

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Mustapha Stambouli de Mascara  
Faculté des sciences de la nature et de la vie  
Département de biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de  
**DOCTORAT**

**Spécialité : Sciences de la vie**

**THEME**

***Effet préventif et curatif de certains  
aliments fonctionnels sur le  
développement du cancer colorectal***

*Présenté par :*

*Amar Sidi Mohamed El Yacine*

**Mr. Meddah. B - Professeur U. Mascara - Président**

**Mr. Boudjama - Professeur U. Tlemcen - Examineur**

**Mr. Abbouni B – Professeur U. SBA – Examineur**

**Mr. Raho B – MCA. U. Mascara – Examineur**

**Mme Mullie C – HDR U. Amiens - Examinatrice**

**Mme Tirtouil. A - Professeur U. Mascara – Encadreur**

**Mr. Ferlazzo. G – Professor U. Messina - Co Encadreur**

*Année universitaire: 2014- 2015*

## Remerciements

A l'exemple de mon idole je dirai "On ne peut être qu'humble serviteur devant celui qui nous apprendra ne serais qu'une lettre", que dire alors à ceux qui nous ont éclairé le chemin, qui nous ont appris à peser mots et idées et qui ont contribué pour une grande part à faire de nous ce que nous sommes aujourd'hui.

J'exprime ma reconnaissance et mes plus sincères sentiments de gratitude à mon cher encadreur Madame Tirtouil Meddah, pour sa présence, sa générosité et ses qualités au combien humaines. De même je remercie Mr Ferlazzo pour ses précieux conseils et aimables orientations.

J'adresse également mes profonds remerciements aux examinateurs, d'avoir aussi modestement accepté de juger ce travail et pour leur patience lors de sa lecture.

Un remerciement spécial à ma famille notamment à ma très chère et tendre mère et à tout ceux qui mon aidé et soutenu pour la réalisation de cet ouvrage, à Irene, Gory, Riccardo, Tania, Rafaella et Martina qui mon chaleureusement accueillit et aidé.

## Résumé

De nombreuses études soutiennent l'idée que la microflore du côlon intervient pour une grande part dans l'étiologie du cancer colorectal. Du fait, un grand intérêt s'est développé en faveur d'aliments fonctionnels capable de prévenir son évolution en modulant la flore intestinale et/ou son métabolisme. L'objectif de cette étude est la sélection d'une combinaison symbiotique dotée de caractéristiques prévenant et/ou limitant le développement de cette pathologie. Au total 22 souches lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Streptococcus* ont été caractérisées pour leurs potentialités probiotiques, puis évaluées pour leurs habilités à former des combinaisons symbiotiques avec des extraits phénoliques du *Rosmarinus officinalis* et du *Citrus cinensis*. Ensuite, l'extrait phénolique sélectionné est étudié pour ses effets antioxydants et antiprolifératifs. Les résultats obtenus suggèrent que les composés phénoliques du romarin lui confèreraient des propriétés biologiques intéressantes notamment une activité antimicrobienne à l'égard des pathogènes de même que leur sensibilisation à l'action des antibiotiques. Cet extrait avait non seulement épargné la croissance des souches probiotiques, mais également amélioré leurs habilités d'adhésion et d'agrégation. Les fortes activités antioxydante et antitumorale observées chez la fraction Méthanolique de cet extrait, particulièrement riche en acide rosmarinique, seraient en faveur de sa potentialité chimio-thérapeutique. L'extrait méthanolique du *Rosmarinus officinalis* pourrait renfermer des candidats prébiotiques dotés de potentialités anticancéreuses. Nous avons en outre démontré dans cette étude que *Lactobacillus reuteri* 5289, peut inhiber la production d'IL-12 chez des cellules dendritiques induites par *Lactobacillus acidophilus* NCFM. L'inhibition de l'IL-12 a été observée non seulement pour les lactobacilles, comme indiqué jusqu'ici, mais aussi pour des bactéries de genres différents, y compris des agents pathogènes. L'étude des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'inhibition de l'IL-12 par *L. reuteri* 5289, avait révélée que l'activité anti-inflammatoire observée est associée à une phosphorylation prolongée de la voie ERK1/2 des MAP kinases. Une meilleure compréhension des mécanismes de régulation immunitaire exercée par les lactobacilles est cruciale pour un emploi plus efficace de souches probiotiques dans les pathologies inflammatoires de l'intestin ainsi que la prévention de la tumeur colorectal.

**Mots clés :** Cancer colorectal, Polyphénols, Probiotique, Prebiotique, Symbiotique.

## Abstract

Many studies support the idea that the microflora of the colon occurs largely in the aetiology of colorectal cancer. Thus, great interest has developed in favour of functional foods capable of preventing its development by modulating the intestinal flora and/or its metabolism. The objective of this study is the selection of a symbiotic combination with characteristics preventing and/or limiting the development of this pathology. A total of 22 lactic strains belonging to the genus *Lactobacillus* and *Streptococcus* were characterized for their probiotic potentials and then evaluated for their ability to form symbiotic combinations with phenolic extracts obtained from *Rosmarinus officinalis* and *Citrus cinensis*. Then the selected phenolic extract was studied for its antioxidant and antiproliferative effects. The results suggest that Rosemary phenolic compounds confer interesting biological properties including antimicrobial activity against pathogens and also by enhancing their sensitiveness toward the antibiotics. This extract had not only stimulated the growth of probiotic strains, but also improved their adhesion and aggregation abilities. The strong antioxidant and antitumor activity observed in the methanol fraction of this extract, rich in rosmarinic acid, would be in favour of its chemotherapeutic potential. The methanolic extract of *Rosmarinus officinalis* could contain prebiotics candidates with anticancer potentials. We also demonstrated in this study that *Lactobacillus reuteri* 5289, can inhibit the production of IL-12 in dendritic cells induced by *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Inhibition of IL-12 was observed not only for lactobacilli, as shown so far, but also for different kinds of bacteria, including pathogens. The study of intracellular signalling pathways involved in the inhibition of IL-12 by *L. reuteri* 5289, had revealed that the observed anti-inflammatory activity is associated with prolonged phosphorylation of ERK1/2 MAP kinase. A better understanding of immune regulatory mechanisms applied by lactobacilli is crucial for more effective use of probiotic strains in inflammatory bowel diseases and the prevention of colorectal tumor.

**Keywords:** Colorectal cancer, Polyphenols, Probiotic, Prebiotic, Symbiotic.

# Sommaire

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Liste des abréviations**

**Introduction** ..... 1

## **Chapitre I: Le colon physiologique et Cancéreux**

**I.1. Le Tube digestif** ..... 3

I.1.1. Généralités sur le tube digestif..... 3

I.1.2. Anatomie physiologique de la muqueuse intestinale..... 4

I.1.3. Le Colon physiologique..... 6

1.3.1. Topographie..... 6

1.3.2. Structure..... 6

1.3.3. Fonctions..... 7

**I.2. Cancer du colon**..... 8

I.2.1. Epidémiologie..... 8

I.2.2. Eléments de la Tumorigénèse..... 8

I.2.3. Les différentes phases de la Tumorigénèse..... 10

I.2.4. Aspects moléculaires et génétiques..... 12

I.2.5. Facteurs de risque..... 12

I.2.6. Rôle de la flore digestive dans l'initiation ou la promotion du cancer du côlon..... 14

2.6.1. Flore commensale et inflammation..... 14

2.6.2. Métabolisme et synthèse de carcinogènes par les bactéries commensales..... 14

2.6.3. Biotransformation des acides biliaires..... 15

2.6.4. Effets sur le cancer.....	15
----------------------------------	----

## **Chapitre II. Aliments fonctionnels en prévention de cancer colorectal**

<b>II.1. Aliments fonctionnels.....</b>	<b>16</b>
---	-----------

II.1.1. Concept.....	16
----------------------	----

II.1.2. Définitions.....	16
--------------------------	----

II.1.3. Modulation de la microflore intestinale.....	16
--	----

1.3.1. Approche probiotique.....	16
----------------------------------	----

1.3.2. Approche prébiotique.....	19
----------------------------------	----

1.3.3. Approche symbiotique.....	20
----------------------------------	----

<b>II.2. Aliments fonctionnels en prévention du Cancer colorectal.....</b>	<b>21</b>
--	-----------

II. 2.1. Alimentation et Cancer.....	21
--------------------------------------	----

II.2.2. Mécanismes d'action.....	22
----------------------------------	----

2.2.1. Changement du pH du Colon.....	22
---------------------------------------	----

2.2.2. Altération du métabolisme des xénobiotiques dans le système intestinal.....	22
--	----

2.2.3. Modulation de la réponse immunitaire.....	23
--	----

2.2.4. Réduction de l'inflammation intestinale.....	23
---	----

2.2.5. Propriétés anti-oxydantes.....	23
---------------------------------------	----

2.2.6. Anti-mutagénéité.....	24
------------------------------	----

<b>II.3. Aliments fonctionnels d'origine végétale.....</b>	<b>24</b>
--	-----------

II.3.1. Principaux groupes d'aliments fonctionnels.....	24
---	----

II.3.2. Composés phénoliques et microflore intestinale.....	26
---	----

## **Chapitre III : Matériel et Méthodes**

<b>III.1. Objectifs.....</b>	<b>28</b>
------------------------------	-----------

<b>III.2. Matériel biologique et réactifs</b> .....	29
<b>III.3. Caractérisation des souches probiotiques</b> .....	30
<b>3.1. Résistance a la barrière gastro-intestinale</b> .....	29
<b>3.2. Impact de la source de carbone sur L’habilité d’adhésion</b> .....	30
3.2.1. Effet sur la capacité d'auto-agrégation.....	30
3.2.2. Effet sur l’habilité d'adhésion aux solvants.....	31
3.2.3. Effet sur la production d'exopolysaccharides probiotiques.....	31
<b>III.4. Evaluation de la potentialité prébiotique des extraits phénoliques du <i>Rosmarinus officinalis</i> et <i>Citrus cinensis</i></b> .....	31
4.1. Obtention des extraits phénoliques.....	32
4.2. Evaluation de la potentialité prébiotique.....	32
4.3. Effet antimicrobien des extraits phénoliques.....	32
4.4. Effets des extraits sur l’habilité d’agrégation et d’adhésions des probiotiques.....	33
4.5. Effet des extraits phénoliques sur l’antibiorésistance des pathogènes.....	33
<b>III.5. Propriétés antiproliférative et antioxydante de l’extrait sélectionné</b> .....	33
5.1. Produits chimiques.....	34
5.2. Extraction des composés phénoliques du <i>Rosemarinus officinalis</i> .....	34
5.3. Lignées cellulaire et conditions de culture.....	34
5.4. Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux.....	35
5.5. Identification des composés phénoliques.....	35
5.6 Mesure de l’activité antioxydante.....	35
a) Test de neutralisation du radical DPPH.....	35
b) Le test de réduction du radical ferrique FRAP .....	36
5.7. Evaluation des propriétés antiprolifératives.....	36
a) Cyto-toxicité : Méthode d’exclusion au Trypan bleu.....	36
b) Analyse du cycle cellulaire.....	37
c) Analyse de l’apoptose.....	37
<b>III.6. Etude des propriétés immuno-modulateurs d’une souche probiotique</b>	
6.1. Souches bactérienne et des conditions de croissance . . . . .	38
6.2. Génération des cellules dendritiques à partir des monocytes .....	38

6.3. La stimulation des cellules dendritiques avec des bactéries .....	38
6.4. Immuno-marquage et cytométrie en flux .....	39
6.5. Quantification des cytokines dans le surnageant de culture .....	39
6.6. Phosphorylation des MAPK .....	39
<b>III.7. Analyse statistique.....</b>	<b>40</b>
 <b>Chapitre IV : Résultats et discussion</b>	
<b>IV.1. Isolement et Caractérisation des candidats probiotiques. . . . .</b>	<b>41</b>
<b>1.1. Résistance à la barrière gastro-intestinale.....</b>	<b>41</b>
<b>1.2. Impact de la source de carbone sur les propriétés d'adhésion.....</b>	<b>44</b>
1.2.1. Effet sur la capacité d'auto-agrégation.....	44
1.2.2. Effet sur l'habilité d'adhésion.....	46
1.2.3. Effet sur la production d'EPS probiotiques.....	47
<b>IV.3. Potentialité prébiotique des extraits phénoliques du Romarin et Citrus.....</b>	<b>48</b>
IV.3.1. Effet antibactérien des extraits phénoliques du Romarin et du Citrus.....	49
IV.3.2. Effet des extraits phénoliques sur l'habilité d'adhésion et d'agrégation.....	50
3.2.1. Effet des extraits phénoliques sur la propriété auto-agrégation.....	51
3.2.2. Effets des extraits du Romarin et du Citrus sur l'habilité d'adhésion.....	53
3.2.3. Effet des extraits phénoliques sur l'antibiorésistance des pathogènes.....	55
<b>IV.4. Propriétés antioxydantes et antiproliférative des extraits du Romarin.....</b>	<b>57</b>
VI.4.1. Caractérisation physico-chimique .....	57
VI.4.2. Tests antioxydants.....	59
VI.4.3. Effet antiprolifératif des extraits du romarin.....	61
4.3.1. Evaluation de la cytotoxicité.....	61
4.3.2. Analyse du cycle cellulaire.....	63
4.3.3. Effet Apoptotique.....	65
<b>IV.5. Etude des propriétés immuno-modulatoires d'une souche probiotique.....</b>	<b>67</b>
5.1. <i>Lactobacillus reuteri</i> 5289 inhibe l'IL-12 produit par les DCs stimulées.	67
5.2. Régulation positive du CD80 et CD83 dans les cellules dendritiques.....	70
5.3. IL-12 est associée à une inhibition prolongée de la phosphorylation ERK 1/2 .....	73

<b>Conclusion</b> .....	75
<b>Références bibliographiques</b> .....	78

**Liste des tableaux :**

<b>Tableau 1:</b> Bactéries probiotiques et leurs bénéfices sanitaires attribués.....	18
<b>Tableau 2 :</b> Exemples des principaux probiotiques, prébiotiques et symbiotiques.....	20
<b>Tableau 3 :</b> Phytochimiques associés a la prévention des cancers.....	25
<b>Tableau 4 :</b> Polyphénols et microbiote intestinal.....	27
<b>Table 5:</b> Effet de la source de carbone sur la production des exopolysaccharides probiotiques.....	48
<b>Table 6:</b> Caractérisation par chromatographie à haute pression (HPLC) des extraits méthnolique (ME) et d'acétate d'éthyle (EA) du Romarin à 280nm.....	59
<b>Table 7.</b> Activité anti-oxydante des extraits phénoliques du <i>Rosemarinus officinalis</i> .....	60
<b>Tableau 8.</b> Les valeurs d'IC50 $\pm$ SD des extraits du <i>Rosemarinus officinalis</i> et du Taxol après 24 heures d'exposition.....	61

## Liste des figures:

<b>Figure 1:</b> Schéma anatomique du tube digestif.....	3
<b>Figure 2:</b> Structure anatomique responsable d'un accroissement de la surface réelle de la muqueuse intestinale.....	4
<b>Figure 3 :</b> Structure de l'épithélium intestinal.....	5
<b>Figure 4:</b> Structure de la surface du colon.....	7
<b>Figure 5:</b> Segments du colon avec l'activité bactérienne et les différences physiologiques correspondantes.....	7
<b>Figure 6 :</b> Modifications acquises au cours de la tumorigenèse.....	9
<b>Figure 7 :</b> Evolution multiphasique d'une crypte normale en adénocarcinome et mutations associées à chaque étape.....	10
<b>Figure 8:</b> Interactions hôte-microbes et impact des pré-probiotiques.....	17
<b>Figure 9 :</b> Mécanismes supposés de l'action des probiotiques, prébiotiques et symbiotiques sur la transition des cellules normales vers des cellules cancéreuses.....	22
<b>Figure 10 :</b> Interactions entre les Composés phénoliques et le microbiote intestinal.....	26
<b>Figure<sup>o</sup> 11:</b> Résistance des souches de <i>Lactobacillus</i> à la barrière gastro-intestinale.....	41
<b>Figure 12:</b> Résistance des souches de <i>Streptococcus</i> à la barrière gastro-intestinale.....	42
<b>Figure 13:</b> Activité inhibitrice des souches lactiques l'égard de <i>S. aureus</i> 6538 et <i>E.coli</i> 25922.....	43
<b>Figure 14:</b> Effet de la source carbone sur l'habilité d'auto-agrégation des candidats probiotiques.....	45
<b>Figure 15:</b> Effet de la source de carbone sur la propriété d'adhésion des candidats probiotiques.....	46
<b>Figure 16:</b> Effet des extraits Méthanoliques du <i>Rosmarinus officinalis</i> et du <i>Citrus cinensis</i> sur les souches probiotiques et pathogènes.....	49
<b>Figure 17 :</b> Effet des extraits phénoliques sur les propriétés d'auto-agrégation des souches probiotiques.....	51
<b>Figure 18 :</b> Effet des extraits phénoliques sur les propriétés d'auto-agrégation des souches pathogènes.....	52
<b>Figure 19 :</b> Effet des extraits phénoliques sur les propriétés d'adhésion des souches probiotiques et pathogènes.....	54

<b>Figure 20 :</b> Effet des extraits phénoliques sur l'antibiorésistance des souches pathogènes..	56
<b>Figure 21:</b> Chromatogrammes HPLC-MS des extraits du <i>Rosmarinus officinalis</i> enregistrés à 280nm.....	58
<b>Figure 22:</b> Cytotoxicité de l'extrait du romarin sur deux lignées cellulaires tumorales et les cellules mononucléaires du sang périphérique.....	62
<b>Figure 23:</b> Analyse de la distribution du cycle cellulaire chez lignées cancéreuses U937 et CaCo-2 traitées avec deux différents extraits du <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	64
<b>Figure 24:</b> Effet Apoptotique des extraits méthanolique et acétate d'éthyle du romarin sur lignées cancéreuses U937 CaCo-2 après 24h d'exposition.....	65
<b>Figure 25 :</b> Effet apoptotique des extraits du Romarin sur la lignée cellulaire CaCo-2 après 24h d'exposition aux extraits méthanolique et acétate d'éthyle.....	66
<b>Figure 26:</b> Production de cytokines chez les cellules dendritiques dérivées des monocytes stimulées avec des souches Gram positives et Gram négatives en combinaison avec <i>L reuteri</i> 5289.....	68
<b>Figure 27:</b> Une régulation positive des marqueurs de surface suite à la stimulation des DCs par des bactéries Gram positives et Gram négatives.....	71
<b>Figure 28:</b> Effets des stimuli bactériens sur la phosphorylation des p38 et ERK1/2 MAPKinases.....	73

## **Liste des abréviations :**

**GI :** Gastro-intestinal

**CCR :** Cancer colorectal

**LOH :** Loss Of Heterozygosity

**MSI :** Loci microsatellites

**RER:** Replication error

**PAF :** Polypose adénomateuse familiale

**HNPCC:** Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer

**DMH :** 1,2-Dimethylhydrazine

**AOM :** Azoxymethane

**DCA :** Acide déoxycholique

**LCA :** Acide lithocholique

**IBD :** Inflammatory bowel diseases

**MICI :** Maladies Inflammatoire chronique de l'intestin

**ROS :** Espèces réactives de l'oxygène

**PBS :** Solution tampon phosphate

**MATS :** Adhésion microbienne aux solvants

**DMSO :** Dimethyl sulfoxide

**PBMC :** Cellules mononuclées du sang périphérique

**DPPH:** 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

**FRAP :** Test de réduction du radical ferrique

**DMEM :** Dulbecco Minimal essential medium

**EPS:** Exopolysaccharides

**DCs:** Cellules dendritiques

**IL :** Interleukine

**MAPK :** Mitogen-activated protein kinases

# **Introduction Générale**

Chaque année, environ un million de nouveaux cas de cancer colorectaux sont diagnostiqués dans le monde, et plus de 500 000 décès sont signalés (**Jemal et al, 2011**). La tumeur colorectale est la deuxième cause de mortalité après celle du cancer du poumon chez les hommes et celui du sein chez les femmes et a montré peu de signes de diminution au courant des 20 à 30 dernières années (**Rafter, 2003**). L'apport alimentaire contribue fortement à son développement, jusqu'à 75% des cas étant supposés être associé à l'alimentation, ce qui implique que le risque de voir naître cette affection serait potentiellement réductible (**Saikali et al, 2004**). Par ailleurs, un grand nombre d'études soutient l'idée que la microflore du côlon intervient pour une grande part dans l'étiologie de ce type de cancer. Du fait, un grand intérêt s'est développé en faveur d'aliments fonctionnels probiotiques, prébiotiques ou leur combinaison en symbiotiques ayant la caractéristique de prévenir le développement de ce cancer en modulant la flore intestinale et/ou son métabolisme (**Cho et Finocchiaro, 2010**). Il fut également suggéré par plusieurs auteurs que l'association symbiotique serait plus efficace que les deux approches séparées (**Rafter, 2003**). Toutefois, la limitation de l'approche prébiotique peut être due à la faible sélectivité de ces ingrédients alimentaires introduit seuls ou en symbiotiques au risque d'encourager la croissance des pathogènes intestinaux. A partir de là, de nouveaux candidats prébiotiques plus sélectifs ou même ayant une action directe sur les agents pathogènes intestinaux sont maintenant ciblés (**Amar et al, 2012**). Compte tenu de l'association entre consommation des fruits et légumes et la régression en fréquence des cancers, les plantes comestibles sont de plus en plus considérées comme source potentielle de médicaments anticancéreux (**Liu et al, 2012., Sharif et al, 2012**). Ainsi, les composés phytochimiques alimentaires présentent un intérêt grâce à leur grande variété en composés biologiquement actifs, y compris les polyphénols comme les flavonoïdes, les tanins hydrolysables et condensés (**Feng et al, 2007., Zakaria et al, 2011**). En particulier les polyphénols avaient démontrés des effets anticancéreux par des mécanismes impliquant leur propriétés antioxydante, anti-proliférative et anti-inflammatoire ainsi que leurs effets sur les voies de signalisation intracellulaires faisant intervenir l'apoptose et l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire (**Zakaria, 2011., Gonzalez- Sarrias et al, 2012**). Ils constituent donc une source prometteuse de composés chimiothérapeutiques potentiels (**Lambert et al, 2005., McCann, 2007**) comptant plus de 8000 composés différents décrits jusqu'à présent (**Manach et al, 2005**). Par ailleurs, une inflammation chronique du côlon, dans le cas de colite ulcéraire ou de maladie de Crohn notamment, a souvent été considérée comme un facteur prédisposant au cancer colorectal (**Collins et al, 2006., WCRF, 2007**). Ainsi, la réduction de

l'inflammation intestinale par le biais d'interventions probiotiques à caractère immuno-modulateur aurait le potentiel de mener à une réduction de l'incidence du cancer colorectal (**Van Guelpen et al, 2006., Tooley et al, 2006**). L'objectif principal de cette étude est la sélection d'une combinaison symbiotique capable de prévenir le développement du cancer colorectal. Plusieurs souches lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Streptococcus* ont été caractérisées pour leurs potentialités probiotiques, puis évaluées pour leurs habilités à former des combinaisons symbiotiques avec des extraits phénoliques du *Rosmarinus officinalis* et du *Citrus cinensis*. Dans une seconde étape, l'extrait phénolique sélectionné (celui du Romarin dans notre étude) est étudié pour ses effets antioxydants et antiprolifératifs sur un modèle tumoral intestinal représenté par la lignée cellulaire Caco-2 et une autre lignée tumorale sanguine U937 servant de contrôle. De même les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs) sont utilisées afin d'évaluer son impact sur des cellules non tumorales. En vue d'élucider les processus cellulaires impliqués dans l'activité anticancéreuse, l'extrait phénolique du Romarin est étudié pour ses propriétés cytotoxiques, sa capacité modulateur du cycle cellulaire ainsi que ses effets pro-apoptotiques. Dans la dernière partie de ce travail nous évaluons le mécanisme régissant l'activité anti-inflammatoire d'une souche lactique à potentiel probiotique utilisant comme modèle *in vitro* des cellules dendritiques générées à partir de monocytes. La propriété immuno-modulateur de la souche concernée *L.reuteri* 5289 est estimée en terme de production de cytokines pro ou anti-inflammatoires, de l'expression de marqueurs de maturation ainsi que l'évaluation des voies de signalisation intracellulaires.

# **Partie Bibliographique**

# *Chapitre I*

## **Le colon physiologique et cancéreux**

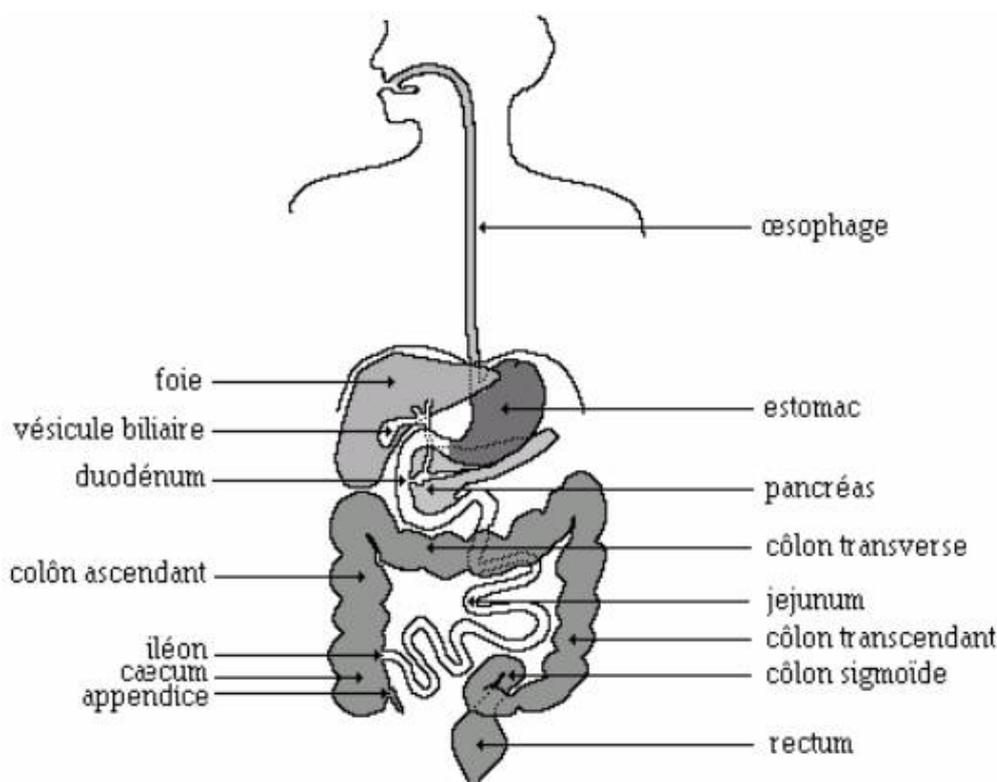
"La vérité est un miroir tombé de la main de Dieu et qui s'est brisé.  
Chacun en ramasse un fragment et dit que toute la vérité s'y trouve"

Jalâl al-Dîn Rûmî.

## I.1. Le Tube digestif :

### 1.1. Généralités sur le tube digestif :

Le tractus gastro-intestinal (GI) est responsable de la digestion des aliments, de leur dégradation en protéines, glucides, lipides, sels minéraux, oligoéléments et autres substances utilisables par l'organisme. Il permet également le transport de ces nutriments à travers la muqueuse intestinale vers la circulation sanguine de façon à ce qu'ils puissent être utilisés par l'organisme, ceci correspond à l'absorption (**Cinquin, 2005**). Cet appareil diffère beaucoup d'une espèce à l'autre, ainsi par exemple la fermentation des fibres alimentaires a lieu chez l'homme dans le côlon alors qu'elle a lieu chez les ruminants dans le rumen (situé avant l'intestin grêle) (**Roberfroid, 2002**).

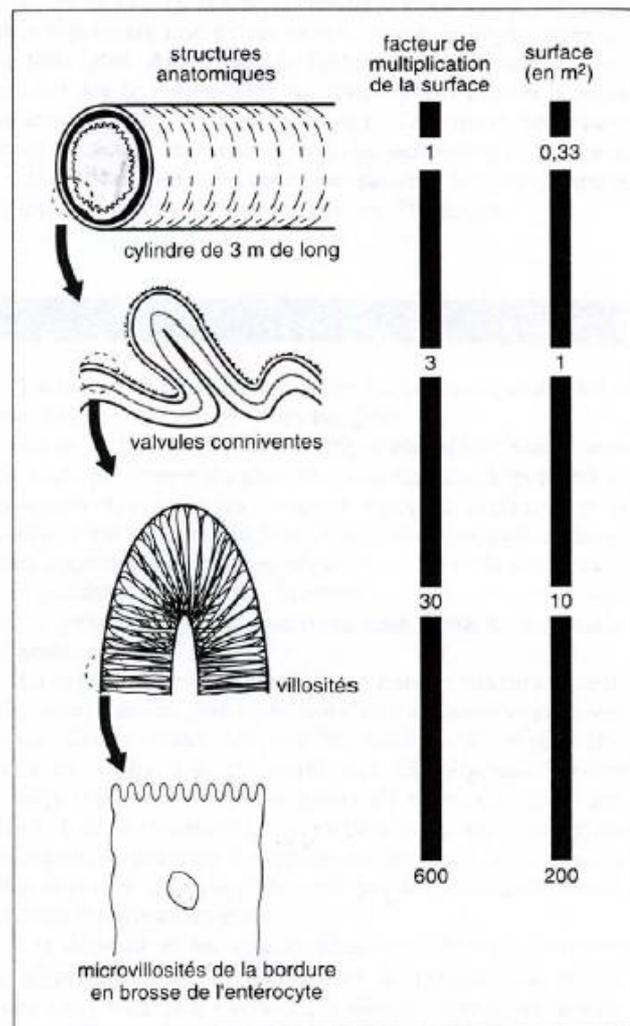


**Figure 1:** Schéma anatomique du tube digestif (**Bernier, 1997**)

L'écosystème GI est généré par une alliance stable entre l'épithélium GI, le système immunitaire et une importante flore microbienne. Ces trois composants sont continuellement liés entre eux et évoluent ensemble en assurant une fonction et une activité de l'écosystème. Si l'un des trois composants est défaillant, l'alliance est altérée et par conséquent diverses pathologies s'y installent (**McCraken et Lorenz, 2001**).

## 1.2. Anatomie physiologique de la muqueuse intestinale :

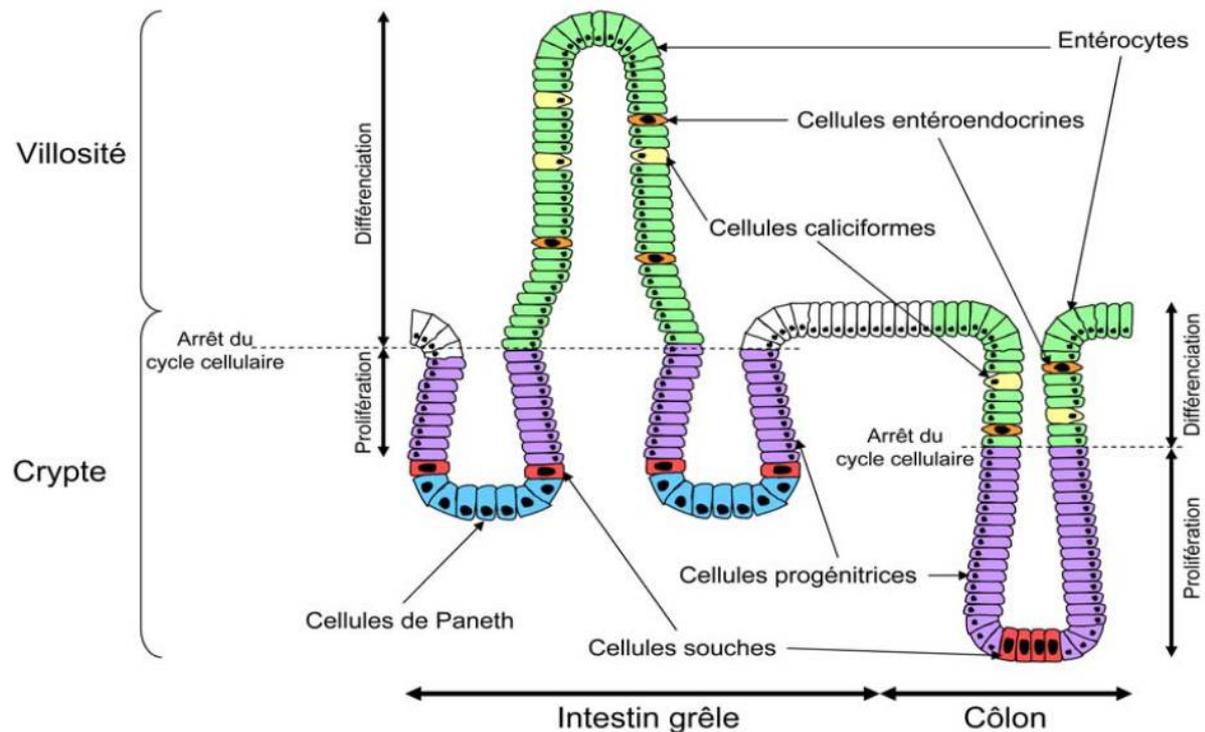
La muqueuse est fortement pliée et les plis formés sont orientés vers la lumière intestinale. La surface interne du tube se trouve alors augmentée (200 à 300 m<sup>2</sup>) ce qui accroît la digestion et l'absorption. De plus la muqueuse est arrangée pour former une panoplie de prolongement en doigts (0.5-1mm de long) connus sous le nom de villosités et qui sont en nombre de 20 à 40/mm<sup>2</sup>.



**Figure 2:** Structure anatomique responsable d'un accroissement de la surface réelle de la muqueuse intestinale (Friemel et Jarry, 2004)

La couverture de la surface épithéliale est une couche de mucus de 10 à 250 µm d'épaisseur, l'épithélium est constitué principalement de cellules épithéliales en colonne, cellules absorbantes (entérocytes) et cellules calciformes sécrétant le mucus. La surface des

entérocytes est formée de petits plis appelés microvillosités, qui fournissent une très large surface communément appelée « bordure en brosse » (Wilson, 2005).



**Figure 3 :** Structure de l'épithélium intestinal. L'intestin grêle et le côlon présentent un épithélium polarisé avec des cellules prolifératives localisées à la base des cryptes. Au fur et à mesure que les cellules migrent vers la partie apicale, elles se différencient pour former les entérocytes et les cellules sécrétrices (caliciformes et entéroendocrines). L'intestin grêle se caractérise par sa structure en villosités et la présence de cellules de Paneth. Le côlon présente une surface plane et les cellules de Paneth sont absentes (Sanchez *et al*, 2004).

Il existe dans la muqueuse entre les bases des villosités un bon nombre de cryptes (cryptes de Liber Kühn) entre 6 et 10, ce sont les unités prolifératives de la muqueuse et contiennent des cellules indifférenciées. Les cellules sortent des cryptes et bougent de la base de la villosité vers son sommet, en se transformant en : entérocytes, cellules calciformes ou en cellules endocrines, à l'arrivé au sommet chacune d'elles est larguée dans le lumen. Le processus entier dure environ trois jours. Les cryptes produisent un quatrième type de cellules « cellules de Paneth » qui y restent et synthétisent une gamme de composés antimicrobiens.

La couche du mucus est essentiel pour le maintient intestinal, elle assure la lubrification, une protection de l'intestin contre les attaques de l'acidité enzymatique et des toxines, elle constitue un substrat pour plusieurs espèces microbiennes, permet de détacher les microorganismes, et peut servir en plus comme antioxydant (Kohen *et al*, 1993).

### 1.3. Le Colon physiologique :

#### 1.3.1. Topographie :

Le gros intestin comprend le caecum, colon (ascendant, transverse, descendant et sigmoïde), rectum et canal anal. Il est d'approximativement 150 cm de long, 6.5 cm de diamètre d'un volume d'à peu près 540 ml, et d'une surface d'environ 1250 cm<sup>2</sup>, cette dernière ne contient pas de plis ou de villosités permanentes (**Wilson, 2005**) et présente un aspect relativement lisse, bien qu'elle soit parsemée de nombreuses glandes qui s'ouvrent à sa surface. Les types cellulaires ressemblent à ceux de l'intestin grêle mais le nombre de cellules calciformes y est beaucoup plus élevé (**Hartley et al, 1979**). .

#### 1.3.2. Structure :

Le côlon est constitué de quatre tuniques : séreuse, musculuse, sous-muqueuse et muqueuse.

- *La séreuse*

Formée du péritoine viscéral, elle comprend un mésothélium et une couche sous-séreuse de tissu conjonctif lâche, riche en tissu adipeux au niveau des appendices épiploïques.

- *La musculuse*

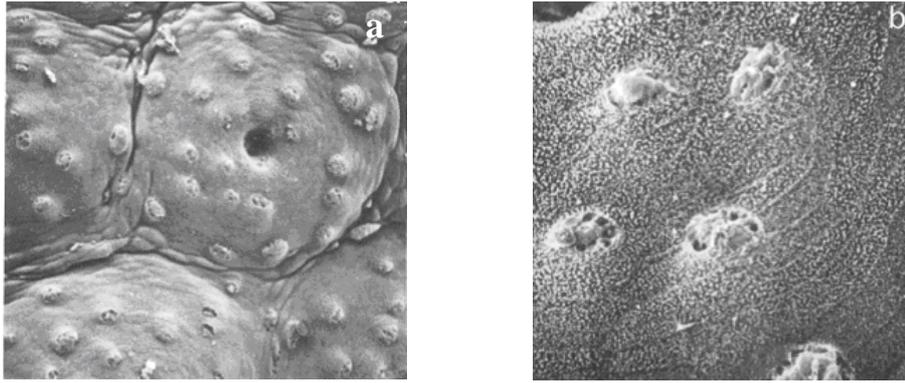
Sa couche externe est constituée de myofibres lisses longitudinales. Cette couche mince s'épaissit par endroits au niveau des ténias coliques en bandelettes longitudinales. Sa couche interne est constituée de myofibres lisses circulaires.

