale pendant 4 semaines. En revanche, la perte du tiers des souris ayant reçu la souche *Lb. acidophilus* LbA-CECT4529, laisse penser que cette souche n'a pas le statut GRAS.

Dans notre étude et selon les résultats reportés en tableau 8, il y a une modification remarquable de la composition de la flore intestinale des souris des différents lots en comparaison avec les témoins, due à la colonisation des souches bifides et lactiques inoculées par voie orale à des concentrations journalières de 9 log UFC/mL.

En effet, le taux des Clostridies et des Bacteroides a significativement chuté dès la deuxième semaine d'administration des souches lactiques ou bifides. Cette diminution est accentuée par la présence de son entier de blé.

Les résultats de dénombrement des différentes populations microbiennes indiquent que le son entier de blé dans le régime alimentaire des souris, stimule la prolifération des bifidobactéries et des lactobacilles fécaux. Sur les 28 jours d'expérimentation, le nombre de lactobacilles et de bifidobactéries fécaux de tous les groupes de souris traitées par le son entier de blé étaient significativement plus élevés (16% de plus en moyenne) que ceux du groupe témoin ( $P < 0,05$ ).

Néanmoins, le son entier de blé contribue à la réduction du nombre de *Clostridium* dans les groupes des souris (SEBP-Bb12P et SEBP-LBRE-LSASP) inoculées par les souches bénéfiques (*B. lactis* Bb12 et *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS). Après 28 jours d'administration de régime à base de son entier de blé, cette réduction des *Clostridium* s'est révélée plus importante (-18%) en présence de la souche Bb12 que de la souche expérimentale *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS (-11.39%).

L'administration de *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS et *B. lactis* Bb12 aux souris induit, également, la réduction des Bacteroides fécaux, dont l'effet le plus important est obtenu par la souche *B.lactis* Bb12 (15,08%) alors qu'elle ne représente que 2% de diminution en présence de *Lb.rhamnosus* LBRE-LSAS, or que, cette réduction n'est pas obtenue lors de l'administration des souches *Lb. acidophilus* et *B.bifidum*.

Par rapport au témoin (SEBP-SBN), les aérobies totaux étaient plus faibles dans tous les groupes, ils ont été réduits de 3% en présence de son entier de blé à la quatrième semaine ; alors que le total des anaérobies était plus élevé dans les groupes de souris ayant reçu les souches bénéfiques testées.

**Tableau 8 :** L'impact de la consommation de son entier de blé sur la microflore fécale des souris (log UFC/g crottes) après 28 jours d'administration quotidienne de souches bénéfiques.

		Bb12	Bb443	LBRE-LSAS	LbA CECT 4529	Témoin
<i>Bifidobacteries</i>	0 <sup>th</sup> day	6,69±0,25	6,74±0,70	6,69±0,53	6,70±0,42	6,70±0,70
	28 <sup>th</sup> day	7,89±0,30 <sup>a</sup>	7,00±0,82 <sup>a</sup>	6,69±0,15	6,77±0,86	6,77±0,29
<i>Lactobacillus</i>	0 <sup>th</sup> day	7,77±0,89	7,77±0,14	7,77±0,23	7,77±0,60	7,77±0,34
	28 <sup>th</sup> day	7,78±0,45	7,79±0,20	8,90±0,16 <sup>a</sup>	8,84±0,71 <sup>a</sup>	7,87±0,71
<i>Bacteroides</i>	0 <sup>th</sup> day	7,89±0,55	7,89±0,30	7,80±0,18	7,80±0,56	7,90±0,42
	28 <sup>th</sup> day	6,7±0,16 <sup>a</sup>	7,90±0,25	7,68±0,22 <sup>a</sup>	7,82±0,23	7,89±0,38
<i>Clostridies</i>	0 <sup>th</sup> day	5,01±0,16	6,01±0,21	5,88±0,86	5,03±0,12	5,01±0,15
	28 <sup>th</sup> day	4,08±0,21 <sup>a</sup>	5,99±0,11	5,21±0,71 <sup>a</sup>	5,01±0,25	4,99±0,14
<i>Enterobacteriaceae</i>	0 <sup>th</sup> day	7,76±0,58	7,88±0,34	7,63±0,33	7,80±0,42	7,87±0,25
	28 <sup>th</sup> day	7,66±0,47 <sup>a</sup>	7,86±0,60	7,65±0,38 <sup>a</sup>	7,82±0,30 <sup>a</sup>	7,86±0,13
<i>Enterococci</i>	0 <sup>th</sup> day	5,56±0,32	5,56±0,47	5,54±0,59 <sup>a</sup>	5,52±0,35 <sup>a</sup>	5,58±0,25
	28 <sup>th</sup> day	5,57±0,21	5,51±0,35	5,38±0,12 <sup>a</sup>	5,54±0,55	5,56±0,16
Aérobies totaux	0 <sup>th</sup> day	7,86±0,16	7,87±0,69	7,82±0,22	7,88±0,14	7,90±0,38
	28 <sup>th</sup> day	7,58±0,40 <sup>a</sup>	7,60±0,47 <sup>a</sup>	7,70±0,38 <sup>a</sup>	7,80±0,15	7,87±0,25
Anaérobies totaux	0 <sup>th</sup> day	8,03±0,60	8,15±0,29	8,30±0,17	8,02±0,59	8,01±0,29
	28 <sup>th</sup> day	8,35±0,63 <sup>a</sup>	8,38±0,51 <sup>a</sup>	8,52±0,29 <sup>a</sup>	8,04±0,65	7,99±0,42

Les valeurs représentent la moyenne de 6 déterminations ± SEM (n=6); <sup>a</sup> significatif par rapport au témoin

L'utilisation de plus en plus large des prébiotiques, y compris chez les nourrissons et les jeunes enfants, implique que l'analyse approfondie des effets des prébiotiques soit réalisée sur l'ensemble des populations bactériennes, et pas seulement sur quelques espèces bien connues.

Selon les travaux rapportés par [Isumi et al. \(2001\)](#), les fractions des xylooligosaccharides de son de blé peuvent moduler la prolifération des bifidobactéries et lactobacilles *in vivo*, et par ailleurs, réprimer la croissance des *Clostridium*.

Toutefois, les prébiotiques ont la capacité de moduler le microbiote intestinal par la stimulation des germes bénéfiques avec la suppression ou non des germes pathogènes (Vardakou et al., 2007).

La modification du profil bactérien de la flore colique peut avoir plusieurs conséquences positives sur la santé. Une des plus immédiatement envisageable est une augmentation de la résistance à la colonisation par des microorganismes pathogènes. Parmi les mécanismes potentiels d'une telle action, les acides organiques produits par les bifidobactéries sont bactériostatiques et contribuent à abaisser le pH luminal à un niveau défavorable aux germes pathogènes (Buddington et al., 2002).

Par ailleurs, une compétition pour l'occupation des sites de colonisation peut s'exercer entre les bactéries stimulées par les prébiotiques et les pathogènes. Un autre mécanisme serait la stimulation des capacités de défense de la barrière intestinale. La démonstration que l'ingestion d'un mélange d'inuline et d'oligofructose pendant 2 semaines a augmenté d'environ 1 log la concentration de bifidobactéries associées à la muqueuse intestinale, sans changer les taux de *Bacteroides*, clostridies et entérobactéries dans les biofilms muqueux de volontaires, est en ce sens très intéressante (Langlands et al., 2004).

Si les mécanismes d'action sont encore hypothétiques, la preuve que l'ingestion de prébiotiques peut diminuer la colonisation par des germes pathogènes a été apportée chez plusieurs espèces animales (Buddington et al., 2002).

Les prébiotiques pourraient avoir un effet transitoire sur le profil bactérien ; celui-ci retrouvant sa configuration initiale après 4 à 6 semaines, mais qu'ils modifieraient de façon persistante (pendant leur ingestion) l'activité métabolique de la flore colique.

Bouhnik et al. (2007) soulignent également la nécessité d'analyser les effets à long terme des prébiotiques chez l'homme. Par ailleurs, les effets éventuels des prébiotiques sur les populations bactériennes sous-dominantes sont quasiment ignorés. Une étude menée chez la souris par Apajalahti et al. (2002) avait montré que l'inuline provoquait des changements majeurs dans les proportions de bactéries encore inconnues.

Chez l'homme adulte, la concentration fécale de bifidobactéries est comprise entre 9 et 10 logUFC/g de selles (Kimura et al., 1997), mais est plus basse chez le sujet âgé (Saunier &

Doré, 2002). Associée à l'augmentation de la proportion des bifidobactéries induite par les prébiotiques, une diminution de la quantité relative d'autres populations bactériennes dominantes, telles que les *Bacteroides*, les fusobactéries ou les clostridies, a été quelquefois observée (Gibson *et al.*, 2004). Toutefois, le bénéfice santé d'une telle réduction n'est pas établi.

La fermentation des prébiotiques est associée à une diminution du pH intraluminal, due à la production d'acide lactique et d'AGCC, ainsi qu'à une modulation de plusieurs activités enzymatiques de la flore. Outre l'inhibition de la prolifération des microorganismes pathogènes, la diminution du pH a plusieurs conséquences favorables. Par exemple, des minéraux, en particulier le calcium, sont solubilisés à pH acide, ce qui améliore leur absorption par la muqueuse colique; cet effet a été observé avec les prébiotiques à plusieurs reprises chez l'animal, et chez l'homme dans certaines conditions (Griffin *et al.*, 2002).

Brighenti (2007) a ainsi observé une augmentation de la concentration fécale des acides biliaires primaires, et une diminution des acides secondaires, chez des sujets consommant au petit déjeuner des céréales contenant 18 % d'inuline.

La consommation de prébiotiques peut aussi influencer la dégradation bactérienne des protéines et diminuer la production d'ammoniaque, de phénols et d'indols, ainsi qu'un certain nombre de composés soufrés, considérés comme néfastes pour la santé. La concentration fécale de ces produits du catabolisme protéique a été diminuée chez des sujets sains consommant des FOS (Swanson *et al.*, 2002).

#### **IV.2.4. Indice prébiotique (IP)**

Pour comparer l'intensité de l'effet prébiotique exercé par différents produits, Palfaman *et al.* (2003) ont introduit le concept d'indice prébiotique (IP). L'IP est utilisé pour évaluer l'effet de l'addition de prébiotiques sur la stimulation sélective de la croissance des bactéries bénéfiques comme les bifidobactéries et les lactobacilles par rapport aux autres microorganismes (*Bacteroides* et *Clostridium*) en comparaison avec la flore totale.

