

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique

Université Abderrahmane Mira de Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de Vie

Département de Microbiologie

Mémoire de Master

En Microbiologie Moléculaire et Médicale

Thème

Effet de *Ruminococcus gnavus* E1 sur la variation du taux de cholestérol chez le lapin.

Réalisé par :

❖ *Sahi Faten*

❖ *Taraki Assia*

Devant le jury :

Président: Mr Touati A

Promotrice: M^{me} Benachour K

Examineur: Mr Bensaid A K.

Examineur: Mr Bendjaddou K.

Année universitaire : 2012-2013



Remerciement

Nous tenons à remercier gracieusement notre promotrice
M^{me} Benachour, qui nous a fait confiance, encadrée, encouragée et
initiée à cette recherche.

Un sentiment de gratitude aux honorables membres de jury qui ont
accepté d'évaluer notre travail d'abord à **Mr Touati** et également **Mr
Bendjaddou** et **Mr Bensaid**.

Nous vifs remerciements s'adressent au **Dr Moualek** et son équipe
« **Souad, Dawiya, Nadia, Hamid, Kiki, Fouad, Saliha**, et tous les
autres » pour leur aide, orientation durant notre stage.

Nous remercions également nous enseignants pour leur savoir qu'ils
ont su partagé.

Merci infiniment.



Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes parents, les deux êtres les plus chères à mon cœur, tout les mots du monde ne pourront décrire ma reconnaissance ; l'amour que j'ai pour vous ; de m'avoir soutenu ; encouragé et aidé dans ce qu'il ya de plus important à mes yeux, et je sais que c'est le cas pour vous aussi, j'espère être toujours à la hauteur de vous espérances, car vous méritez tout ce qu'il ya de mieux en ce monde , pour toi ma chère maman **Nouria** je te dit merci car grâce à toi que j'ai pu réaliser mes rêves « **je t'aime maman** »

Et toi mon cher **Papa Ahmed** un grand merci pour tous j'espère que tu es fière de moi et vous le serai toujours toi et Maman.

A mes frères: **Foudil** pour avoir toujours été là pour moi, plus qu'un frère t'es un ami ; **Halim** qui m'a toujours soutenu pendant mon stage et dans l'élevage de nos lapins; **Azzeddine** pour son aide et soutien.et j'oublié pas ma jolie petite sœur **Chanez** que j'aime beaucoup.

A mes tantes maternelle **Khokha, Zoulikha , Djamila, Samia** et **Rbiha** ainsi que leurs enfants pour leur aide et prière.

Un très grand merci pour ma grand-mère **Zohra**, que dieu te protège titi.

A mes copines : **Assia** mon rayon de soleil, **Malika, Bania ,Salima, Hakima, et Meriem**, à toutes et à tous les autres je vous dirai juste merci, et pardon je ne pourrai pas toutes vous citez.

Un très grand merci à **Hamid** qui ma aider durant tous mon stage et ma vie, il m'a portée sur son dos, je te dis, moi je te porterai dans mon cœur pour toujours, merci pour ton soutien.

A tous ceux que j'ai connus, rencontrés et ceux que je n'ai pas pu citer, merci à tous.

FATEN





Dédicaces

Je dédie ce travail :

À deux chères personnes, ma maman **Sakina** et mon Papa **Rachid** tout les mots du monde ne pourront pas décrire ma reconnaissance ; l'amour que j'ai pour vous ; merci de m'avoir soutenu ; encouragé et aidé dans ce qu'il ya de plus important à mes yeux et j'espère être toujours à la hauteur de vous espérances, car vous méritez tout ce qu'il ya de mieux en ce monde.

À mon cher mari **Hassen**, merci de m'avoir soutenu, aidé et compris.

À mes beaux parents **Mouloud** et **Fatma**, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

À mes chères sœurs : **Tounes, Louiza, Karima, Souhila et Nandjet** pour leurs conseils, aide et de les avoir trouvé toujours à mes cotés, ainsi que leurs maris **Layachi, Mustapha 1, Mustapha 2, Rachid** et **Adel**.

À mon cher frère **Saddek**, que j'ai trouvé toujours à mes cotés et sa femme **Aicha**.

À ma chère mami **Manana**, merci pour tes douza.

A ma belle soeur **Hassina** ainsi que son mari **Sadi**.

A mes oncles, tantes, cousins(**Hichem**) et cousines(**Lamia**).

À mes neveux : **Hamza, Amyas, Massoud, Abdsalam, Abdrahim, Said, Fouad, Abdraouf** et **Abdlouheb**.

À mes nièces : **Ahlem, Romaissa, Lyna, Arwa, Houda, Sarah, Assma, Manel, Farah** et ma petite chérie **Malek**.

À mes copines : **Faten, Hakima, Meriem, Kahina, Amel, Amina, Malika, Bania**.



ASSIA

Liste des figures

Figure 01 : Structure plane du cholestérol	2
Figure 02 : Voie d'entrée et de sortie du cholestérol dans l'organisme.	4
Figure 03 : Schéma général de la synthèse du cholestérol	5
Figure 04 : Différentes lipoprotéines responsables du transport du cholestérol	6
Figure 05 : Cage des lapins	12
Figure 06 : Lot des lapins mâles.	13
Figure 07 : Répartition des lapins en lots.	13
Figure 08 : Pesée des lapins avec la balance « ACS-C ».	14
Figure 09 : Etapes de prélèvement du sang à partir de la veine marginale du lapin	15
Figure 10 : Centrifugeuse (Centurion Scientific LTD)	16
Figure 11 : Beckman Coulter Synchron CX9 Pro.....	18
Figure 12 : Cobas C111 (ROCHE DIAGNOSTICS).....	19
Figure 13 : Etapes du dosage automatique par Cobas C111	20
Figure 14 : Observation de <i>Ruminococcus gnavus E1</i> sous microscope optique	22
Figure 15 : Croissance pondérale des lapins	22
Figure 16 : Evolution du cholestérol total des lapins	24
Figure 17 : Evolution du triglycéride des lapins.	26
Figure 18 : Evolution du HDL - cholestérol des lapins	27
Figure 19 : Evolution du LDL - cholestérol des lapins.....	28

Liste des tableaux des annexes

Tableau I : Représentation du poids corporel des lapins mâles.

Tableau II : Résultats du premier dosage des paramètres biologiques des lapins.

Tableau III: Résultats du deuxième dosage des paramètres biologiques des lapins.

Tableau IV : Résultats du troisième dosage des paramètres biologiques des lapins.

Tableau V : Résultats du quatrième dosage des paramètres biologiques des lapins.

Tableau VI : Résultats du cinquième dosage des paramètres biologiques des lapins.

Tableau VII : Résultats du sixième dosage des paramètres biologiques des lapins.

Tableau VIII : Résultats du septième dosage des paramètres biologiques des lapins mâles.

Sommaire

Introduction	1
Synthèse bibliographique	
1. Cholestérol	2
2. Structure du cholestérol.....	2
3. Origine du cholestérol.....	2
3.1. Origine exogène	3
3.2. Origine endogène.....	3
4. Devenir du cholestérol dans l'organisme	3
5. Rôle biologique du cholestérol	4
6. Synthèse du cholestérol.....	4
7. Transporteurs du cholestérol	5
8.1. Chylomicrons (CM).....	6
8.2. Lipoprotéines de très faible densité (VLDL)	6
8.3. Lipoprotéines de faible densité (LDL).....	7
8.4. Lipoprotéine de haute densité (HDL).....	7
8.5. Les triglycérides.....	7
9. Régulation du cholestérol	7
10. Hypercholestérolémie.....	8
<i>II. Ruminococcus gnavus E1</i>.....	8
1. Généralités	8
2. Taxonomie.....	8
3. Caractères morphologiques et cultureux	9
4. Antagonisme de <i>Ruminococcus gnavus E 1</i> à l'égard les bactéries pathogènes	9

Matériel et Méthodes

1. La souche bactérienne.....	11
1.1. Origine de la souche bactérienne	11
1.2. Revivification et vérification de la pureté de <i>Ruminococcus gnavus</i> E1	11
1.3. Culture de <i>Ruminococcus gnavus</i> E1 dans le lait	11
2. Lapins	11
2.2. Enceinte d'élevage	12
2.3. Aliment des lapins	12
2.4. Répartition des lapins en lots	12
3. Source de cholestérol.....	13
4. Mode de traitement	14
5. Mesure du poids corporel.....	14
6. Prélèvements du sang.....	14
7. Technique et dosage	15
7.1. Principe du dosage manuel.....	15
7.2. Echantillons.....	16
7.3. Dosage des paramètres biologiques	16
7.4.1. Dosage manuel du cholestérol total	16
7.4.2 Dosage automatique du cholestérol total et du triglycéride	17
7.5.1. Dosage manuel du HDL – cholestérol.....	18
7.5.2. Dosage automatique du HDL – cholestérol.....	19

Sommaire

7.6.1. Calcule de la concentration du LDL- cholestérol	20
7.6.2. Dosage manuel (si Triglycéride > 4 g/l)	20
8. Etude statistique	21
Résultat et discussion	
1 .Vérification de la pureté de la souche.....	22
2. Croissance pondérale des lapins.....	22
3. Variation des paramètres biologique des lapins.....	23
3.1. Variation du cholestérol total.....	23
3.2. Variation des triglycérides.....	26
3.3. Variation des HDL – cholestérol.....	27
3.4. Variation de LDL - cholestérol total.....	28
6. Conclusion.....	29

Références bibliographique

Annexe

Introduction

Le cholestérol est une molécule élémentaire de la vie humaine : dans la cellule, il est un constituant des membranes ; dans l'organisme, il est le noyau de base des stérols et des sels biliaires (**Gimpl et Katja, 2011**).

Sa concentration excessive dans le plasma s'associe à une incidence accrue des maladies artérielles, notamment des accidents coronaires qui dans les pays industrialisés tiennent une place de haut rang dans la morbidité et dans la mortalité (**Jacotot, 1990**).