- *La sous-muqueuse*

Elle est constituée de tissu conjonctif lâche contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des cellules adipeuses, un plexus nerveux et des follicules lymphatiques solitaires. Ces follicules sont plus nombreux au niveau de l'appendice vermiforme (**Krstic, 1991**).

- *La muqueuse*

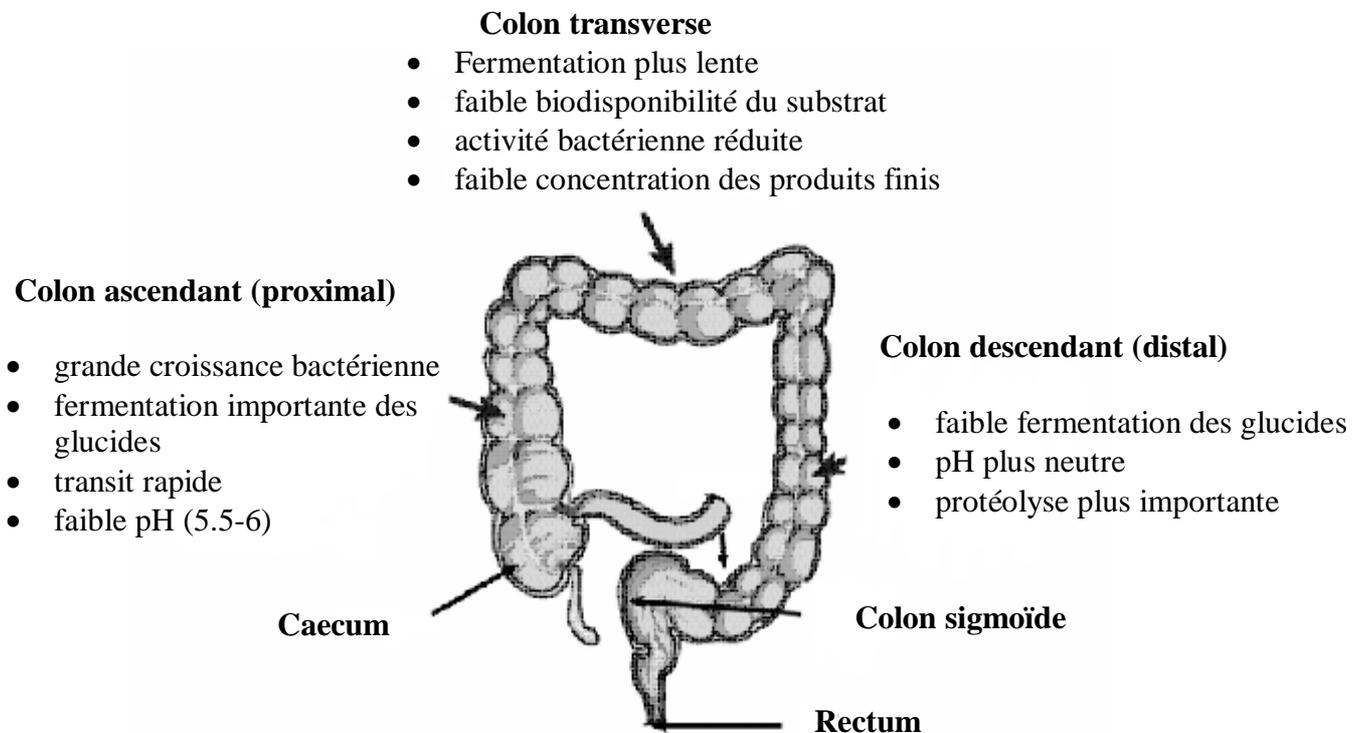
Elle ne présente pas de villosités. Elle est épaisse, soulevée par les crêtes des plis semilunaires. Sa surface est parsemée des orifices des cryptes intestinales. Son épithélium est cylindrique simple avec des endocrinocytes gastro-intestinaux. Les cryptes sont riches en cellules calciformes. Sa *lamina propria* est un conjonctif lâche, bien vascularisé et innervé et sa *musculosa* est une fine couche de myofibres lisses (**Krstic, 1991**).



**Figure 4:** Structure de la surface du colon. *a)* unité polygonale avec crypte centrale, X 650. *b)* Cellules calciformes de la bordure en brosse sécrétant du mucus (Hartley *et al*, 1979).

### 1.3.3. Fonctions :

Sur le plan fonctionnel le colon peut être divisé en deux parties séparées par le colon transverse : colon droit et colon gauche. Le colon droit (caecum et colon ascendant) joue un rôle majeur dans l'absorption de l'eau et des électrolytes, de même que dans la fermentation des sucres non digérés, le colon gauche (colon descendant, colon sigmoïde et rectum) intervient dans l'entreposage et l'évacuation des déchets (Nevière, 2005).



**Figure 5:** Segments du colon avec l'activité bactérienne et les différences physiologiques correspondantes (Vernazza *et al*, 2006)

Le chyme intestinal arrive semi pâteux dans le gros intestin où il subi d'importantes modifications. Tout d'abord un essorage par réabsorption d'eau a lieu. Il est également enrichit par la sécrétion de substances telles que les graisses neutres, des substances minérales diverses, des cellules intestinales et des fragments cellulaires provenant de la desquamation des muqueuses. Cette partie du tube digestif est le site d'une intense activité bactérienne. Il en résulte des produits alcalin souvent toxiques pour l'organisme (ammoniaque, phénols...) les produits toxiques absorbés par la muqueuse arrive au foie qui les transforment par glucuroconjugaison, avant leur élimination urinaire. Les matières fécales ont une origine endogène (3/4) et exogène (1/4) (**Calas et al, 1996**).

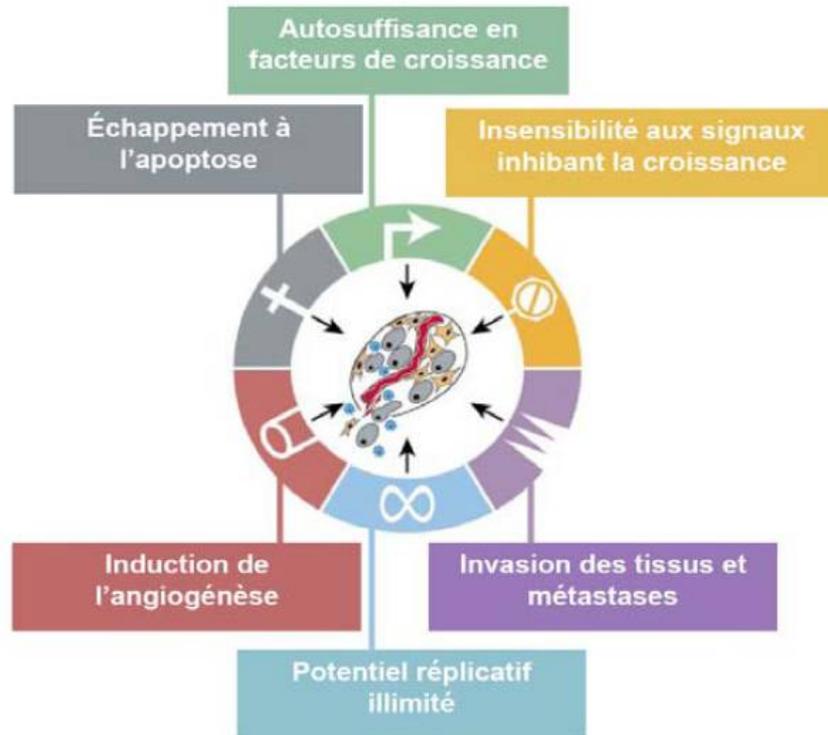
## **I.2. Cancer du colon**

### **I.2.1. Epidémiologie**

L'incidence du cancer du colon dans le monde est extrêmement variable selon les pays avec un rapport de 1 à 25 entre l'Inde pays le moins touché et l'Amérique du Nord pays le plus touché. Chaque année, environ un million de nouveaux cas de cancer colorectaux sont diagnostiqués dans le monde, et plus de 500 000 décès par an (**Jemal et al, 2011**). C'est la troisième tumeur maligne la plus diagnostiquée dans le monde d'après l'étude GLOBOCAN (**Parkin, 2001**) et le deuxième cancer le plus meurtrier après celui des poumons dans les pays occidentaux (**Parker, 1997**). Les pays riches et industrialisés sont les plus concernés avec une forte fréquence dans le nord et l'ouest de l'Europe. Dans la dernière étude Eurocare-4 du registre européen des cancer portant sur la période 2000-2002 le taux de survie relative à 5 ans est passé à 59.9 % au côté de la Belgique (60.7%), l'Allemagne (61.2%) et la Suisse (63.8%) (**Verdecchia et Francisci, 2007**). De plus, les émigrants originaires d'un pays pauvre acquièrent en une génération un taux de cancer colorectal qui se rapproche de celui des habitants de leur pays d'accueil. Ces faits suggèrent que le mode de vie, l'environnement, et l'alimentation ont un impact important sur le risque de développement du cancer (**WCRF, 2007**).

### **I.2.2. Eléments de la Tumorigénèse :**

**Hanahan et Weinberg (2000)** ont proposé que la formation d'une tumeur nécessite l'acquisition de 6 propriétés cellulaires (**Figure 6**):



**Figure 6 :** Modifications acquises au cours de la tumorigenèse. Selon cette théorie les cellules doivent accumuler 6 modifications, quel que soit le moyen, pour former un cancer. (**Hanahan et Weinberg, 2000**).

*a) Autosuffisance en signaux de croissance.*

La tumeur produit elle-même des signaux de croissance afin de ne pas dépendre totalement de son microenvironnement de ce point de vue.

*b) Insensibilité aux signaux inhibant la croissance.*

La prolifération des cellules est contrôlée au niveau du cycle cellulaire. Il existe des signaux qui bloquent le cycle cellulaire. Les cellules tumorales doivent échapper à ces signaux afin de proliférer.

*c) Potentiel répliatif illimité.*

Bien qu'étant dotées de capacités répliatives élevées, les cellules finissent toujours par arrêter de se multiplier par un mécanisme appelé sénescence. Celui-ci semble être en partie dépendant de l'érosion des télomères qui progresse au fur et à mesure des cycles de divisions. Une des caractéristiques des cellules tumorales est de limiter l'érosion des télomères et d'échapper ainsi aux mécanismes de sénescence. Cela permet aux cellules tumorales d'avoir la capacité de proliférer indéfiniment (**Hanahan et Weinberg, 2000**).

d) *Echappement à l'apoptose.*

Parallèlement à la prolifération, l'inhibition de l'apoptose contribue également à l'expansion d'une population cellulaire. Les tumeurs doivent devenir insensibles aux signaux initiant ce mécanisme.

e) *Induction de l'angiogénèse.*

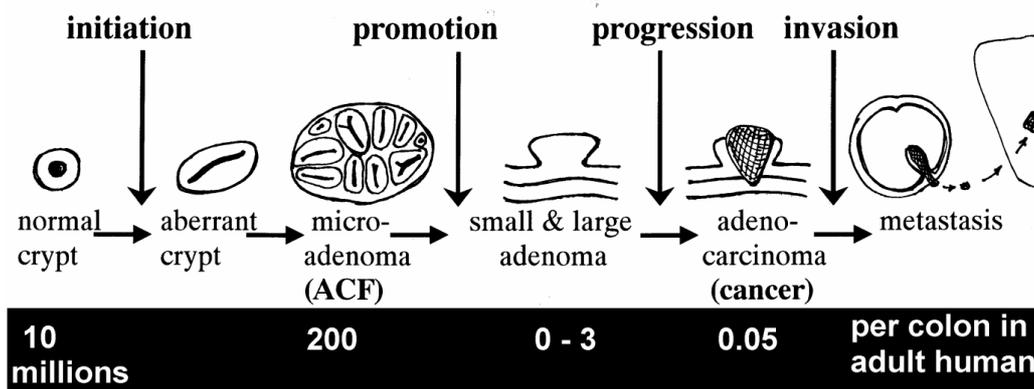
Les cellules nécessitent un apport en oxygène et en nutriments afin de survivre. Cet apport se fait par l'intermédiaire des vaisseaux sanguins. Lorsque la tumeur devient volumineuse, elle nécessite une irrigation plus importante. Elle doit être capable d'initier la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par un mécanisme appelé angiogénèse.

f) *Invasion des tissus et métastases.*

Durant le développement de la plupart des tumeurs, des cellules vont se détacher de la tumeur et être à l'origine de la formation de tumeurs dans d'autres organes. C'est cette dernière étape qui est souvent fatale au patient. Hanahan et Weinberg proposent que ces 6 propriétés soient communes à la plupart, voire à la totalité des tumeurs (**Hanahan et Weinberg, 2000**).

**I.2.3. Les différentes phases de la Tumorigénèse:**

La cancérogenèse est un processus multiphasique très complexe, qui se déroule sur une longue durée. Un modèle extrêmement simplifié de la cancérogenèse la divise en trois étapes : initiation, promotion, et progression (**Riboli et al, 1996**).



**Figure 7 :** Evolution multiphasique d'une crypte normale en adénocarcinome, et mutations associées à chaque étape (**Corpet, 2014**).

### **a) Initiation**

Lors de la phase d'initiation, les cellules acquièrent des altérations génétiques stables et transmissibles. Ces mutations peuvent être spontanées, ou induites par des agents carcinogènes physiques (radiations, traumatismes), chimiques (hydrocarbures polycycliques, toxiques végétaux...) ou biologiques (virus). Les cellules initiées le sont de façon irréversible. Les protooncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs ont un rôle fondamental dans l'apparition du cancer, puisqu'ils coordonnent le développement et la division cellulaire. Par mutation, ils deviennent des oncogènes en favorisant la prolifération cellulaire. Ces cellules sont donc anormales sans qu'aucune tumeur ne soit encore cliniquement observable, tant que d'autres agents, appelés promoteurs, n'interviennent pas (**Weinberg, 1996**).

### **b) Promotion**

Les cellules initiées peuvent persister dans l'organisme pendant de longues périodes, sans exprimer leurs potentialités oncogènes. La phase de promotion recouvre l'ensemble des mécanismes épigénétiques qui permettent le passage de cet état quiescent à l'expansion clonale des cellules initiées. Elle a toujours lieu après la phase d'initiation, mais un même agent peut être à la fois initiateur et promoteur. Contrairement à l'initiation, la phase de promotion est réversible, au moins dans ses premiers stades (**Riboli et al, 1996**).

### **c) Progression et invasion**

L'initiation et la promotion sont inapparentes cliniquement. La phase de progression aboutit à l'émergence clinique de la tumeur. Elle met en jeu, à nouveau, des mutations génétiques. Lors de la phase d'invasion, des cellules tumorales se disséminent dans l'organisme par voie sanguine ou lymphatique, et forment des métastases à distance. Le malade meurt rarement de la tumeur primaire ; ce sont généralement les métastases qui conduisent à la mort (**Riboli et al, 1996**).

Le CCR est précédé dans 60 à 80% des cas et pendant de nombreuses années d'une tumeur bénigne épithéliale : l'adénome (**Bedenne et al, 1992**). Les adénomes sont très fréquents: leur prévalence varie entre 7 et 20%. Sur 100 adénomes, 10 atteindront 1 cm et 3 deviendront des cancers (**Grepithe, 1981**). Les facteurs qui influencent le risque de transformation maligne des adénomes sont leur taille, leur nombre, leur degré de dysplasie et la présence d'un comportement vilieux. La durée de la séquence adénome-cancer est estimée à 9 ans pour un adénome macroscopiquement visible (**Faivre, 2001**).

#### **I.2.4. Aspects moléculaires et génétiques :**

Dans 80% des cas de cancers du côlon gauche, elles font partie du groupe des tumeurs LOH+ (Loss Of Heterozygosity), et se traduisent par des pertes alléliques sur les chromosomes 17 et 18, et une hyperploïdie. Dans les cancers du côlon droit, on rencontre 40% de tumeurs LOH+, et un tiers d'erreurs de réplication des loci microsatellites (MSI+). L'accumulation de ces mutations est indispensable pour que le phénotype malin soit exprimé (**Fearon, 1992**). La cancérogenèse colique correspond à deux types d'instabilité génomique :

- L'instabilité microsatellite (MIN, MSI encore appelé RER pour replication error) dans 15% des cas pour lesquels le contenu génétique reste diploïde.
- L'instabilité chromosomique dans 85% des cas est caractérisée par une aneuploïdie.

Cette instabilité génomique s'accompagne de nombreuses mutations dans trois classes de gènes : les oncogènes (Ex. gènes pro et anti-apoptotiques : Bcl-2, Bax), les suppresseurs de tumeurs (Ex. gène codant pour la p53) et les gènes mutateurs (hMSH2, hMSH6, hMLH1, hPSM1, hPSM2) (**Lengauer et al, 1998**).

#### **I.2.5. Facteurs de risque :**

##### **a) Age**

Le risque apparaît vers 45 ans pour les formes sporadiques. En effet, le CCR est rare avant 50 ans, mais à partir de cet âge la proportion de cas diagnostiqués double chaque décennie, pour atteindre des taux voisins de 450 pour 100 000 hommes de 80 à 84 ans, et de 310 pour 100 000 femmes du même âge (**Eckburg et al, 2005**). L'incidence maximale se situe entre 50 et 70 ans. Cependant, les personnes atteintes de FAP ou de HNPCC peuvent développer un cancer colorectal avant l'âge de 40 ans (**Remontet et al, 2003**).

##### **b) Hérité**

Certains CCR doivent être considérés comme de véritables maladies génétiques, du fait de caractères transmis de manière héréditaire entraînent un risque accru de CCR, mais ces formes familiales représentent 6 à 7% des CCR :

- la polypose adénomateuse familiale (PAF) (environ 1% des CCR dans les pays Occidentaux), entraînant une cancérisation inéluctable, soit un risque de 100% ;

- Le syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer), dit Syndrome de Lynch (environ 5% des CCR), avec un risque cumulé de développer un CCR avant 75 ans de 92% chez l'homme et 83% chez la femme;
- La polypose juvénile ;
- Le syndrome de Peutz-Jeghers (**Menegoz et al, 1998**).

### c) Sexe

Les cancers du colon descendant et du sigmoïde se caractérisent par une prédominance masculine qui apparaît au-delà de 65 ans, avec au maximum un chiffre de 1,5 (**Faivre et al, 2001**). C'est le troisième cancer le plus fréquent chez les hommes, et le deuxième chez les femmes (après le cancer du poumon et de la prostate chez l'homme, et le cancer du sein chez la femme) (**Remontet et al, 2003**).

### d) Mode de vie

Le rapport du World Cancer Research Fund paru en Novembre 2007 (**WCRF, 2007**) est la synthèse de nombreuses études sur le rôle de l'alimentation, de la nutrition et de l'activité physique pour la prévention des cancers. Selon les experts qui ont rédigé ce rapport, l'activité physique est un facteur de protection avéré contre le cancer colorectal. De même des études épidémiologiques ont démontrées que des facteurs de l'alimentation tels que la quantité de lipides, de viande et d'alcool, ainsi que l'ingestion d'un excès de calories sont associés à un risque augmenté de cancer colique. Par ailleurs, d'autres facteurs comme les légumes, les fruits, le calcium, les fibres alimentaires contenant des pentosanes, et certains glucides, seraient associés à un risque diminué. On a noté, par exemple, dans certaines études, que la mortalité par cancer du côlon est inversement proportionnelle à la consommation de blé et de céréales (**Riboli, 1996**).

### e) Autres affections

Une inflammation chronique du côlon, dans le cas de colite ulcéraire ou de maladie de Crohn notamment, est un facteur prédisposant au cancer colorectal (**WCRF, 2007**).

## **I.2.6. Rôle de la flore digestive dans l'initiation ou la promotion du cancer du côlon**

### **2.6.1. Flore commensale et inflammation**

Des souris knockout pour le gène IL-10, ou double knockout pour les gènes *Tgfb-1* et *Rag2*, *TCRb* et *p53*, ou *Gpx1* et *Gpx2*, sont utilisées pour l'étude des maladies inflammatoires du côlon. Lorsque ces souris sont élevées dans des conditions stériles, l'inflammation du côlon est réduite de façon significative, et aucune tumeur n'est observable. Les mêmes souris associées à une flore normale développent des tumeurs. Les souris Min sont un autre modèle utilisé pour l'étude du cancer colorectal. L'inflammation intestinale des souris Min est réduite par rapport aux animaux précités. Cependant, les souris Min axéniques développent moitié moins de petits adénomes que les souris Min à flore normale : la flore intestinale a donc un rôle promoteur du cancer, même chez des animaux capables de réguler normalement l'inflammation. L'inflammation provoquée par la flore est variable suivant les espèces bactériennes (**Huycke and Gaskins, 2004**).

### **2.6.2. Métabolisme et synthèse de carcinogènes par les bactéries commensales**

En 1975, Reddy a démontré que la flore microbienne jouait un rôle crucial dans la cancérogenèse. Un groupe de rats axéniques et un groupe de rats à flore normale ont reçu des injections de DMH. Seuls 20% des rats axéniques ont développé des tumeurs colorectales, contre 93% des rats normaux. L'instillation par voie rectale d'AOM, le principal métabolite du DMH, a augmenté de façon importante le nombre de tumeurs chez les rats axéniques (**Reddy et al, 1975**) Le métabolisme de la flore intestinale produit de nombreuses espèces chimiques réactives, notamment des radicaux libres comme le superoxyde. Pour l'instant, aucune étude n'a pu prouver l'existence d'un lien entre le cancer du côlon et les bactéries synthétisant du superoxyde (**Huycke and Gaskins, 2004**). Les bactéries sulfo-réductrices font partie de la flore intestinale habituelle. Ces bactéries produisent de l'H<sub>2</sub>S. La production de sulfure est liée à la cancérogenèse, car il augmente la prolifération cellulaire, inhibe le métabolisme du butyrate par les colonocytes, et active certaines voies de transduction cellulaire défavorables (**Ridlon et al, 2006**). Plus les bactéries sulfo-réductrices sont nombreuses, moins les bactéries méthanogènes le sont. Environ 50% des Européens et des Américains, et 90% des Noirs Africains d'origine rurale excrètent principalement du méthane, et hébergent vraisemblablement peu de bactéries sulfo-réductrices. Cette répartition est corrélée négativement aux prédispositions pour le cancer colorectal (**Huycke and Gaskins, 2004**).

### 2.6.3. Biotransformation des acides biliaires

Chez l'homme, les principaux acides biliaires primaires sont l'acide cholique et l'acide chénocolique. Environ 5% des sels biliaires (0.2 à 0.3 g/j) sont déconjugués et métabolisés par la flore (principalement les genres *Clostridium*, *Lactobacillus Eubacterium*, *Bacteroides* et *Peptococcus*). Plus de vingt acides biliaires secondaires différents ont été mis en évidence dans les selles (**Rambaud et al, 2004**). Les acides biliaires secondaires peuvent provoquer l'apoptose des colonocytes, et de fortes concentrations en DCA (acide déoxycholique) ou LCA (acide lithocolique) pourraient exercer une pression de sélection favorable à l'émergence de cellules épithéliales mutantes résistantes à l'apoptose. Le DCA intervient également dans l'activation de voies de transduction dont le rôle dans la cancérogenèse est connu, comme la voie  $\beta$ -caténine (**Ridlon et al, 2006; Pai et al, 2004**) ou l'inhibition de l'activité de la protéine p53 (**Qiao et al, 2001**).

### 2.6.4. Effets sur le cancer :

La viande peut être convertie en amines hétérocycliques durant sa cuisson et la fermentation bactérienne de protéines produit des amines et de l'ammoniaque fortement toxigènes. Deux enzymes capables de produire des carcinogènes sont la  $\beta$ - glucuronidase chez l'hôte et la flore et la  $\beta$ - glucosidase chez la microflore, bien que cette dernière catalyse d'autre part la production de substances antimutagènes. Les bactéries lactiques sont capables de réduire les taux de ces deux enzymes dans les fèces. Cela peut être dû à l'inhibition d'une enzyme l'ornithine décarboxylase, ou par blocage du gène promoteur de la tumeur (ras-21). De plus la stimulation du système immunitaire devrait être un autre mécanisme anticancéreux des probiotiques (**Vernazza et al, 2006**).

## *Chapitre II*

# **Aliments fonctionnels en prévention du cancer colorectal**

« Qu'il soit lent ou rapide celui qui cherche trouvera.  
Tout ce que tu possèdes en fait de richesses et talents,  
n'était-ce pas d'abord une recherche et une pensée?  
Si ceux qui ont soif cherchent de l'eau dans le monde,  
l'eau aussi cherche dans le monde ceux qui sont assoiffés »

Jalâl al-Dîn Rûmî

## **I.1. Aliments fonctionnels :**

### **I.1.1. Concept :**

Il n'y aura probablement pas de définition simple et universelle de l'aliment fonctionnel car avant tout c'est un concept centré sur « les fonctions à moduler » d'avantage que sur « les produits à développer » (**Diplock, 1999**).

Le Japon a été le berceau du terme aliment fonctionnel connu sous le nom de FOSHU en 1991. Depuis les années 1990, une grande variété de termes plus ou moins inspirés de l'approche japonaise ont vu le jour, incluant des mots ou des expressions plus exotiques tel que : nutraceutique, designer food, f(ph)armafood, medifood, vita food, auxquels il faut ajouté des termes plus traditionnels comme : supplément alimentaire, aliment diététique et aliment enrichi ou fortifié (**Roberfroid, 2002**).

### **I.1.2. Définitions :**

« Aliment fonctionnel » est une expression qui comprend presque autant de définitions qu'il y a d'auteurs s'y référant. Ces définitions sont soit simples « aliment qui fournit des bénéfices nutritionnels au-delà de la nourriture de base » (**IFIC, 1995**). Soit plus élaborées « aliments ou boissons dérivés de substances naturelles et consommés comme partie de la nourriture quotidienne et qui, s'ils sont ingéré, ont des effets physiologiques bénéfiques » (**Hillian, 1995**).

### **I.1.3. Modulation de la microflore intestinale :**

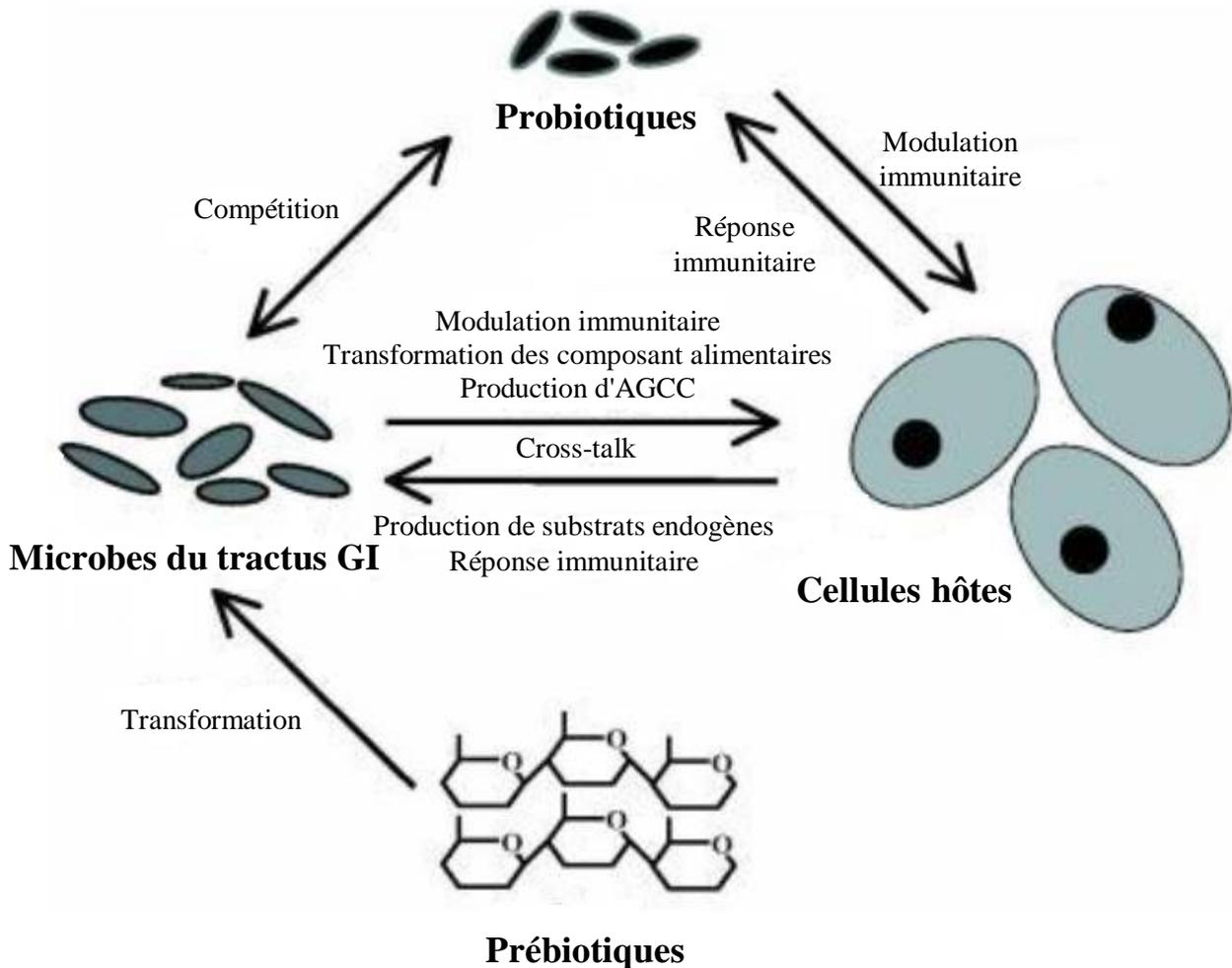
Plusieurs facteurs affectent la composition du microbiote intestinal humain, dont probablement le taux et le type de substrat de croissance sont les plus influençant. L'alimentation peu donc exercer une influence majeure sur les population bactériennes et du fait sur l'état de santé (**Macfarlane et Gibson, 1994**). Trois approche ont été développés les « probiotique », « prébiotique » et leur association en « symbiotique ».

#### **1.3.1. Approche probiotique :**

Les probiotiques sont des suppléments alimentaires microbiens vivant, affectant bénéfiquement l'hôte animal par amélioration de sa balance microbienne intestinale. Pour

l'usage de l'adulte humain, ceci inclue les produits laitiers fermentés aussi bien que les préparations contenant des bactéries lyophilisées (Collins et Gibson, 1999).

Les bactéries impliquées sont souvent des producteurs d'acide lactique (lactobacilles et Bifidobactéries).



**Figure 8:** Interactions hôte-microbes et impact des pré-probiotiques (Tannock, 2005)

a) *Caractéristiques* : Un probiotique efficace doit :

- Exercer un effet bénéfique sur l'hôte.
- Ne doit être pathogène ou toxique.
- Contenir un grand nombre de cellules viables.
- Être capable de survie et de métabolisme dans l'intestin.
- Demeurer viable durant le stockage et l'utilisation.

- Avoir de bonnes propriétés sensorielles.
- Etre isolé à partir des mêmes espèces de l'hôte correspondant (**Steer et al, 2000**)

b) *Avantages :*

- Alléger les symptômes de la malabsorption du lactose.
- Augmentation de la résistance naturelle aux maladies infectieuses du tractus digestif.
- Suppression du cancer.
- Réduction des concentrations sériques du cholestérol.
- Amélioration de la digestion.
- Stimulation de l'immunité gastro-intestinale.

c) *Limitations :*

Les limitations majeures de cette approche sont la survie en stockage et la suppression dans le tractus gastro-intestinal. Pour cela ils doivent être en grand nombre, au moins 7-8 log UFC/ml de contenu du lumen (**Ducluzeau et Bensaada, 1982**). **Kullen et al (1997)** ont trouvés qu'une ingestion journalière d'une préparation de *Bifidobacterium spp*, une fois stoppée, le germe ne sera détectable que pour 8 jours. L'élaboration par génigénétique ou la sélection d'espèces probiotiques avec des sites d'adhésion à l'épithélium du colon humain est l'une des voies d'augmentation de la survie *in vivo* (**Korpela et Saxelin, 1999**).

**Tableau 1:** Bactéries probiotiques et leurs bénéfices sanitaires attribués (**Steer et al, 2000**)

Effets reportés	Espèce probiotique
Modulation du système immunitaire.	<i>Lactobacillus acidophilus, L. casei, L. plantarum, L. rhamnosus.</i>
Amélioration de la balance microbienne intestinale.	<i>L.acidophilus, L.casei, Bifidobacterium bifidum</i>
Réduction des activités enzymatiques fécales (activant les carcinogènes).	<i>L.acidophilus, L.casei, L.gasseri, L.delbrueckii,</i>
Effet antitumoral.	<i>L.acidophilus, L.casei, L.gasseri, L.delbrueckii, L. plantarum, B.infantis, B.adolescentis, B.bifidum, B.longum.</i>

Prévention des diarrhées des voyageurs	<i>Saccharomyces spp.</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>B.bifidum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>L.bulgaricus</i>
Prévention de diarrhées à rotavirus.	<i>L. rhamnosus</i> , <i>B.bifidum</i> .
Prévention des diarrhées à <i>C.difficile</i>	<i>L. rhamnosus</i> , <i>S.spp</i> .
Prévention des autres types de diarrhées	<i>L.acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>B.bifidum</i> .

### 1.3.2. Approche prébiotique :

#### a) Définition :

Un prébiotique est un ingrédient alimentaire non digestible qui affecte bénéfiquement l'hôte par la stimulation sélective de la croissance et/ou de l'activité d'une ou d'un nombre limité de bactéries dans le colon et ainsi moduler la composition naturelle de cet écosystème (**Roberfroid, 2001**). Un prébiotique idéal devrait aussi être capable de réduire ou de supprimer le nombre et l'activité de pathogène connus, exemple l'effet de la cellobiose sur *L.monocytogene* (**Park & Kroll, 1993**). Les fructanes type-inulin semble exercer les meilleurs effets. Une simple stimulation des Bifidobactéries semble insuffisante pour démontrer un effet, l'action *in vivo* sur les autres microorganismes intestinaux doit aussi être révélée (**Roberfroid, 2001**).

#### b) Critères de sélection :

A fin d'être reconnu comme prébiotique, un ingrédient alimentaire devrait :

- N'être du moins partiellement, ni digéré, ni assimilé dans la partie supérieure du système gastrointestinal.
- Etre fermenté dans le colon de façon sélective par un nombre limité de bactéries potentiellement favorables.
- Altérer la composition de la microflore colique en faveur d'une flore potentiellement plus saine.
- Eventuellement induire des effets systémiques qui peuvent être bénéfique pour la santé de l'hôte (**Roberfroid, 2002**).

## c) Mécanismes d'action :

Les cibles principales des prébiotiques sont *Bifidobacterium spp* et *Lactobacillus spp*. Il est toutefois, désirable d'augmenter la production du butyrate dans le colon (**Andoh et al, 2003**). Ceci ouvre une nouvelle voie ciblant les producteurs intestinaux de butyrates autres que les Clostridies (**Hold et al, 2003**). Les prébiotiques induisent des effets antimicrobiens via leur stimulation sélective des espèces indigènes bénéfiques, qui sécrètent des composés antimicrobiens, modulent la fonction immunitaire et entrent en compétition avec les pathogènes sur leurs sites d'adhésion. A titre d'exemple, les oligosaccharides solubles peuvent fixer les pathogènes ou les déloger des cellules épithéliales par encombrement stérique et réduire ainsi leur habilité à coloniser et infecter l'hôte (**Zopt et Roth, 1996**).

**1.3.3. Approche symbiotique :**

Un symbiotique est un aliment associant un probiotique et un prébiotique, autrement dit une bactérie vivante et le nutriment qui lui est favorable (**Robertfroid, 2002**). L'objectif est d'améliorer la survie des probiotique durant leur passage dans le tractus digestif supérieur et de leur favoriser une meilleure implantation au sein de la microflore colonique avec un effet stimulant sur la croissance ou l'activité ou les deux à la fois (**Steer et al, 2000**). Il est d' autre part possible de concevoir un symbiotique pour des régions différentes du tube digestif par exemple pour le petit intestin ou gros intestin (**Holzappel & Schillinger, 2002**).