Un IP positif indique que le prébiotique testé est capable de stimuler spécifiquement les bactéries probiotiques dans les conditions expérimentales ; alors que s'il est négatif cela signifie que l'ajout du prébiotique n'a aucun effet sur la croissance des probiotiques.

Les résultats du score de l'indice prébiotique de son entier de blé en présence des souches bénéfiques testées et du groupe témoin sont reportés en tableau 9. Les IP positifs du son de blé obtenus dans l'ensemble des groupes de souris testés attestent de l'effet prébiotique de ce sous-produit de meunerie et de son pouvoir à moduler le microbiote intestinal en faveur des germes bénéfiques.

Les souris nourries par un régime supplémenté de son entier de blé et inoculées par la souche probiotique *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (SEBP-Bb12P), présente l'IP le plus élevé (soit 0.3), alors qu'il n'y a pas de différence significative entre les IP observés en présence des deux souches lactiques *Lactobacillus acidophilus* LbA CECT 4529 (0.17) et *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS (0.16).

Chez les souris ayant reçu la souche *Bifidobacterium bifidum* Bb443 (SEBP-Bb443P), l'IP du son entier de blé est plus faible (0.11).

Dans une étude similaire, [Vardakou et al. \(2008\)](#), en utilisant les xylooligosaccharides de blé en culture fed batch et en inoculant le milieu avec les fèces humaines, des IP positifs compris entre 0,6 et 3 ont été obtenus.

**Tableau 9:** Les scores de l'indice prébiotique de son entier de blé dans les différents groupes de souris après 28 jours de traitement synbiotique (régime à base de son entier de blé + administration quotidienne de souche bénéfique).

Groupe d'animaux	Indice prébiotique (IP)
Témoin SEBP-SBN	0.05
SEBP-Bb12P	0.3
SEBP-Bb443P	0.11
SEBP-LbA CECT 4529P	0.17
SEBP-LBRE-LSASP	0.16

#### IV.2.5. La translocation bactérienne

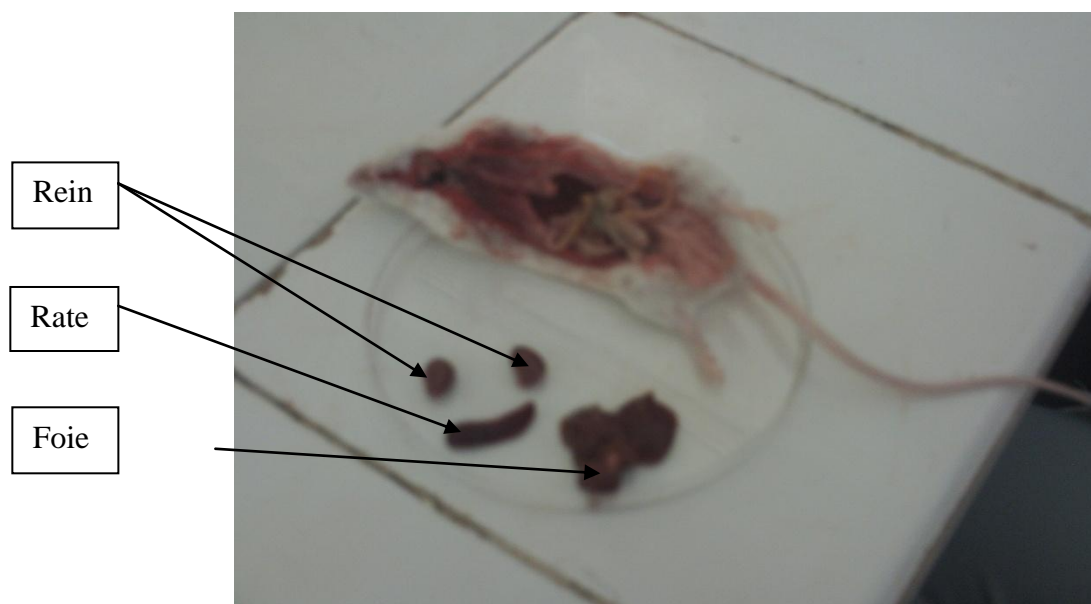
Une souris à translocation positive a été définie comme un animal qui avait au moins un échantillon de tissu (y compris le sang) contenant une ou plusieurs cellules bactériennes viables. Un tissu à translocation positive a été défini comme le tissu à partir duquel au moins une colonie de cellules bactériennes viables a été récupérée (Zhou *et al.*, 2000). Le nombre d'animaux positifs et le nombre d'échantillons de tissus positifs dans chaque groupe de traitement est indiqué au tableau 10. L'analyse statistique n'a pas révélé de différences significatives dans le pourcentage de souris et de tissus positifs entre les différents groupes ( $P > 0,05$ ).

*Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont les plus utilisés comme probiotique dans l'alimentation humaine (Gibson *et al.*, 2004, Oelschlaeger, 2010). L'étude de leur sécurité est limitée mais les recherches ont démontré que les souches *Lactobacillus sp.* et *Bifidobacterium sp.* ne sont ni pathogènes ni toxiques (par voie orale) pour l'animal et l'homme (Su *et al.*, 2007).

L'infection et la pathologie sont deux éléments importants dans les études de sécurité des bactéries probiotiques. L'hépatomégalie et la splénomégalie sont des indicateurs indirects de l'infection, mais dans cette étude, nous n'avons trouvé aucun changement macroscopique (sur le plan morphologique) dans les organes des souris traitées avec des souches bénéfiques (fig.35). De plus, les groupes de souris testées se sont avérés similaires à ceux des souris témoins. Ces résultats suggèrent que les souris n'ont connu aucune infection suite à l'administration orale des souches testées pendant 4 semaines.

**Tableau 10 :** Translocation bactérienne des souches administrées aux souris (exprimée en Tissu positif/Total des tissus examinés) dans le foie, les reins, la rate et le sang.

Différents groupes	Rate	Foie	Rein	Sang
Témoin	0/12	0/12	0/12	0/12
LbA-CECT4529	0/12	1/12	2/12	0/12
LBRE-LSAS	1/12	0/12	0/12	0/12
Bb12	0/12	0/12	0/12	0/12
Bb443	0/12	1/12	1/12	0/12



**Figure 35:** Dissection des souris et prélèvement du foie, des reins et de la rate pour évaluation de la translocation bactérienne dans ces organes.

La translocation des bactéries indique le degré d'infection et le pouvoir pathogène bactérien (Zhou *et al.*, 2000). Dans le présent travail, l'absence de toutes les souches testées dans le sang et dans les tissus extra-intestinaux, laisse penser qu'aucune de ces souches présentaient des propriétés invasives. La capacité de la flore intestinale indigène de translocation dans les tissus extra-intestinaux a été démontrée dans plusieurs études publiées (Su *et al.*, 2007).

La muqueuse intestinale joue un rôle important dans la fonction de barrière intestinale, car elle empêche les agents pathogènes et les substances toxiques d'envahir les tissus systémiques (Cani, 2009). Dans cette étude, l'inoculation des souris par voie orale avec les souches d'essai n'a eu aucun effet indésirable sur l'intégrité de la muqueuse intestinale ; ce qui représente un argument en faveur du caractère non toxique et non pathogène de ces souches.

Dans une étude sur l'inocuité de *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus acidophilus* HN017 et de *Bifidobacterium lactis* HN019, Zhou *et al.* (2000) avaient, également, rapporté cette absence de toxicité et de translocation de ces souches.

Des observations similaires ont été, également, faites par Candela *et al.*(2010) chez l'homme. Ces auteurs avaient noté l'absence d'effets indésirables (toxicité et pathogénicité) dus à l'ingestion de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri* et *Bifidobacterium longum*.

#### **IV.2.6. Résultats d'analyse hématologique et biochimique**

L'analyse hématologique et biochimique peut être utilisée pour détecter une carence modérée bénigne de nutriments ou d'un déséquilibre du métabolisme de ces nutriments (Zhou *et al.*, 2000).

Cette carence est généralement apparente avant l'apparition des symptômes cliniques ou des changements de poids corporel. Afin de dépister des symptômes sous-cliniques néfastes ou des effets dus aux traitements par les souches bactériennes testées, une gamme de tests hématologiques et biochimiques a été effectuée.

Les effets de l'administration orale des différentes souches bifides et lactiques étudiées sur les paramètres hématologiques et biochimiques sont présentés dans le tableau 11 où l'on peut noter que ces souches n'induisaient aucun effet négatif sur le nombre total des globules rouges, le taux d'hémoglobine, le volume globulaire moyen des hématies (VGM), la numération plaquettaire.

De même qu'aucune différence significative ( $P > 0,05$ ) du nombre de leucocytes différentiels n'a été détectée parmi les groupes de souris ayant reçu les deux régimes (régime sans son de blé, régime avec son de blé). Il n'y avait pas de différence significative dans l'hématocrite (Ht), la *Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine* (TCMH) et la *Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine* (CCMH) chez les souris des dix lots.

**Tableau 11:** Effets de l'administration de son entier de blé dur et de souches bénéfiques sur les paramètres hématologiques—et biochimiques sanguins des souris après une administration orale des souches lactiques et bifides pendant 4 semaines.