Le cholestérol intervient dans les maladies cardiovasculaires, hypercholestérolémie comme facteur de risque.

A l'heure actuelle les traitements pour lutter contre l'hypercholestérolémie comme les statines, les résines ou les fibrates ; nécessitent une prise conjuguée et provoquent de nombreux effets secondaires. Ces contraintes aboutissent souvent à l'arrêt prématuré du traitement. C'est pourquoi, il y'a un évident besoin d'améliorer la prise en charge de l'hypercholestérolémie. Les nouvelles classes de médicaments en cours de développement, ou déjà disponibles comme les inhibiteurs de l'absorption intestinale du cholestérol, seront peut-être la solution pour demain dans le cadre d'associations thérapeutiques (**Philippe, 2003**).

Après les effets antihypertenseurs des probiotiques, voici que l'on évoque leur action favorable sur les profils lipidiques. Des produits laitiers divers (yaourts, laits fermentés, fromages) supplémentés en probiotiques permettent de diminuer les taux de cholestérol total, de LDL et de triglycérides (**Gibson et Rastall, 2004**).

Certaines études ont démontré que les probiotiques pouvaient aider à réduire le mauvais cholestérol (lipoprotéines de basse densité), bien que leurs mode d'action n'aient été pas encore bien expliqué. Les bactéries probiotiques pourraient participer à la décomposition des acides biliaires. Ainsi, cela aurait pour effet de limiter à son tour la réabsorption du cholestérol, car le cholestérol est un important composant de la bile (**Resta, 2009**).

Des études *in vitro* ont montrées que la souche de *Lactobacillus acidophilus* pouvait assimiler le cholestérol présent dans le milieu de culture (**Gilliland, 1990**).

C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à l'action de *Ruminococcus gnavus* E1 sur les taux élevés du cholestérol total, en utilisant comme modèle animal, le lapin.

1. Cholestérol

Le cholestérol est un élément vital pour la survie cellulaire. Il rentre dans la composition des membranes cellulaires et des hormones stéroïdiennes (**Rawn, 1990**).

Il tire son nom du grec ancien chole- (bile) et de stéréos (solide), car il fut découvert sous forme solide dans les calculs biliaires en 1758 par François Poulletier (**Feltgen, 1993**).

Le cholestérol est un lipide amphiphile transporté par le plasma sanguin sous forme de lipoprotéines, qui sont des particules globulaires de haute masse moléculaire, présentant une membrane formée d'une monocouche de phospholipides et de cholestérol libre, un cœur formé de lipides apolaires (esters de cholestérol et triglycérides de même que des apolipoprotéines) (**Havel, 1987**).

2. Structure du cholestérol

Le cholestérol est composée de 4 cycles notés A, B, C et D et possède une fonction hydroxyl (alcool). Cette fonction est importante car elle peut réagir avec des acides gras pour donner des esters de cholestérol (**Rog et al., 2009**) (**figure 1**).

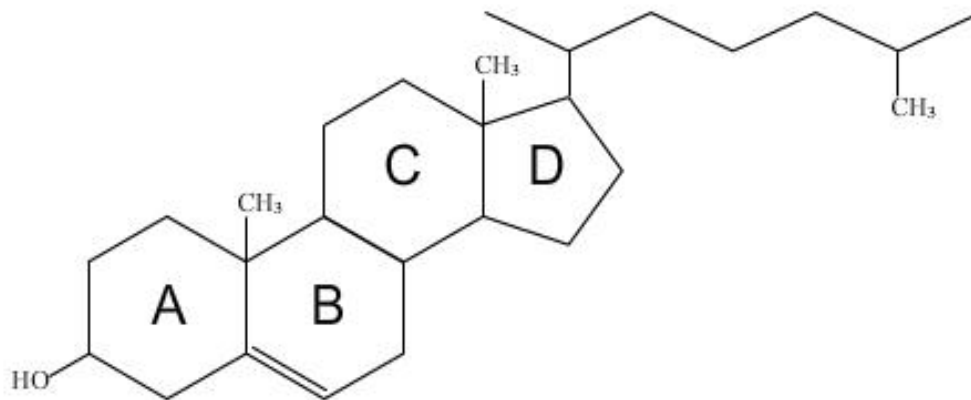


Figure 1 : structure plane du cholestérol (**Rog et al., 2009**).

3. Origines du cholestérol

Le cholestérol présent dans l'organisme peut avoir deux sources, l'alimentation qui constitue l'apport exogène et la biosynthèse du cholestérol ; Le foie est capable d'en produire la moitié (**Repa et Mangelsdorf, 2000**).

3.1. Origine exogène

L'alimentation apporte 0,5 à 1 g de cholestérol par jour. Les principales sources alimentaires de cholestérol sont les poissons, la volaille, la viande et les produits laitiers mais majoritairement les œufs (**Whitney et al., 2005**).

Le cholestérol estérifié est hydrolysé par une cholestérol-estérase pancréatique. Le cholestérol libre entre dans la composition des micelles mixtes. Il diffuse passivement dans l'entérocyte au niveau du jéjunum. Le pourcentage d'absorption diminue lorsque les apports en cholestérol augmentent. Dans l'entérocyte, 80 % du cholestérol alimentaire est réestérifié grâce à l'acylcholestérolacyl transférase (ACAT) (**Luc et al., 1991**).

L'entérocyte synthétise aussi du cholestérol à partir d'acétate (0,3 à 0,7 g/24h). Le cholestérol libre ou estérifié s'incorpore dans les chylomicrons. Les stérols végétaux (phytostérols) consommés en grande quantité inhibent l'absorption du cholestérol (**Luc, 1991**).

3.2. Origine endogène

La synthèse endogène peut se faire dans toutes les cellules de l'organisme, à l'exception des cellules nerveuses et des érythrocytes (**Luc, 1991**).

Néanmoins, c'est dans le foie que se fait la plus grande partie de cette synthèse et elle est à l'origine de 0,7 à 0,9 g de cholestérol par jour (**Suty, 1994**).

Le cholestérol peut provenir de l'alimentation, qui est à l'origine d'environ un tiers des apports journaliers, ou de la biosynthèse, responsable de l'apport des deux tiers restants. La seule voie importante d'élimination du cholestérol est sa transformation hépatique en acides biliaires. Le foie excrète le cholestérol et les acides biliaires dans la bile, qui est déversée dans la lumière intestinale au moment de la prise alimentaire. La fraction non réabsorbée d'acides biliaires et de cholestérol est éliminée dans les fèces (**Morozova et al., 2004**).

4. Devenir du cholestérol dans l'organisme

Dans l'organisme, le cholestérol peut se retrouver sous forme libre ou bien sous forme estérifiée lorsque le groupe hydroxyle (-OH) se lie à un acide gras (**Gropper et al., 2005**).

Des échanges réciproques de cholestérol s'effectuent entre le plasma d'une part et tous les autres compartiments d' autre part (**Dacosta, 2002**).

Le cholestérol est estérifié par des acides gras à longue chaîne et les esters sont transportés par des lipoprotéines plasmatiques (**Suty, 1994**).

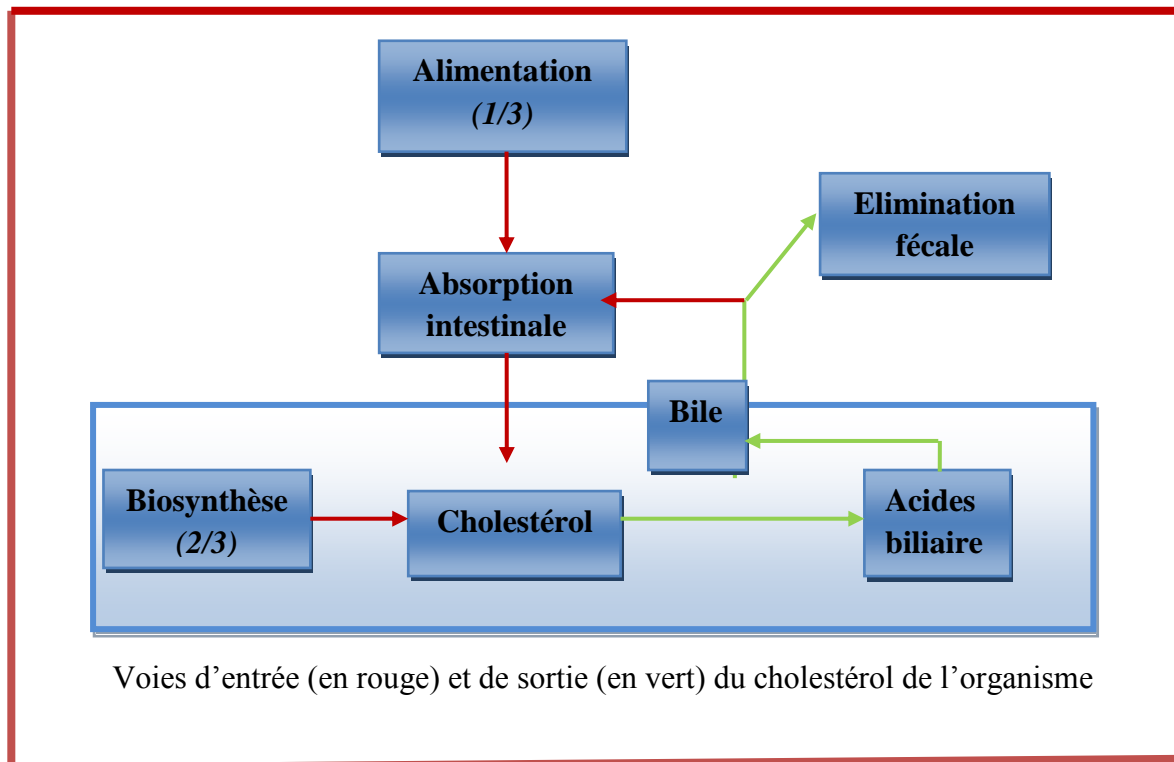


Figure 2: Voie d'entrée et de sortie du cholestérol de l'organisme

(**Morozova et al., 2004**).