**Tableau 2 :** Exemples des principaux probiotiques, prébiotiques et symbiotiques :

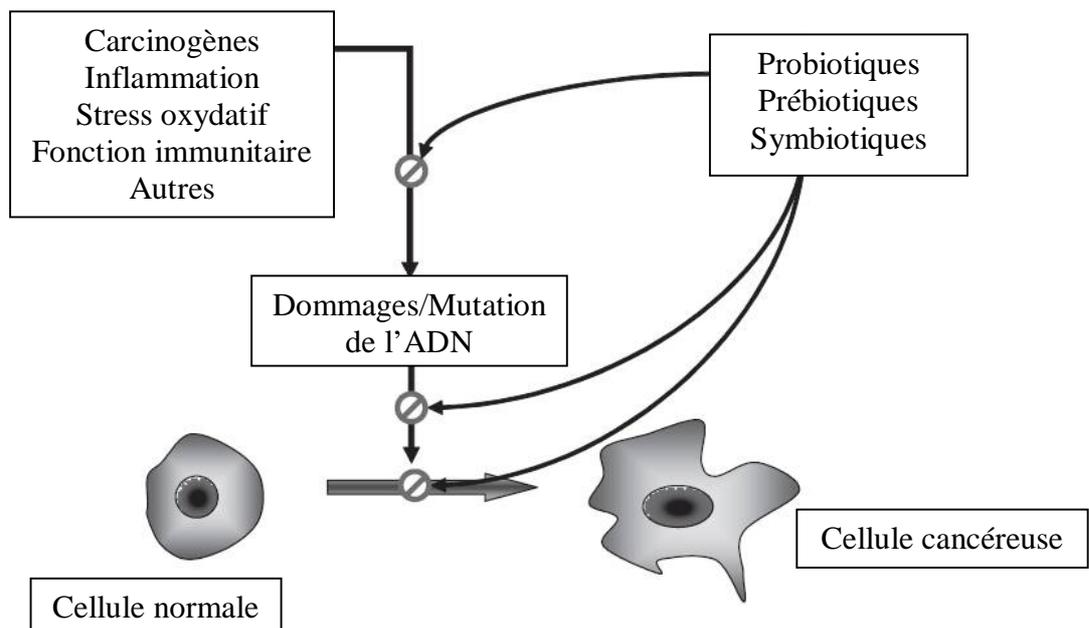
Type	Espèces
Probiotique	<p><b>Lactobacillus :</b> <i>L.acidophilus, L.casei, L.delbruckii subsp.bulgaricus</i>  <i>L.reuteri, L.brevis, L.cellobiosus, L.curvatus, L.fermentum, L.plantarum.</i></p> <p><b>Cocci Gram positif :</b> <i>Lactococcus lactis subsp. Cremoris, streptococcus salivarius subsp. Thermophilus, Enterococcus faecium, S.diaacetylactis, S.intermedius.</i></p> <p><b>Bifidobacterium :</b> <i>B.bifidum, B.adolescentis, B.animalis, B.infantis, B.longum, B.thermophilum.</i></p>

Prébiotique	Fructooligosaccharides (FOS), galactooligosaccharides (GOS), inuline, lactulose, lactitol,
Symbiotique	Bifidobactéries + FOS Lactobacilles + lactitol Bifidobactéries + GOS

## II.2. Aliments fonctionnels en prévention du Cancer colorectal :

### II.2.1. Alimentation et Cancer :

Environ 70 pour cent du cancer colorectal est associée à des facteurs environnementaux, principalement d'origine alimentaires (**Saikali et al, 2004**). Ainsi, beaucoup d'attention a été portée sur la diminution du risque de cancer par des modifications de régime, en particulier la consommation de probiotiques et/ou l'augmentation d'apport en ingrédients prébiotiques (**Cho et Finocchiaro, 2010**). Plusieurs études ont suggéré un effet indirecte de l'alimentation sur le développement du cancer, principalement en agissant sur la capacité de l'hôte à métaboliser les pro-carcinogènes dont l'activation, dans le cas du cancer du côlon, peut être médiée par la flore bactérienne du gros intestin. Un certain nombre d'enzymes bactériennes ont été impliquées dans la production ou l'activation des mutagènes, cancérigènes et divers promoteurs de tumeurs, tels que les  $\beta$ -glucuronidase, azoreductase, déshydrogénase 7- $\alpha$ -hydroxy-stéroïde, l'hydrolase de l'acide glycocholique, et la cholestérol déshydrogénase (**Goldin et Gorbach, 1976**).



**Figure 9** : Mécanismes supposés de l'action des probiotiques, prébiotiques et symbiotiques sur la transition des cellules normales vers des cellules cancéreuses (**Cho et Finocchiaro, 2010**).

## **II.2.2. Mécanismes d'action :**

### **2.2.1. Changement du pH du Colon :**

Le pH du colon joue un rôle très important en tant que barrière immunitaire inné. Les bactéries lactiques ont la capacité de produire divers acides gras libres, des acides organiques et d'autres métabolites, ce qui conduit à une diminution du pH dans l'intestin. Cette baisse du pH est considérée comme l'une des principales propriétés des bactéries probiotiques réduisant l'incidence du cancer colorectal (**Reddy et al, 1997**). La diminution de la croissance des micro-organismes pathogènes peut également moduler les enzymes pro-carcinogènes telles que la  $\beta$ -glucuronidase, 7 $\alpha$ -hydroxylase et nitroreductase (**Kulkarni et Reddy, 1994., Ballongue et al, 1997**). En outre, la diminution du pH colique induite par les pré-probiotiques a été révélée capable d'améliorer la solubilité et l'absorption de minéraux tels que le Calcium. En fait, une meilleure absorption de ce minéral fut démontrée bénéfique pour le cancer colorectal par inhibition de la prolifération, de la différenciation et par induction de l'apoptose chez les cellules de la muqueuse colique (**Younes et al, 2001., Lamprecht et Lipkins, 2003**).

### **2.2.2. Altération du métabolisme des xénobiotiques dans le système intestinal :**

Un xénobiotique est "une substance chimique trouvée dans les organismes, mais qui ne devrait pas être produite ou présente en eux», et beaucoup, sinon la plupart des xénobiotiques sont cancérogènes pour l'homme. Les enzymes métabolisant les xénobiotiques (XME) sont classées soit en phase 1 ou 2, respectivement responsables de la conversion de ces composés exogènes en métabolites réactifs ou assurant les réactions de conjugaison afin de détoxifier les composés réactifs pour leur excréation (**Lhoste et al, 2001**). Les enzymes Phase 1 comprennent le cytochrome P450 (CYP) et les enzymes de phase 2 incluent la glutathion-S-transférase (GST) et NAD (P), la quinone réductase (quinone réductase), UDP-glucuronosyltransférase (UGT), les sulfotransférases, et la N-acétyl-transférase (NAT) (**Hashimoto et Degawa, 1995; Joseph et Jaiswal, 1994; Lin et al, 1994**). Il a été postulé que des probiotiques à l'exemple des Bifidobactéries pourraient réduire les risques du cancer colorectal en produisant des métabolites affectant la fonction du P450 et par la suite la conversion de l'azoxyméthane en carcinogène. Ces propriétés des probiotiques de modifier les enzymes métabolisant les

xénobiotiques suggèrent que les probiotiques pourraient prévenir le développement du cancer du colorectal (**Campbell et Hayes, 1976**).

### **2.2.3. Modulation de la réponse immunitaire :**

Les propriétés des lactobacilles de moduler le système immunitaire les rendent attrayants pour des applications sanitaires. Leur administration s'est révélée capable affecter l'expression de cytokines tel que l'IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) favorisant ainsi le processus de la phagocytose (**Maassen, 2000**). Il a été également démontré récemment que les bactéries lactiques, en particulier la fraction cytoplasmique de *L. acidophilus* SNUL, *L. casei* YIT9029, et *B. longum* HY8001, ont été capables de réduire de manière significative la prolifération tumorale *in vitro*, d'augmenter le taux de survie chez les souris injectées avec des cellules cancéreuses, et de promouvoir l'activité anti-tumorale par l'intermédiaire de l'immunité cellulaire (**Lee et al, 2004**). De même, la consommation de prébiotiques avait démontrée un effet anti-tumorigène par le biais de l'augmentation de la réponse immunitaire, notamment l'activation des cellules NK et leur fixation sur les cellules tumorales indiquant un avantage potentiel dans le traitement du cancer colorectal (**Ghoneum et al, 2004**).

### **2.2.4. Réduction de l'inflammation intestinale :**

L'inflammation intestinale chronique (IBD) a été liée au développement du cancer colorectal dans plusieurs travaux (**Collins et al, 2006**). Récemment, les probiotiques ont été démontrés capables de réduire l'inflammation intestinale dans un certain nombre de modèles animaux de MICI (**Rachmilewitz et al, 2004**) et chez des patients humains atteints de MICI (**Bibiloni et al, 2005**). Cette réduction de l'inflammation a le potentiel de mener à la réduction de l'incidence du cancer colorectal. Certaines bactéries lactiques, telles que *Streptococcus thermophilus* TH-4 et des Bifidobacteries à l'exemple de *B. adolescentis* MB 227, *B. adolescentis* MB 239, and *B. pseudocatenulatum* MB 116 ont la capacité de produire des niveaux élevés de folate, un composé avec des propriétés importantes de réparation d'ADN. (**Van Guelpen et al, 2006., Tooley et al, 2006**).

### **2.2.5. Propriétés antioxydantes :**

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) de divers types sont formées *in vivo* et beaucoup d'entre eux sont de puissants agents oxydants, capables d'endommager l'ADN et

d'autres biomolécules (**Salim et al, 2008**). La formation accrue de ROS peut favoriser le développement d'une tumeur maligne, et même des taux «normaux» pourraient constituer un risque pour le développement du cancer chez les personnes âgées (**Halliwell, 2007**). Divers chercheurs ont signalé l'effet antioxydant de bactéries lactiques ou de leurs produits de fermentation. Ces études montrent que les bactéries lactiques empêchent les processus de stress oxydatif, qui sont considérés comme facteur clé dans la pathogenèse de la progression du cancer (**Grajek et Olejnik, 2005; Yadav et al, 2008**).

### **2.2.6. Anti-mutagénicité :**

Il a été indiqué dans de nombreuses études que les probiotiques jouent un rôle important dans l'inhibition de la mutagénicité (**Usman et Hosono, 1998**). Il a été proposé que les agents mutagènes se lient à la paroi cellulaire des probiotiques. En outre, des cellules entières de bactéries bifidus ont également été trouvées se lier avec des carcinogènes tels que le méthylazoxyméthanol (**Kulkarni et Reddy, 1994**) et le 3-amino-1,4-diméthyl-5H-pyrido [4,3-b] indole, favorisant ainsi leur élimination physique via les fèces, minimisant ainsi leur absorption dans la lumière intestinale (**Zhang et Ohta, 1993**).

## **II.3. Aliments fonctionnels d'origine végétale :**

### **II.3.1. Principaux groupes d'aliments fonctionnels :**

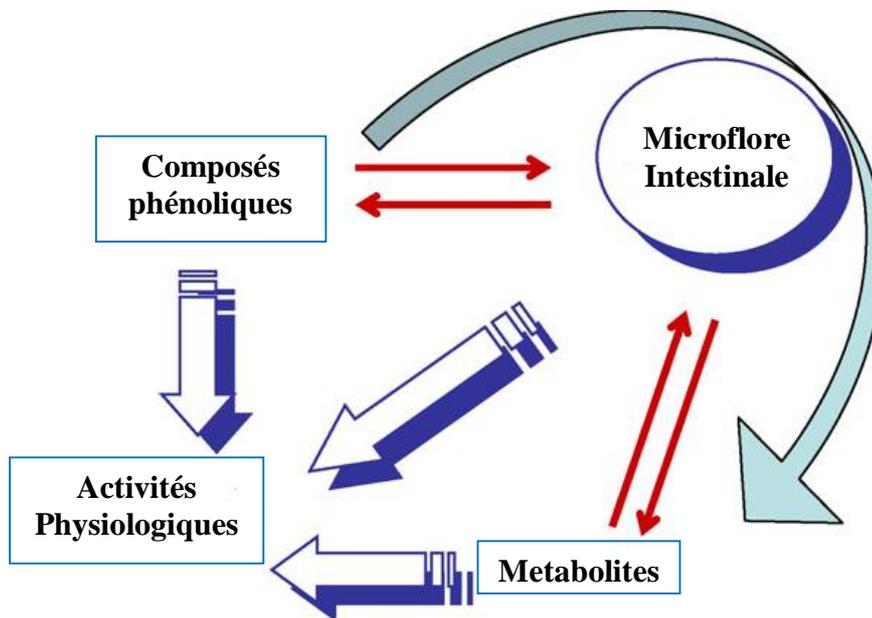
Une alimentation à base de plantes peut aider à guérir des maladies chroniques, notamment le cancer. Une étude menée en 1992 a montré que le risque de développer un cancer chez les personnes qui consomment les fruits et légumes est de moitié comparé à ceux qui en consomment moins (**Block et al, 1992**). Cela prouve que les aliments à base de plantes ont des composants qui agissent contre ces maladies mortelles. Ces produits chimiques ont été désignés par **Steinmetz et Potter (1991)** par le terme phytochimiques. Les phytochimiques sont définis comme étant des composés bioactifs non nutritifs présents dans les fruits, les légumes, les céréales et autres aliments, dont l'ingestion a été liée à la réduction du risque des principales maladies chroniques (**Liu, 2004**). Les différents composés inclus dans ce groupe peuvent être classés en fonction de leur structure chimique en : caroténoïdes, les composés phénoliques, les alcaloïdes et les composés organo-soufrés. Les composés phénoliques, les flavonoïdes et phytoestrogènes ont suscité un intérêt particulier en raison de leur effets potentiels antioxydant, anti-œstrogénique, anti-inflammatoire, immunomodulateur, cardioprotecteur et composés anticancérigènes (**Laparra et Sanz, 2010**).

**Tableau 3 :** Phytochimiques associés a la prévention des cancers (**Greenwald et al, 2001**) :

<b>Classe phytochimique</b>	<b>Composés typiques</b>	<b>Source alimentaire</b>	<b>Activités liées à la prévention-cancer</b>
<b>Carotenoids</b>	$\alpha$ -Carotene, $\beta$ -carotene, lycopene, $\beta$ -cryptoxanthin, lutein, astaxanthin	Fruits et légumes Jaune-rouge et vert foncés.	Activité antioxydante, modulation du métabolisme des cancérrogènes, inhibition de la prolifération cellulaire, inhibition de l'expression des oncogènes, des effets bénéfiques sur la fonction immunitaire, effets bénéfiques sur la transformation et la différenciation cellulaire, amélioration de la communication cellule-à-cellule.
<b>Composés organosoufrés</b>	Diallyl sulphide, diallyl disulphide, allyl methyl trisulphide, dithiolthiones.	Sulfures, légumes Allium (par exemple, l'ail, l'oignon); dithiolthiones, les légumes crucifères (brocoli, chou).	Augmenter l'activité de l'enzyme de phase II, inhiber la prolifération cellulaire, induire la différenciation des cellules, modifier le métabolisme des hormones stéroïdes, inhiber l'activité de l'ornithine-décarboxylase.
<b>Polyphenols</b>	Acides phénoliques (acide caféique), des acides hydroxycinnamiques (curcumine), flavanols (quercétine, apigénine), flavanones (naringine, hespéridine), catéchines (gallate épigallo-catéchine), theaflavines (resvératrol)	Les légumes et les fruits; catéchines, le thé vert; theaflavines, thé noir; resvératrol, vin rouge.	Réduire la formation de liaisons cancérrogène-ADN, inhiber la prolifération cellulaire, induire l'apoptose et un arrêt du cycle cellulaire, inhiber les voies de transduction du signal, améliorer la communication cellule à cellule, améliorer la fonction immunitaire.
<b>Phyto-oestrogenes</b>	Isoflavones (e.g. genistein, daidzein), lignans (matairesinol, secoisolariresinol)	Isoflavones, soja, les aliments à base de soja; lignanes, légumes, graines de lin, le seigle	Modifier le métabolisme des oestrogènes, diminuer l'activité de la tyrosine kinase, induire l'apoptose et un arrêt du cycle cellulaire, induire la topoisomérase II médiée par cassure de l'ADN
<b>Glucosinolates, isothiocyanates, indoles</b>	Glucobrassicin, sulphorophane, indole-3-carbinol	Les légumes crucifères	Augmenter l'activité de l'enzyme de la phase II, induire l'apoptose et un arrêt du cycle cellulaire, inhibent l'adhérence cellulaire et l'invasion
<b>Terpènes</b>	Monoterpenes (limonene, perillyl alcohol, geraniol), sesquiterpenes (farnesol)	Les légumes et les fruits (Citrus)	Augmenter l'activité de l'enzyme II de phase, influence la progression du cycle cellulaire, d'induire l'apoptose

### II.3.2. Composés phénoliques et microflore intestinale :

La biodisponibilité et les effets des polyphénols dépendent fortement de leur transformation par des composantes spécifiques de la microflore intestinale grâce à des activités estérase, glucosidase, déméthylation, déshydroxylation et décarboxylation. Beaucoup de polyphénols alimentaires sont des glycosides qui sont transformés en aglycones par des glycohydrolases des bactéries commensales, modifiant ainsi leur biodisponibilité et affectant positivement ou négativement leurs activités et effets fonctionnels sur les tissus de mammifères (**Laparra et Sanz, 2010**).



**Figure 10 :** Interactions entre les Composés phénoliques et le microbiote intestinal (**Laparra et Sanz, 2010**).

Les composés phytochimiques et leurs produits dérivés peuvent également affecter l'écologie intestinale comme une partie importante d'entre eux ne soit pas entièrement absorbée. Ils sont métabolisés dans le foie, excrété par la bile sous forme de glucuronides et accumulé dans la lumière de l'iléon et du côlon (**Bazzocco et al, 2008**). Par exemple, la consommation d'aliments riches en flavonol a été démontrée capable de modifier la composition du microbiote intestinal, exerçant des effets prébiotiques (**Tzonuis et al, 2008**). Les composés phénoliques alimentaires non absorbés et de leurs métabolites exercent le plus souvent une activité antimicrobienne ou bactériostatique. Ces métabolites inhibent sélectivement la croissance des agents pathogènes et stimulent celle des bactéries

commensales, y compris les souches probiotiques, influençant ainsi la composition du microbiote (Lee *et al*, 2006).

**Tableau 4 : Polyphénols et microbiote intestinal (Laparra et Sanz, 2010).**

<b>Polyphénols</b>	<b>composés</b>	<b>Fonction physiologique</b>
<b>Phénoliques :</b> Acide Hydroxy-cinnamic	Acides p-Coumarique et Cafféique	Activités bactériostatiques ou antimicrobiens
<b>Flavonoïdes :</b>		
Flavonols	Quercetin,3-rhamnosyl quercetin, Kaempferol.	Activités anti-inflammatoire et antiproliférative.
	Resveratrol	Effet prébiotique, suppression de l'expression des facteurs de virulence, modulation de la réponse proliférative.
Flavones	Apigenin, luteolin	Inhibition de l'inflammation induite par les LPS.
Flavanols	Catechins	Propriétés antimicrobiennes, la modulation des mucines
Flavanones	Hesperitin, naringenin	Activité anti-inflammatoire
Isoflavonoïdes	Genistein, daidzein, Equol	Propriétés Anti-adhésives. Effet oestrogénique
Anthocyanidins	Cyanidin Hydroxyl-6H-dibenzopyran-6-one	Propriétés antimicrobiennes Faible capacité antioxydante

# **Partie Expérimentale**

## *Chapitre III*

# **Matériel et Méthodes**

« L'effort n'est pas un combat avec le destin, parce que  
c'est le Destin lui-même qui nous a imposé cet effort »

Jalâl al-Dîn Rûmî

### III. Matériel et Méthodes :

#### III.1. Objectifs

- 1- Isolement et caractérisation de candidats probiotiques
- 2- Evaluation de la potentialité prébiotique des extraits phénoliques du *Rosmarinus officinalis* et du *Citrus sinensis*.
- 3- Caractérisation physicochimique, antioxydante et antiproliférative de l'extrait sélectionné.
- 4- Etude des propriétés immuno-modulatoires d'une souche lactique à potentiel probiotique

Les deux premiers objectifs ont été réalisés au niveau du laboratoire de microbiologie ainsi que celui de biochimie rattachés à l'université de Chlef-Algérie. La caractérisation physicochimique et l'étude des propriétés antioxydantes ont été réalisées au niveau de la faculté de pharmacie, département des sciences des médicaments et produits de santé, Université de Messine, Sicile, Italie. Tandis que l'évaluation de la potentialité antiproliférative et l'étude de l'activité immuno-modulatrice ont été effectuées au niveau du laboratoire d'immunologie et de biothérapie, département de pathologie humaine, polyclinique de Messine, Italie.

## III.2. Matériel biologique et réactifs:

### 2.1. Plantes:

Les deux extraits phénoliques faisant l'objet de cette étude avaient été recueillis à partir des feuilles sèches du *Rosmarinus officinalis* et la peau du *Citrus sinensis* récoltés dans la région de Chlef (Algérie) durant les mois de Mars à Avril de l'année 2011.

### 2.2. Les souches bactériennes:

Vingt huit souches avaient fait l'objet de ce travail dont six souches potentiellement pathogènes: *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* SV, *S. aureus* (infection urinaire-génitale) et *E. coli* (échantillon fécal d'un adulte sain) et 22 autres candidats probiotiques appartenant aux genres *Lactobacillus* (15 isolats) et *Streptococcus* (07 isolats). Les souches lactiques ont été isolées à partir de fèces de jeunes enfants en bonne santé âgés entre 3 mois et 5 ans n'ayant pas subis d'antibiothérapie au cours des trois derniers mois. Les échantillons fécaux sont dilués dans une solution de Ringer (diluée 1/4<sup>ème</sup>) puis ensemencées sur: MRS (Institut Pasteur, Alger-Algérie) pour l'isolement des lactobacilles et M17 (Institut Pasteur, Alger-Algérie) pour les Streptocoques. Les souches sauvages de *S. aureus* et *E. coli* ont été respectivement identifiés avec les galeries API Staph et API E 20, (Institut Pasteur, Alger-Algérie). L'identification des candidats probiotiques appartenant aux genres *Lactobacillus* spp et *Streptococcus* spp a été basée sur leur caractères macro et microscopique, le test catalase et ADH (arginine dihydrolase), la thermorésistance à 60°C/30min pour les streptocoques ainsi que le profil de fermentaire (**Larpen, 1997**) en utilisant les sucres: glucose, fructose, saccharose, lactose, maltose, rhamnose, raffinose, salicine, mannitol, galactose, lévulose, sorbitol et le mannose. Une fois isolé et identifié, les souches ont été cultivées dans un bouillon nutritif (pendant 18 heures à 37 ° C), puis conservées à -20°C après ajout du glycérol (20% V/V).

### 2.3. Produits chimiques:

2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) a été fourni par Sigma Chemicals Co., MO, St Louis, USA. Le 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) et le Chlorure du fer.6H<sub>2</sub>O ont été acheté de Sigma Aldrich s.r.l.(Milan, Italy). Le Paclitaxel de Bristol-Myers Squibb (Princeton, USA), Dimethyl sulfoxide (DMSO) de Sigma Aldrich (France) et le bleu de Trypan 0.4% de McLean (Virginia, USA). L-Glutamine a été fournie par Euro-Clone (Italy) tandis que la Penicilline /Streptomycine et le sérum foetal bovin ont été acheté de Gibco pour les sciences

de la vie (Grand Island, USA). L'RNase et Propidium iodure sont fournis par Sigma-Aldrich. L'annexine-V PE/ AAD fut achetée de BD Biosciences (Pharmingen, San Diego, CA, USA).

### III.3. Caractérisation des souches probiotiques:

#### 3.1. Résistance a la barrière gastro-intestinale:

Les bactéries lactiques isolées ont été évaluées pour leur potentialités probiotiques, à savoir: la résistance à un environnement acide et la tolérance des sels biliaires tel que décrit par **Vinderola et Reinheimer (2003)**, ainsi que leurs activité inhibitrice des agents pathogènes suivant le protocole de **Benkerroum et al (1993)**. Afin d'évaluer la résistance à l'acidité, les souches appartenant au genre *Lactobacillus* et *Streptococcus* ont été respectivement ensemencée dans du bouillon MRS non sélectif (exempte d'acétate de sodium et de citrate d'ammonium) ajustée à un pH de 2,5 (avec une solution de HCl 10M) correspondant à la valeur moyenne quotidienne du pH gastrique. L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 3 h. La variation de la charge microbienne a été mesurée par un spectrophotomètre à 600 nm. De même, la tolérance des sels biliaires a été estimée en cultivant les candidats testés dans le milieu précité supplémenté en sels biliaires à 0,3% (représentant la valeur physiologique de l'intestin) pendant 24 heures à 37°C. L'activité antagoniste a été évaluée en utilisant la méthode de diffusion en puits sur gélose Muller Hinton. Après inondation des boites gélosées avec les agents pathogènes testés *S. aureus* ATCC 6538 ou *E. coli* ATCC 25922, les probiotiques ont été ensemencées dans les puits pendant 24 heures à 37 °C. Les charges initiales ont été ajustées pour toutes les expériences à une valeur de  $10^8$  UFC/ml. La zone claire autour des puits correspondant à la zone d'inhibition représente la moyenne de deux diamètres perpendiculaires.

#### 3.2. Impact de la source de carbone sur les propriétés d'adhésion

##### 3.2.1. Effet sur la capacité d'auto-agrégation :

La capacité d'auto-agrégation a été évaluée selon la méthode de **Del Re et al (2000)** modifiée par **Kos et al (2003)**. Les candidats probiotiques sélectionnés (*S.thermophilus*, *L.rhamnosus*, *L.bulgaricus* et *L.johnsonii*) ont été incubés dans du bouillon MRS non sélectif (exempte d'acétate de sodium et de citrate d'ammonium) additionné de diverses sources de carbone (glucose, lactose, saccharose, fructose) à raison de 5% ainsi que la pectine à une teneur de 1%. Après une période d'incubation de 18 heures à 37°C les cellules bactériennes ont été récoltées par centrifugation (5000 g pendant 15 min), lavées deux fois à laide d'une

solution tampon phosphate (PBS), puis ajustée par spectrophotométrie à une charge viable de  $10^8$  UFC/ml. La suspension cellulaire (4 ml) est mixée (votrex) pour 10 secondes. L'auto-agrégation est déterminée après 5 heures d'incubation à la température ambiante. Toutes les heures 0.1 ml de la suspension (à partir de la surface) est transféré dans un tube contenant 3.9 ml de PBS est l'absorbance ( $A$ ) est mesurée à 600 nm. Le pourcentage d'auto-agrégation est calculé comme suit :

$$\% \text{ d'auto-agrégation} = 1 - (A_t / A_0) \times 100$$

$A_t$  représente l'absorbance aux temps  $t = 1, 2, 3, 4, 5$  heures et  $A_0$  l'absorbance à  $t = 0$ .

### 3.2.2. Effet sur l'habilité d'adhésion aux solvants:

L'adhésion microbienne aux solvants (MATS) a été mesurée suivant la méthode **Rosenberg et al, 1980** modifiée par **Kos et al, 2003**. Les candidats probiotiques ont été ensemencés dans le milieu prédécrit (MRS non sélectif) en présence des différentes sources de carbone. Après une incubation de 18 heures à  $37^\circ\text{C}$  les cellules ont été récupérées par centrifugation à 5000 g pendant 15 mn, lavées deux fois puis resuspendues dans  $0.1 \text{ mol}^{-1}$  de  $\text{KNO}_3$  (pH 6.2) et calibrées à approximativement  $10^8$  UFC /ml. L'absorbance de la suspension cellulaire est mesurée à 600 nm ( $A_0$ ). Un millilitre de solvant Xylène est ajouté à 3 millilitre de suspension bactérienne, et après 10 mn de préincubation à la température ambiante, le mélange à deux phases est mixé (votrex) pendant 2 mn. La phase aqueuse est récupérée après 20 mn d'incubation à la température ambiante, puis son absorbance ( $A_1$ ) est mesurée à 600 nm. Le pourcentage d'adhésion est calculé ainsi:

$$\% \text{ ad} = (1 - A_1 / A_0) \times 100$$

### 3.2.3. Effet sur la production d'exopolysaccharides probiotiques:

Après 18 heures d'incubation à  $37^\circ\text{C}$  dans le milieu mentionné en utilisant différents substrats carbonés, les exopolysaccharides attachés à la membrane cellulaire (EPS capsulaires) ont été libérés en augmentant la température à  $80^\circ\text{C}$  /15 minutes dans un bain marie sous agitation douce. Les cultures ont été ensuite refroidies à la température ambiante et la biomasse cellulaire (culot) fut éliminée par centrifugation à 5000g pendant 10 min. Le surnageant récupéré a été filtré trois fois utilisant un filtre Millipore ( $0,22 \mu\text{m}$ ) et le contenu en EPS du surnageant a été précipité par addition de trois volumes d'éthanol froid ( $-20^\circ\text{C}$ ).

Après décantation pendant une nuit à 4°C, le culot a été remis en suspension dans 100 ml d'eau distillée et précipité deux fois comme décrit; cet EPS partiellement purifié a été dissous dans de l'eau distillée et lyophilisé. La teneur en exopolysaccharides a été déterminée par la méthode de **Dubois et al (1956)** en utilisant une courbe d'étalonnage d'un mélange (galactose-glucose) dans un rapport 4/1 (**Ricciardi et al, 2002**).

### **III.4. Evaluation de la potentialité prébiotique des extraits phénoliques du *Rosmarinus officinalis* et *Citrus sinensis* :**

Les deux extraits avaient non seulement été évalués pour leurs propriétés antimicrobiennes à l'égard des candidats probiotiques et pathogènes, mais en outre testés pour leur effet sur les propriétés d'adhésion ainsi que la sensibilisation des pathogènes à l'égard des antibiotiques. L'objet de cette partie d'étude est d'évaluer l'aptitude de deux extraits phénoliques du Romarin et du Citrus à former des combinaisons symbiotiques en association avec les candidats probiotiques préalablement isolés et caractérisés.

#### **4.1. Obtention des extraits phénoliques :**

En premier lieu, le matériel végétal est séché à l'ombre et à température ambiante pour une durée de 07 jours, puis broyé jusqu'à obtenir une poudre fine. Sur 50g de broyat on ajoute un volume de 100 ml de MeOH aqueux 70% (7:3), puis on procède à un chauffage à 70°C pendant 5 minutes (ce procédé tue le tissu végétal, empêchant l'oxydation ou l'hydrolyse enzymatique). L'échantillon est ensuite macéré pour une durée de 24 heures à la température ambiante. Le macéra obtenu est filtré puis évaporé sous vide au moyen d'un Rotavapeur. Les extraits obtenus sont récupérés dans du DMSO (v/v) et conservés à +5°C, à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation **Upson et al (2000)**.

#### **4.2. Evaluation de la potentialité prébiotique :**

##### **a) Effet antimicrobien des extraits phénoliques :**

L'efficacité antibactérienne fut évaluée pour six candidats probiotiques (*L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. johnsonii*, *S. thermophilus* 1, 2 et 3 et six autres pathogènes (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* S.V, *Pseudomonas aeruginosa* I, *Pseudomonas aeruginosa* II et *Klebsiella pneumoniae* S.V). Nous avons utilisé la méthode des puits **Tumin et al (2005)** où suite à l'étalement sur milieu gélosé Muller Hinton d'un volume de 100 µl de la souche bactérienne à 10<sup>8</sup> UFC/ml ; l'extrait

solubilisé dans le DMSO est ajouté à des doses variantes de 10, 20, 30, 40 et 50µg. Le témoin constitué par le DMSO n'avait démontré aucun effet inhibiteur sur les souches testées, il ne figure pas à cet effet dans la partie résultats et discussion. Une pré-incubation est effectuée au réfrigérateur pendant 30 mn à 1h à +4°C afin de permettre la diffusion de l'extrait, puis l'incubation et réalisée pour une durée de 24h à 37°C. L'inhibition apparaissant autour des puits est exprimée en millimètre et correspond à la moyenne de deux diamètres perpendiculaires.

**b) Effets des extraits sur l'habilité d'adhésions et d'agrégation :**

Les candidats probiotiques et pathogènes testés ont été d'abord cultivés pour une durée de 18 h à 37°C sur milieu hyper-glucosé de la référence **Larpent (1997)** additionné du DMSO à raison de 3%, et de l'extrait phénolique du Romarin ou Citrus à 1% (5mg/ml). Ensuite Les cellules bactérienne sont récupérées par centrifugation à 5000g pendant 15 mn et lavées deux fois dans un tampon phosphate (PBS). Nous avons ensuite procéder aux tests d'adhésion et d'agrégation comme décrit au dessus dans la partie caractérisation suivant la référence **Kos et al, 2003**.

**c) Effet des extraits phénoliques sur l'antibio-résistance des pathogènes:**

Les bactéries pathogènes sont d'abord cultivées pour une durée de 18 h à 37°C sur le milieu de la référence **Larpent et al, 1997** additionné de DMSO à raison de 3%, et d'extraits phénoliques à 1% (5mg/ml). Ensuite Les cellules bactériennes sont récupérées par centrifugation à 5000g pendant 15 mn, lavées deux fois dans de l'eau physiologique puis leur charge est ajustée à  $10^8$  UFC /ml. Sur des boites Pétri contenant le milieu Muller Hinton agar 1ml de la suspension bactérienne est étalé, suite à quoi des disques d'antibiotiques sont déposés (Gentamicine CN10 : 10µg/disc, Kanamycine K30 : 30µg/disc, Oxaciline OX5 : 5µg/disc, Ampicilline A10 : 10µg/disc, Tobramycine TOB : 10µg/disc, Streptomycine S10 : 10µg/disc) sur la surface du milieu gélosé. Les boites Petrie ainsi préparées sont pré incubées au réfrigérateur pendant 30mn à 1h à +4°C afin de permettre la diffusion de l'extrait puis incubées pour une durée de 24h à 37°C. Les zones d'inhibition apparaissant autour des disques sont mesurés par le calcul de la moyenne de deux diamètres perpendiculaires (exprimés en mm).

### **III.5. Etude *in vitro* des propriétés antiproliférative et antioxydante de l'extrait sélectionné**

Ayant présenté les meilleurs propriétés ; l'étude des extraits du Romarin a été approfondie dans cette partie du travail. Deux fractions, méthanolique et d'acétate d'éthyle ont été évaluées pour leur propriétés antioxydantes et antiprolifératives vis-à-vis de deux lignées cancéreuses : CaCO-2 (lignée tumorale intestinale) et U937 (une lignée immortalisée de macrophage) ainsi que sur les cellules mono-nucléaires du sang périphérique (PBMCs).

#### **5.2. Extraction des composés phénoliques du *Rosmarinus officinalis*:**

La procédure d'extraction a été réalisée pour les feuilles sèches broyées du *Rosmarinus officinalis* en ajoutant trois solvants purs, l'hexane (HE), acétate d'éthyle (EA) et le méthanol (MeOH) respectivement. La matière végétale a été agitée avec 400ml du premier solvant (utilisé ici que pour éliminer la phase lipidique) en rotation magnétique pendant 8 h, puis filtrée sur papier Whatman. L'opération a été répétée deux autres fois, et puis la Romarin résiduel (culot) est séquentiellement extrait de la même façon par les deux autres solvants respectif pour obtenir l'extrait d'Hexane, d'Acétate d'éthyle et l'extrait Methanolique. Ces deux derniers, ont été séchés par Rota-évaporation, solubilisés dans le DMSO et ensuite conservés dans l'obscurité à -30°C attendant l'évaluation de leurs activités antioxydante et antiproliférative.

#### **5.3. Lignées cellulaire et conditions de culture:**

La lignée cellulaire Caco-2 (adénocarcinome du colon humain) a été cultivée dans le milieu DMEM supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau foetal (inactivé thermiquement à 56°C), 1% (v/v) d'acides aminés non essentiels, 1% (v/v) L -glutamine en solution et 1% (v/v) d'antibiotique (pénicilline/streptomycine). La lignée cellulaire U937 (macrophages humains immortalisés) et PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) ont été cultivées dans un milieu RPMI 1640 supplémenté par les ingrédients ajoutés ci-dessus à l'exception des acides aminés. Au cours de l'expérimentation, les cellules ont été maintenues à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub> à une humidité constante.

#### 5.4. Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux:

La teneur des extraits du *Rosmarinus officinalis* en composés phénoliques totaux a été déterminée au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu (Cimino *et al*, 2007). Brièvement, 50 µl de solution DMSO/eau contenant différentes concentrations des extraits à tester a été ajoutés à 450 µl d'eau déionisée, 500 µl de réactif de Folin-Ciocalteu et 500 µl d'une solution aqueuse de carbonate de sodium à 10%, puis les échantillons ont été maintenus à la température ambiante pendant 1 h. L'absorbance a été enregistrée à 786 nm (spectrophotomètre UV-Vis, Shimadzu Japon) contre un blanc contenant 50 µl du même solvant DMSO utilisé pour dissoudre les extraits. La teneur totale en composés phénoliques a été exprimée en Grammes d'équivalents d'acide gallique /100g d'extrait, en utilisant une courbe d'étalonnage préparée avec des solutions standard d'acide gallique. Chaque détermination a été effectuée en double et répétée au moins deux fois.

#### 5.5. Identification des composés phénoliques:

Les extraits phénoliques du *R.officinalis* ont été analysés par un équipement de chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC). Le système a été équipé de la manière suivante: deux pompes SCL-10-AVP, un contrôleur SCL-10-AVP, un détecteur à barrette de photodiodes (SPD-M10 Avp), un dégaseur DGU-14A (tout l'équipement a été fourni par Shimadzu); la colonne utilisée était une C18 (Supelco, Milan, Italie) 150 x 4,6 mm i.d 2,7 µm taille des particules. La phase mobile est composée d'une phase binaire d'eau (A) et d'acétonitrile (B) acidifiés avec de l'acide acétique jusqu'à un pH = 3. Le gradient était: 0-5 min (2% B), 5-120 min (2-100% B). Tous les solvants sont de qualité pour HPLC (Merck, Allemagne). Le volume injecté était de 20 µL à un débit de 1 mL /min. Les spectres UV ont été enregistrés entre 190 et 370 nm, et le chromatogramme fut extrait à une longueur d'onde de 280 nm (Mokhtar *et al*, 2014).

#### 5.6. Mesure de l'activité antioxydante :

##### a) Test de neutralisation du radical DPPH :

L'activité antioxydante des extraits du romarin a été évaluée en fonction de l'activité de neutralisation du radical 2,2-diphényl -1- picrylhydrazyl (DPPH). Le test DPPH a été réalisé suivant le protocole détaillé dans le travail de Siracusa *et al*, (2011). Des dilutions en série de l'extrait ont été faites de 0 à 2000 mg /mL. 1ml de chaque dilution a été mélangé avec 80 µg /mL DPPH. Après 20 min d'incubation dans l'obscurité, à température ambiante, l'absorbance

a été mesurée à 517 nm. L'échantillon témoin contenait tous les réactifs à l'exception de l'extrait. Le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant l'équation suivante:

$$\% \text{ DPPH restant} = ([\text{DPPH}] \text{ Total} / [\text{DPPH}]_0) \times 100$$

-% DPPH restant = Valeur de l'absorbance de chaque concentration / valeur de 0 absorbance (solvant + DPPH).

- Les concentrations sont rapportées comme mmol TE /g (TE = Equivalent trolox ; g = gramme d'extrait).