Paramètres hématologiques et Biochimiques	Régime son entier de blé négatif et souches bénéfiques positif					Régime son entier de blé positif et souches bénéfiques positif				
	Témoin sans souches	LbA CECT 4529	LBRE-LSAS	Bb12	Bb443	Témoin sans souches	LbA CECT 4529	LBRE-LSAS	Bb12	Bb443
Hémoglobine (g/dl)	13±1.04	15±1.65	15.4±1.24	13.8±2.31	14.8±1.46	15.1±1.33	14.2±1.22	15±2.40	14±1.23	14.7±2.30
Total globule rouge ( $10^{12}/l$ )	9.20±0.05	10.1±0.09	10.07±0.1	9.22±0.15	7.39±0.32	9.45±0.18	8.41±0.06	7.72±0.10	6.2±0.16	9.70±0.05
Plaquette ( $10^9/l$ )	442± 22.2	500±34.1	780±50.0	754±45.5	667±35.8	459±43.9	549±39.1	464±30.9	477±21.5	736±28.6
HT (%)	44±0.02	50±0.05	52±0.10	45±0.02	36.6±0.01	46.2±0.03	46.2±0.01	44.2±0.22	45.8±0.14	42.5±0.13
VGM (fl)	49±0.10	48.2±0.15	48±0.32	49±0.25	50±0.13	49±0.20	47.9±0.17	45±0.28	48±0.20	44±0.16
TCMH(pg)	14.1±0.30	14.1±0.23	14.3±0.38	15±0.42	15.9±0.13	16±0.27	13.5±0.12	14.4±0;20	15.1±0.16	14.4±0.15
CCMH (g/dl)	29.1±0.38	29.3±0.40	29.6±0.22	30.7±0.34	32±0.30	32.7±0.14	33.3±0.21	32.3±0.15	31.6±0.29	33±0.31
Leucocytes ( $10^9/l$ )	4.06±3.0	8.88±2.98	5.03±2.56	15.4±4.01	4.79±3.86	6.00±3.36	9.68±2.66	4.5±2.50	4.62±4.0	6.3±3.66
Lymphocytes( $10^9/l$ )	3.38±2.60	5±3.02	2.96±2.86	11.1±4.02	3.71±2.89	3.48±2.51	3.97±2.05	5.01±2.29	3.67±3.45	4.5±4.09
proteine plasmatique (g/dl)	2.92±0.32	1.43±0.13	1.71±0.18	3.5±0.21	3.14±0.34	4.07±0.26	4.0±0.51	3.42±0.24	3.52±0.53	3.07±0.30

Albumine (g/dl)	4.26±0.16	3.21±0.19	3.5±0.26	3.08±0.20	5±0.15	3.5±0.14	4.64±0.23	2.8±0.18	2.78±0.16	3.5±0.21
Glucose (g/dl)	1.26±0.14	1.05±0.03	1.05±0.06	1.23±0.08	1.36±0.10	1.07±0.09	1.17±0.01	1.04±0.13	1.1±0.11	1.24±0.05
Cholesterol (g/dl)	2.14±0.42	1.61±0.34	2.18±0.28	1.46±0.40	2.07±0.39	1.29±0.41	1.10±0.34	1.1±0.30	2.07±0.22	1.14±0.31

Toutes les valeurs sont dans les normes ( $P>0.05$ ). **HT**: hématoците; **VGM**: volume globulaire moyen ; **TCMH**: Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine; **CCMH**: Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine.

La protéonémie, l'albuminémie, la glycémie et la cholestérolémie de souris traitées avec les souches bénéfiques n'étaient pas significativement différentes de celles des souris témoins et se situaient dans les tranches de valeurs normales. Ceci laisse suggérer que l'inoculation des souris avec les souches lactiques et bifides testées sur une période de 4 semaines n'a pas d'effet négatif sur l'hématologie et la biochimie sanguine de ces animaux. Le métabolisme des protéines, des glucides, et des lipides n'était pas affecté ni par le régime utilisé, ni par l'administration des souches bénéfiques expérimentales.

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par [Zhou et al. \(2000\)](#). En effet, l'alimentation des souris avec un potentiel de souches probiotiques. *rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* HN017 ou *B. lactis* HN019 à des doses de  $1 \cdot 10^9$ ,  $5 \cdot 10^{12}$  UFC / kg poids corporel / jour pendant 4 semaines, n'a eu aucun effet négatif sur la croissance générale de l'état de santé, de l'hématologie et la biochimie du sang.

[Zhou et al. \(2000\)](#), ont également constaté que l'administration des LAB n'a pas un effet sur le glucose plasmatique, les protéines totales et l'albumine.

#### IV.2. 7. Résultats d'analyse histologique

Les observations morphologiques des différents organes n'ont pas révélé des différences entre les organes des lots inoculés par les souches expérimentales et ceux des souris témoins.

L'observation au microscope à flux laminaire des différentes coupes histologiques des différents tissus (caecum, iléon et côlon) traitées et colorées à l'hématoxyline et l'éosine n'a révélé aucun signe d'inflammation ou nécrose de la muqueuse intestinale chez les souris traitées par les trois souches *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS, *B. bifidum* Bb443 et *B. lactis* Bb12. Cependant, des signes de nécrose, d'inflammation et la présence de neutrophiles dans les cellules ont été détectés dans les groupes recevant la souche lactique *Lb. acidophilus* LbA CECT-4529 (fig.36 et 37).

Par ailleurs, un potentiel immunomodulateur a été remarqué dans les groupes recevant la souche *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS au vu de la plus grande taille des plaques de Peyer

au niveau tissulaire chez les souris traitées (fig. 38). Les deux souches de bifidobactéries ont également montré une stimulation mais avec un degré différent du

tractus gastro-intestinal, où les cellules lymphocytaires sont abondantes dans les tissus du Caecum, iléon et côlon (fig. 39).

La stimulation du système immunitaire est corrélée au degré d'infiltration des cellules lymphocytaires dans les différents tissus; ce dernier est en étroite relation avec le bon équilibre du microbiote et avec les différentes espèces présentes.

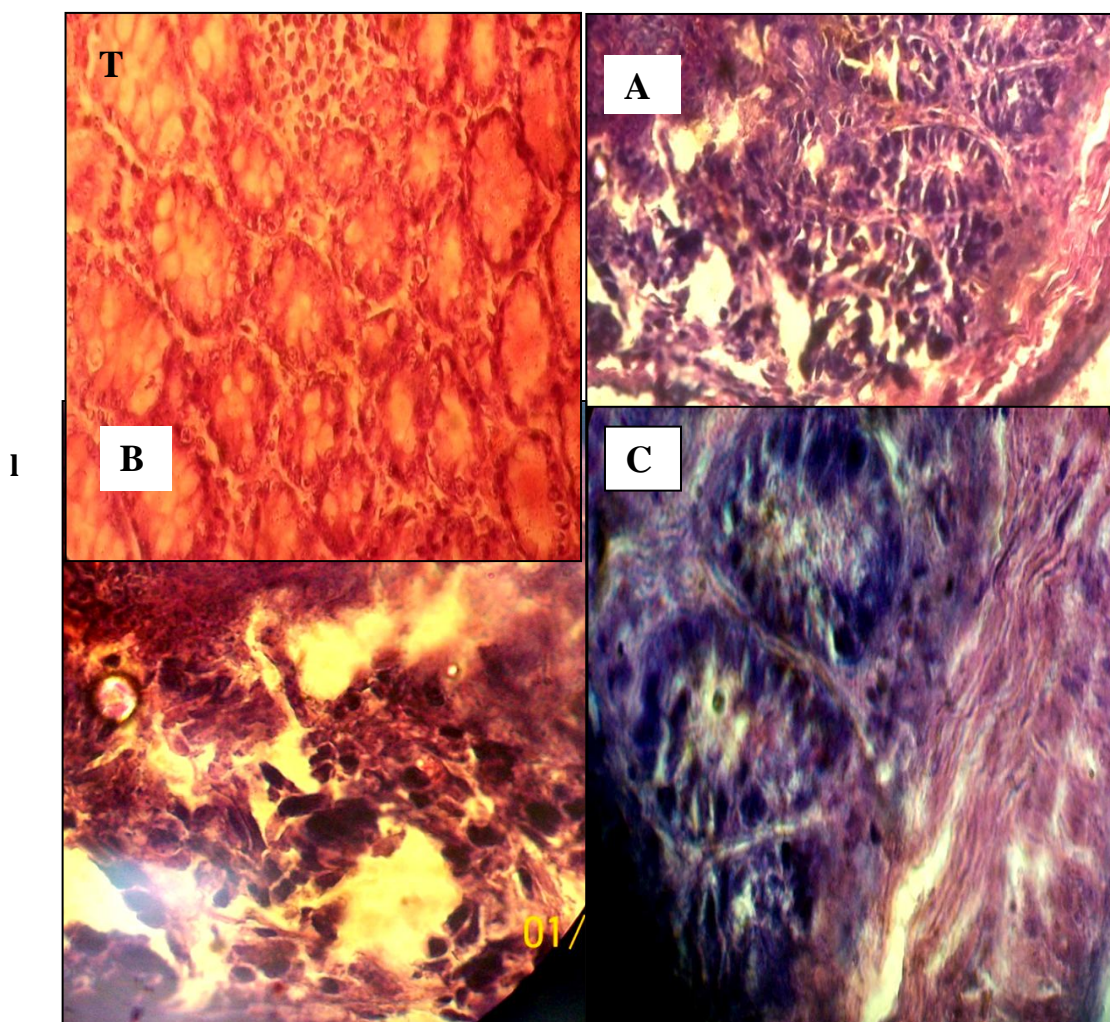
En effet, on assiste à une bonne modulation du système immunitaire en présence de la souche probiotique *B. lactis* (Bb12) ou de celle de *Lb. rhamnosus* (LBRE-LSAS). En revanche, une très faible immuno-stimulation a été enregistrée en présence de la deuxième souche bifide *B. bifidum* (Bb443). .

L'administration orale quotidienne de la souche lactique *Lb. acidophilus* CECT-4529 aux souris traitées avec les deux régimes avec ou sans l'addition de son de blé, provoque des changements histologiques négatifs (nécrose et présence de neutrophiles dans le sang périphérique). Ceci laisse présager que cette souche ne peut prétendre au statut de probiotique car elle n'est pas GRAS. Alors que, les trois autres souches utilisées dans cette étude; *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS, *B. lactis* Bb12 et *B. bifidum* Bb 443 sont des souches non pathogènes et sans danger pour la consommation humaine avec un bénéfice santé.