5. Rôle biologique du cholestérol

Le cholestérol a un rôle fondamental dans la physiologie et la physiopathologie des cellules eucaryotes (**Gimpl et Katja, 2011**). Il contrôle la fluidité membranaire, module l'activité des différentes protéines de la membrane, il participe au renouvellement des membranes plasmiques et des gaines de myéline (**Luc, 1991**) et il est le précurseur des hormones stéroïdes et des acides biliaires et aussi de la vitamine D (**Gimpl et Katja, 2011**).

6- Synthèse du cholestérol

La synthèse du cholestérol se fait dans le cytoplasme des cellules (sur tout l'intestin et le foie) à partir de l'hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA). L'HMG-CoA provient de la condensation de 3 Acétyl-CoA venant des peroxyosomes. Les acides gras à chaînes courtes

(C8) et la leucine sont aussi de bons substrats pour la synthèse du cholestérol. L'étape d'engagement est la transformation de l'HMG-CoA en mévalonate par l'HMG-CoA réductase. Les radicaux isoprènes activés, isopentényl pyrophosphate (IPPP) et diméthylallyl pyrophosphate (DMPP) sont produits à partir du mévalonate. Dans le tissu nerveux une voie mineure (cycle de POPJAK) permet de resynthétiser l'HMG-CoA à partir du DMPP. Les étapes intermédiaires de la voie, jusqu'au farnésyl pyrophosphate conduisent aux synthèses des radicaux isopentényl et farnésyl (modifications post-traductionnelles) et des isoprénoïdes (dolichols, ubiquinone et cytochromes a). A partir du squalène, débute la synthèse du cholestérol (**Raisonnier, 2003**) (**Figure 3**).

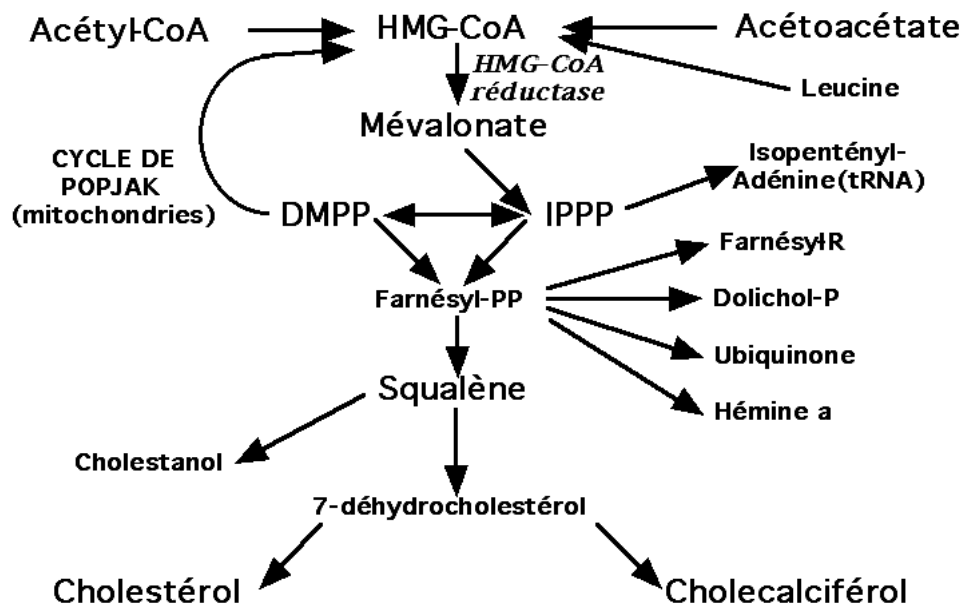


Figure 3: Schéma général de la synthèse du cholestérol (**Raisonnier, 2003**).

7. Transporteurs du cholestérol

Les lipoprotéines sont des macromolécules sphériques de taille et composition variables et de structure générale identique. Elles sont formées d'un corps lipidique hydrophobe contenant essentiellement des triglycérides et des esters de cholestérol. Ils sont les principaux porteurs du cholestérol et d'autres lipides dans l'organisme. Ces particules sont formées dans le foie et les intestins et sont transportées, par le plasma sanguin, vers les cellules et les tissus pour fournir les lipides pour l'usage dans le métabolisme cellulaire (**Cobbold et al., 2002**).

Des protéines spécifiques, nommées apolipoprotéines (apo), à la surface des lipoprotéines assurent la stabilité de la macromolécule et en contrôlent le devenir métabolique. Les lipoprotéines se groupent en plusieurs classes selon leurs origines, composition chimique et propriétés physiques (**figure 4**).

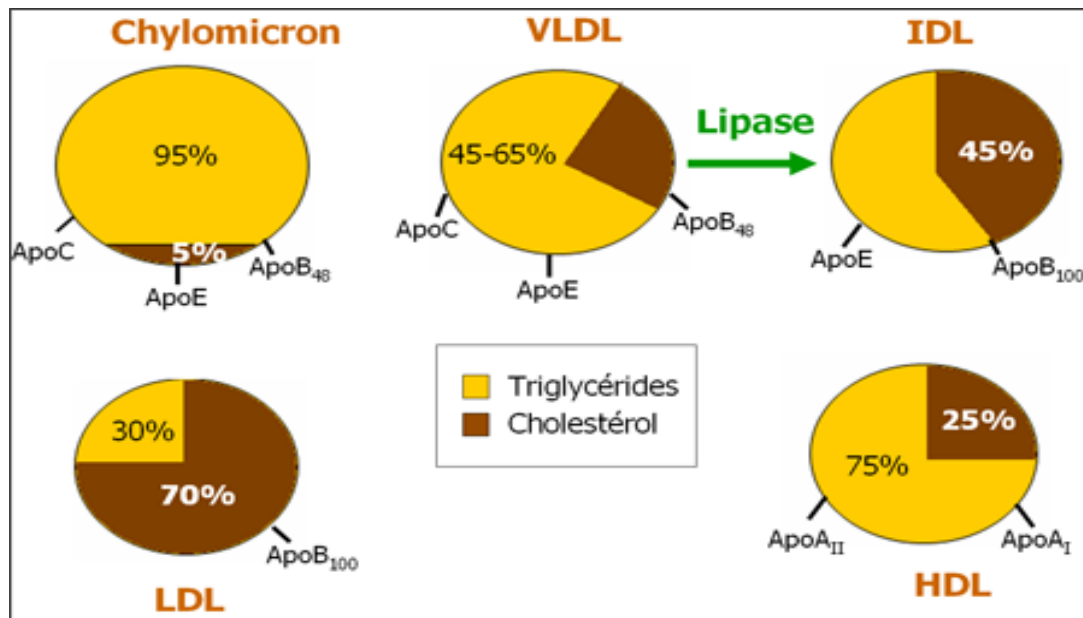


Figure 4 : Différentes lipoprotéines responsables du transport du cholestérol (Cobbold et al., 2002).

8.1. Chylomicrons (CM)

Les Chylomicrons (CM) sont responsables du transport des lipides alimentaires des intestins aux tissus. Ils ont un diamètre variable de 800 à 5000 Å, une densité de 0.93 g/ml (Hobbs et al., 1987 ; Leitersdorf et al., 1990).

8.2. Lipoprotéines de très faible densité (VLDL)

Les VLDL participent à la voie endogène des lipoprotéines, du foie vers les tissus périphériques. Ces particules, d'un diamètre variant de 300 à 700 Å et d'une densité de 0.95 à 1.010 g/ml. La population des particules VLDL est hétérogène quant à la composition et à la fonction : la proportion des apolipoprotéines peut varier d'une particule à l'autre. La composition elle-même varie à partir de la transformation du VLDL vers sa conversion en IDL au fur et à mesure que les lipases viennent hydrolyser les triglycérides pour leurs

utilisation par les cellules (Hobbs *et al.*, 1987 ; Leitersdorf *et al.*, 1990 ; Simard *et al.*, 1994).

8.3. Lipoprotéines de faible densité (LDL)

Les LDL sont issues des IDL par l'action des lipases leurs taille est d'environ 220 à 272 Å et leur densité varie entre 1.019 et 1.060g/ml. Leur demi-vie plasmatique est de l'ordre de 4 jours. Elles alimentent les tissus en lipides, ce qui explique que leur élévation puisse entraîner des surcharges lipidiques. Les LDL sont hétérogènes dans la distribution de leur taille, de leur densité et de certaines de leurs propriétés. Même si toutes les LDL sont athérogène, les LDL petites et denses sont considérées comme étant la sous-population la plus athérogène, ces dernières peuvent être classées soit en phénotype A ou en phénotype B. Une autre classification permet de classer les sous-populations selon leurs taille, de LDL₁ à LDL₇ (Hobbs *et al.*, 1987 ; Leitersdorf *et al.*, 1990 ; Simard *et al.*, 1994).

8.4. Lipoprotéine de haute densité (HDL)

Les HDL ont pour fonction de transporter l'excédent de cholestérol dans le sang vers le foie et qui participe ainsi à l'élimination de cette graisse par l'organisme. Cette variable représente le "bon" cholestérol, celui pour lequel il est préférable d'obtenir des valeurs fortes. Plus le taux sanguin de HDL-cholestérol est élevé, plus le risque d'athérosclérose est faible. Leur demi-vie plasmatique est d'environ 6 jours (Idris *et Al-Ubaidi*, 2010).

8.5. Les triglycérides

Il s'agit d'une autre catégorie de lipides, qui est associée au risque d'athérosclérose, mais de façon moins nette que le cholestérol. Leur concentration sanguine est mesurée par technique enzymatique (Dennis, 2003).

9. Régulation du cholestérol

Au cours de l'évolution, les animaux ont acquis un mécanisme qui permet de réguler la concentration du cholestérol dans le sang. Ce mécanisme du complexe de régulation en feed-back du cholestérol faisant intervenir les protéines SCAP et SREBP pour l'activation de la transcription des gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol et Insig pour l'inhibition de la transcription de ces gènes (Brendel *et al.*, 1998).