Les valeurs de l'IC50 (concentration de l'extrait dans le mélange réactionnel, qui diminue la concentration initiale de DPPH à 50 %) ont été estimées à partir des % d'inhibition par rapport à la courbe sigmoïde de concentration par analyse de régression non linéaire. Les données ont été présentées sous forme de valeurs moyennes  $\pm$  écart type (n = 3).

#### **b) Le test de réduction du radical ferrique FRAP :**

La capacité de réduction du radical ferrique par les extraits a été évaluée selon la méthode décrite par **Benzie et coauteurs (1996)** modifiée par **Morabito et al (2010)**. Le réactif de FRAP contenait 10 mM de 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) dans une solution d'HCl 40 mM, 20 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , et un tampon d'acétate (300 mM, pH 3,6) dans des rapports 01:01:10 (v/v/v). 50  $\mu\text{l}$  d'une solution méthanolique/aqueuse contenant différentes concentrations des extraits testés (0,06, 0,12, 0,25, 0,5, 1 et 2 mg/ml) ou du véhicule (DMSO) seul ont été ajoutés à 1 ml du réactif de FRAP, et l'absorbance a été mesurée à 593 nm par spectrophotométrie (Shimadzu, Japon) après incubation à 20°C pendant 4 min. Les résultats sont exprimés en équivalents de  $\text{Fe}^{2+}$  mmol /g d'extrait sec. Chaque détermination a été effectuée en double et répétée au moins deux fois.

### **5.7. Evaluation des propriétés antiprolifératives :**

#### **a) Activité antiproliférative « Méthode d'exclusion au Trypane bleu » :**

Pour chaque lignée cancéreuse (Caco-2 et U937)  $5 \times 10^4$  cellules/puits ont été cultivées (dans une microplaque de 48 puits) dans les deux milieu respectif DMEM et RPMI-1640 à 37°C en présence de 5% de  $\text{CO}_2$  (v/v) pendant au moins 24 h avant l'addition de l'extrait solubilisé (acétate d'éthyle ou méthanolique) dans du DMSO à différentes concentrations finales (0, 5, 10, 15, 20, 25  $\mu\text{g/ml}$ ), le paclitaxel a été utilisé comme contrôle positif (0, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5  $\mu\text{g/ml}$ ). La cytotoxicité a également été évaluée pour les PBMC ( $5 \times 10^4$

cellules/puits) aux mêmes concentrations servant de témoin. La lecture s'est faite tous les jours pendant une période d'incubation de 72h par héamocytomètre utilisant la méthode d'exclusion au colorant bleu de trypan, où les cellules mortes prennent la couleur bleue permettant un dénombrement facile des cellules viables. Les IC50 correspondent à une réduction de moitié de la croissance par rapport au témoin non traité. Les résultats sont représentés comme la moyenne de trois expériences indépendantes (**Dinicola et al, 2012**).

#### **b) Analyse du cycle cellulaire :**

L'effet des extraits sur la distribution des phases du cycle cellulaire, a été évalué par incubation des lignées tumorales U937 et Caco-2 à raison de  $4 \times 10^4$  /ml dans leurs milieux respectifs dans microplaques de 48 puits pendant 24 h. Les cellules sont cultivées en présence des extraits Méthanolique et Acétate d'Ethyle à différentes concentrations (0, 5 et 10 µg/ml) puis ensuite recueillies, lavées et fixées dans 70% d'éthanol. Après une période d'incubation d'au moins 2 h à 4°C, les cellules sont lavées, traitées avec une solution de RNase et colorées avec du fluorochrome pour ADN : le propidium iodure (PI, 50 mg / ml) pendant 30 min à la température ambiante. La fluorescence de l'iodure de propidium est ensuite mesurée par cytométrie de flux (FACScan, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Un minimum de 10 000 cellules par échantillon est acquis, et les données sont ensuite analysées en utilisant le logiciel Modfit 3. Le pourcentage de cellules en phase G0/G1, S et G2 /M est déterminé à partir des histogrammes de la teneur en ADN.

#### **c) Analyse de l'apoptose :**

L'essai à l'annexine-V PE/ AAD (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) a été utilisé pour détecter l'apoptose précoce et tardive. L'annexine V possède une forte affinité pour une phosphatidyl-sérine, qui s'extériorise dans les membranes des cellules apoptotiques. L'expérience a été réalisée selon les indications du fabricant pour les deux lignées « U937 et CaCo-2 » exposées aux extraits méthanolique et acétate d'éthyle obtenus du *Rosmarinus officinalis* à différentes concentrations (0, 10 et 15 µg/ml) pour une durée de 24 h. Les taux d'apoptose sont évalués par cytométrie en flux et la cytométrie en flux d'image (Image Stream<sup>x</sup>, Seattle, USA). Au moins 10 000 événements sont enregistrés et représentés sous forme de courbes de points.

### III.6. Etude des propriétés immuno-modulatoires d'une souche probiotique

#### 6.1. Souches bactérienne et des conditions de croissance

*Lactobacillus acidophilus* NCFM et *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 5289 ont été fournies par le Pr. Lisbeth Nielsen (Center for Biological Sequence Analysis, Université technique de Lyngby, au Danemark), tandis que *E. coli* 10536, *P. aeruginosa* 25853 et *S. aureus* 43300 ont été fournis par le Dr Angela Filocamo (Laboratoire de Microbiologie, Université de Messine, Italie). Les cultures ont été récoltées à la phase stationnaire de croissance par centrifugation (5000 g, 5 min) puis lavées deux fois dans du PBS. Les souches obtenues ont été éliminées par une exposition de 20 min à la lumière UV puis stockées à -80°C. La mortalité bactérienne a été vérifiée par ensemencement des bactéries exposées aux UV sur des boîtes de gélose nutritive (Merck, Darmstadt, Allemagne).

#### 6.2. Génération des cellules dendritiques à partir des monocytes

Les cellules mononuclées du sang périphérique PBMCs humaines ont été obtenues à partir de sang hépariné de volontaires sains en utilisant la méthode de séparation Ficoll basée sur le gradient de densité, puis les cellules dendritiques ont été obtenues comme décrit précédemment (**Bonaccorsi et al, 2010**). Brièvement, les monocytes adhérentes isolées ont été cultivées pendant 6 jours dans un milieu RPMI-1640 (Bio-Whittaker, Cambrex Société, Verriers, Belgique) contenant 10% (v/v) de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur (Sigma-Aldrich), la pénicilline (100 U/ml), streptomycine (100 µg/ml), de la glutamine (4 mM) et supplémenté avec  $10^3$  U/ml d'IFN- $\alpha$  et 25 ng/ml de GM-CSF (Schering-Plough, Kenilworth, NJ) comme facteur de différenciation. Après 3 jours d'incubation du milieu frais contenant de l'IFN- $\alpha$  et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages a été ajouté. Après 6 jours, les cellules CD14 ont été différenciées en DCs immatures non adhérentes. Quatre-vingt dix à 95% des cellules a exprimé les marqueurs DCs.

#### 6.3. La stimulation des cellules dendritiques avec des bactéries

Des DCs immatures ont été remis en suspension à une densité de  $5 \times 10^5$  cellules /ml dans du milieu RPMI-1640 frais etensemencées dans des plaques de 48 puits à un volume final de 500 µl /puits. Les bactéries pro-inflammatoires (*Lactobacillus acidophilus* NCFM, *E. coli* 10536, *P. aeruginosa* 25853 et *S. aureus* 43300) ont été ajoutés (à 1/100 ratios DC / bactéries) seul ou en combinaison avec *Lactobacillus reuteri* 5289. Les cultures cellulaires ont été

incubées pendant 48 heures à 37°C dans 5% de CO<sub>2</sub>. Le LPS (*E coli*; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) a été utilisé comme contrôle positif à une concentration finale de 0,1 µg/ml.

#### **6.4. Immuno-marquage et cytométrie en flux**

Les cellules dendritiques exposées à divers traitements sont récoltées et lavées deux fois dans une solution tampon phosphate (PBS). Les anticorps suivants ont été utilisés pour le marquage des cellules : PE-conjugué anti-souris CD80, FITC conjugué anti-souris CD83 (BD Biosciences, San Jose, CA). La liaison non spécifique est évaluée par des isotypes contrôles. Les DCs ont été analysées en utilisant un cytomètre en flux BD FACS basée sur le comptage de 10 000 cellules. Le niveau d'expression est mesuré comme la moyenne géométrique de la fluorescence (MFI).

#### **6.5. Quantification des cytokines dans le surnageant de culture**

Après exposition des DCs immatures à différentes conditions pendant 48 heures, les surnageants de culture ont été récoltés et stockés à une température de -30°C jusqu'à utilisation. La production d'IL10 et IL12 (p70) a été quantifiée en utilisant FlowCytomix système de détection d'analytes multiples (E-Bioscience, San Diego, CA, USA) en suivant les instructions du fabricant.

#### **6.6. Phosphorylation des MAPK**

L'expression de la phosphorylation des MAP kinases p38 et ERK1/2 a été estimée par cytométrie de flux en utilisant des anticorps dirigés (BD Bioscience, San Jose, CA). Des DC immatures ont été exposés à des bactéries pour différents points dans le temps, puis les cellules ont été fixées dans 2% de formaldéhyde pendant 10 min à 37°C. Après lavage, la perméabilisation de la membrane cellulaire a été effectuée avec du méthanol froid à 90% pendant 30 min sur de la glace. Les cellules ont été lavées deux fois dans du tampon d'incubation (PBS + BSA à 0,5%), marqué avec des anticorps anti-p38 et anti-ERK1 /2 pour 45mn, et on le lave ensuite dans un tampon d'incubation. La cascade de transduction du signal a été évaluée en utilisant un cytomètre de flux (FACSCanto II; Becton Dickinson, Mountain View, CA).

### **III.7. Analyse statistique**

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> des tests antioxydants et antiprolifératifs ont été calculées à partir des courbes de régression linéaire utilisant le logiciel PHARMA /PCS-version 4. Pour l'ensemble des expériences les résultats sont exprimés sous forme de valeurs moyennes +écart-type de trois expériences séparées. Les données ont été analysées en utilisant le test t de Student. Les différences sont considérées comme statistiquement significative des contrôles à un P <0,05.

## *Chapitre IV*

# **Résultats et Discussion**

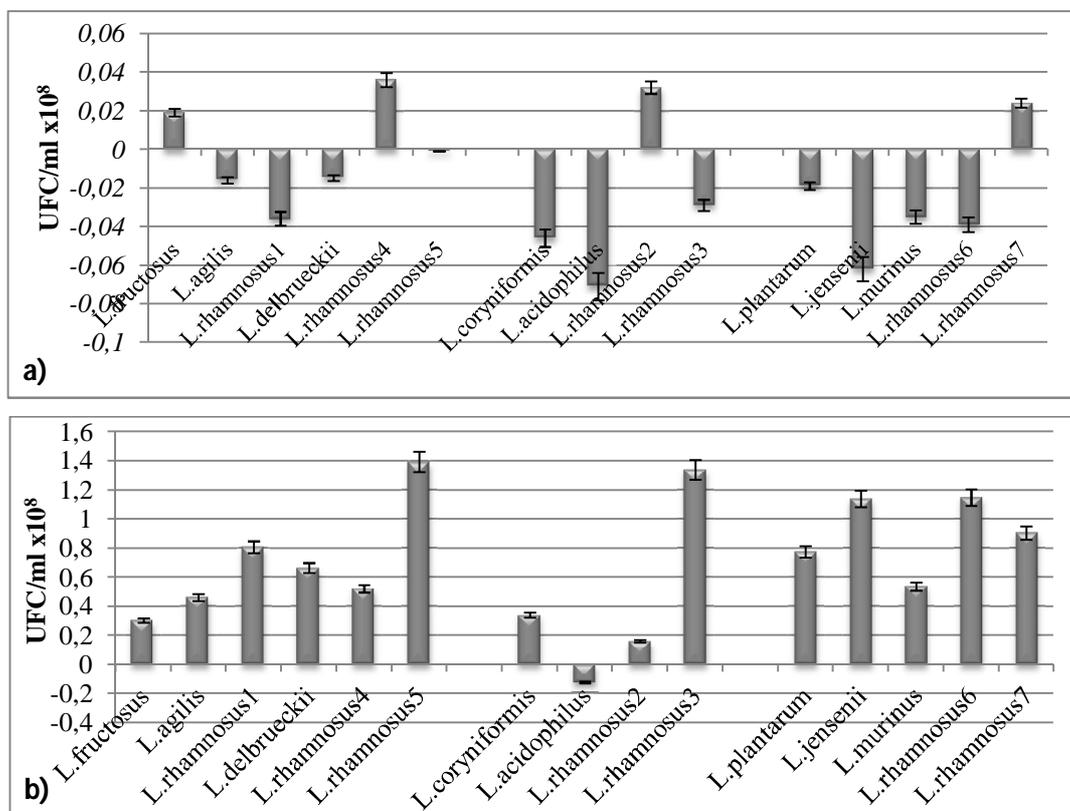
« Il y'a un chemin secret de la difficulté au succès »

Jalâl al-Dîn Rûmî

## IV.1. Isolement et Caractérisation des candidats probiotiques :

### 1.1. Résistance a la barrière gastro-intestinale

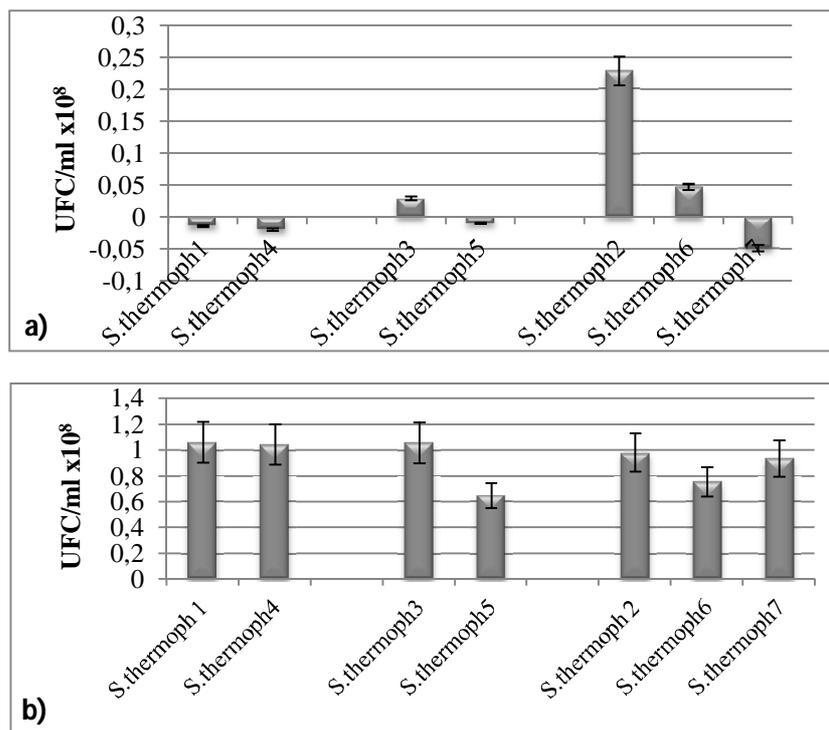
L'objet de cette partie d'étude est d'isoler des souches lactiques à partir de matières fécales humaines, et de les caractériser ensuite pour leurs potentialités probiotique. Au total 22 souches appartenat aux genres *Lactobacillus* et *Streptococcus* ont été obtenues. Les souches lactiques ayant présentées les meilleures caractéristiques en termes de résistance à l'acidité, de tolérance des sels biliaries et d'activité antimicrobienne ont été sélectionnées pour l'évaluation de leurs propriétés d'adhésion et d'agrégation.



**Figure 11:** Résistance des souches de *Lactobacillus* à la barrière gastro-intestinale. a) Resistance à l'acidité b) tolérance des sels biliaries. Les variations observées ont été comparées à l'énumération initiale et les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD d'au moins deux expériences indépendantes.

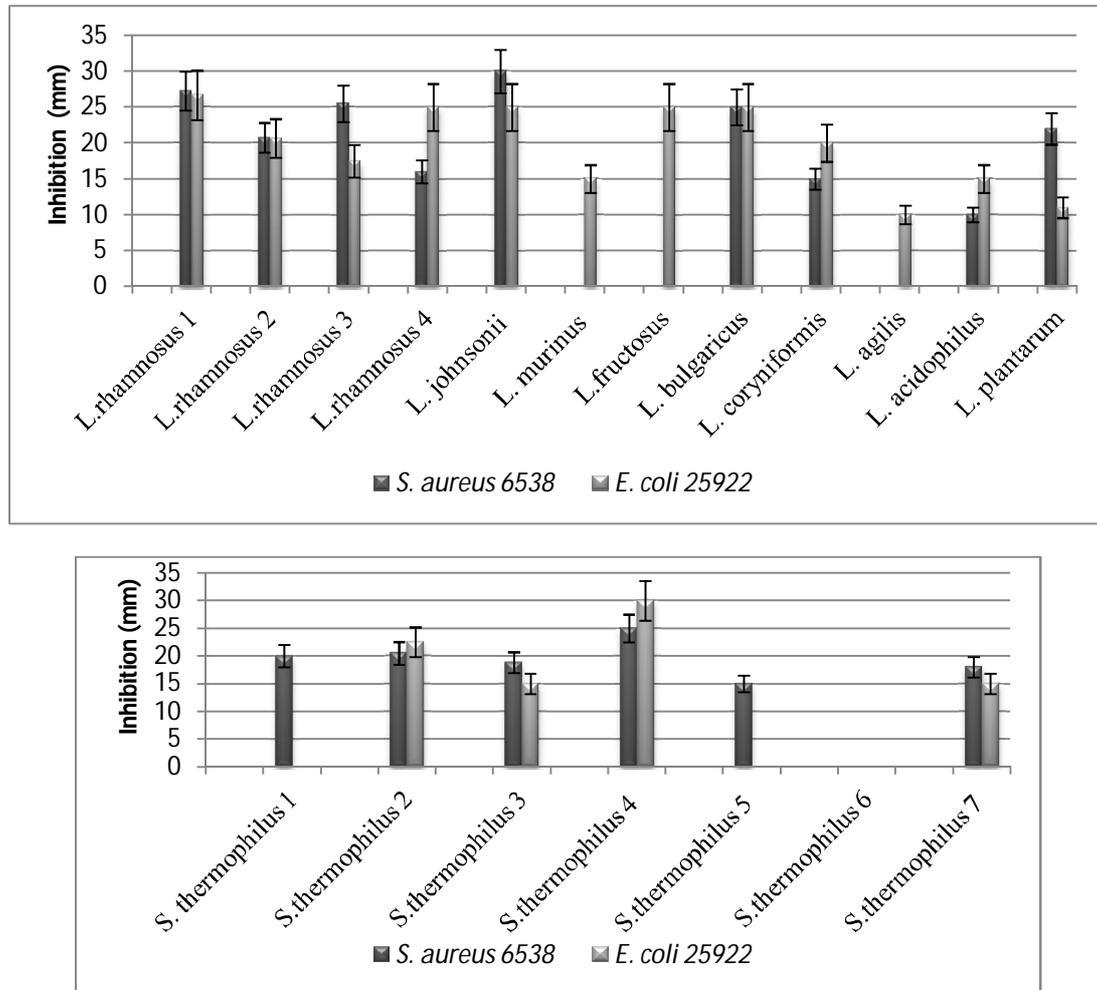
Environ 2,5 L de suc gastrique sont quotidiennement libéré dans l'estomac (**Charteris et al, 1998**). Au repos le pH de l'estomac est d'environ 2, mais peut atteindre une valeur de 5 avec un apport de repas (tampon), et revenir à la ligne de base dans les deux heures (**Hill et**

**Marsh, 1989**). Par conséquent, une bonne résistance à la barrière gastrique est un critère important pour la sélection des micro-organismes probiotiques (**Charteris et al, 1998**). La moyenne de la concentration des sels biliaries dans le tractus intestinal humain est d'environ 0,3% (p/v) (**Dunne et al, 1999**). Ainsi, il est également nécessaire d'évaluer la capacité d'un candidat probiotique à résister à l'action des sécrétions en sels biliaries (**Collins et al, 1998**). Nous avons étudié les potentialités probiotiques de 15 souches de *Lactobacillus* et 07 *Streptococcus* isolés à partir de matières fécales de donneurs enfants âgés entre 3 mois et 5 ans en bonne santé n'ayant pas subi de traitement antibiotique pendant au moins trois mois avant l'échantillonnage. Les résultats avaient montrés une grande variabilité entre les souches en réponse à ce système *in vitro* simulant la barrière gastro-intestinale. Cependant, les bactéries testées étaient nettement plus résistant aux sels biliaries à une teneur physiologique de 0,3% par rapport au milieu acide où la plupart des souches ont été inhibées (**figure 11 et 12**).



**Figure 12:** Résistance des souches de *Streptococcus* à la barrière gastro-intestinale. a) Resistance à l'acidité b) tolérance des sels biliaries. Les variations observées ont été comparées à l'énumération initiale et les données sont exprimées en moyennes± SD d'au moins deux expériences indépendantes.

Les résultats sont en concordance avec ceux obtenus par **Vinderola et Reinheimer (2003)** qui ont observé pour différentes souches de *S. thermophilus* et *Lactobacillus* une baisse significative de la croissance jusqu'à 3 et 5 log UFC/ ml à un pH de 3, tandis que les bactéries étaient plus résistantes à la action des sels biliaries.



**Figure 13:** Activité inhibitrice des souches lactiques l'égard de *S. aureus* 6538 et *E. coli* 25922. Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  SD d'au moins deux expériences indépendantes.

Comme démontré par la méthode de diffusion sur gélose, les candidats probiotiques ont exercé une grande activité inhibitrice contre les bactéries cibles. L'effet antagoniste diffère toutefois grandement entre les souches (**figure 13**). Quelques auteurs ont montré que les bactériocines sont plus efficaces contre les agents pathogènes à Gram positif, agissant par la formation de pores dans la membrane plasmique, ce qui conduit à une perturbation des fonctions cellulaires. Par ailleurs, les agents pathogènes Gram-négatives ont été démontrés

plus sensibles à la production d'acides par les bactéries lactiques (**Tortzis et al, 2004; Amar et al, 2012**). La majorité des souches testées ont été capables d'inhiber à la fois *S. aureus* et *E. coli* ce qui pourrait indiquer que le mécanisme comprend la production d'acides ainsi que les bactériocines. À la lumière des résultats obtenus, quatre souches lactiques ont été sélectionnés comme probiotiques potentiels: *S. thermophilus* 3, *L.rhamnosus* 1, *L. johnsonii* et *L. bulgaricus*. Elles ont donc été validées pour les expériences qui suivent.

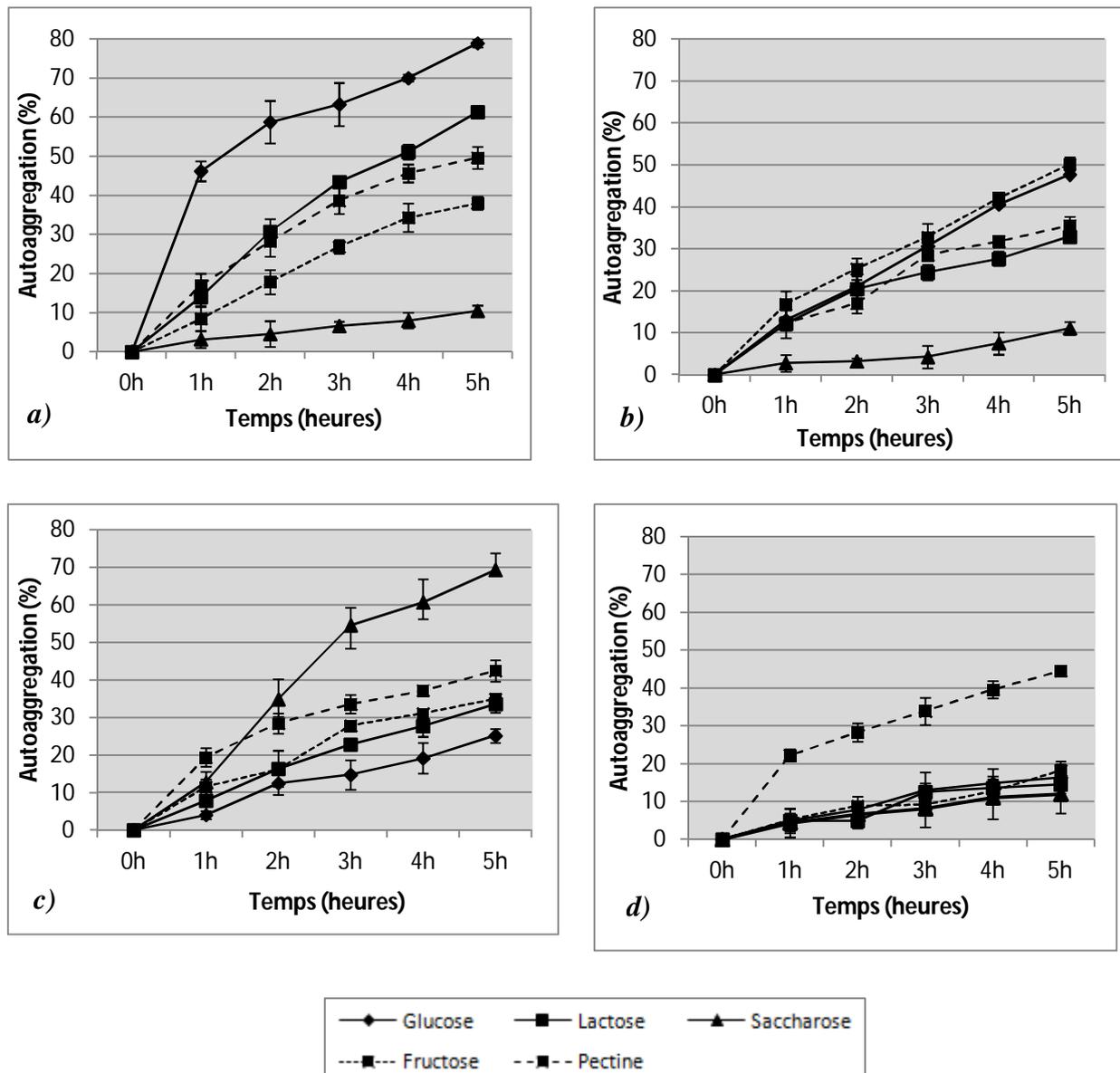
## **1.2. Impact de la source de carbone sur les propriétés d'adhésion:**

Une bonne adhérence des souches probiotiques au sein du tractus digestif prolongerait leur séjour et ainsi l'exercice de leurs bénéfices. A partir de là nous nous sommes intéressés à évaluer la possibilité d'améliorer cette propriété chez les candidats probiotiques sélectionnés. Nous avons démontré au sein de ce travail que la source de carbone est un élément majeur possédant un impact direct sur les propriétés d'adhésion et d'agrégation.

### **1.2.1. Effet sur la capacité d'auto-agrégation**

L'auto-agrégation des souches probiotiques semble être nécessaire pour leur adhérence sur les cellules épithéliales de l'intestin comme démontré dans diverses études (**Del Re et al, 2000**). Cette propriété est fortement corrélée aux caractéristiques de sédimentation des souches. Tel que rapporté par **Balakrishna (2013)** trois phénotypes d'auto-agrégation peuvent être définies: a) des souches fortement auto-agrégantes ( $\geq 70\%$ ) agrégation immédiatement et formation d'un précipité résultant en une solution claire; b) des souches non-auto-agrégantes ( $\leq 20\%$ ) produisant une turbidité constante; c) des souches mixtes (entre 20 et 70%) montrant à la fois un précipité et une turbidité constante. La nature de la source de carbone a remarquablement influencé la capacité d'agrégation des candidats probiotiques testés (**Figure 14**). Les valeurs maximales d'agrégation ont été remarquées pour *L.bulgaricus* (avec le glucose comme substrat : **figure 14-a**) et *L.rhamnosus* 1 (en présence du saccharose : **La figure 14-c**) avec des taux respectifs d'adhérence de l'ordre de 79% et 69%. Cependant, nous n'avons pas trouvé d'influence significative pour *L.johnsonii* (sauf avec la pectine) où les valeurs obtenues sont relativement faibles par rapport aux autres souches (**figure 14-d**). Une explication possible des taux variables obtenus de l'auto- agrégation pourrait être due à leur différence d'affinité pour la source de carbone. Cette affinité spécifique a été rapportée dans la littérature principalement déterminée par le système de transport ABC. Ce dernier est composé de lipoprotéines ATP-dépendant situé à la surface de la cellule et impliqués dans le transport de différents composés, en particulier les sucres (**Sutcliffe et Russell, 1995**). De même, certains

auteurs ont rapporté que la source de carbone constitue un facteur important influençant la biosynthèse d'exopolysaccharides (EPS) sécrétés par les bactéries lactiques. En plus de la nature du substrat, sa concentration peut avoir un effet stimulant sur la production d'EPS (**Gamar et al, 1997**), et pourrait même changer la nature de l'exopolymère excrété (**Gancel et Novel, 1994**). Certains auteurs ont également signalé une forte relation entre la production d'exo- polysaccharides et l'adhérence des bactéries à la muqueuse intestinale. En effet, ces polymères favorisent l'agrégation et la formation du bio-film, une étape nécessaire dans le processus de colonisation (**Roger, 2002**).

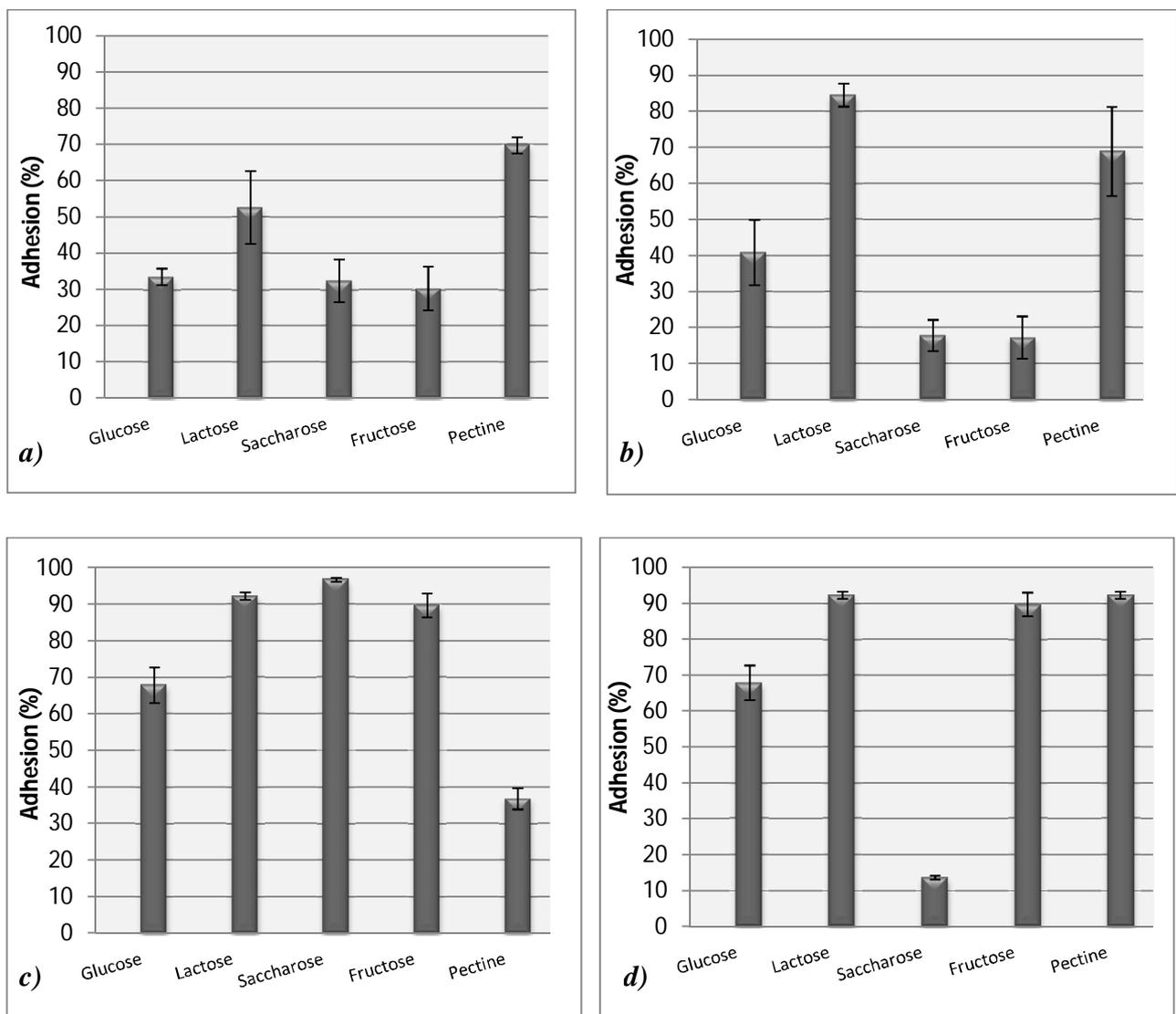


**Figure 14:** Effet de la source carbone sur l'habilité d'auto-agrégation des candidats probiotiques. *a) L. bulgaricus b) S. thermophilus 3 c) L. rhamnosus 1 and d) L. johnsonii* (Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  Ecart type de trois expériences indépendantes).

Une autre explication pourrait être associée à la *Quorum Sensing* et la production d'EPS. En effet, ce phénomène d'auto-induction est fortement influencé par des facteurs environnementaux, tels que: le pH, l'osmolarité, mais aussi de la nature de la source de carbone peut en outre constituer un facteur important (Anderson, 2003), ce qui peut justifier la variabilité des taux d'auto-agrégation.

### 1.2.2. Effet sur l'habilité d'adhésion :

Les résultats obtenus dans cette étude ont révélés que la nature de la source de carbone ; peut significativement influencer la propriété d'adhérence des bactéries probiotiques (figure 15).



**Figure 15:** Effet de la source de carbone sur la propriété d'adhésion des candidats probiotiques. *a) Lbulgaricus*, *b) S.thermophilus* 3 , *c) L.rhamnosus* 1 , *d) L.johnsonii*. (Les résultats sont exprimés en moyenne de trois expériences indépendantes  $\pm$  écart type).

La souche *S.thermophilus* 3 (**figure 15-b**) est hydrophile après une pré-incubation en présence du saccharose (18%) et du fructose (17%), modérément hydrophobe en présence de glucose (41%) et hydrophobe en présence du lactose (84%) et de la pectine (69%). Une corrélation remarquable entre l'adhésion et l'auto- agrégation a été remarqué pour les deux souches *L. bulgaricus* et *S.thermophilus* 3 pour les substrats : pectine, glucose et lactose. De même, une bonne corrélation a été observée pour la souche *L.rhamnosus* 1 en particulier en présence des sucres saccharose, lactose et pectine. Des résultats similaires ont été signalés dans certaines études (**Perez et al, 1998; Del Re et al, 2000**), tandis que d'autres auteurs n'avaient pas démontrés de corrélation (**Vinderola et al, 2004**). Il convient de noter que la synthèse de la plupart des constituants de la paroi cellulaire, est spécifique de chaque souche et peut être modifié en fonction de l'état physiologique des celle-ci. Modifiant ainsi, ses propriétés physico-chimiques de surface telles que l'hydrophobie et le comportement bio-adhésif (**Peng et al, 2001**). La capacité d'adhérence des bactéries associée à la production de bactériocines, confère à la souche un avantage compétitif en favorisant son installation à l'intérieur du tractus gastro-intestinal (**Ennahar et al, 1996**). En outre, les mécanismes à l'origine de cette variabilité sont probablement les mêmes que ceux mentionnés ci-dessus pour le test d'auto- agrégation.

### 1.2.3. Effet sur la production d'EPS probiotiques :

Les données obtenues indiquent que la nature de la source de carbone exerce une influence majeure sur la production d'exopolysaccharides par les souches lactiques étudiées (**Tableau 05**). Les niveaux d'EPS étaient plus importants en présence du lactose comme substrat où *S.thermophilus* 3 et *L.bulgaricus* avaient atteint des productions maximales respectives de  $807 \pm 153$  et  $585,75 \pm 85$  mg/L. Cette production élevée semble être associée avec leurs capacités élevées adhésions et d'agrégation des comme le montre les **figures 14 et 15**. De même, la production d'EPS maximale enregistrée pour *L.rhamnosus* 1 en présence du saccharose, a été corrélée avec des taux d'adhésion et d'agrégation plus élevés. Cependant, nous n'avons pas observé une corrélation entre la production des exopolysaccharides et les propriétés d'adhérence pour toutes les bactéries testées. Plusieurs facteurs peuvent affecter la production des EPS: la nature de la souche, le milieu de culture, la période d'incubation ainsi que la nature de la source de carbone (**Robjin et al, 1996**). Il a été rapporté que la source de carbone constitue un facteur important qui influence la biosynthèse des EPS par les bactéries lactiques. En plus de la nature du substrat, sa concentration peut avoir un effet stimulant sur la production d'EPS et pourrait même changer la nature du polymère excrété (**Gamar et al,**

1997). Certains auteurs ont également observé une forte relation entre la production des exopolysaccharides et l'adhérence des bactéries aux surfaces inertes ainsi que les tissus vivants (Tannock, 2005). Ruas-mediedo *et al* (2006) ont rapporté que les EPS produits par les souches probiotiques pourraient être en mesure d'adhérer à la muqueuse intestinale, et que les effets sont dépendant de la dose et de la nature de l'EPS. Ces polymères pourraient favoriser l'agrégation et la formation du biofilm, une étape nécessaire dans le processus de la colonisation (Robjin *et al*, 1996). D'autre part, la production d'exopolysaccharides peut être associée au phénomène du *quorum sensing*, où l'exopolymère pourrait être sécrété seulement à une certaine charge bactérienne. En effet, ce phénomène d'auto-induction est fortement influencée par des facteurs environnementaux tels que: le pH, l'osmolarité et la nature du substrat saccharidique (Gamar *et al*, 1997).