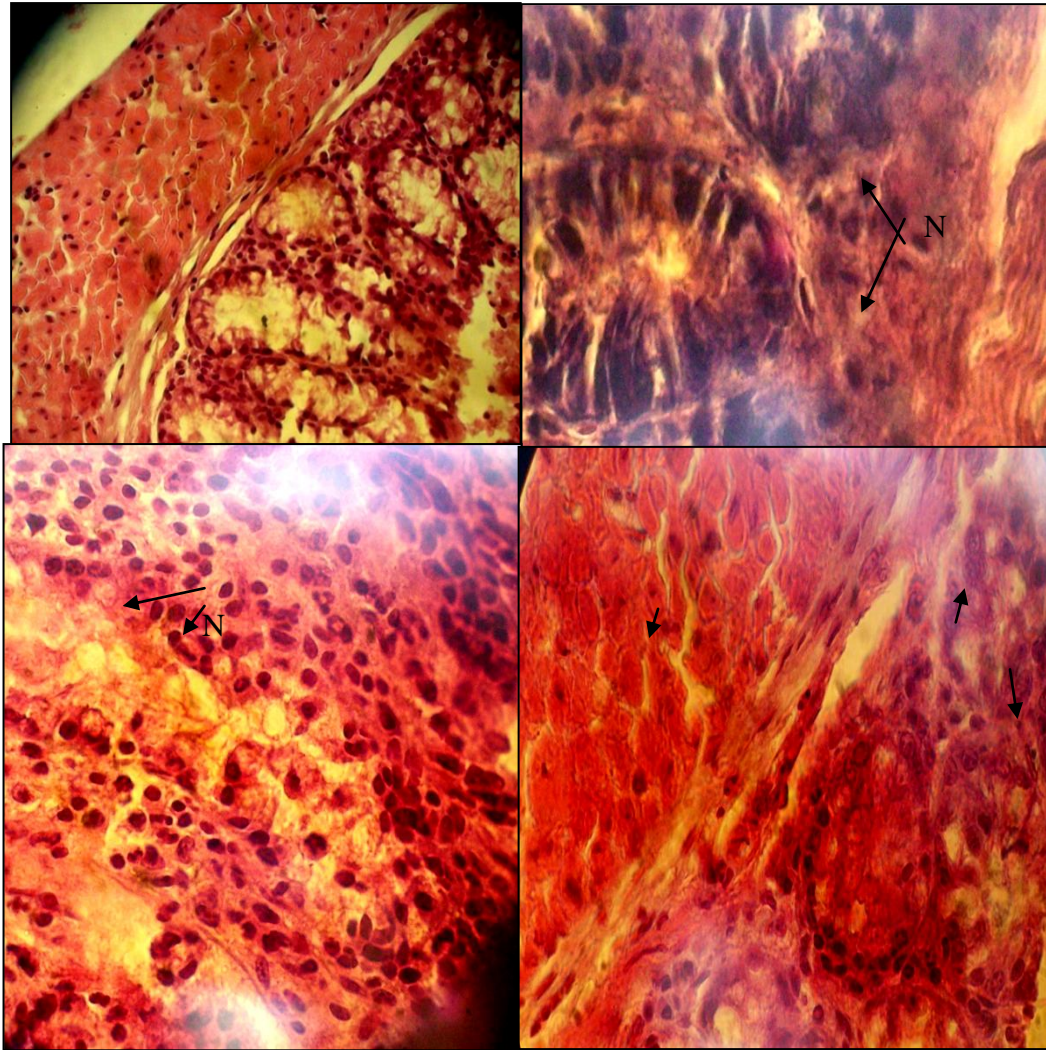
De nombreux effets santé ont été associés à la consommation des synbiotiques. Parmi ces effets, les effets immunomodulateurs représentent un champ d'investigation très peu exploré. Des actions sur l'immunité innée et adaptative ont pu être mises en évidence essentiellement chez l'animal ou *in vitro*. Les résultats d'études cliniques sont encore limitées à l'heure actuelle, mais ceux relatifs à l'immunité muco-sale et systémique chez l'homme ont déjà fait l'objet de publications (Geier *et al.*, 2007 ; Charalampopoulos, 2009 ; Resta,2009).

Les fructanes, les galacto-oligosaccharides (GOS), les pectines ou encore les amidons résistants font partie des glucides non digestibles les plus prometteurs. Deux grands mécanismes d'action ont été décrits avec ces composés:

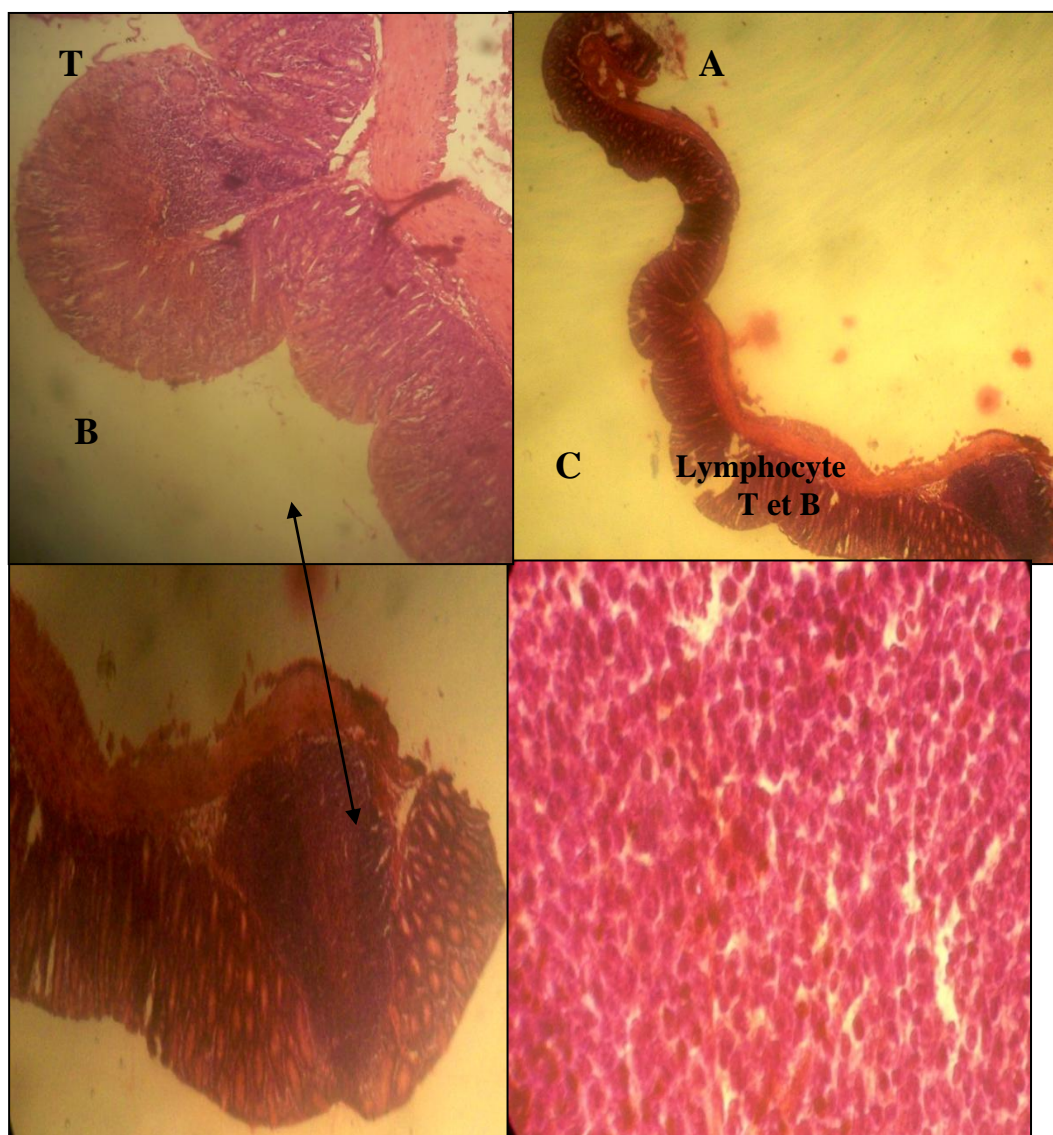
- d'une part, les glucides non digestibles sont fermentés à des degrés différents par la flore intestinale et de ce fait, leurs effets immunomodulateurs ont souvent été attribués à l'effet de cette flore, notamment dans le cas des prébiotiques. Les composés issus de cette interaction fibre-bactérie interagissent pour certains avec le système immunitaire.
- D'autre part, plusieurs travaux ont mis en évidence une action spécifique des glucides non digestibles qui se lie à des récepteurs des cellules immunitaires, notamment aux lectines (Vos et al



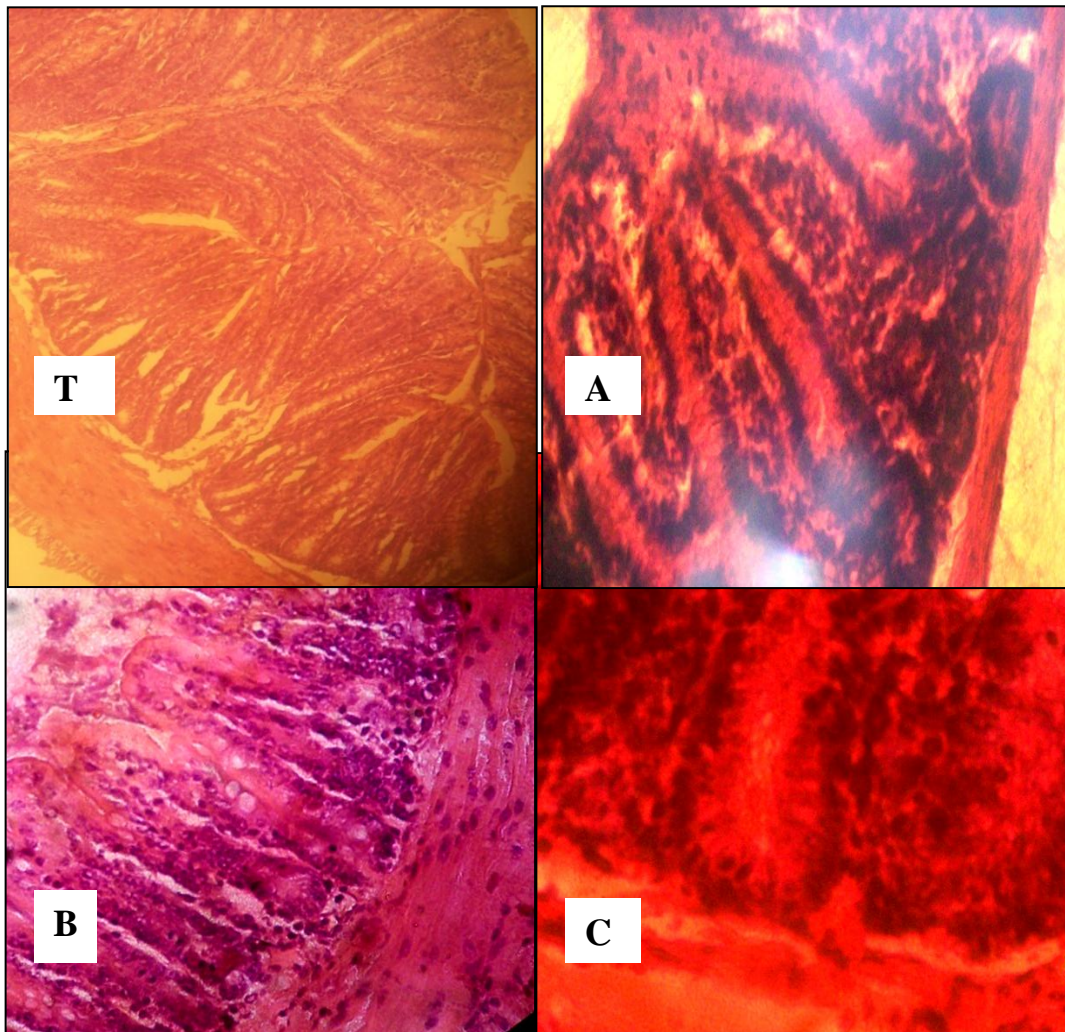
**Figure 36:** Nécrose au niveau de l'iléon chez les souris conventionnelles recevant la souche *Lb. acidophilus* LbA CECT-4529 après un traitement de 28 jours. T : témoin sain, A, B,C : même échantillon à différent grossissement (40X et 100X)



**Figure 37:** Inflammation (présence de neutrophiles périphériques :N) au niveau des tissus du colon des souris traitées par la souche lactique *Lactobacillus acidophilus* LbA CECT 4529 pendant 28 jours.