10. Hypercholestérolémie

L'hypercholestérolémie fait partie des troubles du métabolisme lipidique. Ces troubles se caractérisent par une augmentation du cholestérol dans le sang (hyperlipidémie), ces troubles peuvent être congénitaux ou acquis. L'hypercholestérolémie constitue un facteur de risque essentiel pour l'athérosclérose des vaisseaux et tout particulièrement pour la maladie coronarienne (Luc et al., 1991).

II. *Ruminococcus gnavus* E1

1-Généralités

La famille *Ruminococcaceae* a été proposée dans la 2^{ème} édition de Bergey's manual of systematic bacteriology, et cette nomenclature a été validée et publiée en mars 2010 par inscription sur la liste de validation 132 (Euzéby, 2011).

Cette famille a été décrite sur la base des analyses phylogénétiques de séquences de gène ARNr 16S, la famille contient le genre type « *Ruminococcus*, *Acetanaerobacterium*, *Acetivibrio*, *Anaerofilum*, *Anaerotruncus*, *Ethanoligenens*, *Faecalibacterium* » (Bergey et David, 2010).

L'espèce *Ruminococcus gnavus* E1 appartient au groupe phylogénétique *Clostridium* coccoides, qui est l'un des plus importants au sein du microbiote Humain. Il représente 25 à 60% du microbiote intestinal et comprend des genres tels que *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Eubacterium* ou encore *Ruminococcus* (Hayashi, 2006).

La souche E1 avait été initialement identifiée d'après ses caractéristiques phénotypiques comme *Peptostreptococcus* sp (Ramare, 1993) mais le séquençage de son ADNr 16S a montré qu'elle appartient en fait à l'espèce *Ruminococcus gnavus*, l'un des composants du cluster phylogénétique *C. coccoides* (Dabard et al., 2001).

2-Taxonomie

Le genre *Ruminococcus* appartient au phylum des firmicutes, classe des Clostridia, ordre des Clostridiales, la famille des *Ruminococcaceae*. Et aussi *Lachnospiraceae*.

Le nom latin de *Ruminococcus* est composé de deux mots : « *rumin* » qui veut dire rumen, et « *coccus* » : coques, donc les coques du rumen, et « *gnavus* », signifie : actif ou occupé (Moore et al., 1976).

3-Caractères morphologiques et culturels

Les cellules de genre *Ruminococcus* sont sous forme de coques, habituellement 0.3-1.5 x 0.7-1.8µm. Les cellules sont en paire ou en chaînette, peu sont mobile avec 1 à 3 flagelles. Ce sont des bactéries Gram positif (Bergey et al., 2010).

La température optimale est entre 37 à 42°C, ce sont des bactéries chimioorganotrophes anaérobie stricte et ont besoin de glucides fermentescibles pour leur croissance (Bergey et al., 2010).

La fermentation des glucides fournit des proportions variées d'acétate, succinate, lactate, et éthanol. Les acides aminés et les peptides ne sont pas fermentés (Bergey et al., 2010).

Les espèces du genre *Ruminococcus* sont isolées du rumen, côlon, ou bien des selles de nombreux animaux et de l'homme, certaines sont isolées à partir d'échantillons cliniques Humains (Bergey et al., 2010). Ces espèces ne produisent pas d'indole (Brayan, 1986), le milieu le plus efficace pour l'isolement et la caractérisation des souches est le liquide agar ruminal.

Certaines souches utilisent de la cellulose dans la gélose ruminale cellobiose (Holdeman et al., 1977), et exigent l'ammoniac comme source d'azote. Ces espèces ont été divisées en deux différents groupes phylogéniques dont la famille de *Lachnospiraceae*, l'espèce type de ce genre : *R.flavifaciens*, appartenant au premier groupe (Bergey et al., 2010).

R.gnavus E1 est une coque fusiforme à Gram positif, anaérobie strict, isolé du microbiote fécal dominant d'un homme sain.

4. Antagonisme de *Ruminococcus gnavus E 1* à l'égard les bactéries pathogènes

Lorsqu'elle est cultivée en milieu liquide supplémenté en trypsine, la souche *R.gnavus E1* est capable de produire une substance anti *Clostridium perfringens* nommé Ruminococcine A (RumA), classé dans le groupe des antibiotiques. Son activité antibactérienne s'exerce

contre deux types de cibles : des bactéries phylogénétiquement proches de l'espèce *R.gnavus* et des *Clostridium sp.* Pathogènes (*C. perfringens*, *C.difficile*, ...) (**Dabard et al ., 2001**).

La Ruminococcine C (RumC) a été définie comme étant la substance antimicrobienne produite *in vivo* et active contre *C.perfringens*. Bien que la souche *R.gnavus E1* soit cultivable, RumC n'est pas produite *in vitro*, en milieu de culture supplémenté ou non en trypsine, mais seulement *in vivo*.

En plus de ces bactériocines, cette souche produit aussi une enzyme codée par le gène *gus* appelée β -glucuronidase, son activité joue un rôle majeur dans la désintoxication (**Beaud et tailliez, 2005**).

Matériel
et
Méthodes

Cette étude a été réalisée durant une période de deux mois, du mois de Mars au mois de Mai de l'année 2013 au niveau du « Laboratoire de la Microbiologie du Lait et Probiotiques » et « l'animalerie » de l'université A/MIRA de Bejaia et au Laboratoire D'analyse Médicale Moualek (Bejaia).

1. La souche bactérienne

1.1. Origine de la souche bactérienne

La souche utilisée pour l'évaluation de la variation du taux de cholestérol total et de ses différentes fractions (HDL et LDL) *in vivo* est *Ruminococcus gnavus E1* fourni par l'Institut de Biologie Moléculaire de Marseille (France) isolée à partir des selles d'un adulte.

1.2. Revivification et vérification de la pureté de *Ruminococcus gnavus E1*

La souche bactérienne utilisée dans cette étude, a été cultivée dans le bouillon BHI-RCY, dans des conditions d'anaérobiose à une température de 37°C.

Plusieurs repiquages sont réalisés dans le BHI-RCY, afin d'activer et d'avoir une croissance maximale à 37° pendant 48 heures.

La pureté de *Ruminococcus gnavus E1* a été vérifiée par la coloration de Gram, observation à l'état frais, catalase et croissance en anaérobiose et aérobiose.

1.3. Culture de *Ruminococcus gnavus E1* dans le lait

L'étude *in vivo*, nécessite l'administration par voie orale, d'une dose journalière de 2 ml du lait entier contenant 10^8 UFC/ml de *Ruminococcus gnavus E1*. La culture de cette souche est réalisée dans un lait entier additionné de rézasurine et de cystéine reparti dans des flacons hermétiquement fermé. Chaque flacon renferme 50 ml de lait préparé, stérilisé à 100 °C pendant 15 min.

2. Lapins

L'étude *in vivo* a nécessité 12 lapins de 30-35 jours et d'un poids variant entre 385 et 740 g. Ils sont issus de 02 portées de race locale *Oryctolagus cuniculus* provenant de la région de Tala Hamza (Bejaia).

Après un séjour d'adaptation de 15 jours, les lapins ont été divisés en lots (les mâles et les femelles sont séparés). Les lapins isolés dans des cages reçoivent tous les jours de l'eau fraîche et du granulé.

2.2. Enceinte d'élevage

Les lapins sont mis dans des cages collectives métalliques grillagées munies par une mangeoire et d'un flacon d'eau. Ces cages sont nettoyées chaque jour. Les lapins sont acclimatés pendant 2 semaines aux conditions de l'animalerie (Université de Bejaia). Ces animaux ont libre accès à la nourriture et à l'eau (**figure 5**).



Figure 05 : Cage des lapins.

2.3. Aliment des lapins

l'aliment est sous forme de granulé « Cérégrand », il est composé de : son de blé, l'orge, Mais, le soja total (protéines végétales), et l'huile de table.

2.4. Répartition des lapins en lots

Dans la présente étude; après sexage des 12 lapins nous avons identifié (9 mâles et 3 femelles), à cause de manque d'effectifs femelles afin de faire une étude statistique nous travailler seulement sur les lapins mâles qui ont été répartis en 03 lots de 3 lapins chacun aussi homogènes que possible en fonction de leurs poids.



Figure 06: Lot des lapins mâles.

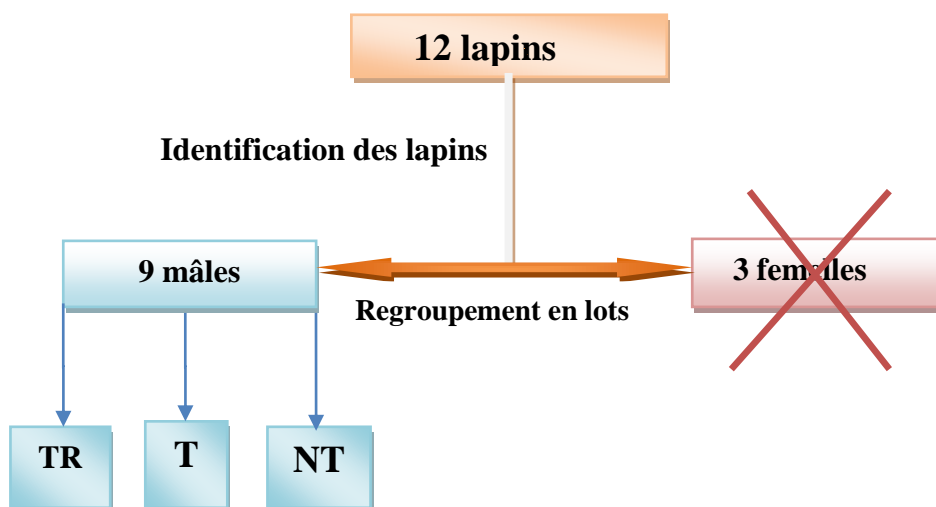


Figure 07: Répartition des lapins en lots

Lot Témoin (T) mâle: reçoit une alimentation normal et équilibrée (granulé, eau).