**Table 05:** Effet de la source de carbone sur la production des exopolysaccharides

Substrat Souche	Glucose	Lactose	Saccharose	Fructose	Pectine
<i>L.bulgaricus</i>	355,25 ± 59	585,75 ± 85 <sup>a</sup>	549,75 ± 59	500,75 ± 67	315,5 ± 50
<i>S.thermophilus</i> 3	531,25 ±140	807 ± 153 <sup>a</sup>	524,25 ± 30	370,5 ± 80	369,75 ± 27
<i>L.rhamnosus</i> 1	342,75 ± 97	292,25 ± 15	680,75 ± 67 <sup>a</sup>	672,25 ± 80 <sup>a</sup>	353,75 ± 35
<i>L.johnsonii</i>	278 ± 110	298,5 ± 68	480 ± 110 <sup>a</sup>	250,75 ± 27	275,5 ± 29

probiotiques (EPS mg/L):

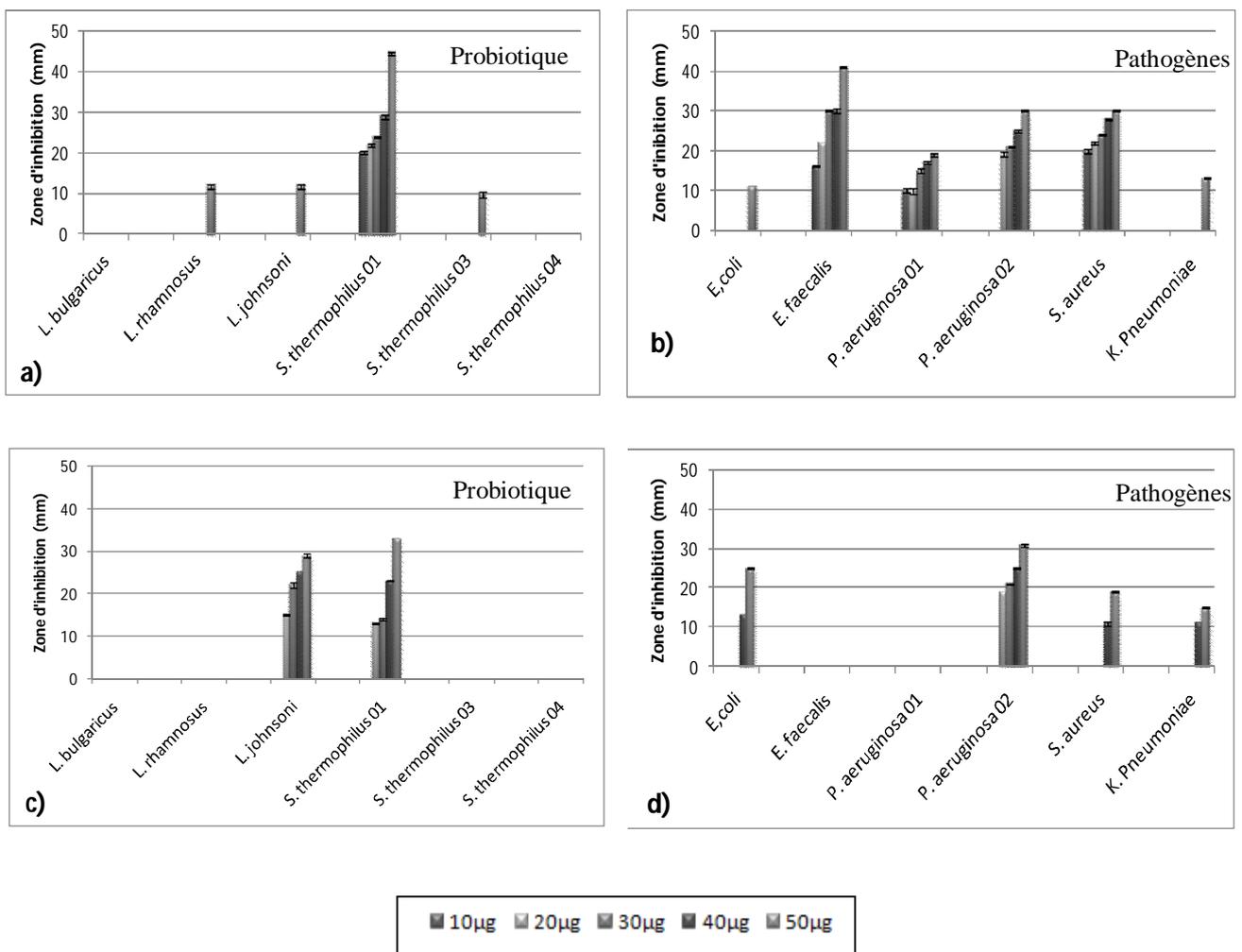
a: Représente une différence statistiquement significatif entre les groupes.

### IV.3. Potentialité prébiotique des extraits phénoliques du Romarin et Citrus:

Deux extraits phénoliques obtenus à partir du *Rosmarinus officinalis* et du *Citrus sinensis* ont fait l'objet de cette étude. La potentialité prébiotique a été évaluée en terme d'activité antibactérienne à l'égard de candidats porbiotiques et pathogènes, leur impact sur les propriétés d'adhérence ainsi que la sensibilisation vis-à-vis des antibiotiques.

### 3.1. Effet antibactérien des extraits phénoliques du Romarin et du Citrus:

La **figure 16 a, b** montre que les candidats probiotiques avaient présenté une bonne résistance à l'égard de l'extrait Méthanolique du *Rosmarinus officinalis* exception faite pour la souche *S.thermophilus* 01 ayant connue un maximum d'inhibition de l'ordre de 45mm. Par contre les souches pathogènes se sont révélées sensibles pour les différentes doses utilisées, particulièrement *Enterococcus faecalis* avec un diamètre d'inhibition de 40 mm. La même observation fut relevée pour l'extrait du *Citrus sinensis* (**Figure 16 c, d**) où seulement deux candidats probiotiques se sont révélé sensibles alors quatre des six pathogènes étudiées ont été fortement inhibées notamment *P.aeruginosa* 02.



**Figure 16:** Effet des extraits Méthanoliques du *Rosmarinus officinalis* (**a, b**) et du *Citrus sinensis* (**c, d**) sur les souches probiotiques et pathogènes (résultats exprimés en moyenne  $\pm$  écart type)

La sensibilité observée pour les souches étudiées peut être due à l'action des composantes des extraits sur des cibles cellulaires multiples, plutôt qu'un emplacement spécifique d'action. Le mécanisme de toxicité peut être lié à: **1)** L'inhibition de la synthèse des acides nucléiques où un certain nombre d'études avait démontré que le cycle aromatique B des flavonoïdes (présent dans les extraits méthanoliques) jouerait un rôle dans l'intercalation des liaisons hydrogènes sur les acides nucléiques, résultant en une inhibition de la synthèse d'ADN et d'ARN (**Mirzoeva et al, 1997**). **2)** Inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique, augmentant la perméabilité de la membrane bactérienne intérieure et une dissipation du potentiel membranaire. Le gradient électrochimique des protons à travers la membrane étant essentiel pour le maintien de la capacité de synthèse d'ATP des bactéries, son transport membranaire et sa motilité (**Cushnie et Lamb, 2005**). **3)** Inhibition des enzymes : Selon (**Cowan, 1999**), les flavonoïdes peuvent provoquer l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases). A titre d'exemple, d'après l'étude de **Plaper et ses collaborateurs (2003)**, l'activité antibactérienne contre *E. coli* est partiellement attribuable à l'inhibition de l'ADN gyrase.

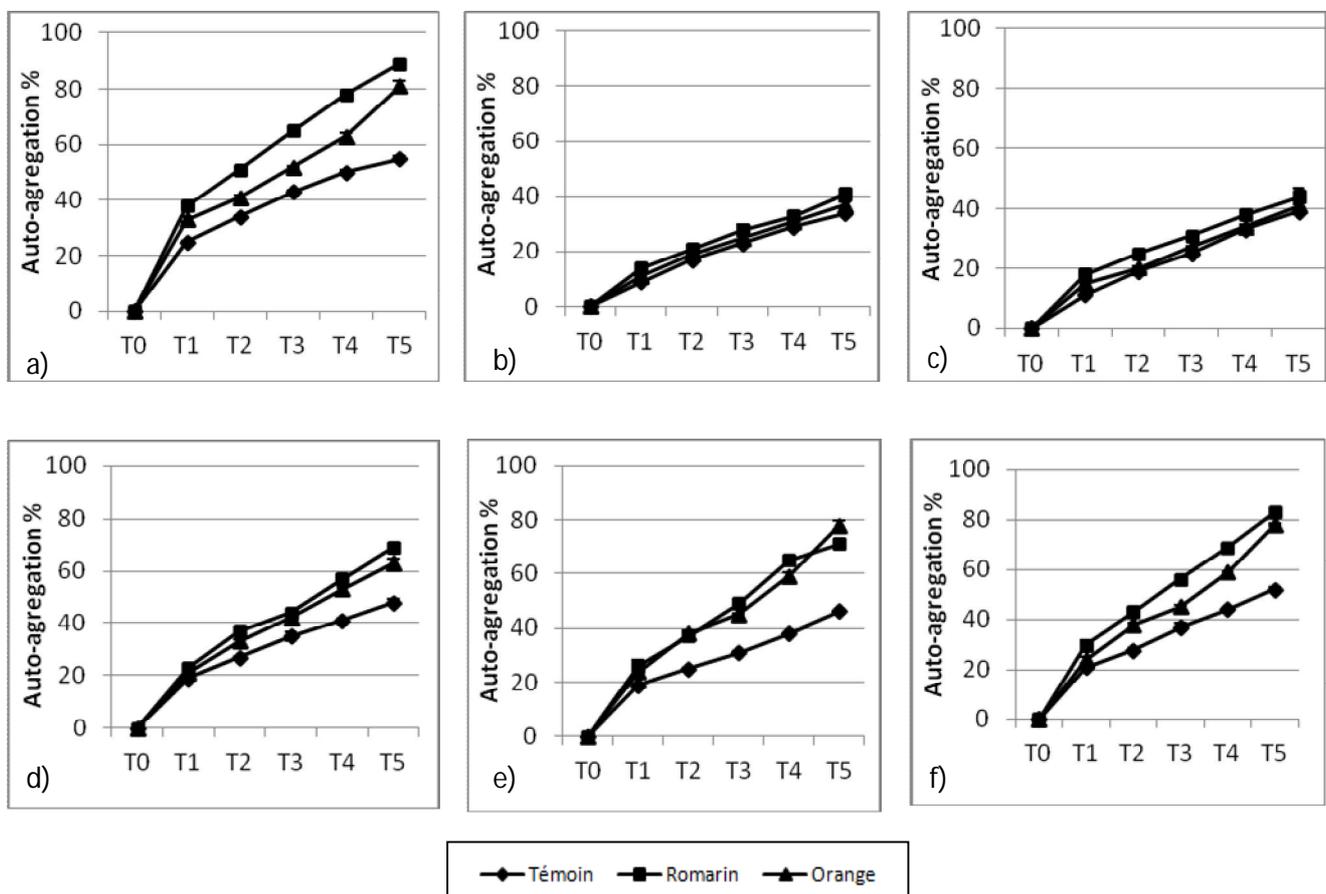
Par ailleurs, la résistance observée peut être expliquée par le fait que Chaque composé agit spécifiquement sur un ou plusieurs germes. A titre d'exemple, la galangine possède une activité spécifique contre *S. aureus* (**Cushnie, 2003., Martini 2004**). En outre certains auteurs ont rapportés que les extraits phénoliques obtenus avec du méthanol à 95% sont actifs sur certaines bactéries, alors que ceux extraits avec le même solvant à 60% ne le sont pas, comme c'est le cas de l'extrait phénolique du *Linum capitatum* contre *S. aureus* (**Akroum, 2006**). À partir de là, la nature du solvant de même que sa concentration peuvent être d'une influence majeure sur la composition de l'extrait, par conséquent sur son efficacité.

### **3.2. Effet des extrais phénoliques sur l'habilité d'adhésion et d'agrégation :**

Afin de manifester des effets bénéfiques, les bactéries probiotiques doivent se trouver en grand nombre dans l'intestin et démontrer de même une bonne agrégation à la muqueuse intestinale en vue d'exercer leur bénéfice. Nous évaluons dans cette partie d'étude l'effet des extraits phénoliques sur ces deux propriétés chez des candidats probiotiques ainsi que des pathogènes intestinaux.

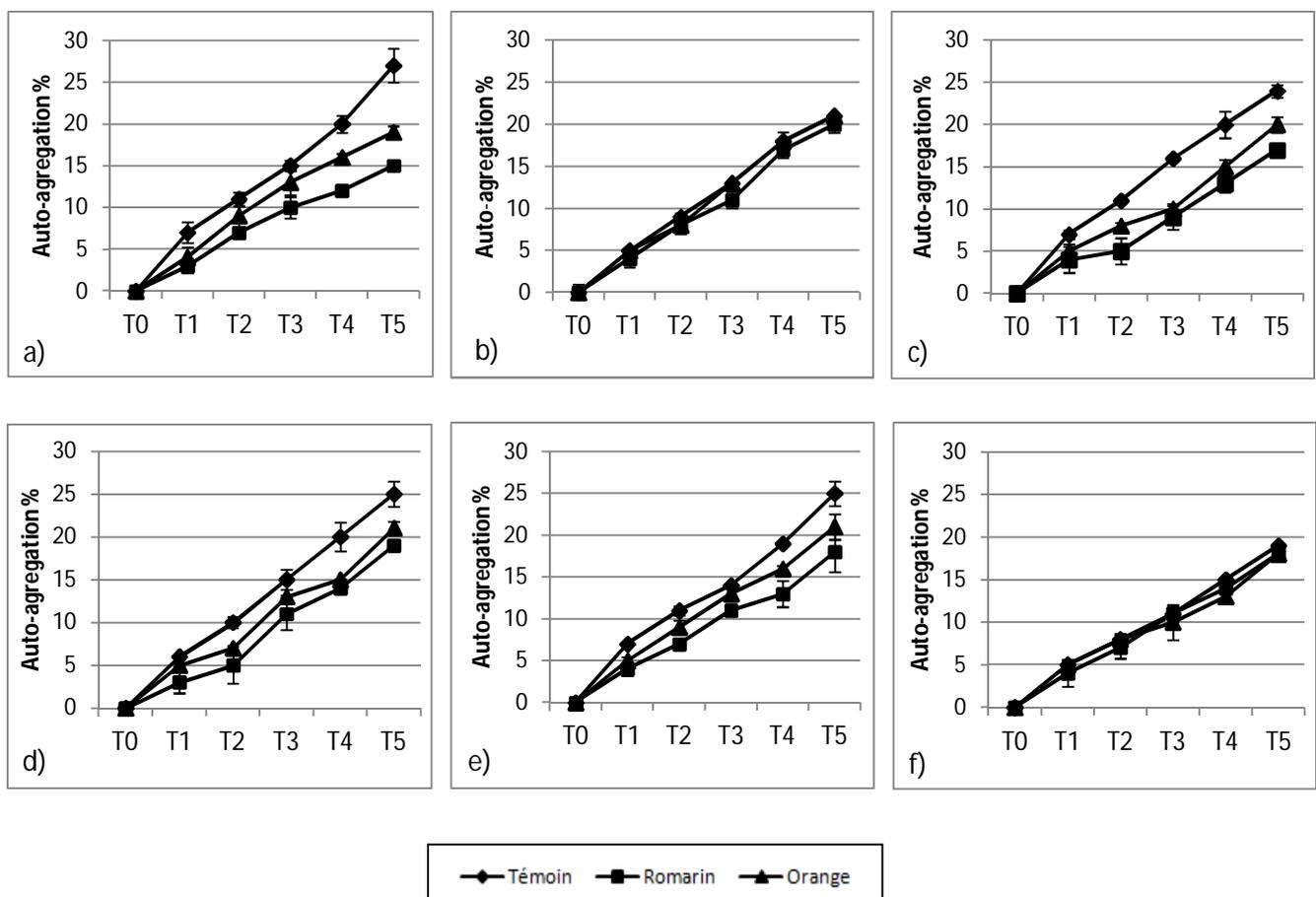
### 3.2.1. Effet des extraits phénoliques sur la propriété d'auto-agrégation:

L'adhésion bactérienne est une action qui se caractérise par l'ensemble des phénomènes physicochimiques et biologiques permettant à une bactérie de s'unir à une surface de façon durable (Quiryne and Bollen, 1995). Tandis que l'auto-agrégation est liée à l'adhésion cellule à cellule entre les bactéries d'une même souche la co-agrégation concerne deux ou plusieurs souches génétiquement différentes (Yuan et Seppo, 2009). L'habilité d'adhésion des souches probiotiques, semble nécessaire pour leur ancrage aux cellules épithéliales de l'intestin, et leur habilité à l'agrégation favoriserait leur installation ainsi que la formation d'une barrière prévenant la colonisation par les microorganismes pathogènes (Del Re *et al*, 2000).



**Figure 17 :** Effet des extraits phénoliques (1%) sur les propriétés d'auto-agrégation des souches probiotiques : **a)** *L. bulgaricus*, **b)** *L. rhamnosus*, **c)** *L. johnsonii*, **d)** *S. thermophilus* 1 **e)** *S. thermophilus* 2, **f)** *S. thermophilus* 3 (résultats exprimés en moyenne  $\pm$  écart type).

Il est clair d'après le **figure 17** que les deux extraits phénoliques ont visiblement stimulé le taux d'auto-agrégation des candidats probiotiques testés, notamment le Romarin où une augmentation maximale de l'ordre de 34% a été obtenue chez *L. bulgaricus* et d'environ 30% chez *S.thermophilus* 03. Pour les deux souches *L.rhamnosus* et *L. johnsonii* une légère augmentation fut également remarquée. L'extrait phénolique de l'orange avait exercé une influence notable sur les propriétés d'auto-agrégation, particulièrement chez la souche *L. bulgaricus* où une stimulation de l'ordre de 27% fut relevée. Les résultats obtenus corroborent les observations faites par **Shinde (2012)** ayant démontré que les extraits phénoliques obtenus à partir de la peau de pomme (notamment la rutine) avaient notablement stimulé l'adhérence de différentes souches probiotiques.



**Figure 18 :** Effet des extraits phénoliques (1%) sur les propriétés d'auto-agrégation des souches pathogènes : **a)** *E. coli*, **b)** *E. faecalis*, **c)** *P. areroginosa 1*, **d)** *P. areroginosa 2* **e)** *S. aureus*, **f)** *K. pneumoniae* (résultats exprimés en moyenne  $\pm$  écart type).

D'après la **figure 18** l'extrait du Romarin avait notablement abaissé le taux d'agrégation des souches pathogènes exception faite pour *E. faecalis* et *K. pneumoniae* où aucun changement remarquable n'a été enregistré. La réduction du taux d'agrégation était maximale chez *Escherichia coli* avec un abaissement d'environ 17%, suivi par *S. aureus*, *P.aeruginosa* 01 et *P. aeruginosa* 02 avec une réduction d'environ 7%. L'action de l'extrait phénolique de l'orange sur l'auto-agrégation du pathogène reste moins efficace comparée à celle du Romarin. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par **Parkar et al, 2008** ayant observés un effet stimulateur des extraits phénoliques sur l'adhésion des souches probiotiques tandis que cette propriété fut notablement réduite chez des pathogènes testés.

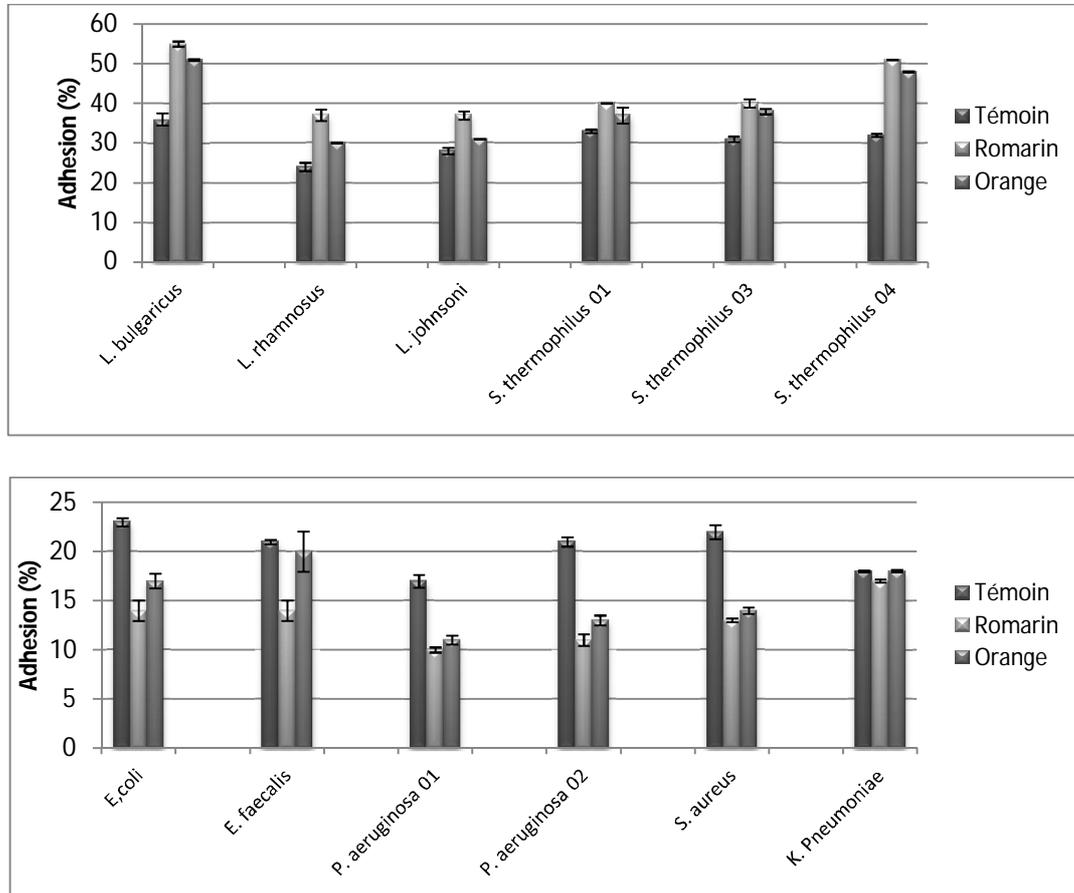
Les résultats de l'auto-agrégation des probiotiques et pathogènes corrobore les recherches de **Collado et al, (2007)** faisant répartir les souches en trois groupes : le premier groupe a montré des capacités d'auto agrégation élevés, une agrégation faible caractérise le deuxième, et le troisième possède une capacité d'auto-agrégation bien faible. La stimulation remarquable de l'auto agrégation des probiotiques et la diminution importante de celle des pathogènes témoigne la potentialité symbiotique entre l'extrait phénolique du Romarin et les candidats probiotiques notamment *S.thermophilus* et *L. bulgaricus*, et son action antagoniste vis-à-vis des pathogènes particulièrement *Escherichia coli* et *S.aureus*.

### 3.2.2. Effets des extraits du Romarin et du Citrus sur l'habilité d'adhésion :

L'adhésion des microorganismes probiotiques à la muqueuse intestinale est essentielle dans le mécanisme de la colonisation ainsi que dans le phénomène d'antagonisme contre différents entéropathogènes (**Owhand, 1998**).

Il est claire d'après la **figure 19** que la capacité d'adhésion des probiotiques est importante atteignant de valeurs maximal de 55% comparée aux pathogène qui présentent une habilité d'adhésion ne dépassant pas les 23%. Les deux extraits étudiés avait amplifié les propriétés d'adhésion des candidats probiotiques, notamment celui du Romarin, où nous avons enregistré des valeurs maximales chez *S.thermophilus* 04 et *L.bulgaricus* (50 et 55% respectivement) avec une augmentation du taux d'adhésion de l'ordre de 18% et 16%. En revanche chez les pathogènes il a été observé que les extraits phénoliques testés avaient remarquablement réduit l'habilité d'adhésion, particulièrement le Romarin, ayant exercé une action notable contre *P. aeruginosa* 02 *S.aureus* et *E. coli*, de même une réduction remarquable fut observé chez *P. aeruginosa* 01 et *E.faecalis*. Exception faite pour *K.pneumoniae* où les deux extraits n'avaient pas atténué cette propriété. La même remarque

a été relevée pour *E. faecalis* avec l'extrait d'orange, où aucun effet n'a été démontré, tandis qu'en présence de l'extrait du Romarin un abaissement du pourcentage de l'ordre de 6% a été noté. Des observations similaires ont été faites par **Parkar et ses collaborateurs (2008)**.



**Figure 19 :** Effet des extraits phénoliques (1%) sur les propriétés d'adhésion des souches probiotiques et pathogènes (Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  écart type)

Globalement, l'extrait du Romarin avait influencé d'une manière plus efficace l'habilité d'adhésion des deux groupes de bactéries ; probiotiques et pathogènes comparé à l'extrait phénolique du Citrus. Nous avons également constaté une forte corrélation entre l'habilité à l'adhésion et la capacité d'auto-agrégation chez les candidats probiotiques et pathogènes. En effet, une stimulation de l'auto-agrégation des candidats probiotiques s'est accompagnée d'une augmentation de la capacité d'adhésion, à titre d'exemple chez *L. bulgaricus* et *S. thermophilus 03* des taux d'adhésion respectifs de 55% et 51%, sont corrélés à des taux d'agrégaions élevés d'environ 89% et 83% respectivement. De même une très bonne corrélation a été obtenue pour les souches pathogènes, où nous avons remarqué une réduction parallèle du pourcentage d'adhésion et d'agrégaion, notamment

avec l'extrait du Romarin. Alors qu'une corrélation positive a été observée dans de nombreux travaux (Peréz *et al*, 1998 ; Del Re *et al*, 2000), elle n'a pas été vérifiée par d'autres auteurs (Vinderola *et al*, 2004).

### 3.2.3. Effet des extraits phénoliques sur l'antibiorésistance des pathogènes

Il est clair d'après la **figure 20** que l'ensemble des souches étaient résistantes à l'action de l'Oxacilline et l'ampicilline, et sensibles à l'action des quatre autres antibiotiques (Tobramycine, Streptomycine, Kanamycine et Gentamicine). Nous avons également remarqué que l'extrait du Romarin avait notablement augmenté la sensibilité aux antibiotiques chez les deux souches *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa* 02 et à une moindre mesure celle de *Pseudomonas aeruginosa* 01. À titre d'exemple, la sensibilité à la Tobramycine chez la souche *Enterococcus faecalis* avait été augmentée de 15mm comparée au témoin. Par contre ce même extrait étudié n'avait pas exercée d'effet notable sur *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae*. D'autre part, l'extrait du Citrus avait démontré un faible effet comparé à celui du Romarin, presque absent chez les souches *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae* ainsi que *Enterococcus faecalis*. Plus remarquable encore était l'augmentation de la résistance chez les souches *Pseudomonas aeruginosa* 02, *Pseudomonas aeruginosa* 01 et *S. aureus* notamment chez cette dernière avec une réduction du diamètre d'inhibition d'environ 13mm (Tobramycine). Par ailleurs, cette induction de la résistance n'a pas été observée chez l'extrait du Romarin qu'avec la souche *S. aureus* où une réduction maximale de l'ordre de 15mm a été notée pour la Tobramycine. À la lumière des résultats obtenus, nous avons pu observer trois types de réponses :

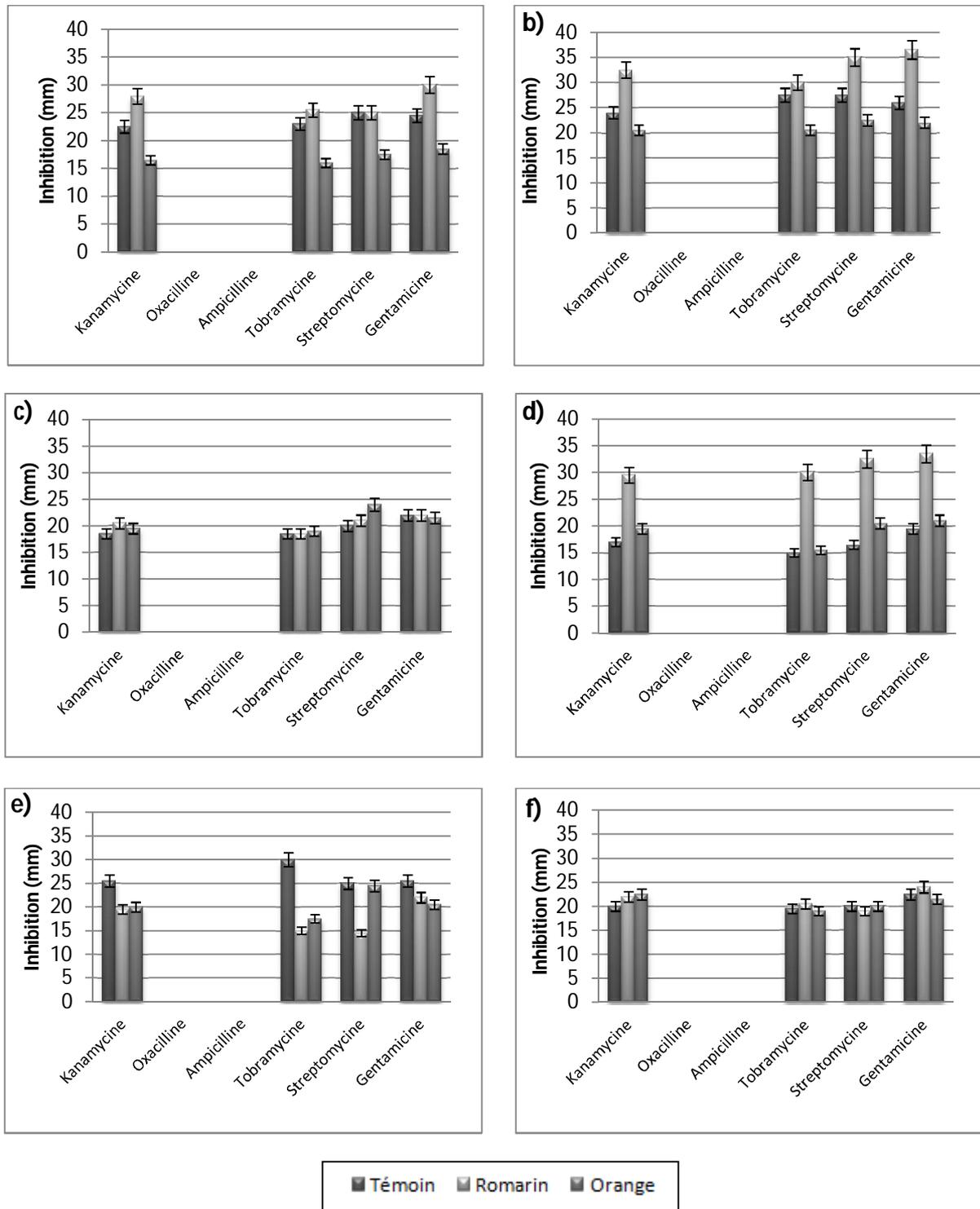
#### a) L'extrait ne sensibilise pas la souche à l'action de l'antibiotique :

Comme c'est le cas pour l'ampicilline et l'oxacilline, Cela peut être dû : **1)** soit au fait que la résistance a comme support génétique le chromosome bactérien, ce qui rend difficile de la moduler, par comparaison à un gène de résistance se trouvant sur un plasmide **2)** que la concentration en extrait est plus réduite pour ainsi voir un effet **3)** il se peut également que l'extrait soit inefficace même à des concentrations élevées.

#### b) L'extrait augmente la sensibilité aux antibiotiques :

Bien apparent avec l'extrait du Romarin chez les deux souches *E. faecalis* et *P. aeruginosa* 02. Cela peut être expliqué par le fait que l'extrait phénolique ait stressé la bactérie, la rendant encore plus sensible à l'action de l'antibiotique. Ce qui laisse suggérer une

potentialité synergétique entre l'extrait du Romarin et des antibiotiques tel que la Kanamycine, la Tobramycine, Streptomycine et la Gentamicine.



**Figure 20 :** Effet des extraits phénoliques (1%) sur l'antibiorésistance des souches pathogènes **a) *P.areroginosa 1*, b) *P.areroginosa 2*, c) *E.coli*, d) *E.faecalis*, e) *S.aureus*, f) *K.pneumoniae*.** Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type.

**c) L'extrait diminue la sensibilité aux antibiotiques :**

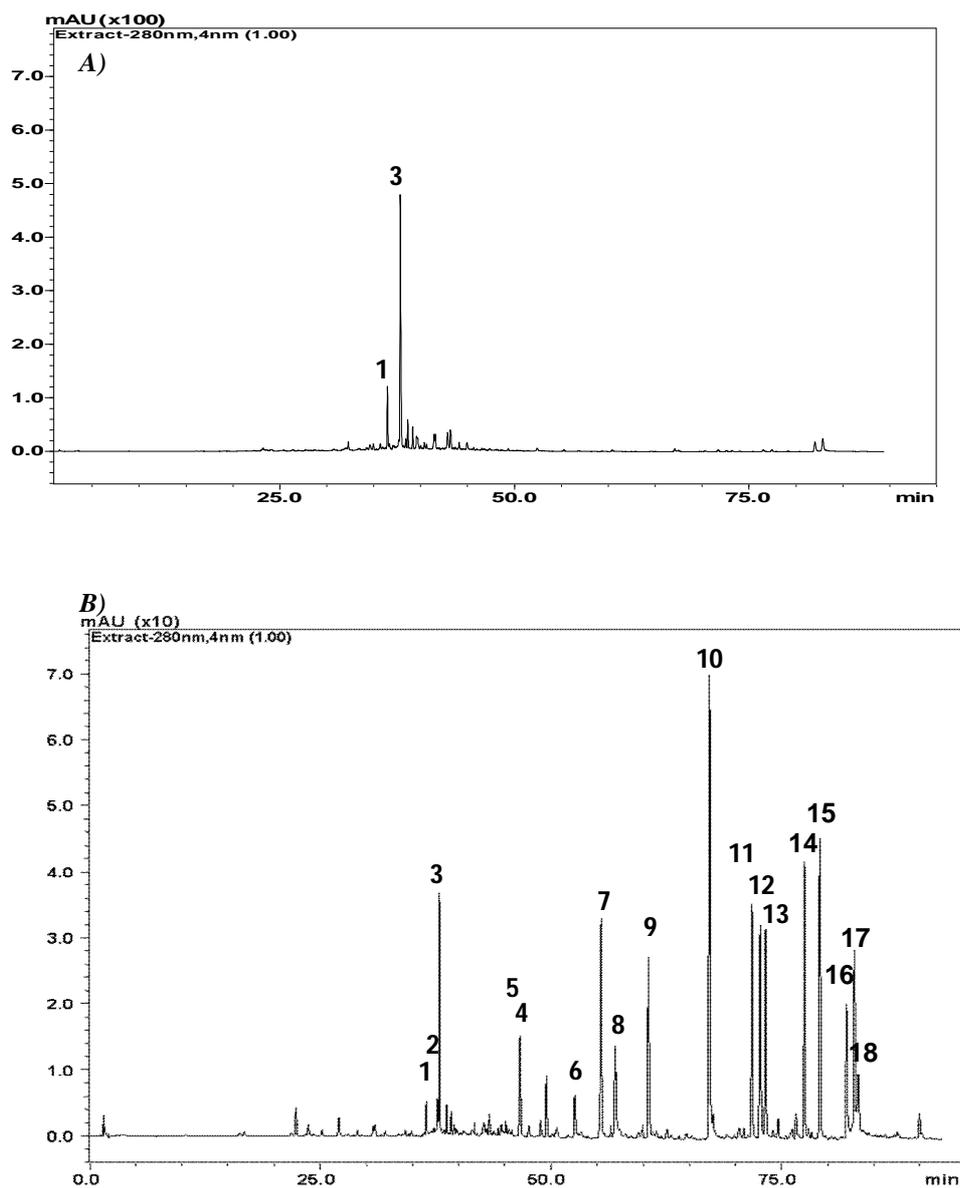
Soit que l'extrait phénolique ait stimulé les acteurs membranaires intervenant dans l'externalisation de l'antibiotique, il serait également probable qu'il ait stimulé l'expression du gène de la résistance.

**IV.4. Propriétés antioxydantes et antiprolifératives des extraits du Romarin**

Ayant présenté les meilleurs caractéristiques prébiotiques, l'extrait phénolique du Romarin fut validé pour cette partie d'étude. Il servira donc pour des analyses de caractérisation physicochimiques ainsi que l'évaluation de ses propriétés antioxydantes et anti-tumorales.

**IV.4.1. Caractérisation physico-chimique :**

Le contenu polyphénolique totale était plus élevée dans l'extrait méthanolique du romarin (ME) avec environ  $2.589 \pm 0,0055$  g/100 g de matière sèche en équivalent acide gallique comparée l'extrait d'acétate d'éthyle (EA) avec  $0,7637 \pm 0,0056$  g/100 g de matière sèche (**Tableau 06**). Toutefois, ce dernier était plus riche en terme de diversité avec environ 13 composés identifiés, principalement des diterpènes phénoliques tels que le Carnosol, l'acide Carnosic et le méthyle carnosate tandis que l'acide Rosemarinique était la composante majeure dans la fraction ME suivie par la isorhamnétine-3-O-hexoside un flavonoïde glycosylé comme le montre la **figure 21** et **tableau 06**. Les composés présents dans les extraits de romarin peuvent être classés en trois groupes: les diterpènes, les flavonoïdes et les acides phénoliques. Les diterpènes sont représentés par l'acide carnosique, le carnosol, rosmanol, méthyle carnosate et Rosmadial. Les flavonoïdes comprennent la genkwanine, 4'Metoxytecto-chrysin, Homoplantagin, scutellaréine et cirsimaritrine. Bien que, de l'acide rosmarinique était le seul acide phénolique identifié. Ces principaux éléments ont été signalés dans de nombreuses études évaluant la composition des extraits du romarin (**Almela et al, 2006**). Nos résultats corroborent ceux de **Zheng et Wang (2001)** et **Shan et al, (2005)**, qui ont indiqué que l'acide Rosemarinique était le composé phénolique le plus abondant identifiés dans les extraits de la famille de Labiacea.