**Figure 38:** Stimulation du système immunitaire digestif des souris au niveau du colon (présence de plaque de peyer :PP), après un traitement orogastrique de 28 jours par la souche *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et un régime supplémenté de son ; T : colon normale ; B, C, D : même échantillon respectivement au grossissement, 10X, 40X et 100X.



**Figure 39:** La modulation du système immunitaire de la souris par infiltration des lymphocytes après un traitement de 28 jours par les souches bénéfiques (*Lb.rhamnosus* LBRE-LSAS ou *B.bifidum* Bb12). **T** : tissus à l'état normal, **A** : Stimulation au niveau du caecum, **B** : Stimulation au niveau de l'iléon ; **C** : Stimulation à la base au niveau du colon. Grossissement 40X.

## Conclusion

Au cours de la dernière décennie, le concept d'alimentation fonctionnalisée a connu un essor considérable. L'association, dans une base alimentaire généralement lactée, de microorganismes vivants qualifiés de probiotiques et/ou de substances oligosaccharidiques dénommées prébiotiques, susceptibles de produire un effet bénéfique sur la santé de l'hôte dépassant le simple apport nutritionnel, suscite l'intérêt tant au niveau commercial que scientifique. Les grands groupes mondiaux leaders de l'agroalimentaire se sont appropriés ce concept et développent actuellement une importante stratégie marketing afin de sensibiliser le consommateur à l'intérêt de cette nouvelle forme d'alimentation.

A travers cette étude, nous avons testé l'effet des différents substrats prébiotiques sur la croissance et l'acidification des souches du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* ainsi que la production des acides organiques et des acides gras à courte chaîne par ces souches.

Les résultats observés démontrent que les cinq substrats prébiotiques (son de blé, son d'avoine, chicorée, pectine et lactulose) ont un effet qui varie selon leur composition et leur structure et même selon le pouvoir dégradable des souches. Le substrat qui a pu stimuler significativement la croissance de la majorité des souches testées en monoculture est le lactulose qui est le seul à marquer une bonne croissance des souches en sa présence.

Les souches sont différenciées par leur pouvoir de dégradation selon les systèmes enzymatiques qu'elles possèdent. On remarque cette différenciation dans le procédé de fermentation du son de blé qui a été bien dégradé par les deux souches lactobacilles *Lb. acidophilus* (LbA-CECT 4529) et *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS, et faiblement dégradé par les trois autres souches. La totalité des souches n'ont pas pu dégrader le son d'avoine et la pectine.

Par ailleurs, le pouvoir d'acidification des milieux est une preuve de capacité des souches de fermenter ces substrats prébiotiques et les convertir en acides gras à courte chaîne. On peut noter, une accumulation continue d'acide lactique dans les milieux de fermentation inoculés par les souches lactiques du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* après 24 et 48h de fermentation.

Cette concentration en lactate varie selon la source de carbone présente dans le milieu de culture. C'est sur substrat référentiel monomère et non prébiotique (i.e. le glucose) fermenté par *Lb. plantarum* Lbp-CECT748 que la production d'acide lactique a été la plus élevée dans le milieu (soit 1.9 mg/mL après 48h), suivie par celle sur lactulose (soit 1.7 mg/mL après 48h de culture). L'accumulation des acides gras volatils à chaîne courte (AGCC) représenté beaucoup plus par l'acétate était beaucoup plus élevée dans les cultures conduites en présence des glucides monomères ou dimères (glucose et lactulose) que dans celles contenant des substrats complexes plus polymérisés (Chicorée, son de blé).

Selon les scores d'activité- prébiotique de cinq substrats ont été calculés en fonction de la biomasse générée par les cinq souches bénéfiques et par la souche pathogène *Escherichia coli* ATCC 25922, avec utilisation du glucose comme substrat monomère référentiel de croissance. Il apparait que le score d'activité prébiotique le plus élevé exercé sur l'ensemble des souches est celui observé en présence du son entier de blé et le plus faible est obtenu en présence de la pectine pour toute les souches testées.

Lorsque, les fibres de son de blé sont présents dans les milieux de fermentation des différentes souches bactériennes étudiées comme seul source de carbone, on enregistre une croissance satisfaisante de toutes les souches, soit une amélioration moyenne de 30% par rapport à leur croissance dans le son entier de blé, cette amélioration touche également la production des acides gras à courtes chaînes où l'acide acétique, propionique et butyrique sont produits en quantité satisfaisante par l'ensemble des souches à l'exception de la souche *Lb.plantarum*.

En ordre générale, la stimulation de la croissance des souches bénéfiques par le son entier d'avoine et ces extraits est faible. Une stimulation significative de la croissance des souches testées de 75% par les fibres insolubles de son de blé par rapport aux fibres insolubles de son d'avoine est enregistrée, ceci exclu l'effet prébiotique de son d'avoine sur les souches testées.

Selon l'étude *in vivo* sur des souris femelles Swiss conventionnelles, le son de blé favorise l'implantation des souches bénéfiques, induit une réduction des aérobies et une augmentation des anaérobies dans le tube digestif des souris. Les examens histologiques révèlent la présence d'inflammation et de nécrose chez les souris gavées avec *Lb. acidophilus*. Une immunomodulation est observée en présence de la souche expérimentale *Lb. rhamnosus* LBRE-LSAS.

Cette étude fournit une base pour l'évaluation et combinaison de probiotiques et les ingrédients prébiotiques pour des applications autant que symbiotiques dans la laiterie et d'autres produits alimentaires.

En prospectives, une extrapolation chez l'être humain est nécessaire pour confirmer ces résultats et prouver l'innocuité des souches testées. Ainsi l'étude de l'effet de son d'avoine *in vitro* et *in vivo* sur d'autres souches du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*.est recommandée.

## Références Bibliographiques

### A

1. **Alanna J., Moshfegh E., James E., Joseph P., Goldman K et Chug A. (1999).** Présence d'inuline et d'oligofructose dans les diètes des Américains. *Journal of Nutrition*; 129:1407-1411.
2. **Alli P., Scholtense P., Raes, M., Hensen, K., Jongen, H., Rummens, J. L. (2007).** Effect of prebiotic galacto-oligosaccharide, long-chain fructooligosaccharide infant formula on serum cholesterol and triacylglycerol levels. *Nutrition*; 23:719-723
3. **Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M., et Hassana, F. A. (2013).** Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods*; 5: 1542–1553.
4. **Apajalahti J.H., Kettunen H., Kettunen A., Holben W.E., Nurminen P.H., Rautonen N., et Mutanen M. (2002).** Cultureindependent microbial community analysis reveals that inulin in the diet primarily affects previously unknown bacteria in the mouse cecum. *Appl. Environ. Microbiol.*;68: 4986-95.
5. **Arabbi P.R.,** Genovese M.I. Lajolo F.M. (2004). Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. *Journal of Agric. Food Chem*; 52: 1124-1131.
6. **Arnold J. N., Dwek R. A., Rudd, P. M., et Sim, R. B. (2006).** Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and in disease. *Immunology Letters* ;106:103-110.
7. **Arslanoglu S., Moro G.E., Schmit J., Tandoi L., Rizzardi S., et Boehm G. (2008).** Intervention Alimentaires précoce avec un mélange d'oligosaccharides prébiotiques réduit l'incidence des manifestations allergiques et les infections au cours des deux premières années de la vie. *Journal Nutrition* ; 138 : 1091-1095.
8. **Asahara T., Nomoto K., Shimizu K., Watanuki M., et Tanaka R. (2001).** Increased resistance of mice to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection by synbiotic administration of *Bifidobacteria* and transgalactosylated oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*; 91: 985-996

### B

9. **Bayliss C.E., et Houston A.P. (1984).** Characterization of plant polysaccharide and mucin fermenting anaerobic bacteria from human feces. *Applied and Environmental Microbiology*; 48:626-632.
10. **Bengmark S. (2010).** Pre-pro-, synbiotics and human health. *Food Technol Biotechnol*; 48:464-75.
11. **Bergonzelli G.E., Blum S., Brussow H., et Corthesy-Theulaz I. (2005).** Probiotics as a treatment strategy for gastrointestinal diseases. *Digestion*; 72:57-68.
12. **Bernier J.J. (1998).** Les bactéries et les aliments dans le côlon. *Eds Doin, Paris, :* 383-411.
13. **Berrada N., Lemeland J. F., Laroche G., Thouvenot P., et Piaia M. (1991).** *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *J Dairy Sci*; 74:409-413.
14. **Bezkorovainy A. (2001).** Probiotics :determinants of survival and growth in the gut. *Am j Clin Nutr*; 73(3):399-405.
15. **Biesebeke R.T., Boesten R., Klaassen E.S., Booijink C.C., DE Vries M.C., et DE Vos W.M. (2004).** Microbial Functionality in the human Gastrointestinal tract. *Microbes Environ.* 4: 276-280.
16. **Bigard M.A. (1994).** Gaz intestinaux. Editions techniques, Encycl. Med. Chir. (Paris-France), *Gastroentérologie*; 5p.
17. **Bomba A., Nemcova R., Gancarcikova S., Herich R., Guba P., et Mudronova D. (2002).** Improvement of the probiotic effect of microorganisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. *British Journal of Nutrition*;88: 95-99.
18. **Bouhnik Y., Flourie B., et Riottot M. (1997) .** Effects of fructo-oligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans. *Nutr. Cancer*, , 26:21-9.
19. **Bouhnik Y., Raskine L., Champion K., Andrieux C., Penven S., Jacobs H., et Simoneau G. (2007).** Prolonged administration of low dose inulin stimulates the growth of bifidobacteria in humans. *Nutrition research*; 27:187-193.
20. **Bouhnik Y., Raskine L., Simoneau G., Vicaut E., Neut C., Flourie B., Brouns F., Bornet F.R., (2004).** The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose–response relation study. *American Journal of Clinical Nutrition*; 80:1658–1664.
21. **Bouhnik Y., Vahedi K., Achour L. (1999).** Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. *J. Nutr.*; 129: 113-6.
22. **Brighenti F. (2007).** Inulin and oligofructose: dietary fructans and serum triacylglycerols: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Nutr*;137:2552-2556.
23. **Broekaert W. F., Courtin C., et Delcour J. (2011a).** Arabinoxylan oligosaccharide preparation. *British Journal of Nutrition*;18: 59-67.
24. **Buddington K. K., Donahoo J. B., et Buddington R. K. (2002).** Dietary oligofructose and inulin. protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. *Journal of Nutrition*; 132: 472-477.
25. **Bugaut M., et Bentéjac M. (1993).** Biological effects of short-chain fatty acids in nonruminant mammals. *Annual Review of Nutrition*; 13: 217-241.