Lot non traité(NT) mâle: reçoit du lait + jaune d’œuf.

Lot traité (TR) mâle: reçoit lait +jaune d’œuf et administration de *Ruminococcus gnavus* E1.

3. Source de cholestérol

Comme source de cholestérol, nous avons utilisé le lait entier stérile qui contient 12 à 14 mg du cholestérol par 100 ml du lait (Sugino et al, 1986). Le lait préparé est réparti dans des flacons de 50 ml et stérilisé à 100 ° C pendant 15 minutes. Avant son administration aux lapins, il est additionné d’un jaune d’œuf qui contient 1500 mg du cholestérol par 100g (Sugino et al, 1986).

4. Mode de traitement

Après la période d'adaptation, 2 ml du lait additionné de jaune d'œuf a été administrée aux lapins des lots traité et non traité par gavage à l'aide d'une seringue stérile, quotidiennement. Une fois le taux du cholestérol est élevé chez les lapins des lots traité et non traité, la souche *Ruminococcus gnavus* *El a* été administrée aux lapins traités pendant 13 jours. La pesée et le prélèvement du sang sont effectués chaque semaine.

5. Mesure du poids corporel

Le poids corporel des lapins a été pris avant chaque prélèvement du sang avec la balance : ACS-C.



Figure 08: Pesée des lapins avec la balance « ACS-C ».

6. Prélèvements du sang

Le premier prélèvement du sang est effectué après 15 jours d'adaptation avec une incision au niveau de la veine marginale des lapins. Après le début du traitement avec le jaune d'œuf les prélèvements sont réalisés chaque semaine.

Une contention ferme et soigneuse du lapin est indispensable au bon déroulement du prélèvement (afin d'éviter tout traumatisme vertébral).

Le prélèvement du sang à partir de la veine marginale de l'oreille après l'application de l'alcool en utilisant une aiguille de 22G « NIPRO » et le volume obtenu est versé, dans des tubes à héparines; une agitation des est importante pour éviter la coagulation du sang.

La centrifugation a été réalisée à 360 rpm pendant 5 minutes avec une centrifugeuse « Centurion Scientific LTD ».

Le sérum obtenu a servi au dosage des paramètres biologiques (cholestérol total, HDL, LDL et triglycéride) au niveau du Laboratoire d'analyse Médicale Moualek (Bejaia).



Figure 09: Etapes de prélèvement du sang à partir de la veine marginale du lapin.

7. Technique et dosage

7.1 Principe du dosage manuel

Le principe des différents dosages effectués repose sur la technique de la spectrophotométrie. La lecture de l'absorbance contre le blanc pour certains paramètres nous permet de calculer les concentrations des métabolites plasmatiques.

La méthode de dosage des différents paramètres triglycérides, cholestérol total, cholestérol des HDL et des LDL, est une méthode colorimétrique basée sur l'absorption d'un composé coloré chromogène pour une longueur d'onde définie.

La transformation du substrat par un enzyme spécifique est évalué par la coloration du chromogène, la concentration du substrat est calculée par rapport à un étalon.

$$[] \text{ g/l} = R \text{ (Do échantillon - Do blanc) / (Do et - Do b1)}$$

R : [] de l'étalon g/l

Do échantillon : absorbance de l'échantillon

Do blanc : absorbance du blanc

Do et : absorbance de l'étalon

Le dosage des paramètres sériques ont été effectués en double et les concentrations sont exprimées en g/l.

7.2. Echantillons

Le prélèvement se fait sur le sérum ou sur plasma recueilli sur héparinate de lithium qui peuvent être congelés à moins 20°C pendant 3 mois.

Il est conseillé d'éviter le traitement des échantillons hémolysés, contaminés ou ayant subi plus d'une décongélation. Il faut séparer le plus rapidement possible le sérum ou le plasma du culot globulaire (dans les 2 heures qui suivent le prélèvement) par une centrifugeuse (Centurion Scientific LTD) (**figure 11**).



Figure 10 : Centrifugeuse (Centurion Scientific LTD)

7.3. Dosage des paramètres biologiques

7.4.1. Dosage manuel du cholestérol total

Le cholestérol total est dosé par la méthode enzymatique colorimétrique. Les esters du cholestérol sont hydrolysés par une cholestérol- ester- hydrolase en cholestérol libre et en acide gras.

La détermination du cholestérol total par la méthode enzymatique se fait selon les réactions suivantes :

Cholestérol estérifié+H₂O à cholestérol estérase à cholestérol + acides gras

Cholestérol + O₂ à cholesterol oxidase àcholestène-4-one-3 + H₂O₂

2H₂O₂ + phénol + amino-4-antipyrine à peroxydase à quinone + 4H₂O

Phénol + amino-4-antipyrine : chromogène réduit incolore

Quinone : chromogène oxydé coloré en rose.

✚ Réactifs pour le dosage manuel du cholestérol total

- **R1** Cholestérol : « SPINREACT » (référence 1001092) .
- **R2** Cholestérol : « SPINREACT » (référence 1001092).
- **CAL** Cholestérol : « SPINREACT » (référence 1002320).

Les mêmes réactifs ont été utilisés manuellement et automatiquement par une méthode adaptée.

✚ Mode opératoire :

	Blanc réactif	Standard	Echantillon
Solution du travail (µl)	100	100	100
Standard (étalon) (µl)	--	10	--
Echantillon (µl)	--	--	10

Mélanger et lire les densités optiques à une longueur d'onde de 505nm des spécimens après incubation de 5 minutes à 37°C par le spectrophotomètre « LKB UV visible ».

✚ Calcule

La concentration du cholestérol total est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Cholestérol (g/l)} = (\text{DO échantillon} / \text{DO étalon}) \times N$$

N= concentration de l'étalon cholestérol en g/l.

7.4.2 Dosage automatique du cholestérol total et du triglycéride

Après centrifugation et récupération du sérum dans des eppendorf, il est met dans des secteurs du la machine utilisé (Beckman Coulter Synchron CX9 Pro Clinical System).



Figure 11: Beckman Coulter Synchron CX9 Pro

Les résultats sont donnés directement par le logiciel associé à l'appareil.

7.5.1. Dosage manuel du HDL - cholestérol

L'analyse de cette fraction du cholestérol est déterminée par la méthode de **CHOD – PAP**.

Les chylomicrons et les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et de faible densité (LDL) contenus dans l'échantillon sont précipités par addition d'acide phosphotungstique en présence d'ions magnésium. Le surnagent obtenu après centrifugation contient les lipoprotéines de haute densité (HDL) dont le cholestérol.

✚ Réactifs pour le dosage manuel du HDL - Cholestérol

Réactif HDL R1 : Acide phosphotungstique 0,55 mmol/l « RANDOX » (référence CH203).

Précipitant : MgCl₂ 6H₂O 490 Chlorure de magnésium 25 mmol/l.

Mode opératoire

	Blanc réactif	Standard	Echantillon
Solution du travail (µl)	1000	1000	1000
étalon (µl)	100	--	--
Cholestérol 2g/l	--	10	--
Echantillon (µl)	--	--	100

Mélanger et lire les densités optiques (DO) des spécimens par spectrophotomètre « LKB UV visible » à 505 nm après 5 minutes d'incubation à 37°C.

Calcule

$$[\text{HDL - Cholestérol}] = \frac{\text{Do dosage}}{\text{Do étalon}} \times N$$

N = 2 g/l (Concentration de l'étalon cholestérol-HDL en g/l).

7.5.2. Dosage automatique du HDL – cholestérol

Après centrifugation et récupération du sérum dans des tubes marqués met dans des secteurs du la machine utilisé Cobas C111 (ROCHE DIAGNOSTICS).

Les réactifs utilisés pour le dosage automatique

HDL cholestérol : R1 Reagent + SR Reagent (ROCHE DIAGNOSTICS « REF 05401488 »)



Figure 12 : Cobas C111 (ROCHE DIAGNOSTICS).



Figure 13 : Etapes du dosage automatique par Cobas C111 (ROCHE DIAGNOSTICS).

Les résultats sont donnés directement par l'appareil.

7.6.1. Calcule de la concentration du LDL- cholestérol

Le taux de Cholestérol-LDL est calculé par la formule de **Friedenwald** :

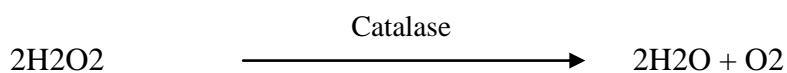
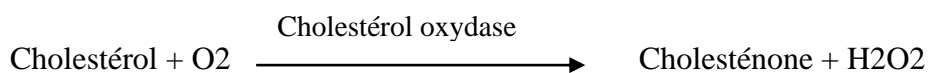
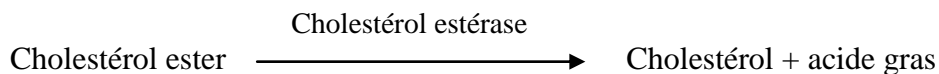
$$\text{Cholesterol-LDL} = \text{Cholesterol total} - (\text{Triglycerides} / 5 _ \text{Cholesterol-HDL})$$

Cette formule n'est applicable que lorsque la concentration de Triglycéride dans le sang ne dépasse pas 3g/l.