**Figure 21:** Chromatogrammes HPLC-MS des extraits du *Rosmarinus officinalis* enregistrés à 280nm: **A)** Extrait méthanolique and **B)** Extrait d'acetate d'éthyle.

**Table 06:** Caractérisation par chromatographie à haute pression (HPLC) des extraits méthanolique (ME) et d'acétate d'éthyle (EA) du Romarin à 280nm:

Composés	$\lambda_{max}$	temps de rétention (mn)	%Area EA	%Area ME
1. Isorhamnetin-3-O-hexoside	274, 345	36.34	0.64	10.18
2. Homoplantagin	270, 333	37.69	1.29	
3. Acide Rosmarinique	218, 328	37.80	5.91	50.11
4. NI	260, 340	46.68	2.01	
5. Scutellarein	275, 337	48.79	0.43	
6. NI	225, 277	52.50	2.08	
7. Cirsimaritin	278, 336	55.37	7.06	
8. Rosmanol	286, 333	56.88	4.23	
9. Genkwanin	269, 338	60.42	5.49	
10. Carnosol	284	66.95	14.18	
11. Rosmadial	230, 286	71.44	5.90	
12. 4'Metoxytectochrysin	270, 334	72.34	6.88	
13. Methyl ester d'acide rosmarinique	270, 329	72.92	3.31	
14. NI	223, 280	77.06	1.90	
15. Carnosoic acid	286	78.66	13.86	
16. NI	225, 276	81.60	5.82	
17. Methyl carnosate	225, 278	82.42	7.40	
18. NI	213, 278	82.89	2.27	

#### IV.4.2. Tests antioxydants :

La teneur en composés phénoliques totaux des extraits étudiés a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Les données du **tableau 07** montrent que la plus grande quantité de phénols totaux a été détectée dans l'extrait méthanolique avec un équivalent d'acide gallique jusqu'à trois fois plus élevé par rapport à la fraction d'acétate Ethyle. En effet, cette teneur plus élevée a été positivement corrélée avec sa capacité antioxydante, en termes de neutralisation du radical DPPH avec une  $IC_{50}$  de 0,510 mg/ml et un équivalent en trolox élevé de l'ordre de  $1,29 \pm 0,07$  mmol extrait TE/g. En outre, l'extrait méthanolique a été caractérisé par un pouvoir réducteur ferrique supérieur de 1,714 mmol de  $Fe^{2+}$  /g d'extrait. Les propriétés observées peuvent être dues à l'acide Rosemarinique qui est le composant dominant dans cette

fraction telle que révélée par l'analyse chromatographique HPLC (**Tableau 06**). Des observations similaires ont été relevées par **Zakariat et collaborateurs (2011)** pour les feuilles de *Melastoma malabathricum*, où la plus forte teneur de la fraction méthanolique a été associée à une capacité antioxydante maximale. En outre, il a été signalé dans quelques études que les extraits naturels de la famille des labiacaes caractérisés par une teneur plus élevée d'acide Rosemarinique possèdent une activité anti-oxydante plus importante (**Shan et al, 2005**). Par ailleurs, l'activité de l'extrait d'acétate Ethyle semble être liée à ses diterpènes dominants, notamment carnosol, l'acide carnosique et le méthyle carnosate. En fait, les propriétés antioxydantes des extraits du romarin ont été attribuées dans quelques études aux diterpènes phénoliques tels que l'acide carnosique, carnosol et rosmanol (**Munne-Bosch et Alegre, 2001**).

**Table 07.** Activité anti-oxydante des extraits phénoliques du *Rosmarinus officinalis*.

Extrait	Phénols totaux (g GAE* /100 g extract)	DPPH (mmol TE/g extract)	DPPH IC <sub>50</sub> (mg/ml)	FRAP (mmol Fe <sup>2+</sup> /g )
Extrait Méthanolique	2.589 ± 0.0055	1.29 ± 0.07	0.510 (0,444-0,5862)	1.714 ± 0.068
Extrait Ethyle Acetate	0.7637± 0.0056	0.72 ± 0.020	0.719 (0,3515-1,471)	1.240 ± 0.052

\*GAE: (équivalent en acide gallique)

Les cellules cancéreuses existent dans un état de stress oxydatif puisque cette pathologie augmente leur potentiel de survie par activation de la signalisation d'oxydo-réduction qui peut conduire à l'activation de facteurs de survie tels que le NFκB et l'AP- 1 et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur tels que la p53 (**Zakaria et al, 2011**). En outre, il a été démontré que de faibles niveaux d'espèces réactives de l'oxygène pourraient induire la prolifération des cellules cancéreuses (**Del Bello et al, 1999**). Ainsi, l'un des mécanismes proposés pour l'activité anti-proliférative a été lié dans quelques études à la capacité antioxydante. En effet, il a été démontré dans plusieurs travaux que les activités antioxydantes des extraits naturels telles que la neutralisation des radicaux libres, la peroxydation lipidique et les activités de chélation des métaux peuvent améliorer l'activité anti-cancéreuse de nombreux médicaments anticancéreux chimiques (**Nagendra - Prasad et al, 2009, Awney et Sindi 2010, Cheng et al, 2011, Manosroi et al, 2012**). A partir de là, les propriétés

antioxydantes démontrées chez les deux extraits du romarin, particulièrement celui méthanolique, pourraient également favoriser leurs potentialités anti-tumorales.

#### IV.4.3. Effet antiprolifératif des extraits du romarin :

##### 4.3.1. Evaluation de la cytotoxicité :

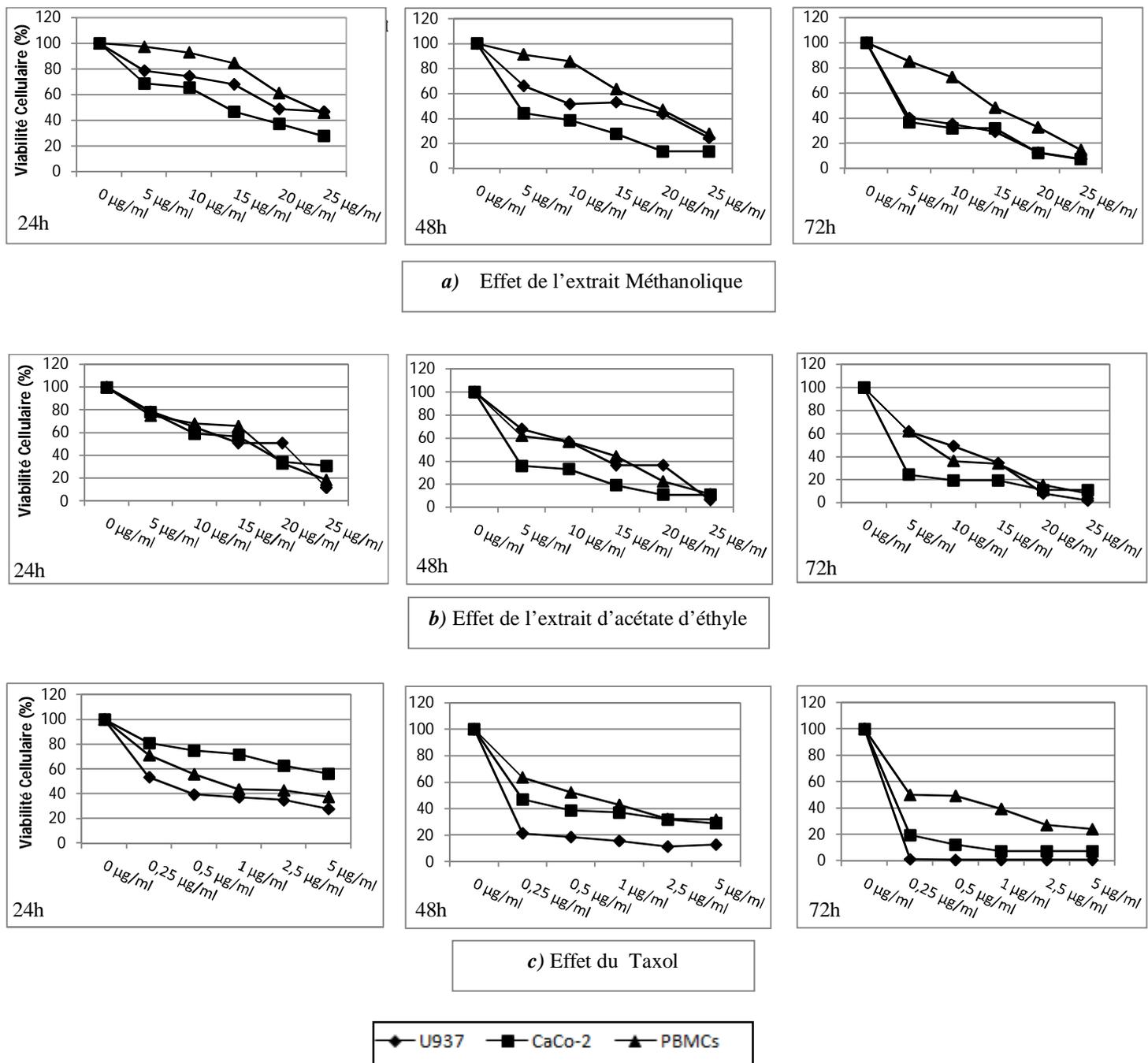
Il est clair à partir de la (**figure 22**), que les deux extraits ont exercé une activité anti-proliférative contre les lignées cellulaires tumorales testées, d'une manière à la fois concentration et temps dépendante. La fraction méthanolique avait démontré une meilleure activité en particulier contre les cellules Caco- 2 (**figure 22 -a**) avec moins d'efficacité sur les cellules PBMC par rapport au Taxol utilisée ici comme témoin positif (**figure 22 -c**). De même l'extrait acétate d'éthyle a été nettement plus Efficace sur les cellules Caco- 2 après 48 heures d'incubation, tandis que l'activité du Taxol était plus prononcée envers la lignée cellulaire U937 (**figure 22- b**).

**Tableau 08.** Les valeurs d'IC<sub>50</sub> ± SD des extraits du *Rosmarinus officinalis* et du Taxol après 24 heures d'exposition.

Composé / extrait	IC <sub>50</sub> (µg/ml)		
	U937	Caco-2	PBMCs
Extrait Méthanolique	19.64 ±1.36	14.62 ±2.00	25.4 ±2.54
Extrait Ethyle Acetate	14.85 ±0.20	14.95 ±2.32	14.43 ±4.33
Taxol	0.23 ±00	3.21 ±1.72	0.96 ±0.24

Les résultats obtenus sont conformes à ceux rapportés par (**Cheung et Tai, 2007, Cheng et al, 2011**) où l'extrait éthanolique du romarin a également démontré des effets anti-prolifératifs sur la leucémie humaine ainsi que sur des cellules du carcinome du sein. Les deux extraits peuvent être classés comme actifs (IC<sub>50</sub> valeurs 20 µg/ml), selon l'Institut national du cancer (NCI), USA (**Boyed, 1995**).

L'activité antiproliférative de l'extrait méthanolique a été plus importante sur les cellules cancéreuses comparée aux cellules normales PBMC (**figure 22-a, tableau 08**), particulièrement après 48 heures d'incubation où les IC<sub>50</sub> étaient respectivement 9,79 ± 0,13 et 4,9 ± 1,04 pour U937 et Caco- 2 et 20,21 ± 1,48 pour les PBMCs.



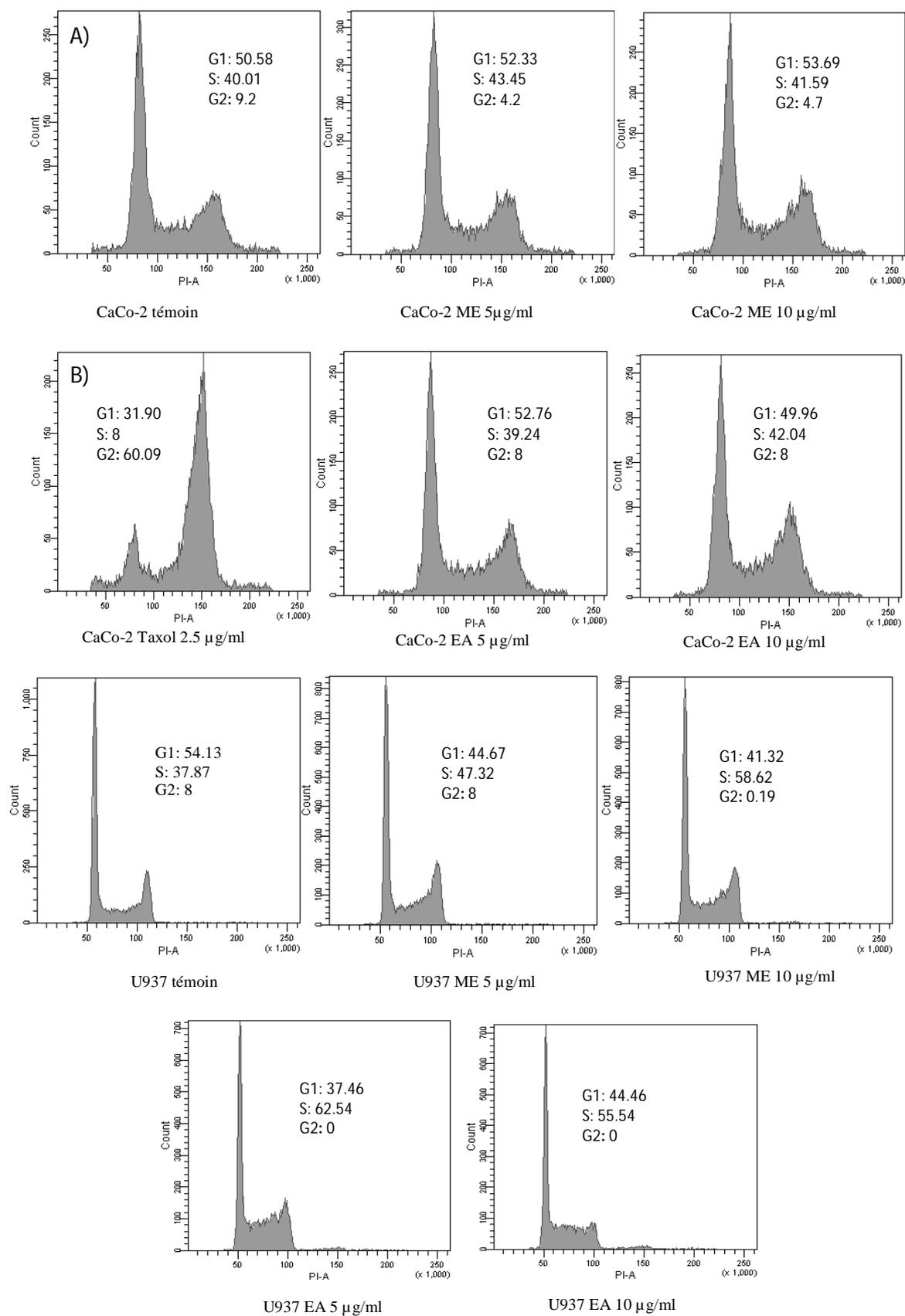
**Figure 22:** Cytotoxicité de l'extrait du romarin sur deux lignées cellulaires tumorales (U937 et Caco- 2) et les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC). Les résultats sont exprimés en tant que pourcentage du contrôle, et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Les résultats corroborent les données de certains travaux indiquant une inhibition sélective de la croissance d'extraits naturels contre différentes cellules cancéreuses humaines avec moins d'effet sur les lignées cellulaires normales (Zhao *et al*, 2004, Noratto *et al*, 2010., Guil

-Guerrero *et al*, 2011., Gonzalez- Sarrias *et al*, 2012). Plusieurs mécanismes antiprolifératifs pourraient être impliqués en fonction du type de constituants phytochimiques présents dans les extraits, principalement : 1) l'induction d'inhibiteurs de cycline kinases-dépendantes ou du mécanisme d'apoptose 2) Arrêt du cycle cellulaire à la phase G1/S 3) l'inhibition des kinases de la survie cellulaire et les facteurs de transcription inflammatoires, ou 4) la réduction des produits de gènes anti-apoptotiques (Zakaria *et al*, 2011). Les résultats qui suivent de l'analyse du cycle cellulaire et de l'apoptose sont en concordance avec les mécanismes présentés.

#### 4.3.2. Analyse du cycle cellulaire:

Les résultats de l'analyse du cycle cellulaire ont montré que la lignée cellulaire U937 était nettement sensible à l'action des deux extraits ainsi que pour le taxol (**Figure 23-b**) où nous avons observé une augmentation significative du pourcentage de cellules en phase S , avec une diminution concomitante des populations cellulaires dans les phases de G1 et G2/M. Ces extraits du Romarin semblent être principalement des inducteurs d'arrêt à la phase S du cycle cellulaire après 24 h de traitement. L'extrait d'acétate d'éthyle a montré la meilleure efficacité à la concentration testée de 5µg/ml (62% de la population dans la phase S) suivi par l'extrait méthanolique à 10 µg/ml et du Taxol 0.05µg/ml. Les résultats corroborent les travaux faits par Vaz *et al* (2012) , où ils ont démontré que l'extrait éthanolique du *Clitocybe alexandri* peu bloquer la distribution du cycle cellulaire dans la phase S d'une manière dose dépendante, de même Gonzalez- Sarrias *et al* (2012) avaient démontrés que les composés phytochimiques présents dans les extraits aqueux d'érable peuvent inhiber la prolifération de cellules du cancer du colon en bloquant la progression du cycle cellulaire à la phase S en raison de la diminution de l'expression des cyclines A et D1. Toutefois, seul l'extrait Méthanolique du romarin avait exercé un effet sur le cycle cellulaire de la lignée Caco-2 avec une nette diminution de la phase G2/M après 24h d'incubation (**figure 23-a**). Cette observation, est en concordance avec les résultats obtenus par Sharif *et al*, (2012), où ils ont rapporté que l'activité anti-proliférative du jus d'*Aronia melanocarpa* sur les cellules Caco-2 et Jurkat a été associée à un arrêt du cycle cellulaire en G2/M avec une diminution concomitante de l'expression de la cycline B1. Le témoin positif (Taxol) avait bloqué la croissance dans la phase G0/G1 avec une distribution de 92%.

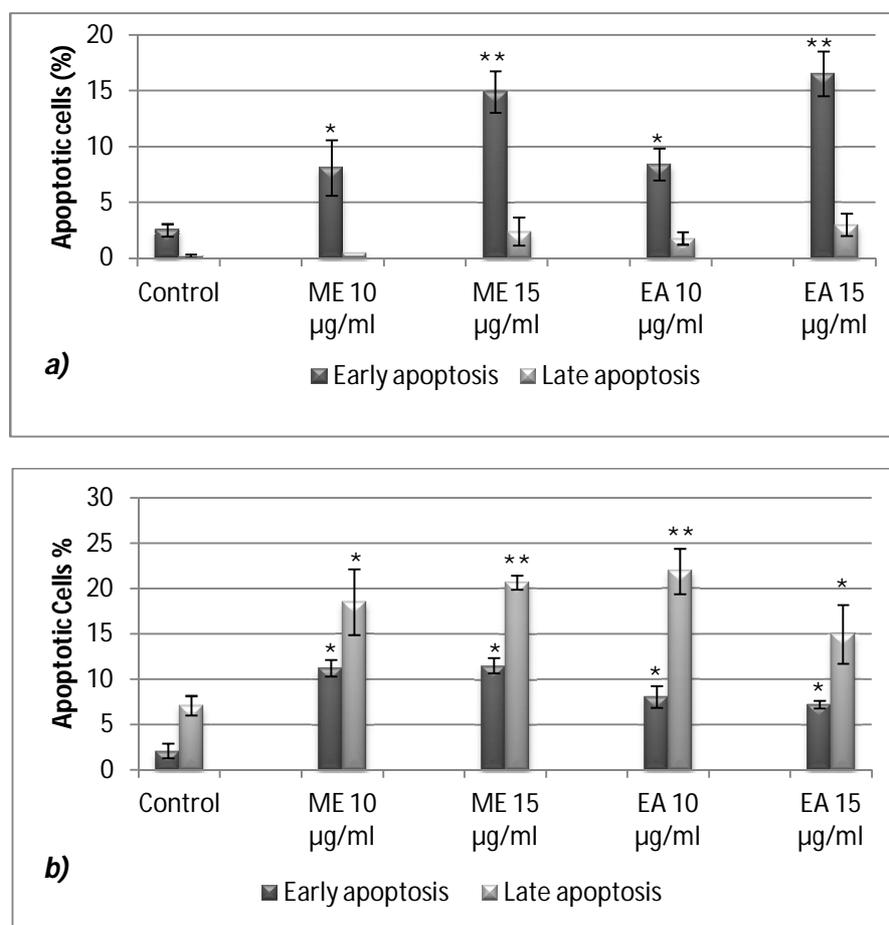


**Figure 23:** Analyse de la distribution du cycle cellulaire chez lignées cancéreuses U937 et CaCo-2 traitées avec deux différents extraits du *Rosmarinus officinalis*. La distribution des

cellules dans les phases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S et G<sub>2</sub>/M a été mesurée après 24h d'exposition aux fractions Méthanolique (ME) et Acétate d'éthyle (EA), le Taxol servant de témoin. Les résultats sont exprimés en moyennes de trois expériences indépendantes.

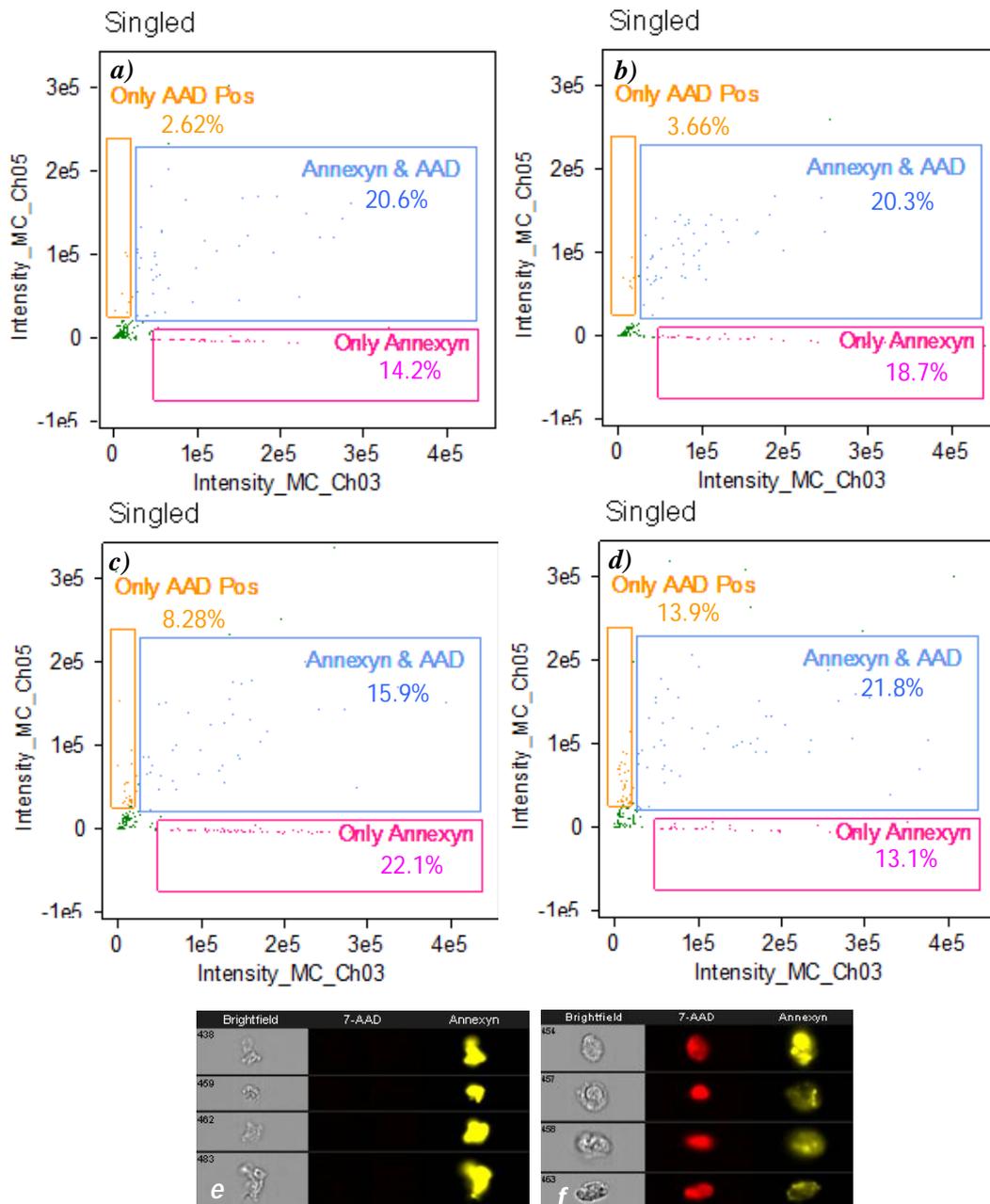
#### 4.3.3. Effet Apoptotique :

Les **Figures 24 et 25** montrent que les extraits du romarin avaient déclenchée de manière significative à la fois l'apoptose précoce (Annexine V<sup>+</sup> et AAD<sup>+</sup>) et l'apoptose tardive (annexine V<sup>+</sup> et AAD<sup>-</sup>) chez les cellules tumorales testées, avec un effet apoptotique nettement élevée sur cellules Caco-2 par rapport à la lignée U937.



**Figure 24:** Effet Apoptotique des extraits méthanolique (ME) et acétate d'éthyle (EA) du romarin sur lignées cancéreuses (a) U937 (b) CaCo-2 après 24h d'exposition. Le test Annexin V-FITC/AAD a été utilisé pour détecter l'apoptose précoce (Annexin<sup>+</sup>/AAD<sup>-</sup>) et tardive (Annexin<sup>+</sup>/AAD<sup>+</sup>). Les données sont exprimées sous forme de valeurs moyennes  $\pm$  SD (n = 3). \*P  $\leq$  0.05 and \*\*P  $\leq$  0.01 indiquent respectivement des différences significatives et hautement significatives par rapport aux cellules non traitées.

Les deux fractions méthanolique et acétate d'éthyle ont induit l'apoptose précoce de cette dernière lignée de manière dose dépendante sans grand écart d'efficacité entre les extraits. Alors qu'une apoptose tardive avait caractérisée les cellules Caco-2, avec des valeurs de 20,6 et 21,8 % respectivement pour l'extrait Méthanolique (5 $\mu$ g/ml) et l'acétate Ethyle (10 $\mu$ g/ml). Les effets observés peuvent être attribués aux composés majeurs identifiés tels que: les ditèrpens et flavonoïdes dans l'acétate Ethyle et de l'acide Rosemarinique dans la fraction Méthanolique.



**Figure 25** : Effet apoptotique des extraits du Romarin sur la lignée cellulaire CaCo-2 après 24h d'exposition aux extraits : méthanolique *a*) à 10  $\mu$ g/ml et *b*) 15 $\mu$ g/ml et d'acétate d'éthyle

c) à 10 µg/ml et d) 15µg/ml. L'analyse à l'image stream démontre respectivement en e) et en f) l'apoptose précoce et tardive des cellules Caco-2 traités avec l'extrait méthanolique (10µg/ml).

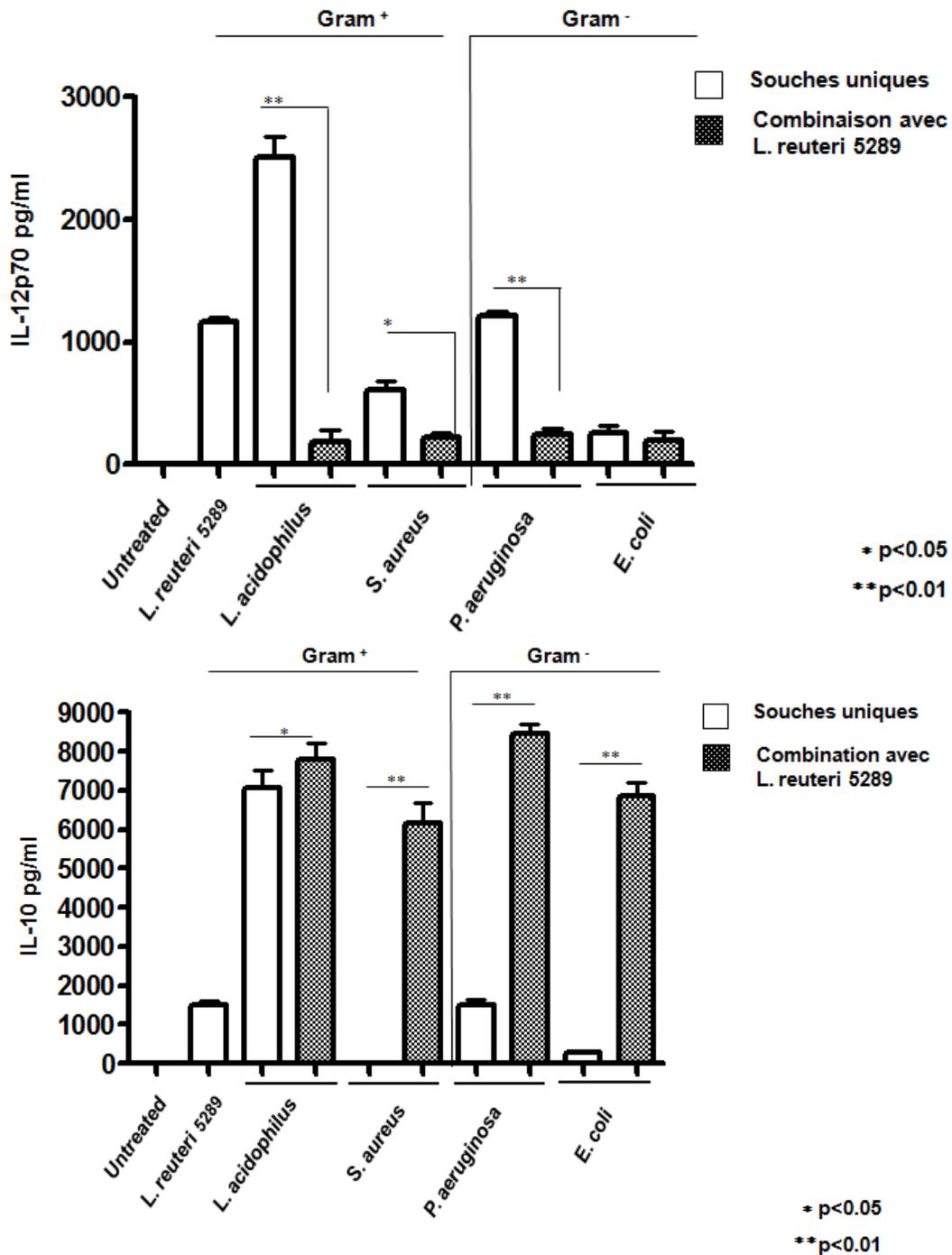
Un certain nombre d'études a rapporté que les composés polyphénoliques sont inducteurs d'apoptose chez les cellules cancéreuses par déclenchement d'une réponse pro-oxydante (Das *et al*, 2010). Cependant, la nature et la source des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produits en réponse aux polyphénols restent très peu étudiés. Un rôle pour les anions superoxydes générés dans les mitochondries a été suggéré dans l'apoptose induite par le resvératrol sur les cellules du carcinome colorectal humain HT- 29 (Juan *et al*, 2008) et la réduction du système anti-oxydant du glutathion avait été corrélée à l'induction d'apoptose par l'hispolon sur les cellules du cancer gastrique humain (Sharif *et al*, 2012). Cheng *et al* (2011) ont également démontré que le rosmanol est fort inducteur d'apoptose chez les cellules COLO 205 par l'intermédiaire des voies mitochondriales, où les cellules traitées présentaient une augmentation significative de la sécrétion à la fois du cytochrome-c et l'AIF (facteur induisant l'apoptose) dans le cytosol.

#### IV.5. Etude des propriétés immuno-modulatoires d'une souche probiotique

Différentes souches de bactéries commensales coexistent dans l'intestin, et donc, les effets combinatoires de ces groupes de bactéries sur la maturation des DC sont de pertinence. Dans cette étude, les effets de la présence simultanée de bactéries induisant l'IL-12 telles que *L acidophilus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. coli* et d'un faible producteur d'IL-12, à savoir *L reuteri* 5289, ont été étudiés.

##### 5.1. *Lactobacillus reuteri* 5289 inhibe l'IL-12 produit par les DCs stimulées

Il a été précédemment observé que la quantité d'IL-12 produite par les DC en réponse à différentes souches individuelles et combinées des lactobacilles diffère largement en fonction de la combinaison employée de lactobacilles (Zeuthen *et al*, 2006., Christensen *et al*, 2002., Fink *et al*, 2007). Pour étudier les propriétés anti-inflammatoires de *Lactobacillus reuteri* 5289, nous avons évalué la production de cytokines par les DC cultivées en présence de *Lactobacillus reuteri* 5289 seul ou en combinaison avec un ensemble de différentes bactéries, y compris *L.acidophilus* NCFM et *S. aureus* 43300 représentant des bactéries Gram positives ainsi que *E. coli* 10536 et *P. aeruginosa* 25853, qui sont des bactéries à Gram négatif.



**Figure 26:** Production de cytokines chez les cellules dendritiques dérivées des monocytes stimulées avec des souches Gram positives et Gram négatives en combinaison avec *L reuteri* 5289. Les DCs ont été stimulées avec des souches bactériennes exposées aux UV seuls (barres vides) ou en combinaison avec *L reuteri* 5289 (barres pleines) pendant 48 h. IL-12p70 (panneau a) et IL-10 (groupe B) productions ont été analysés par cytométrie en flux. Les données représentent les moyennes ± écarts-types dérivés d'au moins trois expériences indépendantes (\*p<0.05, \*\*p<001).

La **figure 26** représente le profil de cytokine induites chez les cellules dendritiques dérivées de monocytes humains suite à la stimulation par les diverses souches bactériennes. *L acidophilus* avait induit la plus grande quantité de l'IL-12 et IL-10. L'ajout de *Lactobacillus reuteri* à d'autres bactéries avait conduit à une forte diminution de la production d'IL-12 par les DCs, tandis que la production d'IL-10 a été augmentée de façon additive. Fait intéressant, *L acidophilus* NCFM avait induit presque la même quantité d'IL-10 lorsqu'elle est ensemencée seul ou en association avec *L. reuteri* 5289 tandis que l'IL-12 n'a été abrogée qu'en présence de *L reuteri*. Ces données confirment les observations de certains auteurs (**Fink et al, 2007**) ayant signalé auparavant que l'IL-10 n'est pas le seul élément responsable de la baisse de production d'IL-12 chez les DC induites par *L reuteri*.

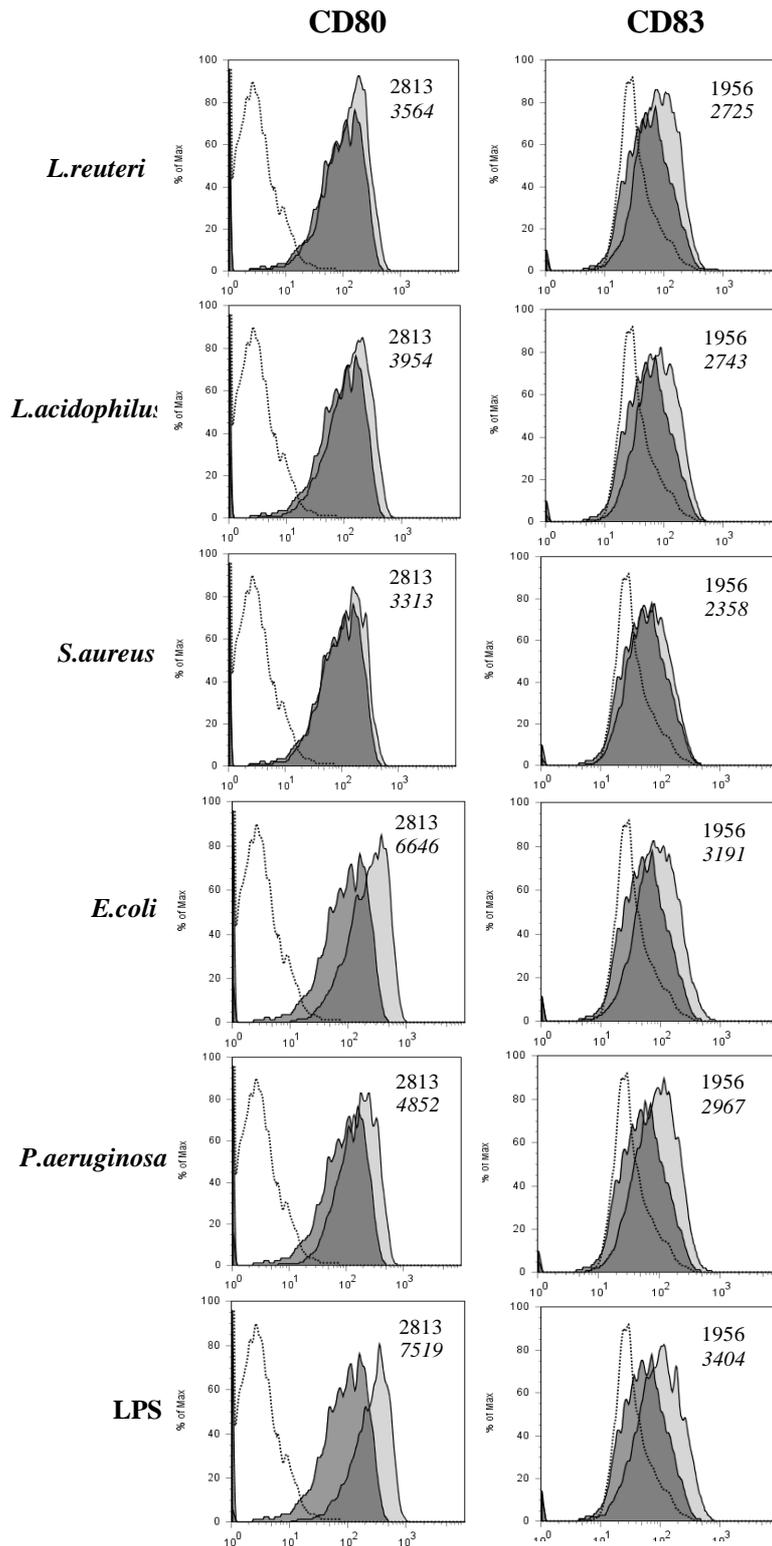
Il est bien connu qu'en fonction de la nature des stimuli bactériens, les cellules dendritiques peuvent se développer en différents sous-ensembles avec une expression caractéristique de molécules de surface et de cytokines (**Christensen et al, 2002**). Cependant, les phénotypes des différents sous-ensembles fonctionnant pour induire une polarisation Th1, Th2, ou T-régulation, semblent varier en fonction de facteurs environnementaux du tissu dans lequel résident les DCs (**Amati et al, 2006., Smits et al, 2005**). Les variations individuelles de la concentration en bactéries, en plus de la présence de différents types bactériens peuvent générer des résultats différents suivant l'interaction avec les DC locales pour ainsi dicter une réponse immunitaire ou une tolérance (**Rescigno, 2008**). Les bactéries probiotiques se sont révélés interagir avec des cellules dendritiques pour induire des effets souche spécifiques (**Christensen et al, 2002**). La forte variabilité a été indiqué précédemment en ce qui concerne la capacité des souches de *Lactobacillus* pour induire la production de cytokines DCs clés telles que l'IL-12 et IL-10, ce qui entraîne respectivement des modèles pro- et anti-inflammatoires. IL-12 est une cytokine de type Th1 critique qui induit la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T et les cellules NK. Au contraire, l'IL-10 peut inhiber l'IL-12 et par conséquent la production d'IFN- $\gamma$ , favorisant ainsi une réponse Th2 régulatrice (**Sabat et al, 2010**).