## C

26. **Campbell J. M., Fahey G. C., et Wolf, B. W. (1997).** Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *Journal of Nutrition*; 127: 130–136.
27. **Candela M., Maccaferri S., Turrone S., Carnevali P., et Brigidi P. (2010).** Functional intestinal microbiome, new frontiers in prebiotic design. *International Journal of Food Microbiology*; 140: 93–101.
28. **Cani P.D. (2009).** Modulation nutritionnelle du microbiote intestinal: Impact sur la perméabilité intestinale et les désordres métaboliques. *Médecine des maladies métaboliques*; 3 :280-284.
29. **Carabin I.G., Flamm W.G. (1999).** Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*; 30: 268-282.
30. **Caselato S. V. M., Freitas S., et Sgarbieri V. C. (2011).** The importance of prebiotics in functional foods and clinical practice. *Food and Nutrition Sciences*; 2(2): 133–144.
31. **Cerf-Bensussan N., Jarry A., Brousse N., et Guy-Grand D. (1991).** Système immunitaire associé à l'intestin. *Encycl Med Chir*, Editions techniques, 1991, Gastroentérologie, Paris, 6P.
32. **Charalampopoulos D. (2009).** Immunological effects of probiotics and their significance to human health. *Prebiotics and Probiotics. Science and Technology.*; 2:901-948.
33. **Chen R., Wu J., Lee S., Huang A. et Wu H. (2000).** Increase of intestinal *Bifidobacterium* and suppression of coliform bacteria with short-term yogurt ingestion. *International Dairy Journal*; 82: 2308-2314
34. **Cherbut C. (2002).** Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. *Br. J. Nutr.* ;87 (suppl 2) : 159-162.
35. **Cherbut C. (2003).** Prébiotiques et fonctions gastro-intestinales : revue des effets et des perspectives. *Cahier de Nutrition et de Diététique*; 38 : 346-54.
36. **Chonan O., Takahashi R., et Watanuki M. (2001).** Role of activity of gastrointestinal micro flora in absorption of calcium and magnesium in rats fed  $\beta$  (1, 4) linked galactooligosaccharides. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*; 65: 1872-1875.
37. **Chow J. (2002).** Probiotics and prebiotics : A brief overview. *Journal of Renal Nutrition* ;12 :76-86.
38. **Cloetens L. (2009).** In vivo evaluation of the gastrointestinal effects of arabinoxylan-oligosaccharides in healthy subjects (Doctoral thesis in Medical Sciences). Leuven, Belgium: Katholieke Universiteit Leuven (p. 199).
39. **Collins M.D., Gibson G.R. (1999).** Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*; 69: 1052-1057.
40. **Connolly M. L., Lovegrove J. A., et Tuohy M. K. (2010).** Konjac glucomannan hydrolysate beneficially modulates bacterial composition and activity within the faecal microbiota. *Journal of Functional Foods* ; 2 : 219–224.
41. **Corthier G., et Raibaud P. (1993) Ecologie intestinale, flore de barrière, flore en transit et translocation bactérienne. In : Diarrhées aiguës infectieuses, Rambaud J.C, Rampal P (Eds), Doin, Paris, 1993 : 1-10.**

42. **Costabile A., Klinder A., Fava F., Napolitano A., Fogliano V., Leonard C., Gibson G.R., et Tuohy K.M. (2007).** Whole-grain wheat breakfast cereal has a prebiotic effect on the human gut microbiota: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Br J Nutr.*; 29:1-11.
43. **Cumming J.H., Pomare E.W., et Mc Farlane (1991).** The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. applied Bacteriol*; 70:443-459.
44. **Cummings J.H., Macfarlane G.T (1991).** The control, consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol*; 70:443-459.
45. **Cummings J.H., Macfarlane G.T., Englyst H.N. (2001).** Prebiotic digestion and fermentation, *American journal of clinical Nutrition*; 73: 415-420.

## D

46. **Date Y., Nakanishi Y., Fukuda S., Nuijima Y., Kato T., Umehara M., Ohno H., et Kikuchi J. (2014).** In vitro evaluation method for screening of candidate prebiotic foods. *Food Chemistry*; 152 : 251–260.
47. **De Man J.C, Rogosa M., et Sharpe M.E. (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J.appl.Bacteriol*; 23:130-135.
48. **De Roissart H., et Luquet F.M. (1994)** *Bactéries lactiques. Br J Nutr.*;23:56-61.
49. **Delzenne N. M., Neyrinck A. M., Bäckhed F., et Cani P. D. (2011).** Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nature Reviews Endocrinology*; 7: 639-646.
50. **Delzenne, N. M., Daubioul, C., Neyrinck, A., Lasa, M., & Taper, H. S. (2002).** Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals, review of biological events and future prospects. *British Journal of Nutrition*;87(Suppl. 1) :255-259.
51. **Demigné C., Jacobs H., Moundras C., Davicco M. J., et Horcajada M. N. (2008).** Comparison of native or reformulated chicory fructans, or nonpurified chicory, on rat cecal fermentation and mineral metabolism. *European Journal of Nutrition*; 47: 366-374.
52. **Dervilly G., Lecjercq C., Roue C., Thibault J.F. et Saulnier L. (2002).** Isolation and characterization of high molar mass water soluble arabinoxylans from barley and barley malt. *Carbohydrate polymers*; 47:143-149.
53. **Diez-García F., Chakrabarty A., González C. et Douglas V. (2012).** An Argrich putative prebiotic protein is as stable as its Lys-rich variant. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 528 (2012) 118–126.
54. **Dongowski G., et Lorenz A. (1998).** Unsaturated oligogalacturonic acids are generated by in vitro treatment of pectin with human fecal flora. *Carbohydrate Res.*; 314:237-244.
55. **Ducluzeau R., Ladira M. et Raibaud P. (1984).** Effet de l'ingestion de son de blé  
Sur la flore microbienne fécale de donneurs humains Et de souris gnotoxiniques receveuses,  
Et sur les effets de barrière exercés par ces flores L'égard de divers microorganismes  
potentiellement pathogènes. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* ; 135 A : 303-318.

## E

56. **Englyst H.N., Hay S., et Mc Farlane G.T. (1987).** Polysaccharides breakdown by mixed population of human fecal bacteria. *FEMS Microbiol Ecol*; 95:418-422.

57. **Esposito F., Arlotti G., Bonifati A.M., Napolitano A., Vitale D., et Fogliano V. (2005).**Antioxidant activity and dietary fibre in durum wheat bran by products. *Food Research International*; 38:1167-1173.

## F

58. **FAO/WHO (2001).** Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk live lactic acid bacteria. *Expert consultation report*: Cordoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization.
59. **Fawcett D.W.(1994).** A textbook of histology. 12<sup>th</sup> ed. Chapman & Hall.1994.
60. **Femia A. P., Luceri C., Dolara P., Giannini A., Biggeri A., et Salvadori, M. (2002).** Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*; 23: 1953-1960.
61. **Fooks L., et Gibson G.R. (2002).** Probiotics as modulators of the gut flora. *British journal of Nutrition*; 88:39-49.
62. **Fuller R. (1989).** Probiotics in man and animals. *J.Appl. Bact*; **66**:365-378.

## G

63. **García F.D., ChakrabarttyA., GonzálezC., et Douglas V. (2014).** An Arg-rich putative prebiotic protein is as stable as its Lys-rich variant. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 528 : 118–126.
64. **Gaudier E., Michel C., Segain J.P., Cherbut C. et Hoebler C. (2005).** The VSL# 3 probiotic mixture modifies microflora but does not heal chronic dextran-sodium sulfate-induced colities or reinforce the mucus barrier in mice. *Journal of Nutrition*; 135: 2753-2761.
65. **Geier M.S., Butler R.N., Howarth G.S. (2007).** Inflammatory bowel disease: Current insights into pathogenesis and new therapeutic option; probiotics, prebiotics and synbiotics. *International Journal of Food Microbiology*; 11: 1-11.
66. **Gibson G. R. (1998).** Dietary modulation of human gut microflora using prebiotics. *British Journal of Nutrition*; 80: 209–212.
67. **Gibson G.R. et Roberfroid M.B. (1995).** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.*; 125:1401-12.
68. **Gibson G.R., Beatty E.R., Wang X., et Cummings J.H. (1995).** Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*; 108: 975-82.
69. **Gibson G.R., Probert H.M., Van Loo J.A.E., Rastall R.A. et Roberfroid M.B. (2004).** Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 17/257-259.
70. **Gibson G.R., Wang X. (1994).** Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture. *FEMS. Microbiol Lett*; 118: 121-127.
71. **Gill S.R., Pop M., Deboy R.T., Eckburg P.B., Turnbaugh P.J., et Samuel B.S. (2006)** Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*; 312: 1355-1359.
72. **Gilliland S.E. (2001).** Probiotics and prebiotics.in Marth E.H. & Steel J.L. (Eds), *Applied dairy microbiology* (2<sup>nd</sup> ed, pp.327-343). New York: Marcel Dekker.