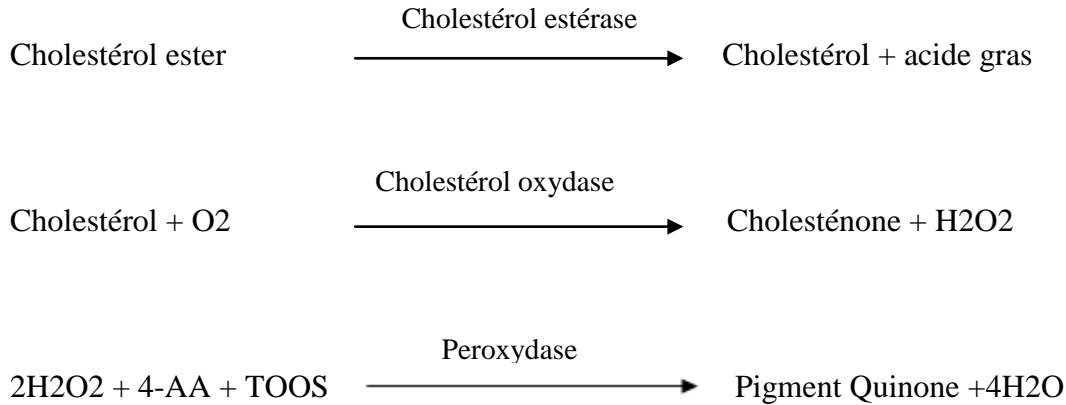
7.6.2. Dosage du LDL –Cholestérol (si Triglycéride > 4 g/l)

Le test est constitué des deux étapes suivantes selon (**Friedewald et al., 1972**):

1. L'élimination du chylomicron, du cholestérol VLDL et du cholestérol LDL par le cholestérol estérase, le cholestérol oxydase et la catalase subséquente.



2. La mesure du cholestérol LDL spécifique après la libération du cholestérol LDL par des détergents dans le Réactif 2.



L'intensité de la coloration quinone imine produite est directement proportionnelle à la concentration en cholestérol mesurée à 505 nm.

Réactifs pour le dosage manuel du LDL - Cholestérol

Réactif A (LDL): cholestérol - LDL precipitating réagent A (BioSystems « REF 11579 »)

Mesurer l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre (LKB UV visible) à une densité de référence de 505 nm.

Calcul de LDL :

$$\text{LDL} = \text{chol} _ N \quad N = 0,158 / 0,500 \times 3$$

8. Etude statistique :

Les résultats obtenus lors de l'expérimentation sont exprimés sous forme de moyenne pour chaque lot.

Pour apprécier la signification des différences entre les résultats des différents lots, nous avons utilisé le test de student qui tient compte à la fois des variations à l'intérieur du groupe et des différences entre ces groupes.

Les résultats des tests sont obtenus par le logiciel XLSTAT Version 2009.

Résultats
et
Discussion

1 .Vérification de la pureté de la souche

Ruminococcus gnavus E1 est une bactérie fusiforme à Gram positif, et le test de catalase est négatif.

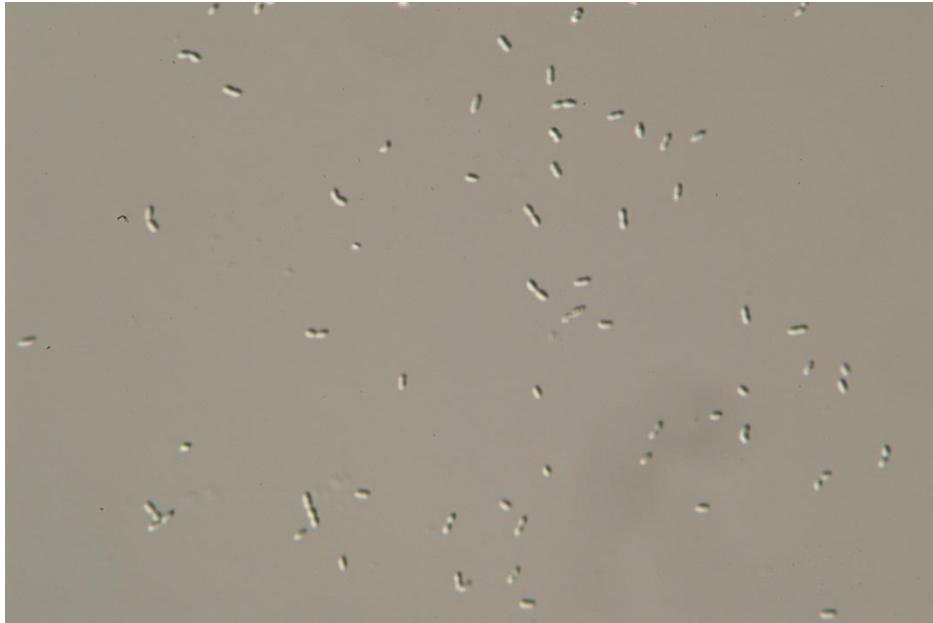


Figure 14 : Observation de *Ruminococcus gnavus E1* sous microscope optique GX40 à l'état frais.

2. Croissance pondérale des lapins

Le suivi du poids corporel moyen des lapins mâles est réalisé pendant 86 jours, les résultats obtenus sont révélés dans la **figure15**.

Lait + jaune d'oeuf

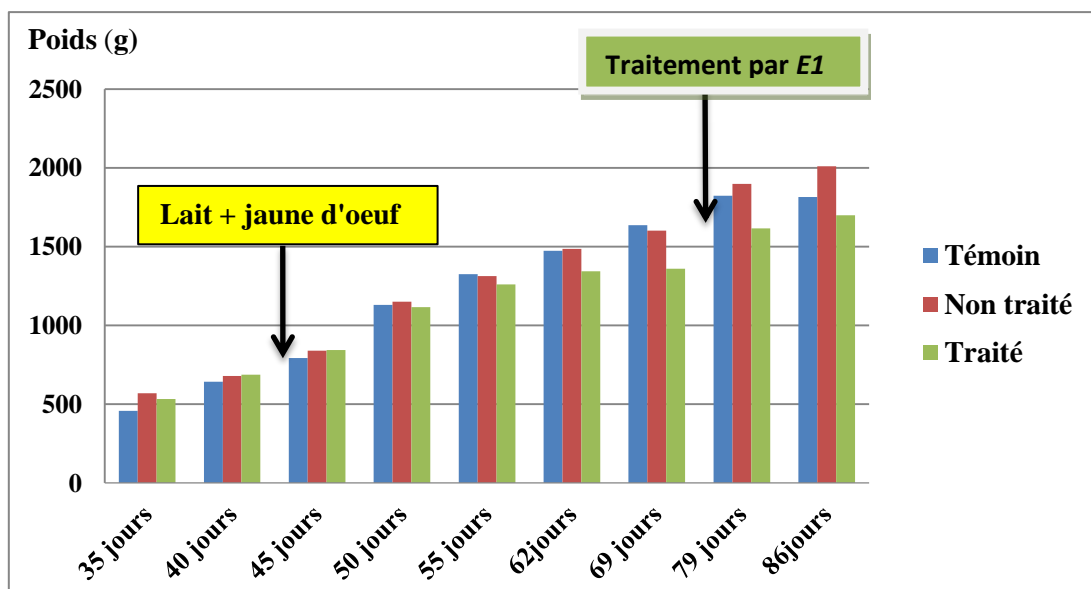


Figure15: Evolution du poids corporel des lapins mâles.

Le gain total moyen du poids des animaux mâles testés représente respectivement pour les lots (témoin, non traité et traité) 1357g, 1167g et 1440g pour des poids initiaux 458g, 533g et 570g.

Après calcul de l'écart type du poids au début de l'expérience pour tous les lots, afin de confirmer l'homogénéité des échantillons dès le départ. D'après le test de Fisher (LSD) qui Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% :

Les différences du poids entre le lot témoin et non traité sont non significatives ($P=0,390$), les différences du poids entre le lot témoin et traité sont non significatives ($P=0,557$), les différences du poids entre le lot traité et non traité sont non significatives ($P=0,771$), donc selon le test de Fisher tous les lots appartient au même groupe A.

Une augmentation progressive du poids corporel pour tous les lots au cours du temps est observée. Cependant pour le lot témoin et traité aux 86^{ème} jours, nous remarquons qu'il y'a pas une grande variabilité du poids, qui est 1815g et 1700 g respectivement.

Bien que pour le lot non traité, le poids s'accroît nettement pour atteindre 2010 g à la fin de l'expérience.

Notons que plus le poids initial est élevé, plus le gain de poids est important.

3. Variation des paramètres biologique des lapins

3.1. Variation du cholestérol total

Le dosage plasmatique du cholestérol total, cholestérol des HDL, cholestérol des LDL et les triglycérides chez les lapins du lot témoin, traité et non traité nous ont permis de constater des variations de concentration au cours de notre étude, les résultats de chaque prélèvement du sang pour tous les lapins mâle sont rapportées dans l'annexe et les concentrations de chaque paramètre dosé pour chaque lots sont représentées dans les figures suivantes.

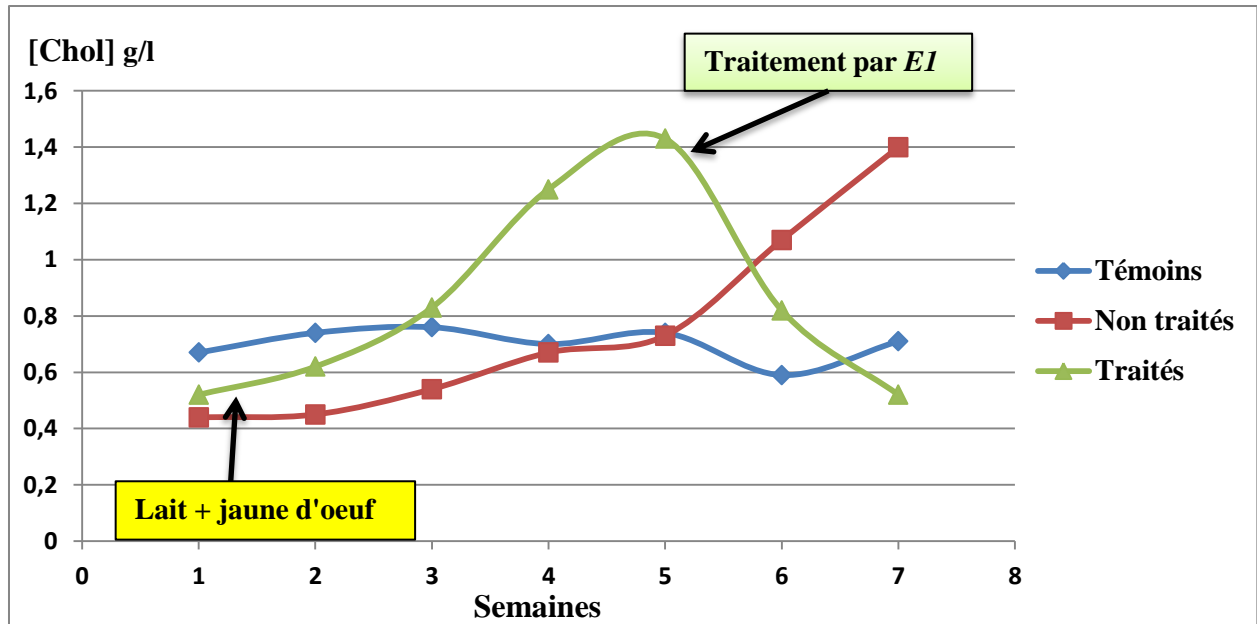


Figure 16 : Evolution du cholestérol total des lapins.