Il a été montré que *L acidophilus* est capable d'induire une réponse pro-inflammatoire via un mécanisme TLR-2-dépendant, ce qui suggère que ce récepteur pourrait jouer un rôle clé dans la stimulation d'endocytose dépendante de la réponse pro-inflammatoire dans les DCs (**Weiss et al, 2010., Zeuthen et al, 2006**). Nos données indiquent que la souche *L reuteri* 5289 est un faible inducteur d'IL-12 chez les DC, mais qui est capable d'abaisser la production de cette cytokine pro-inflammatoire lorsqu'elle est co-cultivée en présence de bactéries Gram

positives ou Gram négatives induisant la libération d'IL-12. Les résultats obtenus sont en accord avec des études antérieures indiquant que les souches de lactobacilles induisant une faible production d'IL-12 peuvent inhiber la libération d'IL-12 dans les DCs stimulées par des souches de lactobacilles induisant une forte production d'IL-12 (Weiss *et al*, 2011., Zeuthen *et al*, 2006., Christensen *et al*, 2002., Fink *et al*, 2007). Le mécanisme de l'effet inhibiteur observé dans la présente étude pourrait impliquer les TLR et/ou d'autres récepteurs avec des propriétés suppressives comme les récepteurs lectine de type C (CLRs). Le DC-SIGN (un membre de la famille CLR) a été impliqué dans l'abrogation de la signalisation des TLR (Evrard *et al*, 2011). Néanmoins, il est connu que l'IL-10 inhibe la production d'IL-12 dans les DC dans un mode autocrine par le contrôle de l'expression du récepteur l'IL-10 et l'activation des STAT-3 (Corinti *et al*, 2001). Cependant, nous avons observé que la souche *L acidophilus* NCFM induit presque la même quantité d'IL-10 lorsqu'elle est ensemencée seul ou en association avec *L. reuteri* 5289 tandis que la production d'IL-12 n'a été abrogée qu'en présence de *L. reuteri*. Par conséquent, il semble que l'IL-10 n'est pas le seul élément responsable de la réduction de l'expression de l'IL-12 chez les DCs. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Zeuthen *et al* (2006), qui indique que l'effet inhibiteur sur la production d'IL12 est partiellement indépendant de l'action de l'IL-10, du fait que des souches induisant de faibles quantités d'IL-10, comme *L. rhamnosus* GG, sont encore capables d'inhiber l'IL-12 et TNF- $\alpha$  induit par d'autres lactobacilles. En accord avec cette constatation, Fink *et al* (2007) ont démontré que l'IL-10 n'était pas responsable de l'inhibition de l'IL-12 induit par *L acidophilus* en présence de *Lreuteri* DSM 12246, de même que cette inhibition était également évidente lors du blocage de l'IL-10 (par ajout l'anticorps anti-IL10).

## 5.2. Régulation positive du CD80 et CD83 dans les DC stimulées par différentes bactéries

Lorsque l'expression des marqueurs de surface des DCs a été analysée, les données obtenues avaient révélées que les bactéries à Gram négatif (*E. coli* 10536, et *P. aeruginosa* 25853) ainsi que l'LPS étaient de forts inducteurs de l'expression des marqueurs de maturation CD80 et CD83 comparées aux Gram positifs *L reuteri* 5289, *L acidophilus* NCFM et *S. aureus* 43300 (figure 27).



**Figure 27:** Une régulation positive des marqueurs de surface suite à la stimulation des DCs par des bactéries Gram positives et Gram négatives. Les DCs immatures ont été co-cultivées avec les bactéries pendant 48 heures. Ensuite, l'expression des CD80 et CD83 a été évaluée par cytométrie de flux. Les histogrammes en blanc représentent l'isotype contrôle tandis que

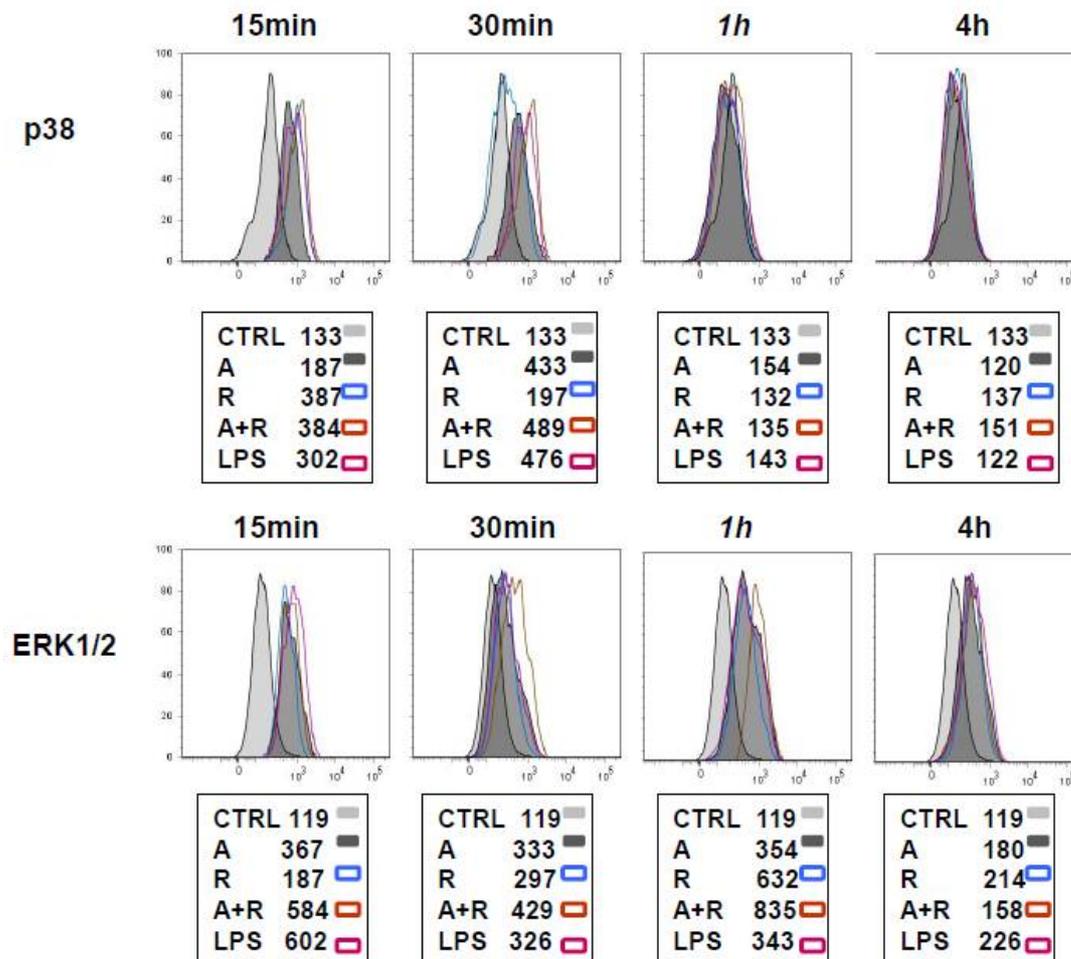
les histogrammes en gris clairs et sombres représentent respectivement les cellules traitées et non traitées. Les chiffres sur les histogrammes représentent la moyenne de l'intensité de la fluorescence (IMF); les numéros supérieurs représentent les témoins non traités. Les données sont représentatives d'au moins trois expériences indépendantes.

La capacité des bactéries à réguler à la hausse l'expression des marqueurs de maturation n'est pas corrélée avec la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-12. En effet, *L acidophilus* NCFM, caractérisé par une production maximale d'IL-12, est un faible inducteur de molécules de co-stimulation comparé aux bactéries à Gram négatif et l'LPS.

Il a été postulé que les DC intestinales exprimant un faible niveau de CD86 produisent peu d'IL-12 et favorisent ainsi l'induction d'une réponse T régulatrice, tandis que l'immunité active est induite par des DC exprimant des taux élevés de CD86 soit avec une faible production d'IL-12 (réponse Type 2) ou de haut niveau IL-12 (réponse type 1) (**Dongarra et al, 2013**). Les données obtenues ont montré que les bactéries Gram négatives et LPS étaient de fortes inducteurs des marqueurs de maturation CD80 et CD83 comparées aux Gram positifs. La capacité des bactéries à stimuler l'expression des marqueurs de maturation n'est pas corrélée avec la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-12. En effet, *L acidophilus* NCFM, caractérisé par une production maximale en IL-12, est un faible inducteur de molécules de co-stimulation par rapport aux Gram négatifs et LPS. Au contraire **Weiss et al (2011)** avaient observés que les lactobacilles induisant une forte réponse IL-12 stimuler notablement l'expression des marqueurs de maturation, principalement CD40 et CD86. Après combinaison de *L reuteri* avec les autres bactéries aucun effet n'a été remarqué sur l'expression des marqueurs de surface, sauf avec l'LPS où le probiotique testé a pu abaisser l'expression du marqueur CD83. Les mêmes auteurs (**Weiss et al, 2011**) ont également constaté que les souches inhibitrices de l'IL-12 abaissaient l'expression des CD40, CD86 et MHCII chez les cellules dendritiques stimulées avec *L acidophilus* NCFM, tandis que l'expression du CD80 n'a pas été affectée. Ces résultats peuvent être divergents en raison des différentes stratégies utilisées pour la différenciation des DCs à partir des monocytes, et, par le comportement spécifique des différentes souches *L reuteri*.

### 5.3. IL-12 est associée à une inhibition prolongée de la phosphorylation ERK 1/2

Par la suite nous avons étudié les voies de transduction du signal impliquées dans la régulation de l'IL-12 lors de l'exposition à *L. reuteri* 5289. Comme le montre la **figure 28**, les bactéries pro-inflammatoires, telles que *L. acidophilus*, induit une activation prolongée de la p38 MAP kinase tandis que *L. reuteri* 5289 abaissait rapidement la phosphorylation de la p38 dans les 30 min suivant la stimulation. D'autre part, l'inhibition de l'IL-12 par *L. reuteri* a été associée à une activation prolongée de la MAP kinase ERK1/2. Il semble donc que la réponse pro-inflammatoire dans les DC stimulées avec *L. acidophilus* NCFM et caractérisé par une forte production d'IL-12 est liée à la stimulation de la voie de p38. A l'inverse, l'activité anti-inflammatoire induite par *L. reuteri* 5289 et accompagnée d'une production élevée d'IL-10 pourrait être liée à l'induction de la cascade ERK1/2.



**Figure 28:** Effets des stimuli bactériens sur la phosphorylation des p38 et ERK1/2 MAPKinases. Les DCs immatures ont été cultivées en présence des stimuli bactériens pour 15, 30 min, 1 et 4 heures. Les histogrammes gris représentent la moyenne de l'intensité de la

fluorescence du témoin non traité; les histogrammes foncés représentent les DCs traitées avec *Lactobacillus acidophilus*; les histogrammes en lignes bleues représentent les DCs traitées avec *Lactobacillus reuteri* 5289, les histogrammes en lignes brunes représentent les DCs traitées avec une combinaison de *Lactobacillus acidophilus* NCFM et *Lactobacillus reuteri* 5289, et les histogrammes en lignes violettes représentent les DCs traitées avec LPS.

Les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) jouent un rôle crucial dans la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation ainsi que le contrôle des réponses cellulaires aux cytokines et au stress environnemental. Il a été démontré récemment que l'activation de la voie ERK est critique pour la détermination de la balance IL-10 / IL-12 chez les macrophages stimulés par des lactobacilles (**Kaji et al, 2010**). Pour clarifier les mécanismes probables par lesquels les souches de *Lactobacillus* induisent de manière différentielle la production d'IL-10 et IL-12 chez les cellules dendritiques, nous avons examiné la relation possible entre la production des cytokines et l'activation des MAPKinases. Nos données montrent que, lorsque les DCs sont stimulées avec *L reuteri* 5289, l'expression de p38 est abaissée comparée à la stimulation par *L acidophilus*, tandis que la phosphorylation de la voie ERK1/2 dure plus longtemps lorsque *L reuteri* 5289 a été additionné avec *L acidophilus*, ce qui suggère qu'il pourrait être responsable de l'inhibition de la production IL12. Par conséquent, nos données suggèrent que la production d'IL-12 par *L acidophilus* NCFM pourrait être soutenu par une signalisation p38 prolongée, tandis que l'activation de la voie ERK 1/2 est associée à l'inhibition de l'IL-12 médiée par *L reuteri* 5289.

Compte tenu des effets immunosuppresseurs observés chez *L reuteri* 5289 en co-culture avec une bactérie Gram positif ou Gram négatif, *L reuteri* 5289 pourrait représenter un traitement potentiel efficace pour moduler le milieu intestinal pro-inflammatoire tel que celui observé dans la pathologie de Crohn. Une meilleure compréhension des mécanismes de régulation immunitaire évoqués par les probiotiques est crucial pour une conception plus précise d'interventions à base de bactéries mieux efficaces dans les maladies inflammatoires de l'intestin ou d'autres maladies auto-immunes ainsi que pour leur emploi comme adjuvant pour améliorer l'efficacité des vaccins à DCs dans le traitement cancer (**Bonaccorsi et al, 2013**). D'autres études sont nécessaires pour identifier les molécules bactériennes actives au-delà des effets inhibiteurs observés induits par *L reuteri*.

# **Conclusion Générale et perspectives**

L'écosystème gastro-intestinal est généré par une alliance stable et en équilibre entre le tube digestif, le système immunitaire et une importante flore colique. En cas de déséquilibre diverses pathologies pourront s'installé, allant d'une simple diarrhée, jusqu'au développement d'un cancer. A partir de là différentes stratégies ont été développées à fin d'y remédier, se résumant en trois principales approches: les probiotiques, les prébiotiques et leur combinaison en symbiotiques. Toutefois du fait de la faible survie des microorganismes probiotiques, ainsi que la faible sélectivité de leurs substrats favorisés, la recherche d'une alternative s'avère du plus grand intérêt. Nous nous sommes ainsi intéressés à évaluer le potentiel prébiotique de deux extraits phénoliques obtenus à partir de *Rosmarinus officinalis* et du *Citrus sinensis* en combinaison avec des souches lactiques caractérisées comme étant probiotiques. Nous avons évalué en outre les potentialités anticancéreuses de l'extrait du Romarin, ayant présenté une bonne caractéristique prébiotique.

Suite à l'isolement et la caractérisation de 15 souches lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Streptococcus*, les candidats présentant les meilleures propriétés probiotiques (résistance à l'acidité, tolérance des sels biliaires et antagonisme des pathogènes) ont été évalués pour leurs propriétés d'adhésion et d'agrégation en présence de différents substrats carbonés. Nous avons observé que la nature de la source de carbone avait considérablement affecté l'habilité d'auto-agrégation ainsi que l'hydrophobicité des souches sélectionnées. Ce changement serait probablement dû à la variation du rendement en Exopolysaccharides (EPS) sécrétés en présence des différents substrats. Puisque les EPS sont directement liés aux propriétés hydrophobes de la paroi cellulaire, les capacités d'adhésion et d'agrégation se trouvent directement modifiées. A partir de là, il semblerait possible d'améliorer au travers d'une fermentation préalable, en présence de substrat carboné convenable, les propriétés d'adhérence des souches probiotiques ce qui prolongerait leur séjour et bénéfices au sein du tractus digestif.

Les deux extraits phénoliques issus du *Rosmarinus officinalis* et *Citrus sinensis* ont été évalués pour leurs potentialités prébiotiques notamment, leur activité antimicrobienne, leur influence sur l'habilité d'adhésion et d'agrégation des candidats probiotiques et pathogènes, ainsi que leur effet sur l'antibiorésistance de ces derniers. Les résultats obtenus avaient dévoilés que l'extrait du Romarin était de loin le plus efficace en inhibant la croissance des souches pathogènes, comparé à celui de l'orange. En revanche, ce dernier était moins efficace à l'égard des candidats probiotiques. Pour les tests d'adhésion et d'agrégation, nous avons observé que les extraits phénoliques avaient d'une part stimulés ces deux propriétés chez les

candidats probiotiques et ils avaient d'autre part, remarquablement abaissé leurs taux pour les souches pathogènes. Les résultats du test d'antibiorésistance avaient également révélés que l'extrait phénolique du Romarin augmentait notablement la sensibilité des souches pathogènes vis-à-vis des antibiotiques.

La seconde partie d'étude fut réservée à l'évaluation des propriétés antioxydantes et antiprolifératives de l'extrait du Romarin ayant présenté une bonne potentialité prébiotique. Nous avons remarqué que les deux fractions Méthanolique et Acétate d'éthyle de cet extrait avaient nettement inhibé la prolifération des lignées cancéreuses testées U937 et Caco-2 d'une manière à la fois concentration et temps dépendante. En outre, l'activité de l'extrait Méthanolique a été remarquablement plus prononcée sur les cellules tumorales comparées aux cellules normales mononucléées du sang périphérique (PBMCs), avec une  $IC_{50}$  deux fois plus élevé chez U937 et jusqu'à quatre fois à l'égard des cellules Caco-2. L'effet inhibiteur de la croissance des deux extraits a été associée à un arrêt du cycle cellulaire en phase S pour U937 avec une baisse concomitante de la phase G2/M. Alors que seul l'extrait Méthanolique avait affecté le cycle cellulaire des Caco-2 avec une nette diminution de la phase G2/M après 24h d'incubation. Les extraits phénoliques testés du Romarin avaient présenté en plus une activité pro-apoptotique remarquable chez les deux lignées cellulaires, avec une dominance de l'apoptose précoce pour U937 et un effet apoptotique tardif chez les cellules Caco-2. Le mécanisme antiprolifératif semble être principalement liée à la perturbation du cycle cellulaire pour les cellules U937 et principalement dû à l'induction de l'apoptose chez les cellules Caco-2. Les propriétés antioxydantes présentées peuvent également être en faveur de la potentialité antitumorale observée.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que les composés phénoliques du Romarin lui conféreraient des propriétés biologiques intéressantes notamment une activité antimicrobienne à l'égard des pathogènes de même qu'en les sensibilisant à l'action des antibiotiques. En outre cet extrait avait non seulement épargné la croissance des souches probiotiques, mais également amélioré leurs habilités d'adhésion et d'agrégation. Les fortes activités antioxydante et anti-tumorale observées chez la fraction Méthanolique de cet extrait, particulièrement riche en Acide Rosmarinique, seraient en faveur de souligner la potentialité chimio-thérapeutique de cette molécule. Nous pouvons conclure que l'extrait méthanolique du *Rosmarinus officinalis* pourrait renfermer des candidats prébiotiques doté de potentialités anticancéreuses. Cette fraction s'était révélée également capable d'élaborer des associations symbiotiques avec des souches lactiques caractérisées comme probiotiques. Ces combinaisons

peuvent être exploitées dans différentes préparations laitière, à l'exemple du yaourt en vue de prolonger le séjour des souches probiotiques voir prévenir le développement du cancer colorectal. En perspective il serait intéressant d'évaluer la toxicité subaigüe de la fraction Méthanolique *in vivo* pour vérifier ensuite l'effet protecteur des combinaisons obtenues sur la tumeur colorectale induite.

Nous avons en outre démontré dans cette étude que *Lactobacillus reuteri* 5289, tel que décrit précédemment pour d'autres souches de *Lactobacillus reuteri*, peut inhiber la production d'IL-12 chez des cellules dendritiques induites par *Lactobacillus acidophilus* NCFM. De manière remarquable, *Lactobacillus reuteri* 5289 est capable d'inhiber la production d'IL-12 induite non seulement par les lactobacilles, comme indiqué jusqu'ici, mais aussi par des bactéries de genres différents, y compris des agents pathogènes. Nous avons également étudié les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'inhibition de l'IL-12 par *Lactobacillus reuteri* 5289, montrant que cette activité anti-inflammatoire potentielle, qui est également accompagné d'une production d'IL-10, est associée à une phosphorylation prolongée de la voie ERK1/2 des MAP kinases. Compte tenu des effets immunosuppresseurs observés chez *L.reuteri* 5289 en co-culture avec des bactéries Gram positives et négatives, ce probiotique pourrait représenter un traitement potentiel efficace pour moduler le milieu intestinal pro-inflammatoire tel que celui observé dans la pathologie de Crohn. Une meilleure compréhension des mécanismes de régulation immunitaire évoqués par les probiotiques serait cruciale pour une conception d'interventions plus efficaces dans les maladies inflammatoires de l'intestin ainsi que la prévention du développement de cancers colorectaux.

# **Références Bibliographiques**

**Références bibliographiques:**

Almela L, Sanchez-Munoz B, Fernandez-Lopez JA, Roca MJ, Rabe V. 2006. Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*.1120; 221–229.

Amar Y, Tirtouil MA, Meddah B, El Keurti K, Mokhtari B and Kridech S. 2012. The *in Vitro* Effect of a Symbiotic Combination Between Cellobiose and Two Probiotic Strains Toward Two Pathogenic Bacteria. *Journal of Life Sciences*. 6, 615-623.

Amati L, Pepe M, Passeri ME, Mastronardi ML, Jirillo E, Covelli V. 2006. Toll-like receptor signaling mechanisms involved in dendritic cell activation: potential therapeutic control of T cell polarization. *Current Pharmaceutical Design*.12, 4247-4254.

Anderson K.L. 2003. The complex world of gastrointestinal bacteria. *Canadian Journal of Animal Science*. 83, 409-429.

Andoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y. 2003. Role of dietary fiber and short-chain fatty acids in the colon. In Rastall R.A; Gibson G.R; Gill .H.S, 2005: Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health. *FEMS microbiology ecology*. 52, 145-154.

Akroum S, *Étude des propriétés biochimiques des polyphénols et tannins issus de Rosmarinus officinalis et Vicia faba L*. 2006. Thèse de magistère. Université de Constantine.

AFSSA. 2003. Alimentation infantile et modification de la flore intestinale. Rapport du groupe de travail.<http://www.afssa.fr>.

Awney HA, Sindi H. 2010. The effect of rosemary on the mutagenic activity of heterocyclic amines extracted from common food consumed in Saudi Arabia. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 61, 192–203.

Balakrishna, A. 2013. *In vitro* Evaluation of Adhesion and Aggregation Abilities of Four Potential Probiotic Strains Isolated from Guppy (*Poecilia reticulata*). *Brazilian Archive of Biology and Technology* 56, 93-800.

Ballongue J, Schumann C, and Quignon P. 1997. Effects of lactulose and lactitol on colonic microflora and enzymatic activity. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 222, 41–44.

Bartosch S, Woodmansey EJ, Paterson JC, McMurdo ME & Macfarlane GT. 2005. Microbiological effects of consuming a synbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, and oligofructose in elderly persons, determined by realtime polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. *Clinical Infectious Diseases*. 40, 28-37.

Basu S, Paul DK, Ganguly S, Chatterjee M, and Chandra PK. 2008. Efficacy of High-dose *Lactobacillus rhamnosus*GG in controlling acute watery diarrhoea in Indian children: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 43, 208-13.

- Bazzocco S, Mattila I, Guyot S, Renard CM, Aura AM. 2008. Factors affecting the conversion of apple polyphenols to phenolic acids and fruit matrix to short-chain fatty acids by human faecal microbiota in vitro. *European Journal of Nutrition*.47, 442–52.
- Bedenne L, Faivre J, Boutron MC et al. 1992. Adenoma-carcinoma sequence or « de novo » carcinogenesis ? A study of adenomatous remnants in a population-based series of large bowel cancers. *Cancer*.; 69, 883-888.
- Benkerroum, N, Ghat Y and Ghalfi H. 1993. Screening for Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria from Various Moroccan Food Products and Partial Characterization of Putative Bacteriocins. *Letters in Applied Microbiology* 17, 78-81.
- Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem*. 239, 70-76.
- Bernier JJ. 1997: *Physiologie de la digestion*. Ed. Doin, Paris.
- Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, and Sartor RB. 2005. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *American Journal of Gastroenterology*. 100, 1539–46.
- Block E. 1992. The Organosulphar Chemistry of the genus *Allium*. Implications for organic sulphar chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*. 3, 1135–78.
- Boltjes A, van Wijk F. 2014. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Frontiers in Immunology*.5:131.
- Bonaccorsi I, Morandi B, Antsiferova O, Costa G, Oliveri D, Conte R, Pezzino G, Vermiglio G, Anastasi GP, Navarra G, Munz C, Di Carlo E, Mingari MC, Ferlazzo G. 2014. Membrane transfer from tumor cells overcomes deficient phagocytic ability of plasmacytoid dendritic cells for the acquisition and presentation of tumor antigens. *Journal of Immunology*.192, 824-832.
- Bonaccorsi I, Pezzino G, Morandi B, Ferlazzo G. 2014. Cells in immunity: Plasmacytoid DCs dress up as cancer cells. *Oncoimmunology*. 3:e28184.
- Bonaccorsi I, Cantoni C, Carrega P, Oliveri D, Lui G, Conte R, Navarra M, Cavaliere R, Traggiai E, Gattorno M, Martini A, Mingari MC, Moretta A, Ferlazzo G. 2010. The immune inhibitory receptor LAIR-1 is highly expressed by plasmacytoid dendritic cells and acts complementary with NKp44 to control IFN $\alpha$  production. *PLoS One*. 5:e15080.
- Bonaccorsi I, Pezzino G, Morandi B, Ferlazzo G. 2013. Novel perspectives on dendritic cell-based immunotherapy of cancer. *Immunology Letters*.155:6-10.
- Bonifait L, Chandad F, Grenier D. 2009. Les probiotiques en santé buccale : mythe ou réalité? Vol.75, pp.586.
- Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, Keen CL, Gershwin ME. 2009. Probiotics and immunity. *Journal of Gastroenterology*. 44:26-46.

- Boris S, Suarez JE, et Barbés C. 1997. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. *Journal of Applied Microbiology*. 83, 413–420.
- Boyed MR. 1995. The NCI *In Vitro* Anticancer Drug Discovery Screen. Concept, Implementation, and Operation, 1985-1995. Edited by: B. Teicher Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Calas A, Perrin JF, Plas C et Vanneste P. 1997. Précis de physiologie. Doin. P.25
- Campbell TC and Hayes JR. 1976. The effect of quantity and quality of dietary protein on drug metabolism. *Fed Proc*. 35, 2470–74.
- Carrega P, Bonaccorsi I, Di Carlo E, Morandi B, Paul P, Rizzello V, Cipollone G, Navarra G, Mingari MC, Moretta L, Ferlazzo G. 2014. CD56(bright)perforin(low) noncytotoxic human NK cells are abundant in both healthy and neoplastic solid tissues and recirculate to secondary lymphoid organs via afferent lymph. *Journal of Immunology*.192, 3805-3815.
- Charteris WP, Kelly PM, Morelli L and Collins JK. 1998. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *International Journal of Dairy Technology*. 51, 123-136.
- Cheng AC, Lee MF, Tsai ML, Lai CS, Lee JH, Ho CT, Pan MH. 2011. Rosmanol potentially induces apoptosis through both the mitochondrial apoptotic pathway and death receptor pathway in human colon adenocarcinoma COLO 205 cells. *Food Chem Toxicol*. 49, 485-93.
- Cherbut C. 2003. Prébiotiques et fonction gastro-intestinales: revue des effets et des perspectives. *Les cahiers de la nutrition et de diététique*. 38, 346-354.
- Cheung S and Tai J. 2007. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncology Reports*. 17, 1525–1531.
- Cho SS et Finocchiaro T. 2010. Handbook of prebiotics and probiotics : health benefits and food applications. CRC press Tylor and Francis group. P-277.
- Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ. 2002. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *Journal of Immunology*.168, 171-178.
- Cimino F, Cristani M, Saija A, Bonina F, Virgili F. 2007. Protective effects of a red orange extract on UV-damage in human keratinocytes. *Biofact*. 30, 129-138.
- Cinquin C. 2005: Développement et validation d'un nouveau modèle de fermentation colique *in vitro* avec cellules immobilisées. Thèse doctorat. Université Laval. Québec. P. 4-8.
- Collado MC., Meriluoto J and Salminen S. 2007. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*. 45, 454–460.
- Collins P, Mpofu C, Watson A, and Rhodes J. 2006. Strategies for detecting colon cancer and/or dysplasia in patients with inflammatory bowel disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. CD000279.

- Collins MD and Gibson GR. 1999: Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*. 69, 1052S- 1057S.
- Collins JK, Thornton G, O'Sullivan GO. 1998. Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal*. 8, 487-490.
- Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G. 2001. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *Journal of Immunology*. 166, 4312-4318.
- Corpet DE. Chemoprevention database. Site internet hébergé par l'INRA. Adresse URL: <http://www7.inra.fr/internet/Projets/reseau-nacre/sci-memb/corpet/indexan.html>. Date d'accès le 26/05/2014.
- Corthier G. 2004. Les bénéfices santé des probiotiques. Danone Nutritopics. 29 pp 12-13.
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12, 564-582.
- Cummings JH, Macfarlane GT. 2002: Gastrointestinal Effects of Prebiotics. *British Journal of Nutrition*. 87, 147-151.
- Cushnie TP, Hamilton VE, Lamb AJ. 2003; Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiology Research*. 158, 281-9.
- Cushnie TP, Lamb AJ. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26, 343–356.
- Dacosta M. 2001. Probiotique et prébiotique en alimentation humaine. Ed : Yves dacosta. Paris p6.
- Das A, Banik NL, Ray SK. 2010. Flavonoids activated caspases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells but not in human normal astrocytes. *Cancer*. 116, 164–176.
- Del Bello B, Paolicchi A, Comporti M, Pompella A, Maellaro E. 1999. Hydrogen peroxide produced during gamma-glutamyl trans-peptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology*. 13, 69-79.
- Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, et Palenzona D. 2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*. 31, 438–442.
- De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. 2001. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am J. Clin Nutr*. 73, 421-429.

- Dinicola S, Cucina A, Pasqualato A, D'Anselmi F, Proietti S, Lisi E, Pasqua G, Antonacci D, Bizzarri M. 2012. Antiproliferative and Apoptotic Effects Triggered by Grape Seed Extract (GSE) versus Epigallocatechin and Procyanidins on Colon Cancer Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*. 13, 651-664.
- Diplock, AT, Agget PJ, Ashwell M, Bornet F, Fern EB. 1999. Scientific concepts in fonctionnel foods in Europe: Consensus document. In Roberfroid M.B, 2002: Aliments fonctionnels. Edition Tec et Doc. P 22-48, 105-159.
- Dongarra ML, Rizzello V, Muccio L, Fries W, Cascio A, Bonaccorsi I, Ferlazzo G. 2013. Mucosal immunology and probiotics. *Current Allergy and Asthma Reports*.13,19-26.
- Drouault S, Corthier G. 2001. Health effects of lactic acidbacteria ingested in fermented milk. *Veterinary Research*. 32, 101-17.
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. 28, 350–356.
- Ducluzeau et Bensaada, 1982. Effet comparé de l'administration unique ou en continu de *Saccharomyces boulardii* sur l'établissement de diverses souches de *Candida* dans le tractus digestif de souris garotoxéniques. In Steer T, Carpenter H, Tuohy K, Gibson GR. 2000. Perspective on the role of human gut microbiota and its modulation by pro- and .prebiotics. *Nutrition research reviews*. 13, 229-254
- Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, O'Sullivan GC, Shanahan F and Collins JK. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Amercan Journal of Clinical Nutrition*. 73, 386-392.
- Dunne C, Murphy L, Flyin S, O'Mahony L. 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76, 279-292.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE and Relman DA. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308, 1635-1638.
- Ennahar S, Aoude-Werner D, Sorokine O, Van Dorsselaer A, Bringel F, Hubert JC, Hasselmann C. 1996. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE92 isolated from cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 4381-4387.
- Erickson KL, Hubbard NE. 2000. Probiotic immunomodulation in health and disease. *Journal of Nutrition*. 130, 403S-409S.
- Evrard B, Coudeyras S, Dosgilbert A, Charbonnel N, Alame J, Tridon A, Forestier C. 2011. Dose-dependent immunomodulation of human dendritic cells by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. *PLoS One*. 6, e18735.
- FAO/WHO. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powdermilk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. <http://www.who.int/foodsafety/publications/en>.

- Faivre J. 2001. *Epidémiologie et prévention du cancer colorectal*. Springer-Verlag France.
- Fearon ER and Jones PA. 1992. Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *Federation of American Societies for Experimental Biology*. 6. 2783-2790.
- Felley C and P Michetti. 2003. "Probiotics and Helicobacter pylori." *Best Practical Researches in Clinical Gastroenterology*. 17, 785-91.
- Feng R, Ni HM, Wang SY, Tourkova IL, Shurin MR. 2007. Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 282, 13468–13476.
- Fink LN, Zeuthen LH, Christensen HR, Morandi B, Frokiaer H, Ferlazzo G. 2007. Distinct gut-derived lactic acid bacteria elicit divergent dendritic cell-mediated NK cell responses. *International Immunology*. 19, 1319-1327.
- Food and Health Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002. Available: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf> (accessed 2009 Aug 31).
- Friemel F et Jarry G. 2004: *Physiologie de la digestion*. PCEM. P. 2-4.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 365-378.
- Gamar L, Blondeau K, Simonet JM. 1997. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Journal of Applied Microbiology*. 83, 281-287.
- Gancel F, Novel G. 1994. Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 1. Conditions of production. *Journal of Dairy Sciences*. 77, 685-688.
- Gibson G and Roberfroid M. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota :introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 125,1401-1412.
- Gibson GR, Probert HM, Van Loo JAE, Roberfroid MB. 2004. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Updating the Concept of Prebiotics, *Nutrition Research Review*. 17, 259-275.
- Ghoneum M, Abedi S. 2004. Enhancement of natural killer cell activity of aged mice by modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran). *J Pharm Pharmacol*. 56, 1581-8.
- Gill HS. 2003. "Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract." *Best Practical Research in Clinical Gastroenterology*. 17, 755-73.
- Glintborg B and Nielsen AM. 2004. Probiotic therapy: mechanisms of action and indications in adult gastrointestinal disease. 166, 135-9.
- Goldin BR, Gorbach SL. 1992. Probiotics for humans. *In: Probiotics, the scientific basis by Fuller R*. Chapman & Hall Ltd, London. PP: 335-76.

- Goldin BR and Gorbach SL. 1976. The relationship between diet and rat fecal bacterial enzymes implicated in colon cancer. *J Natl Cancer Inst*; 57: 371–75.
- Goldin B, Gorbach S, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L and Salminen S. 1992. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive Diseases and Sciences*. 37, 121-128.
- Gonzalez-Sarrias A, Liya L, & Navindra PS. Anticancer effects of maple syrup phenolics and extracts on proliferation, apoptosis, and cell cycle arrest of human colon cells. *J funct foods*. 2012; (4): 185–196.
- Gosselink MP, Schouten WR, van Lieshout LM. 2004. Delay of the first onset of pouchitis by oral intake of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Dis ColonRectum*. 47, 876-884.
- Grajek W, Olejnik A, and Sip A. 2005. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Acta Biochimica Polonia*. 52, 665–71.
- Greenwald P, Clifford CK, Milner JA. 2001. Diet and cancer prevention. *European Journal of Cancer*, 37, 948–965.
- Grepithe. 1981. Etude multicentrique prospective sur la détection des polypes et des cancers rectocoliques dans une population d'hospitalisés et de consultants. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*.; 5: 58-66.
- Guandalini S. 2002. "Use of *Lactobacillus*-GG in paediatric Crohn's disease." *Digestive and Liver Disease*. 34, S63-75.
- Gueimonde M, Salminen S. 2006. New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease*. 38, S242-7.
- Guerin-Danan C, Chabanet C, Pedone C, Popot F, Vaissade P, Bouley C, Szyliet O, Andrieux C. 1998. Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants. *American Journal of Clinical Nutrition*. 67, 111-7.
- Guil-Guerrero JL, Ramos-Bueno R, Rodríguez-García I, López-Sánchez C. 2011. Cytotoxicity screening of several tomato extracts. *J Med Food*. 14, 40–45.
- Roberfroid M.B. 2002: *Aliments fonctionnels*. Edition Tec et Doc. P 22-48, 105-159.
- Halliwell B. 2007. Oxidative stress and cancer: Have we moved forward? *Biochemical Journal*. 401, 1–11.
- Hashimoto Y and Degawa M. 1995. Induction of cytochrome P450 isoforms by carcinogenic aromatic amines and carcinogenic susceptibility of rodent animals. *Pharmacogenetics*. 5, S80–83.
- Hanahan D and Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100, 57-70.