73. **Gionchetti P., Rizello F., Venturi A. et al. (2003).** Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*; 119: 305-9.
74. **Gokavi S., Zhang L.W., Huang M.K., et Guo M.G. (2005).** Oat based symbiotic beverage fermented by *Lactobacillus plantarum*. *Journal Food Science*; 70:216-223.
75. **Gostner A., Blaut M., Schaffer V., Koziowski G., et al.(2006).** Effect of isomalt consumption on faecal microflora and colonic metabolism in healthy volunteers. *British journal of Nutrition*; 95: 40-50.
76. **Griffin I.J., Davila P.M., Abrams S.A. (2002).** Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes. *Br. J. Nutr.*;87 (suppl 2):187-191.
77. **Grizard D. et Barthomeuf C. (1999).** Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Reproduction Nutrition Development*; 39: 563–588.
78. **Grootaert C., Delcour J. A., Broekaert W.F., Verstraete W., Wiele T.V. (2007).** Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. *Trends in Food Science & Technology*; 18:64-71.
79. **Guarner F., et Malagelada J.R.(2003).** Gut flora in health and disease. *Lancet*;361:512-519.
80. **Gulik P., Massar S., Gilis D., Buhrman H., et Rooman M. (2009).** The first peptides: The evolutionary transition between prebiotic amino acids and early proteins. *Journal of Theoretical Biology* ; 261: 531–539.
81. **Gullon B., Gullon P., Tavaría F., et Parajo K. (2014).** Structural features and assessment of prebiotic activity of refined arabinoxyloligosaccharides from wheat bran. *Journal of functional foods*; 6: 438-449.

## H

82. **Hanson L.A., Yolken R.H. (1999).** Probiotics, other nutritional factors, and intestinal microflora. *Nestlé Nutrition*; 42: 306-310.
83. **Hartemink R., Schoustra S. E., et Rombouts F. M. (1999).** Degradation of guar gum by intestinal bacteria. *Bioscience and Microflora* ; 18 : 17–25.
84. **Hartemink R., Van Laere K.M., et Rombouts F.M. (1997).** Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. *Journal of applied Microbiology*; 83:367-374.
85. **Hidaka H., Eida T., Takizawa T., Tokunaga T. et Tashiro Y. (1986).** Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora*; 5: 37 – 50.
86. **Hill M.J. (1997).** Bacterial fermentation of complex carbohydrate in the human colon. *Eur. J. Cancer Prev*; 4:353-358.
87. **Hoentjen F., Welling G. W., Harmsen H. J., Zhang X., Snart J., et Tannock G. W. (2005).** Reduction of colitis by prebiotics in HLA-B27 transgenic rats is associated with microflora changes and immunomodulation. *Inflammatory Bowel Disease* ; 11 : 977-985.

88. **Hosono A., Ozawa A., Kato R., Ohnishi Y., Nakanishi Y., et Kimura T. (2003).** Dietary fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine Peyer's patch cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*; 67:758-764.
89. **Hu J.L., Nie S.P., Li C., et Xie M.Y. (2013).** In vitro fermentation of polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. by human fecal microbiota. *Food Hydrocolloids*; 33:384-392.

90. **Huebner J., Wehling R.L., Hutkins R.W. (2007).** Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*; 17: 770-775.
91. **Hughes R. et Davoodi-semiromi Y., Colee J.C., Culpepper T., Dahl W.J., Mai V., Christman M.C. et Langkamp-Henken B. (2011).** Supplémentation galactooligosaccharides réduit une étude randomisée, en double aveugle, contrôlée chez les étudiants en bonne santé. *Journal Clin Nutrition* ; 23 : 76-86.

### J

92. **Jakobsdottir G., Nyman M., et Fak F. (2013).** Designing future prebiotic fiber to target the metabolic syndrome. *Nutrition*; 14:1-6.
93. **Johnston K. L., Thomas E. L., Bell J. D., Frost G. S., et Robertson M. D. (2010).** Resistant starch improves insulin sensitivity in metabolic syndrome. *Diabetic Medicine*;

### K

94. **Karppinen S., Liukkonen K., Aura A.M., Forssell P., et Poutanen K. (2000).** In vitro fermentation of polysaccharides of rye, wheat and brans and inulin by human faecal bacteria. *Journal of the science of Food and Agriculture*; 80:1469-1476.
95. **Kedia G., Vazquez J.A., et Pandiella S. (2008).** Enzymatic digestion and in vitro fermentation of oat fractions by *lactobacillus* strains. *Enzyme and Microbial technology*; 43:355-361.
96. **Kelly C.P., et LaMont J.T. (2008).** *Clostridium difficile* more difficult than ever.; 359: 1932-40.
97. **Kimura K., McCartney A.L., McConnell M.A., et Tannock G.W. (1997).** Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. *App. Environ. Microbiol*; 63: 3394-8.
98. **Kleessen B., Hartmann L., et Blaut M. (2001).** Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *British Journal of Nutrition*;;86: 291-300.

### L

99. **Langlands S. J., Hopkins M. J., Coleman N., et Cummings J. H. (2004).** Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel. *Gut*; 53: 1610-1616.
100. **Le Blay G., Michel C., Blottiere H.M., et Cherbut C. (1999).** Prolonged intake of fructooligosaccharides induces a shortterm elevation of lactic acid producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. *J. Nutr.*; 129: 2231-5.
101. **Li D., Kim J. M., Jin Z., et Zhou J. (2008).** Prebiotic effectiveness of inulin extracted from edible burdock. *Anaerobe*; 14 (1), 29-34.

102. **Lim C.C., Ferguson L.R., Tannock G.W. (2005).** Dietary fibres as “prebiotics”: implications for colorectal cancer. *Mol Nutr Food Res*; 49: 609–19.
103. **Liu Z., Lin X., Huang G., Zhang W., Rao P. et Li N. (2014).** Prebiotic effects of almonds and almond skins on intestinal microbiota in healthy adult humans. *Anaerobe*; 26: 1-6.
104. **Lopez-Molina D. et Navarro-Maetinez M.D. (2005).** Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus L.*). *Phytochemistry*; 66: 1476-1484.

## M

105. **Macfarlane G., Gibson G., et Cummings J (1992).** Estimation of short chain fatty acid production from protein by human intestinal bacterial based on branched chain fatty acid measurements. *FEMS Microb Ecol*; 101:81-88.
106. **Madhukumar M. S., et Muralikrishna G. (2010).** Structural characterisation and determination of prebiotic activity of purified xylo-oligosaccharides obtained from Bengal gram husk (*Cicer arietinum L.*) and wheat bran (*Triticum aestivum*). *Food Chemistry* ; 118: 215–223.
107. **Madsen K.L., Doyle J.S., Jewell L.D., Tavernini M.M., et Fedorak R.N. (1999).** Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology*; 116: 1107-14.
108. **Maes C., et Delcour J.A. (2002).** Structural characterisation of water extractable and water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. *Journal of Cereal Science*; 35:315-326.
109. **Mai V., et Morris J.G. (2004).** Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age. *Journal of Nutrition*; 134:459-464.
110. **Mandalari G., Faulds C.B., Sancho A.I., Saija A., Bisignana G., LoCurto R., et Waldron K.W. (2005).** Fraktionation and characterisation of arabinoxylans from brewers spent grain and wheat bran. *Journal of Cereal Science*; 42: 205-212.
111. **Manisseri C. et Gudipati M. (2010).** Bioactive xylooligosaccharides from wheat bran soluble polysaccharides. *LWT-Food Science and Technology*; 43: 421-430.
112. **Marlett J.A., Mc Burney M.I., et Slavin J.L. (2002).** Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *Journal American Diet Association*; 102: 993-1000.
113. **Marteau P., et Shanahan F. (2003).** Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*; 17: 725-740.
114. **Marteau P., Lepage P., Mangin I., Suau A., Doré J., Pochart, P., et Seksik, P. (2004).** Review article: gut flora and inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol Ther.* 20 (4): 18-23.
115. **Martensson O., Biorklund M., Lambo A.M., Duenas-chasco M., Irastorza A., Holst O., Norin E., Welling G., Oste R. et Onning G. (2005).** Fermented, ropy, oat-based products reduce cholesterol levels and stimulate the bifidobacteria flora in humans. *Nutrition Research*; 25:429-442.
116. **Maurice C.F, Haiser H. J, Turnbaugh P.J. (2013).** Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human cut. *Microbiome*;152: 39-50.

117. **Menne E., Guggenbuhl N. et Roberfroid M. (2000).** Fn-type chicory inulin hydrolysate has a prebiotic effect in humans. *American society for Nutritional Sciences*; 22: 1197-1199.
118. **Mimura T., Rizzello F., Helwig U., Poggioli G., Schreiber S., et Talbot I. C. (2004).** Once daily high dose probiotic therapy (VSL 3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut*; 53: 108-114.
119. **Mitsuoka T., Hidaka H. et Eida T. (1987).** Effect of fructooligosaccharides on intestinal microflora. *Nahrung*; 31: 5 – 6.
120. **Morais E.C., Cruz A.G., Faria J.A.F. et Bolini H.M.A. (2014).** Prebiotic gluten-free bread: Sensory profiling and drivers of liking. *Food Science and Technology* ; 55: 248-254.
121. **Morris J.G. Maurice R., Boilletot E., et Cotte J.P. (1993).** Assessment of the activity of a fructooligosaccharide on different caecal parameters in rabbits experimentally infected with *E.coli*. *Annals of Zootechnology*; 42:1-87.
122. **Moura P., Barata R., Carvalheiro F., Girio F., Loureiro-Dias M.C. et Esteves M.P. (2007).** In vitro fermentation of xylooligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *LWT*, 40:963-972.
123. **Moura P., Cabanas S., Lourenc P., Girio F., Loureiro-Dias M. C., et Esteves M. P. (2008).** In vitro fermentation of selected xylooligosaccharides by piglet intestinal microbiota. *LWT – Food Science and Technology* ; 41 : 1952–1961.
124. **Munjal U., Gleis M., Pool-Zobel B. L., et Scharlau, D. (2009).** Fermentation products of inulin-type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of different stages of carcinogenesis. *British Journal of Nutrition*; 27: 1-9.
125. **Mussamatto S. I., et Mancilha, I. M. (2007).** Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate Polymers*; 68: 587-597..

## N

126. **Napolitano A., Costabile A., Martin-Pelaez S., Vitaglione P., Klinder A., Gibson G.R. et Fogliano V. (2009).** Potential prebiotic activity of oligo-saccharides obtained by enzymatic conversion of durum wheat insoluble dietary fibre into soluble dietary fibre. *Nutrition, Metabolism et Cardiovascular Diseases*; 19: 283- 290.
127. **Nazzaro F., Fratianni F., Nicolaus B., Poli A., et Orlando P. (2012)** .The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Anaerobe*; 18: 280-285.