La comparaison des taux du cholestérol total des lapins mâles du lot témoin montre une certaine stabilité durant toute l'expérience.

Par contre chez le lot non traité, une augmentation progressive par rapport au témoin après l'administration du jaune d'œuf additionné au lait entier est observée.

L'étude statistique on se base sur ANOVA suivie du test Fisher (LSD) qui analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% :

Montre qu'au 7^{ème} prélèvement : le test de l'Anova est significatif ($P=0,002$) et le test L.S.D révèle des différences significatives entre le lot témoin et non traité où l'augmentation est plus marquée, aussi une différence significatives ($P=0,001$) entre le lot témoin et traité, mais révèle une différence non significative ($P=0,206$) entre le lot témoin et traité.

Le taux du cholestérol total du lot traité et non traité progresse à partir du 2^{ème} prélèvement c'est-à-dire après administration du jaune d'œuf : le taux pour lot non traité augmente continuellement pour atteindre un taux égale à 1,41 g/l au dernier prélèvement; par contre pour le lot traité, après son augmentation optimal à 1,43 g/l lors du 5^{ème} prélèvement mais après l'administration de *Ruminococcus gnavus* EI une réduction sinificative est marquée au 6^{ème} prélèvement, puis une stabilisation au 7^{ème} prélèvement pour revenir à son taux initial du cholestérol (0,52 g/l).

De nombreuses publications révèlent l'existence d'une relation directe positive statistiquement significative entre la quantité de cholestérol et de graisses saturées dans l'alimentation quotidienne et le taux de cholestérol total plasmatique (**Turpin et Bruckert, 1999**).

Sachant que le jaune d'œuf est une source importante du cholestérol (1500mg/100g) ; Donc nous concluons que l'augmentation de la concentration du cholestérol total après l'administration du jaune d'œuf est dû à l'absorption du cholestérol contenu dans ce dernier par les lapins du lot non traité.

Chez l'homme, même effet a été observé dans les populations de sept pays, plus l'alimentation est riche en cholestérol et graisses saturées, plus le taux de cholestérol plasmatique est élevé (**Keys, 1970**).

La diminution significative et la stabilisation de la concentration du cholestérol observée après l'administration de *Ruminococcus gnavus* E1 serait due à l'effet hypocholestérolémiant de cette dernière.

Rares études, effectuées chez l'animal ou *in vitro*, ont prouvé une réduction significative des taux de cholestérol mais aucune n'a eu lieu *in vivo* chez l'homme.

Les résultats obtenus sont comparable à ceux de (**Taranto et al., 1998**), l'administration de *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 (10^4 /jour) aux souris hypercholestérolémiques pendant 7 jours a diminué la concentration en cholestérol sanguin total de 38%. Cette dernière devenant équivalente à la concentration des souris témoins (67.4 mg/ml)

(**DeSmet et al., 1998**) ont entrepris une expérience chez des porcs hypercholestérolémiques et ont montré une réduction significative des taux de cholestérol dans le sérum après administration d'une préparation de *Lactobacillus reuteri*.

D'autre part (**Pereira et al., 2003**) ont aussi obtenu une réduction significative des taux de cholestérol *in vitro* en présence de *Lactobacillus fermentum*.

3.2. Variation des Triglycérides

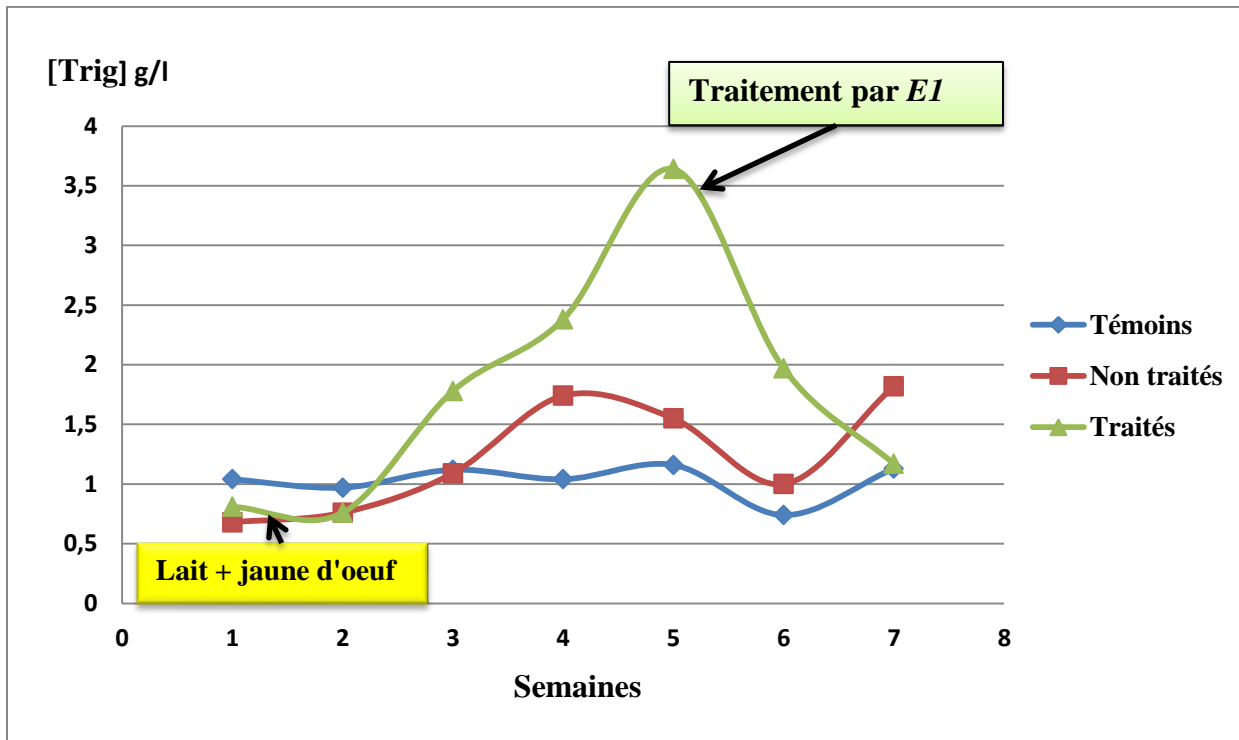


Figure 17: Evolution du triglycéride des lapins.

Les résultats du dosage des triglycérides ne montrent aucune variation notable pour le lot témoin, valeurs comprises entre (1 et 1,17 g/l).

Une augmentation des taux des triglycérides est notée à partir du 2^{ème} prélèvement pour les deux lots, non traité et traité après l'administration du jaune d'œuf, bien que ce dernier au 5^{ème} prélèvement, atteint une concentration maximale de 3,64 g/l. Cette concentration devenant équivalente à la concentration des lapins témoins (1,17g/l) dans la fin du traitement.

Par contre une diminution du 4^{ème} au 6^{ème} prélèvement dans la concentration des triglycérides est remarquée chez le lot non traité qui est pourrait être expliquée par l'état d'engraissement de l'animal et l'alimentation de ce dernier car Les lipides de réserve (lipides neutres) sont principalement les triglycérides, dont les quantités varient considérablement selon la situation anatomique et l'état d'engraissement de l'animal (Mourot et Hermier, 2001).

On remarque d'après les courbes représentées dans les figures 19 et 20 que la concentration du triglycéride varie selon celle du cholestérol total.

3.3. Variation des HDL - cholestérol

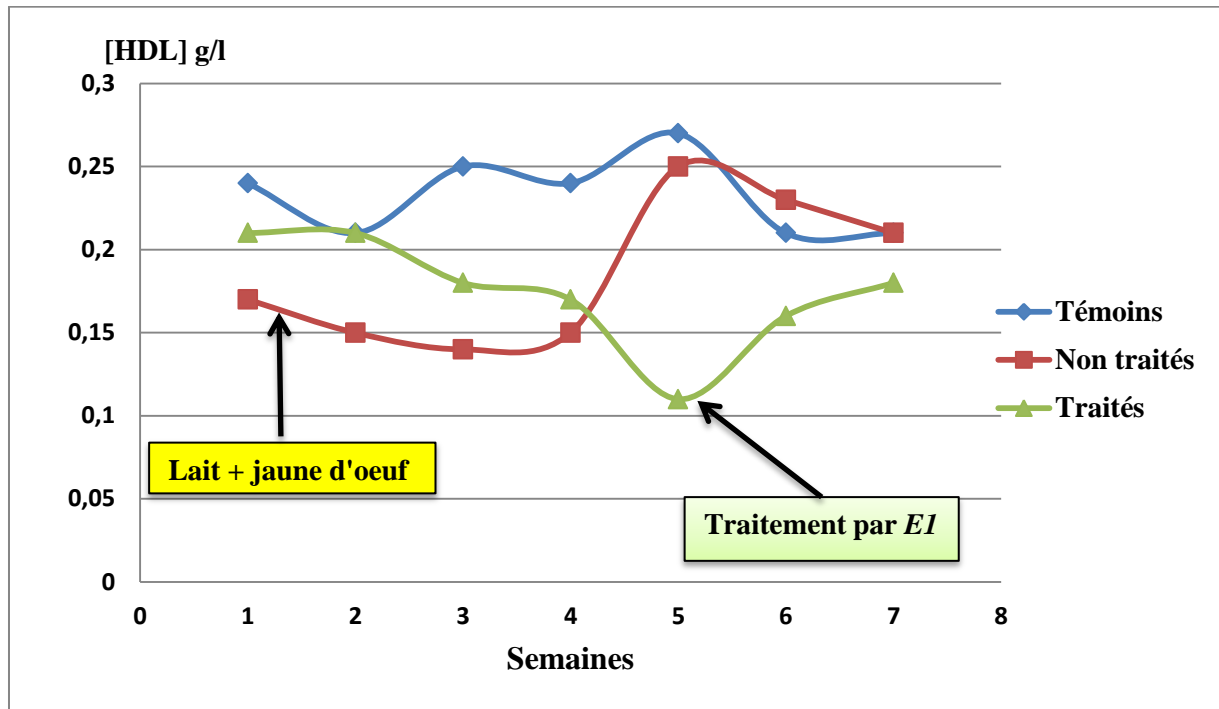


Figure 18 : Evolution du HDL - cholestérol des lapins.