- Hartley CL, Neumann CS et Richmond MH. 1979. Adhesion of commensal bacteria to the large intestine wall in humans. *Infection and Immunity*. 128 – 132.
- Heyman M, Heuvelin E. 2006. Micro-organismes probiotiques et régulation immunologique : le paradoxe. *Nutrition clinique et métabolisme* 20, 85–94.
- Hickson M, D'Souza AL, Muthu N, Rogers TR, Want S, Rajkumar C, and Bulpitt CJ. 2007. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *British Medical Journal*. 335, 80-83.
- Hill MJ, Marsh PD. 1990. Human microbial ecology. CRC press. PP. 57-69.
- Hillman M. 1995. Fonctionnel foods current and future market developments. In Roberfroid MB. 2002. *Aliments fonctionnels*. Edition Tec et Doc. P 22-48, 105-159.
- Holzappel WH, Schillinger U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*. 35, 109–116.
- Holzappel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis Veld JH. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 41, 85-101.
- Hopkins M.J and Macfarlane GT. 2002. "Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection." *Journal of Medical Microbiology* 51, 448-54.
- Hutt PJ, Shchepetova et al. 2006. "Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens." *Journal of Applied Microbiology*. 100, 1324-1332.
- Huycke MM and Gaskins HR. 2004. Commensal bacteria, RedOx stress, and colorectal models : mechanisms and models. *Experimental Biology and Medicine*. 229.
- IFIC Foundation. 1995. Fonctionnel foods. Opening the door to better health. In Roberfroid M.B, 2002: *Aliments fonctionnels*. Edition Tec & Doc. P 22-48, 105-159
- Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen S. 2002. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut*. 50, 54-59.
- Isolauri E and Salminen S. 2008. Probiotics: use in allergic disorders: a Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology, and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group Report. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 42, 91-96.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 61, 69-90.
- Joseph P and Jaiswal AK. 1994. NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT diaphorase) specifically prevents the formation of benzo[*a*]pyrene quinone-DNA adducts generated by cytochrome P4501A1 and P450 reductase. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 91, 8413–17.
- Juan ME, Wenzel U, Daniel H, Planas JM. 2008. Resveratrol induces apoptosis through ROS-

dependent mitochondria pathway in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *J Agric Food Chem.* 56, 4813–4818.

Juntunen M, Kirjavainen PV et al. 2001. "Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 8, 293-6.

Kaji R, Kiyoshima-Shibata J, Nagaoka M, Nanno M, Shida K. 2010. Bacterial teichoic acids reverse predominant IL-12 production induced by certain lactobacillus strains into predominant IL-10 production via TLR2-dependent ERK activation in macrophages. *Journal of Immunology.* 184, 3505-3513.

Klaenhammer TR, Kleerebezem M, Kopp MV, Rescigno M. 2012. The impact of probiotics and prebiotics on the immune system. *Nature Reviews Immunology.* 12, 728-734.

Kohen R, Shadmi V, Kakunda A, Rubinstein A. 1993. Prevention of oxydative damage in the rat jejunal mucosa by pectin. *British Journal of Nutrition.* 69, 789-800.

Korpela R et Saxelin M. 1999. Probiotics and consumer products. In Steer T, Carpenter H, Tuohy K, Gibson GR. 2000. Perspective on the role of human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutrition research reviews.* 13, 229-254.

Korzenik J R and Podolsky DK. 2006. "Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. *National Review of Drug Discovery.* 5, 197-209.

Kos B. 2001. Probiotic concept: in vitro Investigations with chosen Lactic Acid Bacteria. PhD Thesis, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Croatia.

Krstic RV. 1991. *Human microscopic anatomy. An atlas for students of medicine and biology.* Springer-Verlag, Berlin.

Kuisma J, Mentula S, Jarvinen H, Kahri A, Saxelin M, and Farkkila M. 2003. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on ileal pouch inflammation and microbial flora. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics.* 17, 509-15.

Kulkarni N and Reddy BS. 1994. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and faecal bacterial beta-glucuronidase. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medecine.* 207, 278–83.

Kullen MJ, Amann MM, O'Shaughnessy MJ, O'Sullivan DJ, Busta FF, Brady LJ. 1997. Differentiation of ingested and endogenous bifidobacteria by DNA fingerprinting demonstrates survival of an unmodified strain in the gastrointestinal tract of humans. In Steer T, Carpenter H, Tuohy K, Gibson GR. 2000. Perspective on the role of human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutrition research reviews.* 13, 229-254.

Lambert JD, Hong J, Yang GY, Liao J, Yang CS. 2005. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *American Journal of Clinical Nutrition.* 81, 284S–291S.

Lamprecht SA and Lipkin M. 2003. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate. *Molecular mechanisms. National Review of Cancer.* 3, 601–14.

- Laparra JM et Sanz Y. 2010. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research*. 61, 219–225.
- Larpent JP et Gourgand M. 1997. *Mémento technique de microbiologie*. Ed : Tec et Doc. Londre. 1039. P: 55.
- Latvala S, Pietila TE, Veckman V, Kekkonen RA, Tynkkynen S, Korpela R and Julkunen I. 2008. Potentially probiotic bacteria induce efficient maturation but differential cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells. *World J Gastroenterol*. 14, 5570-83.
- Lee HC, Jenner AM, Low CS, Lee YK. 2006. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology*. 157, 876–84.
- Lee JW, Shin JG, Kim EH, Kang HE, Yim IB, Kim JY, Joo HG, and Woo HJ. 2004. Immunomodulatory and antitumor effects *in-vivo* by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. *Journal of Veterinary Sciences*. 5, 41–48.
- Lengauer C, Kinzler KW et al. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 396, 643-9.
- Lhoste EF, Nugon-Baudon L, Lory S, Meslin JC, and Andrieux C. 2001. The fermentation of lactulose in rats inoculated with *Clostridium paraputrificum* influences the activities of liver and intestinal xenobiotic-metabolising enzymes. *Journal of Science and Food Agriculture*. 8, 1397–1404.
- Lilly DM and Still-Well RH. 1965. Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. *Sciences*. 147, pp. 747 – 748.
- Lin D, Meyer DJ, Ketterer B, Lang NP, and Kadlubar FF. 1994. Effects of human and rat glutathione *S*-transferases on the covalent DNA binding of the *N*-acetoxy derivatives of heterocyclic amine carcinogens *in vitro*: A possible mechanism of organ specificity in their carcinogenesis. *Cancer Research*. 54: 4920–26.
- Liu RH. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition*. 134, 3479S–85S.
- Lombardi VC, Khaiboullina SF. Plasmacytoid dendritic cells of the gut: relevance to immunity and pathology. *Clin Immunol* 2014;153:165-177.
- Maassen CB, van Holten-Neelen C, Balk F, den Bak-Glashouwer MJ, Leer RJ, Laman JD, Boersma WJ, and Claassen, E. 2000. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine*. 18, 2613–23.
- McCann MJ, Gill CIR, Brien GO, Rao JR, McRoberts WC, Hughes P, McEntee R, Rowland IR. 2007. Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis *in vitro*. *Food Chemichal Toxicology*. 45, 1224–1230.

- Macfarlane GT, Gibson GR. 1994. Metabolic activities of the normal colonic flora. In Gibson SAW, ed. Human health. The contribution of microorganisms. Londres: Springer – Verlag. 17 – 52.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans: I. Review of 97 bioavailability studies. American Journal of Clinical Nutrition. 81, 230S-242S.
- Manosroi J, Boonpisuttinant K, Manosroi W, Manosroi A. 2012. Anti-proliferative activities on HeLa cancer cell line of Thai medicinal plant recipes selected from MANOSROI II database. J Ethnopharmacol. 142, 422–431.
- Marignani M, Angeletti S et al. 2004. "Acute infectious diarrhea."the New England Journal of Medecine. 350, 1576-7; author reply 1576-7.
- Marteau P, Boutron-Ruault MC. 2002. Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. British Journal of Nutrition. 87, S153-S157.
- Martini A, Katerere DR and Eloff JN. 2004. Seven flavonoids with antibacteria activity isolated from Combretum erythrophyllum. Journal of Ethnopharmacology. 93, 207-12.
- Matsumoto M, Benno Y. 2004. Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM512 yogurt reduces gut mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. Mutation Research. 568, 147-153.
- Mattila-Sandholm T, Matto J and Saarela M. 1999. Lactic acid bacteria with health claims–interactions and interference with gastrointestinal flora. International Dairy Journal. 9, 25-35.
- Mattila-Sandholm T, Blum S, Collins JK, Crittenden R. 2001. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. In Amrouche. T, 2005: Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des Bifidobactéries: Analyse *in vitro* et étude *ex vivo* des mécanismes moléculaires impliqués. Université Laval. Québec. P. 5.
- McCracken VJ and Lorenz RG. 2001. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. In Amrouche T. 2005: Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des Bifidobactéries: Analyse *in vitro* et étude *ex vivo* des mécanismes moléculaires impliqués. Université Laval. Québec. P. 5.
- Menegoz F, Cherie-Challine L, Grosclaude P et al. 1998. Le cancer en France : incidence et mortalité. Situation en 1995. Evolution entre 1975 et 1995. Paris : La Documentation Française. ISBN 2-11-090992-7.
- Mercenier A, Muller-Alouf H et Grangette C. 2000. Lactic acid bacteria as live vaccines. Curr. Issues Molecular Biology. Vol. 2, pp. 17 – 25.
- Metchnikoff E. 1907. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In : The prolongation of life : optimistic studies. Heinemann, London. 161-183.
- Meurman JH. 2005. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? European Journal of Oral Sciences. 113, 188-96.

- Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC. 1997. Antimicrobial action of propolis e some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*. 152, 239-246.
- Mokhtar M, Soukup J, Donato P, Cacciola F, Dugo P, Riazi A, Jandera P, Mondello L. 2014. Determination of the polyphenolic content of a *Capsicum annum* L. extract by liquid chromatography coupled to photodiode array and mass spectrometry detection and evaluation of its biological activity. *Journal of Separation Sciences*. 37, 1-25
- Monsan P. 1993. Oligosaccharides ou oligosaccarines? *Biofutur-Juillet-Aût* 1993.
- Monsan P, Paul F. 1995. Oligosaccharides feed additives. In *biotechnology in animal feels and animals feeding*, eds. Wallace R.J., et Chesson A., VCH Weinheim, 233-45.
- Morabito G, Trombetta D, Brajendra KS, Ashok KP, Virinder SP, Naccari C, Mancari F, Saija A, Cristani M, Firuzi O, Saso L. 2010. Antioxidant properties of 4-methylcoumarins in *in vitro* cell-free systems. *Biochemistry*. 92, 1101-1107.
- Munne-Bosch S, Alegre L. 2001. Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of rosemary. *J Plant Physiol*. 125, 1094–1102.
- Nagendra-Prasad K, Hao J, Shi J, Liu T, Li J, Wei X, Qiu X, Xue S, Jiang Y. 2009. Antioxidant and anticancer activities of high pressure-assisted extract of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. *Innov Food Sci Emer Tech*. 10, 413–419.
- Nevière R. 2005. *Physiologie digestive*. Faculté de médecine de Lille. P. 60-62, 80, 81.
- Niedzielin K, Kordecki H, Birkenfeld B. 2001. A controlled, doubleblind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum*299v in patients with irritable bowel syndrome. *Eur. Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 13, 1143-1147.
- Nikoskelainen S, Salminen S et al. 2001. "Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish." *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 2430-5.
- Noratto GD, Bertoldi MC, Krenek K, Talcott ST, Stringheta PC, Mertens-Talcott SU. 2010. Anticarcinogenic effects of polyphenolics from mango (*Mangifera indica*) varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 7, 4104 – 4112.
- Okada Y, Tsuzuki Y, Hokari R, Komoto S, Kurihara C, Kawaguchi A, Nagao S, and Miura S. 2009. Anti-inflammatory effects of the genus *Bifidobacterium* on macrophages by modification of phospho-I kappaB and SOCS gene expression. *International Journal of Experimental Pathology*. 90, 131-40.
- Ouwehand AC. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In Salminen S et Von Wright A. *Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects*. Eds. New York. Marcel Dekker Inc. pp: 139-160.
- Pai R, Tarnawski AS and Tan T. 2004. Deoxycholic acid activates b-catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness. *Molecular Biology of the Cell*. 15, 2156-2163.

- Park SF, Kroll RG. 1993. Expression of listeriolysins and phosphatidyl inositol – specific phospholipase C is repressed by plant derived molecule cellobiose in *Listeria monocytogenes*. *Molecular microbiology*. 8, 653 - 61.
- Parkar SG, Stevenson DE & Skinner MA. 2008. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *International Journal of Food Microbiology*. 124, 295-298.
- Parker RB. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*. Vol. 29, pp. 4 – 8.
- Parker S, Tony Tong, Sherry Bolden, Phyllis A. Wingo. 1997. Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*. 47, 5-27.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. 2001. Estimating the world cancer burden: GLOBOCAN. *Journal of National Cancer Institute*. 94, 153-156.
- Peng JS, Tsai WC, Chou CC. 2001. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*. 65, 105–111.
- Perez PF, Minnaard Y, Disalvo EA, et De Antoni GL. 1998. Surface properties of *bifidobacterial* strains of human origin. *Appl. Environ Microbiol*. 64, pp: 21-26.
- Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC. 1993. -K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. *Journal of the National Cancer Institute*. 85, 2004-2007.
- Phuapradit P et Varavithya W. 1999. Reduction of rotavirus infection in children receiving bifidobacteria-supplemented formula. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 82, S43-8.
- Plaper A, Golob M, Hafner I, Oblak M, Solmajer T, Jerala R. 2003. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem Biophys Res Commun*. 306:530–6.
- Qiao D, Gaitonde, SV, Qi W and Martiez JD. 2001. Deoxycholic acid suppresses p53 by stimulating proteasome-mediated p53 protein degradation. *Carcinogenesis*. 22, 957-964.
- Quirynen M, Bollen CM. 1995. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *Journal of Clinical Periodontology*. 22, 1-14.
- Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K. 2004. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology*. 126, 520-28.
- Rafter J. 2003. Probiotics and colon cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 17, pp. 849–859.
- Rambaud. JC, Buts JP, Cortier G, Flourir B. 2004. Flore microbienne intestinale : physiologie et pathologie digestive. Edition John Libbey. Paris. P. 19, 23, 50-66.

Raymond-Letron, I. 2005. Cancérologie générale. Cours d'anatomie pathologie spéciale. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Reddy BS, Narisawa T, Wright P, Vukushi D, Weisburger JH and Wynder EL. 1975. Colon carcinogenesis with azoxymethane and dimethylhydrazine in germ free rats. *Cancer Research*. 35, 287-290.

Reddy BS, Hamid R, and Rao CV. 1997. Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. *Carcinogenesis*. 18, 1371-74.

Reid G, McGroarty JA, Angotti R et Cook RL. 1988. *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Canadian Journal of Microbiology*. 34, 344-351.

Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiological Review*. 16, 658-672.

Remontet L, Buemi A and Velten M. 2003. Évolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000, vol. 2007.

Rescigno M. 2008. The pathogenic role of intestinal flora in IBD and colon cancer. *Current Drug Targets*. 9, 395-403.

Riboli E, Decloître F and Collet-Ribbing C. 1996. Alimentation et cancer : Evaluation des données scientifiques. Lavoisier Tec & Doc.

Ridlon JM, Kang DJ and Hylemon PB. 2006. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *The Journal of Lipid Research*. 47, 241-259.

Rinkinen M, Jalava K et al. 2003. Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization?" *Veterinary Microbiology*. 92, 111-9.

Rizzello V, Bonaccorsi I, Dongarra ML, Fink LN, Ferlazzo G. 2011. Role of natural killer and dendritic cell crosstalk in immunomodulation by commensal bacteria probiotics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 473097.

Roberfroid MB. 2001. Prebiotics: preferential substrates for specific germs. *American journal of clinical nutrition*. 73, 406S – 9S.

Roberfroid MB. 2002. Aliments fonctionnels. Edition Tec et Doc. P 22-48, 105-159.

Robijn GW, Gutiérrez-Gallego R, Van den Berg DJ, Amerling JP, Vliegthart JFG. 1996. Structural characterization of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus acidophilus* LMG9433. *Carbohydrate research*. 288, 203-218.

Roger O. 2002. Etude d'oligosaccharides bioactifs issus d'exopolysaccharides bactériens: Obtention, caractérisation et relation structure / fonction. Thèse doctorat. Université Paris 13. p.22.

- Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. *FEMS microbiology Letters*. 9, 29-33.
- Rowland I, Faughnan M, Hoey L, Wähälä K, Williamson G, Cassidy A. 2003. Bioavailability of phytoestrogens. *Br.J.Nutr.*;89:S45-S58.
- Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A, Reyes-Gavilla CG, Salminen S. 2006. Exopolysaccharides Produced by Probiotic Strains Modify the Adhesion of Probiotics and Enteropathogens to Human Intestinal Mucus. *Journal of Food Protection*. 69, 2011–2015.
- Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J et Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. 84, 197 – 215.
- Sabat R, Grutz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J. 2010. Biology of interleukin-10. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 21, 331-344.
- Saikali J, Picard C, Freitas M, and Holt PR. 2004. Fermented milks, probiotic cultures, and colon cancer. *Nutrition and Cancer*. 49, 14–24.
- Salim EI, Morimura K, Menesi A, El-Lity M, Fukushima S, and Wanibuchi H. 2008. Elevated oxidative stress and DNA damage and repair levels in urinary bladder carcinomas associated with schistosomiasis. *International Journal of Cancer*. 123, 601–608.
- Sanchez P, Hernandez AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A, Beyna M, Datta MW, Datta S, and Altaba A. 2004. Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proceedings National Academy of Sciences USA*. 01, 12561-12566.
- Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical Infectious Diseases*. 2008. 46, S58-61; discussion S144-51.
- Sanders M and Huisin't Veld J. 1999. Bringing a probiotic-containing functional food to the market : microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie vanLeeuwenhoek* 76, 293-315.
- Saxelin M, Schiffrin E, Shanahan F, Vaughan E, von Wright A. 1999. Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends in Food Science and Technology*. 10, 393-399.
- Saxelin M, Pessi T et Salmien S. 1995. Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. *International Journal of Microbiology*. 25, 199–203.
- Saxelin M, Gorbach SL, Goldin BR , Barakat S, Gualtieri L, Salminen S. 1992. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive Disease Science*. 37, 121-128.
- Schrezenmeir J, De Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73, 361- 364.

- Segarra-Newnham M. 2007. Probiotics of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: focus on *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii*. *The Annals of Pharmacotherapy*, 41, 1212-1221.
- Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. 2005. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 7749–7759.
- Shah NP. 2007. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*. 17, 1262-1277.
- Sharif T, Alhosin M, Auger C, Minker C, Kim JH, Etienne-Selloum N et al. 2012. Aronia melanocarpa Juice Induces a Redox-Sensitive p73-Related Caspase 3-Dependent Apoptosis in Human Leukemia Cells. *PLoS ONE*. 7, e32526.
- Shinde TS. 2012. Influence of polyphénols on the survival and adhesion of probiotic bacteria. These de Master en sciences appliquées. Auckland, New Zealand.
- Siracusa L, Saija A, Cristani M, Cimino F, D'Arrigo M, Trombetta D, Rao F, Ruberto G. 2011. Phytocomplexes from liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) leaves — Chemical characterization and evaluation of their antioxidant, anti-genotoxic and anti-inflammatory activity, *Fitoterapia*. 82, 546–556.
- Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TM, Zaat BA, Yazdanbakhsh M, Wierenga EA, van Kooyk Y, Kapsenberg ML. 2005. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 115, 1260-1267.
- Steer T, Carpenter H, Tuohy K, Gibson GR. 2000. Perspective on the role of human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutrition research reviews*. 13, 229-254.
- Steinmetz KA, Porter JD. 1991. A review of vegetables, fruits and cancer. *Journal of Epidemiology Cancer Control*. 2, 325–327.
- Szymański H, Armańska M, Kowalska-Duplaga K, Szajewska H. 2008. *Bifidobacterium longum* PL03, *Lactobacillus rhamnosus* KL53A, and *Lactobacillus plantarum* PL02 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized controlled pilot trial. *Digestion*. 78, 13-7.
- Takahashi N, Kitazawa H, Iwabuchi N, Xiao JZ, Miyaji K, Iwatsuki K, and Saito T. 2006. Immunostimulatory oligodeoxynucleotide from *Bifidobacterium longum* suppresses Th2 immune responses in a murine model. *Clinical and Experimental Immunology*. 145, 130-8.
- Tannock GW. 2005. Microbial extracellular polymeric substances. Springer. P. 12, 52.
- Tooley K, Howarth G, Lynn K, Lawrence A, and Butler R. 2006. Oral ingestion of *Streptococcus thermophilus* diminishes severity of small intestinal mucositis in methotrexate treated rats. *Cancer Biol Ther*; 5: 593–600.

- Tzonis X, Vulevic J, Kuhnle GG, George T, Leonczak J, Gibson GR. 2008. Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *British Journal of Nutrition*. 99, 782–92.
- Tzortzis G, Baillon MLA, Gibson GR and Rastall RA. 2004. Modulation of anti-pathogenic activity in canine-derived *Lactobacillus* species by carbohydrate growth substrate. *Journal of Applied Microbiology*. 96, 552-559.
- Tumin N, Halim NAA, Shahjahan M, Izani NNJ, Sattar MA, Khan AH, Mohisin SSJ. 2005. Antibacterial Activity of Local Malaysian Honey. *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 3, 1–10.
- Upton TM, Grayer RJ, Greenham JR, Williams CA, Al-Ghamdi F, Chen FH. 2000. Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Biochem. Systematic Ecology*. 28, 991-1007.
- Usman-Hosono A. 1998. Desmutagenicity of milk cultured with *Lactobacillus acidophilus* strains against mutagenic heated tauco. *Food Chemical Toxicology*. 36: 805–10.
- Van Guelpen B, Hultdin J, Johansson I, Hallmans G, Stenling R, Riboli E, Winkvist A, and Palmqvist R. 2006. Low folate levels may protect against colorectal cancer. *Gut*. 55, 1461–66.
- Vaz JA, Almeida GM, Isabel, Ferreira I CFR, Martins A and Vasconcelos MH. 2012. *Clitocybe alexandri* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in a lung cancer cell line: Identification of phenolic acids with cytotoxic potential. *Food Chemistry*. 132, 482-486
- Verdecchia A, Francisci S et al. 2007. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 analysis of EURO-CARE-4 data. *The Lancet Oncology*. 8, 784-96.
- Vernazza CL, Rabiou BA, Gibson GR. 2006. Human colonic microbiology and the role of dietary intervention: Introduction to Prebiotic. Jhon Wiley & Sons edition. P. 1-28.
- Vinderola CG, Medici M, et Perdigon G. 2004. Relationship between interactions sites in the gut hydrophobicity, Mucosal immunomodulating capacity and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. 96.P: 230.
- Vinderola CG, and Reinheimer JA. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*. 36, 895-904.
- Wang KY, Li SN, Liu CS, Perng DS, Su YC, Wu DC, Jan CM, Lai CH, Wang TN. 2005. Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81, 939-40.
- Wang KY, Li SN, et al. 2004. Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *American Journal of Clinical Nutrition*. 80, 737-41.
- WCRF (2007) World Cancer Research Found International. <http://www.wcrf.org>.

- Weinberg R. 1996. L'apparition des cancers.-, Pour la science, n° special. 229, 34-42.
- Weiss G, Christensen HR, Zeuthen LH, Vogensen FK, Jakobsen M, Frokiaer H. 2011. Lactobacilli and bifidobacteria induce differential interferon-beta profiles in dendritic cells. *Cytokine*.56, 520-530.
- Weiss G, Rasmussen S, Zeuthen LH, Nielsen BN, Jarmer H, Jespersen L, Frokiaer H. 2010. *Lactobacillus acidophilus* induces virus immune defence genes in murine dendritic cells by a Toll-like receptor-2-dependent mechanism. *Immunology*.131, 268-281.
- World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (2007) Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC: AICR.
- Wilson M. 2005. Microbial inhabitants of humans. Cambridge university press.p.255-266, 295.
- Wullt M, Hagslatt ML, and Odenholt I. 2003. *Lactobacillus plantarum*299v for the treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a double-blind, placebo controlled trial. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 35, 365-7.
- Yadav H, Jain S, and Sinha PR. 2008. Oral administration of dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* ameliorated the Streptozotocin-induced oxidative stress and dyslipidemia in rats. *Journal of Dairy Research*. 75, 189–95.
- Younes H, Coudray C, Bellanger J, and Demigne C, et al. 2001. Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *British Journal of Nutrition*. 86, 479–85.
- Yuan S, Seppo KL. 2009. Hand Book of Probiotics and prebiotics. 2ème édition: Wiley. Canada. pp: 377-391.
- Zahng XB, Ohta Y. 1993. Microorganisms in the gastrointestinal tract of the rat prevent the absorption of mutagen-carcinogen 3, amino 1,4 Dimethyl 5H pyrido (4,3 b) indole. *Canadian Journal of Microbiology*. 39, 841-845.
- Zhao C, Giusti M, Malik M, Moyer MP, Magnuson BA. 2004. Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and non-tumourigenic colonic cell growth. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 52, 6122–6128.
- Zheng W, Wang SY. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem*. 49, 5165–5170.
- Zakaria ZA, Rofiee MS, Mohamed AM, The LK, Salleh MZ. 2011. *In Vitro* Antiproliferative and Antioxidant Activities and Total Phenolic Contents of the Extracts of *Melastoma malabathricum* Leaves. *J Acupunct Meridian Stud*. 4, 248 – 256.
- Zeuthen LH, Fink LN, Frokiaer H. 2008. Toll-like receptor 2 and nucleotide-binding oligomerization domain-2 play divergent roles in the recognition of gut-derived lactobacilli and bifidobacteria in dendritic cells. *Immunology*.124, 489-502.

Zeuthen LH, Christensen HR, Frokiaer H. 2006. Lactic acid bacteria inducing a weak interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with gram-negative bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology*. 13, 365-375.

Zopf D and Roth S. 1996. Oligosaccharide anti-infective agents. In Rastall R.A; Gibson G.R; Gill .H.S, 2005: Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health. *FEMS Microbiology Ecology*. 52, 145-154.

# **Annexe**

## 1. Composition des milieux de cultures

- **Bouillon MRS (Man, Rogosa, Sharpe)**

Composant	Quantité (g/l d'eau distillée)
Peptone	10
Extrait de viande	8
Extrait de levure	4
Glucose	20
Acétate de sodium	5
Citrate d'ammonium	2
Tween 80	1 ml
Hydrogénophosphate de potassium	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
pH=6,2	

- **Bouillon M17**

Composant	Quantité (g/l d'eau distillée)
Tryptone	5
Peptone de soja	5
Infusion de viande	5
Extrait de levure	2,5
Glycérohydrogénophosphate de sodium	19
Lactose	5
Acide ascorbique	0,5
Sulfate de magnésium	0,25
pH=6,9	

### Composition du bouillon hypersucré (Larrent, 1997)

Milieu hypersucré (g/l)	
Ingrédient	Quantité
Tryptone	10
Extrait de viande	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5
Sucre	50

**Bouillon nutritif:**

Extrait de viande.....05g  
 Peptone pancréationique.....10g  
 Chlorure de sodium.....05g

**Ringer:**

Chlorure de sodium.....9g  
 Chlorure de potassium.....0.42g  
 Bichlorure de calcium.....0.48g  
 NaHCO<sub>3</sub>.....0.2g

**Tampon phosphate:**

NaCl.....9.93g  
 KCl.....0.25g  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....1.43g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0.25g

**2. Isolement et Identifications des souches lactiques :**

- Test de résistance des Streptocoques à 60°C

Souche	Pendant 30min
<b>Strep 1</b>	+
<b>Strep 2</b>	+
<b>Strep 3</b>	+
<b>Strep 4</b>	+
<b>Strep 5</b>	+
<b>Strep 6</b>	+
<b>Strep 7</b>	+



- **Souches identifiées**

Souche	Identification
LB1	<i>L. coryniformis sub sp torquens</i>
LB2	<i>L. plantarum</i>
LB3	<i>L. fructosus</i>
LB4	<i>L. agilis</i>
LB5	<i>L. johnsonii</i>
LB6	<i>L. acidophilus</i>
LB7, LB9, LB10, LB11, LB12, LB14, LB15	<i>L. casei sub sp rhamnosus</i>
LB8	<i>L. delbrueckii sub sp lactis</i>
LB13	<i>L. murinus</i>
Strep1, Strep2, Strep3, Strep4, Strep5, Strep6, Strep7	<i>S. thermophilus</i>

- **Dosage des Exopolysaccharides "Méthode au phénol": (Dubois et al, 1956)**

*Principe:*

Le principe est fondé sur la condensation du phénol avec les produits de la dégradation des hexoses par l'acide sulfurique.

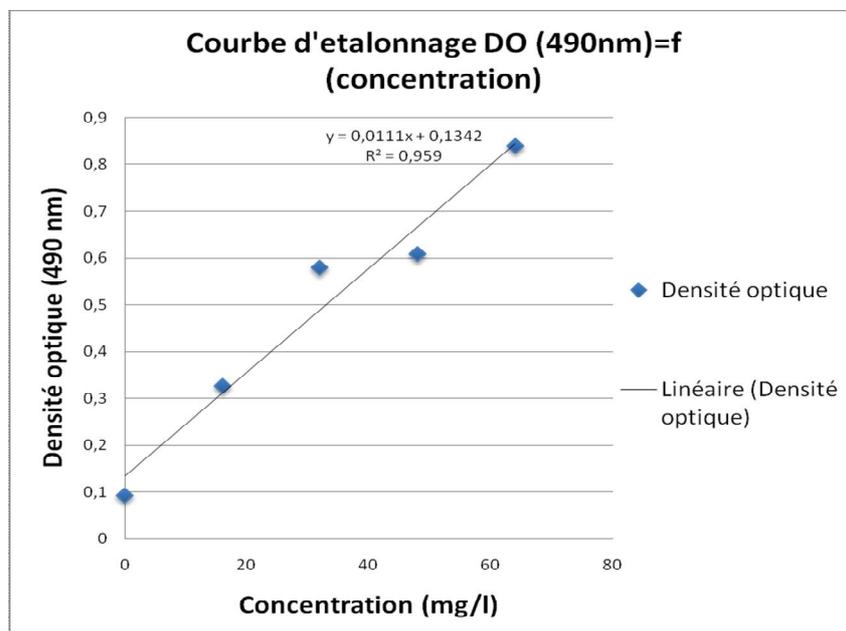
*Réactifs:*

Solution de phénol redistillée à 5g pour 100 ml d'eau bidistillée.

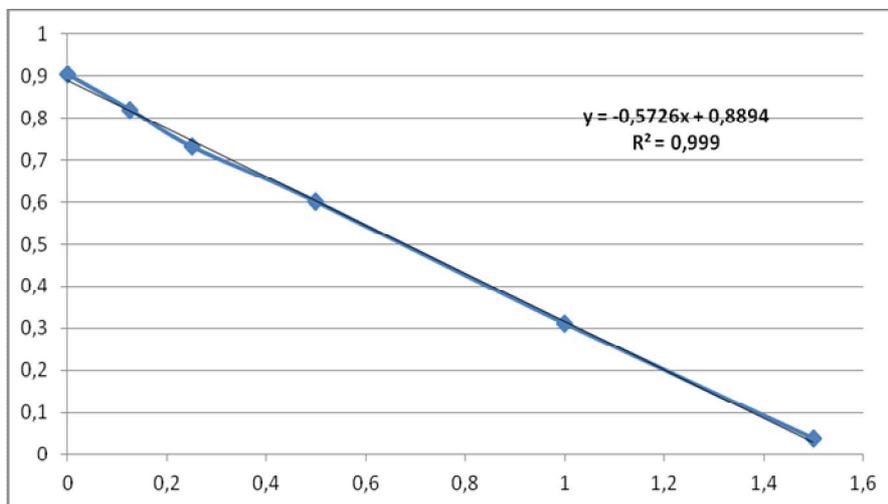
*Mode opératoire:*

Dans des tubes à essai très propres, on introduit 1 ml de la solution à doser contenant de 10 à 70 µg d'oses totaux puis 1 ml de la solution de phénol. Les tubes sont agités, puis 5ml d'acide sulfurique sont ajoutés en 5 secondes à l'aide d'une burette (jet brutal). La température atteint 110°C. Après une agitation rapide les tube sont porté à 100°C/5mn. Après un séjour de 30 mn à l'obscurité on mesure la densité optique à 490 nm et la teneur en sucre est calculée à partir de la courbe d'étalonnage d'un mélange galactose/glucose dans un rapport 4/1.

- Courbe d'étalonnage pour le dosage des exopolysaccharides



- Courbe de neutralisation du DPPH par le Trolox à 517 nm



## Résumé

De nombreuses études soutiennent l'idée que la microflore du côlon intervient pour une grande part dans l'étiologie du cancer colorectal. Du fait, un grand intérêt s'est développé en faveur d'aliments fonctionnels capable de prévenir son évolution en modulant la flore intestinale et/ou son métabolisme. L'objectif de cette étude est la sélection d'une combinaison symbiotique dotée de caractéristiques prévenant et/ou limitant le développement de cette pathologie. Au total 22 souches lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Streptococcus* ont été caractérisées pour leurs potentialités probiotiques, puis évaluées pour leurs habilités à former des combinaisons symbiotiques avec des extraits phénoliques du *Rosmarinus officinalis* et du *Citrus cinensis*. Ensuite, l'extrait phénolique sélectionné est étudié pour ses effets antioxydants et antiprolifératifs. Les résultats obtenus suggèrent que les composés phénoliques du romarin lui confèreraient des propriétés biologiques intéressantes notamment une activité antimicrobienne à l'égard des pathogènes de même que leur sensibilisation à l'action des antibiotiques. Cet extrait avait non seulement épargné la croissance des souches probiotiques, mais également amélioré leurs habilités d'adhésion et d'agrégation. Les fortes activités antioxydante et antitumorale observées chez la fraction Méthanolique de cet extrait, particulièrement riche en acide rosmarinique, seraient en faveur de sa potentialité chimio-thérapeutique. L'extrait méthanolique du *Rosmarinus officinalis* pourrait renfermer des candidats prébiotiques dotés de potentialités anticancéreuses. Nous avons en outre démontré dans cette étude que *Lactobacillus reuteri* 5289, peut inhiber la production d'IL-12 chez des cellules dendritiques induites par *Lactobacillus acidophilus* NCFM. L'inhibition de l'IL-12 a été observée non seulement pour les lactobacilles, comme indiqué jusqu'ici, mais aussi pour des bactéries de genres différents, y compris des agents pathogènes. L'étude des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'inhibition de l'IL-12 par *L. reuteri* 5289, avait révélée que l'activité anti-inflammatoire observée est associée à une phosphorylation prolongée de la voie ERK1/2 des MAP kinases. Une meilleure compréhension des mécanismes de régulation immunitaire exercée par les lactobacilles est cruciale pour un emploi plus efficace de souches probiotiques dans les pathologies inflammatoires de l'intestin ainsi que la prévention de la tumeur colorectal.

**Mots clés :** Cancer colorectal, Polyphénols, Probiotique, Prebiotique, Symbiotique.

## Abstract

Many studies support the idea that the microflora of the colon occurs largely in the aetiology of colorectal cancer. Thus, great interest has developed in favour of functional foods capable of preventing its development by modulating the intestinal flora and/or its metabolism. The objective of this study is the selection of a symbiotic combination with characteristics preventing and/or limiting the development of this pathology. A total of 22 lactic strains belonging to the genus *Lactobacillus* and *Streptococcus* were characterized for their probiotic potentials and then evaluated for their ability to form symbiotic combinations with phenolic extracts obtained from *Rosmarinus officinalis* and *Citrus cinensis*. Then the selected phenolic extract was studied for its antioxidant and antiproliferative effects. The results suggest that Rosemary phenolic compounds confer interesting biological properties including antimicrobial activity against pathogens and also by enhancing their sensitiveness toward the antibiotics. This extract had not only stimulated the growth of probiotic strains, but also improved their adhesion and aggregation abilities. The strong antioxidant and antitumor activity observed in the methanol fraction of this extract, rich in rosmarinic acid, would be in favour of its chemotherapeutic potential. The methanolic extract of *Rosmarinus officinalis* could contain prebiotics candidates with anticancer potentials. We also demonstrated in this study that *Lactobacillus reuteri* 5289, can inhibit the production of IL-12 in dendritic cells induced by *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Inhibition of IL-12 was observed not only for lactobacilli, as shown so far, but also for different kinds of bacteria, including pathogens. The study of intracellular signalling pathways involved in the inhibition of IL-12 by *L. reuteri* 5289, had revealed that the observed anti-inflammatory activity is associated with prolonged phosphorylation of ERK1/2 MAP kinase. A better understanding of immune regulatory mechanisms applied by lactobacilli is crucial for more effective use of probiotic strains in inflammatory bowel diseases and the prevention of colorectal tumor.

**Keywords:** Colorectal cancer, Polyphenols, Probiotic, Prebiotic, Symbiotic.