## O

128. **Oelschlaeger T.A. (2010).** Mechanisms of probiotic actions-A review. *International journal of medical Microbiology*; 300: 57-62.
129. **O'Hara A.M. et Shanahan F. (2006)** The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*; 7:688-693.
130. **Olano-Martin E., Gibson G.R., et Rastall R.A. (2002).** Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of applied Microbiology*; 93:505-511.
131. **Oliveira R.P., Rodrigues F., Perego P., Oliveira M.N., et Converti A. (2011).** Use of lactulose as prebiotic and its influence on the growth, acidification profile and viable counts of different probiotics in fermented skim milk. *International Journal of Food Microbiology*; 145 : 22–27.

132. **Ouwehand A.C., Salminen S. et Isolauri E. (2002).** Probiotics: an overview of beneficial effects. *Anton Leeuw Int J Gen Mol Microbiol*; 82: 279-289.

## P

133. **Paik Y.H., Lee K.S. et Han K.H. (2005).** Comparaison des rifaximine et lactulose pour le traitement de l'encéphalopathie hépatique : une étude randomisée prospective. *Yonsei Revue médicale* ; 46 : 399 :407.
134. **Palframan R., Gibson G.R., et Rastall R.A. (2003).** Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*; 37: 281–284.
135. **Papillon E., Bonaz B., Fournet J. (1999).** Acides gras à chaîne courte : effet sur le fonctionnement gastro-intestinal et potentiel thérapeutique en gastroentérologie. *Gastroenterol Clin Biol* ; 23 : 761-769.
136. **Parnell J. A., et Reimer R. A. (2009).** Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *American Journal of Clinical Nutrition*; 89: 1751-1759.
137. **Pierre F., Perrin P., Champ M., Bornet F., Meflah K., et Menanteau J. (1997).** Shortchain fructo-oligosaccharides reduce the occurrence of colon tumors and develop gut-associated lymphoid tissue in Min mice. *Cancer Research*; 57:225-228.
138. **Pochart P., Marteau P., Bouhnik Y., Goderel I., Bourlioux, P., et Rambaud J. C. (1992).** Survival of *Bifidobacteria* ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. *Am J Clin Nutr*; 55: 78-80.
139. **Pompei A., Cordisco L., Raimondi S., Amaretti A., Pagnoni U. M, Matteuzzi D., Rossi M. (2008).** *In vitro* comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans. *Anaerobe*; 14: 280-286.
140. **Prosky L., Asp N.G., Schweizer T., et Devries J. (1992).** Determination of insoluble and soluble dietary fibre in foods and food products. *J. Assoc Official Anal Chem*; 75: 360-7.

## Q

141. **Quigley E.M.M. (2010).** Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacological Research*; 17: 259-275.

## R

142. **Resta S.C. (2009).** Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling. *J Physiol.*; 587:4169-4174.
143. **Ricardo P.S. O., Ana C.R., Roberta C., Perego P., et Marice N. (2009).** Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*; 128: 467-472.
144. **Rivas S., Gullo B., Gullo P., Alonso J. L., et Parajo J. C. (2012).** Manufacture and properties of bifidogenic saccharides derived from wood mannan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 60 : 4296–4305.
145. **Roberfroid M. (2000).** Prébiotiques et probiotiques: ils sont les aliments fonctionnels. *American Journal of Clinical Nutrition* ; 71 : 1682-1687.
146. **Roberfroid M. (2007).** Prebiotics: the concept revisited. *Journal of Nutrition*. 22: 134-139.

147. **Roberfroid M., Gibson G. R., Hoyles L., McCartney A. L., Rastall R., Rowland I. (2010).** Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition* ; 104(Suppl. 2) :1-63.
148. **Rodrigues D., Rocha-Santos T., Pereira P.I., Gomes A.M., Malcata F.X., Freitas A.C. (2011).** The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. *LWT Food Sci Technol*; 44:100-8.
149. **Rose D. J., et Inglett G. E. (2010).** Two-stage hydrothermal processing of wheat (*Triticum aestivum*) bran for the production of feruloylated
150. **Rubel I.A., P'erez E.E., Genovese D.B. et Manrique G.D. (2014).** *In vitro* prebiotic activity of inulin-rich carbohydrates extracted from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers at different storage times by *Lactobacillus paracasei*, *Food*
151. **Rycroft C.E., Jones M.R., Gibson G.R. et Rastall R.A. (2001).** A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J Appl Microbiol*; 91: 878 - 887.

## S

152. **Saad N., Delattre C., Urdaci M., Schmitter J.M., Bressollier P. (2013).** An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*; 50 : 1-16.
153. **Salminen S., et Salminen E. (1997).** Lactulose, lactic acid bacteria, intestinal microecology and mucosal protection. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*; 32: 45-48.
154. **Saunier K., et Dore J. (2002).** Gastrointestinal tract and the elderly: functional foods, gut microflora and healthy ageing. *Dig Liver Dis*; 34, Suppl. 2: 19-24.
155. **Scheppach W. (1994).** Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut* ;35:35-38.
156. **Schutz K., et Persike M. (2006).** Characterization and quantification of anthocyanins in selected artichoke (*Cynara Scolymus* L.) cultivars by HPLC-DAD-ESI-MS. *Anal Bioanal Chem.*; 22: 54-58.
157. **Simhon A., Douglas J.R., et Soothill J.F. (1982).** Effect of feeding on infants faecal flora. *Arch. Dis. Child*; 57:54-58.
158. **Simon G.L., et Gorbach S.L (1984).** Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology*;86(1):174-193.
159. **Stahl W., et Sies H. (2005).** Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta*; 1740: 101-107.
160. **Stewart C., Hillman K., Maxwell F., Kelly D., et King T. (1993).** Recent advances in probiosis in pigs: observations on the microbiology of the pig gut. Recent advances in animal nutrition. *Nottingham University Press*; 197-220.
161. **Su P., Henriksson A., et Mitchell H. (2007).** Selected prebiotics support the growth of probiotic mono-cultures *in vitro*. *Anaerobes*; 13:134:139.
162. **Swanson K.S., Grieshop C.M., Flickinger E.A., Bauer L.L., Wolf B.W., et Chow J.M. (2002).** Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* modify bowel function and protein catabolites excreted by healthy humans. *J Nutr*; 132: 3042-350.

163. **Swennen K., Courtin C.M., et Delcour J.A. (2006).** Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 46: 459-471.

### T

164. **Tako E., Glahn R. P., Welch R. M., Lei X., Yasuda K., et Miller D. D. (2008).** Dietary  
 165. **Tamime A.Y., Marshall V.M., et Robinson R.K., (1995).** Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *J.Dairy Res.*;62:151-187.  
 166. **Truswell A.S. (2002).** Cereal grains and coronary heart disease. *Eur J. Clin Ntr.* 56:1-14.

### V

167. **Van Craeyveld V., Swennen K., Dornez E., Van de Wiele T., Marzorati M., Verstraete W., Delaet Y., Onagbesan O., Decuypere E., Buyse J., De Ketelaere B., Broekaert W. F., Delcour, Ch. M., et Courtin, Ch. M. (2008).** Structurally different wheat-derived arabinoxylooligosaccharides have different prebiotic and fermentation properties in rats. *The Journal of Nutrition*; 138 : 2348–2355.  
 168. **Van de Wiele T., Boon N., Possemiers S., et Verstraete W., (2004).** Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*; 51: 143-153.  
 169. **Van der Meulen R., Makras L., Verbrugghe K., Adriany T. et De Vuyst. (2006).** In vitro Kinetic analysis of oligofructose consumption by Bacteriodes, Bifidobacterium spp. indicates different degradation mechanisms. *Appl Environ Microbiol* ;721: 006-1012.  
**Vander Gulik A., Massar B., Dimitri Gilis C., Harry Buhrman D. et Marianne Rooman C. (2009).** The first peptides: The evolutionary transition between prebiotic inulin affects the expression of intestinal enterocyte iron transporters, receptors and storage protein and alters the microbiota in the pig intestine. *British Journal of Nutrition*; 99: 472-480.  
 170. **Vardakou M., Palop C.N., Gasson M., Christakopoulos P., et Narbad A. (2008).** Evaluation of the prebiotic properties of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity in gut microflora. *International Journal of Food Microbiology*; 123: 166–170.  
 171. **Vardakou M., Palop C.N., Gasson M., Narbad A. et Christakopoulos P. (2007).** In vitro three-stage continuous fermentation of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity by the gut microflora. *International Journal of Biological Macromolecules*; 41:584-589.  
 172. **Vos A., M'rabet L., Stahl B., Boehm G. et Garssen J. (2007).** Immune-modulatory effects and potential working mechanisms of orally applied nondigestible carbohydrates. *Crit Rev Immunol.*; 27(2):97-140.

### W

173. **Wang J., Sun B., Cao Y., Tian Y. et Wang C. (2009).** Enzymatic preparation of wheat bran xylooligosaccharides and their stability during pasteurization and autoclave sterilization at low pH amino acids and early proteins. *Journal of Theoretical Biology*; 26: 531–539.  
 174. **Wang Y. (2009).** Prebiotics: present and future in food science and technology. *Food Reasearch International*; 42: 8-12.

175. **Wang Y., Han F., Hu B., Li J. et Yu W (2006).** *In vivo* prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate. *Nutrition Research*; 26: 597-603.
176. **Wickens K., Black P.N., Stanley T.V., Mitchell E., Fitzharris P., et Tannock G.W. (2008).** The Probiotic Study Group. A differential effect of 2 probiotics in the prevention of eczema and atopy: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*; 122:788-94.
177. **Wong J.M., de Souza R., Kendall C.W., Emam A., Jenkins D.J. (2006).** Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol*; 40: 235-243.

#### Y

178. **Yang M.H. et Choong Y.C. (2001).** A rapid gas chromatographic method for direct determination of short –chain (C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>) volatile organic acids in foods. *Food Chemistry*; 75: 101-108.
179. **Yasuhiro Date, Yumiko Nakanishi, Shinji Fukuda, et Jun Kikuchi. (2014).** In vitro evaluation method for screening of candidate prebiotic foods. *Food Chemistry*; 152: 251–260.
180. **Yuan X., Wang J., et Yao H. (2005).** Feruloyl oligosaccharides stimulate the growth of *Bifidobacterium bifidum*. *Anaerobes*; 11:225-229.

#### Z

181. **Zhou J.S., Shu Q., Rutherford K.J., Prasad J., Birtles M.J., Gopal P.K. et Gill H.S. (2000).** Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice. *International Journal of Food Microbiology*; 56: 87-96.