D'après les résultats du dosage des HDL - cholestérol nous observons une certaine variabilité dans les valeurs obtenues pour le lot témoin. Alors que pour le lot traité on note une baisse variable de la concentration des HDL-cholestérol du 1^{er} prélèvement au 5^{eme} prélèvement (0,11 et 0,21 g/l), après administration du *Ruminococcus gnavus EI* une augmentation assez importante est remarquée pour atteindre 0,18 (g/l) au dernier prélèvement.

Également il y'a une diminution marquée du taux de HDL-cholestérol pour le lot non traité après le 1^{er} prélèvement mais une augmentation brusque pour atteindre une concentration de 0,25 g/l est observée entre le 4^{eme} et le 5^{eme} prélèvement, après ce dernier le taux du HDL reprend sa diminution ; cette augmentation est peut-être due au poids.

Dans une méta-analyse, il a été mis en évidence que les sujets perdant activement du poids présentent une diminution des taux de HDL-cholestérol mais lorsque leur poids est

stabilisé, on observe une augmentation de la concentration plasmatique en HDL-cholestérol de 0.009 mmol/L pour chaque kilogramme perdu (Dattilo et Kris-Etherton, 1992).

3.4. Variation de LDL - cholestérol total

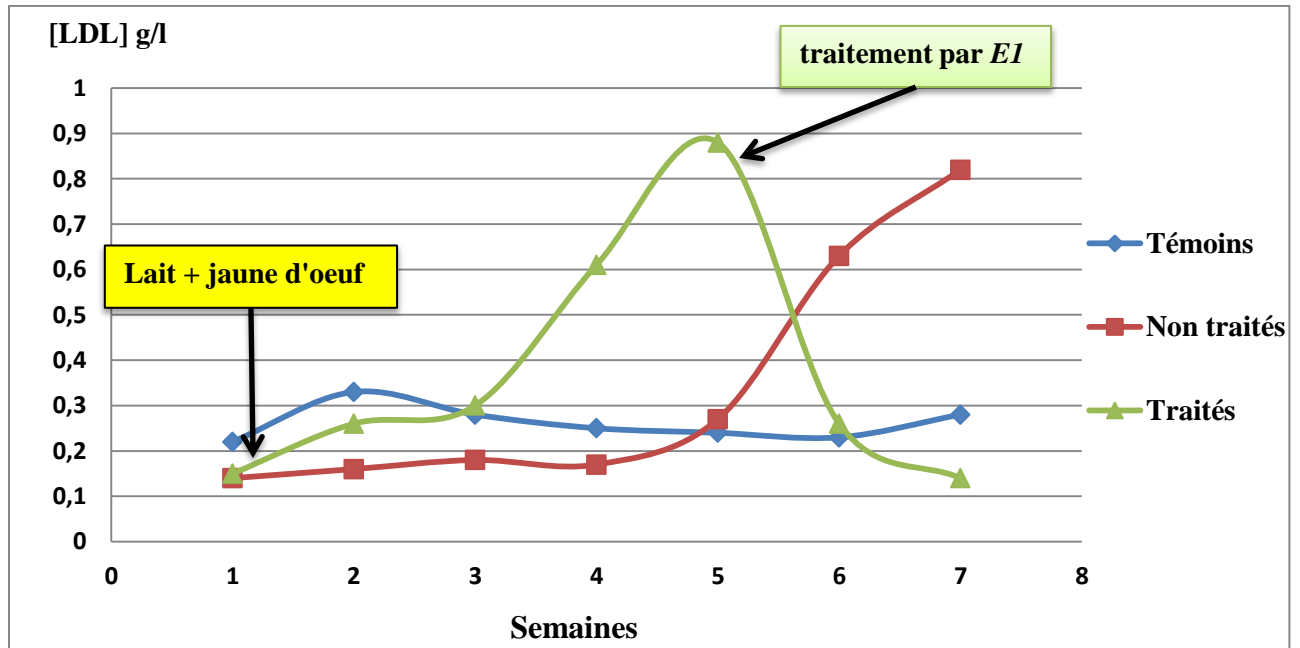


Figure 19 : Evolution du LDL - cholestérol des lapins.

D'après les résultats de dosage du cholestérol - LDL nous notons une légère augmentation suivie d'une stabilité remarquable du lot témoin au cours des autres prélèvements les valeurs de dosages sont comprises entre (0,22 et 0,33 g/l).

Une augmentation du taux du LDL est constaté au début de l'expérience (entre le 1^{er} et 3^{ème} prélèvement) pour le lot traité suivi d'une importante augmentation (3^{ème} prélèvement) pour atteindre sa valeur optimal (0,88g/l) au bout du 5^{ème} prélèvement, cette concentration diminue brusquement pour atteindre à la fin sa valeur initial de 0,14g/l.

Alors qu'une faible augmentation du taux du LDL est constatée au début de l'expérience (1^{er} et 4^{ème}) prélèvement pour le lot non traité suivi d'une importante augmentation à partir du 5^{ème} prélèvement pour atteindre sa valeur optimal (0,82g/l) au bout du 7^{ème} prélèvement.

Conclusion

Conclusion

Une administration continue d'une concentration de 10^8 UFC de la souche bactérienne *Ruminococcus gnavus EI* additionné au lait entier à des lapins mâles et femelles en croissance, nourri par une alimentation riche en cholestérol (jaune d'œuf), entraîne une diminution de la cholestérolémie associée à celle du cholestérol des LDL et des triglycérides et une augmentation du HDL qui est considéré comme le bon cholestérol.

Cependant la variation de certaines valeurs dépend de multiples facteurs : état physiologique du lapin et à sa flore intestinale, exerce une action indirecte en modifiant le métabolisme du cholestérol et les sels biliaires car les lipides servent comme substrat aux autres bactéries intestinal.

Malgré les insuffisances qualitatives et quantitatives de ce premier travail on peut affirmer que les modèles expérimentaux utilisant des animaux sont indispensables pour faire progresser et d'améliorer nos connaissances.

En perspectives, notre étude est préliminaire du fait que cette dernière ne permet pas encore de confirmer à ce stade, l'effet hypocholestérolémiant de *Ruminococcus gnavus EI*. Pour cela, une augmentation du nombre d'effectifs du modèle animale et prolongement de la durée du traitement pourra apporter des résultats plus précis.

L'utilisation d'autres modèles animales pourra aussi affirmer cet effet hypochléstérolimiant.

Ces résultats montrent que *Ruminococcus gnavus EI*, serait un grand intérêt Médicale dans l'avenir, et ouvrent la voie sur la possibilité d'utiliser *Ruminococcus gnavus EI* pour le traitement des maladies associées à l'hypercholestérolémie et de diminuer les atteintes par accidents cardiovasculaire.

Références
Bibliographiques

- Beaud D, Tailliez P. (2005). Genetic characterization of the β -glucuronidase enzyme from a human intestinal bacterium *Ruminococcus gnavus* Microbiology . Anba – Mondoloni J. 2323-2330.
- Bergey DH, David R. (2010) . Bergey's manual of systematic bacteriology. **3**.
- Brayan T. (1986). in Bergey DH , David R. (2010). Bergey's manual of systematic bacteriology. **3**.
- Brendel C, C J Fruchart, Auwerx J et Schoonjans K. (1998). Régulation transcriptionnelle du métabolisme du cholestérol. Médecine Sciences .**15**, 56-62.
- Cobbold CA, Sherratt JA et Maxwell SRJ. (2002). Lipoprotein Oxidation and its Significance for Atherosclerosis: a Mathematical Approach. Bulletin of Mathematical Biology. **64**: 65-95.
- Dabard J, Bridonneau C et Philippe C . (2001). Ruminococcin A , a new antibiotic produced by *ruminococcus gnavus* strain isolated from human feces . American society for Microbiology . **67** ,4111- 4118.
- Dacosta Y. (2002). Nutrition et athérosclérose: le point actuel sur un sujet complexe et de plus en plus controversé .Edition : Lavoisier Paris. 334p.
- Dennis L, Sprecher et Stevens M. (2003). Triglycerides and HDL-cholesterol in pediatric patients. Progress in Pediatric Cardiology. **17**, 151–158.
- DeSmet I, DeBoever Pet Verstraete W. (1998). Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. Br J Nutr. **79** , 185-94.
- Ezuzaby J P. (2011). Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. [http:// :WWW ;bacdico.net](http://WWW.bacdico.net).
- Feltgen K. (1993). Le Cholestérol : 1758-1913. Essai historique sur l'intérêt qu'il a suscité en médecine depuis sa découverte au milieu du XVIIIe jusqu'à l'aube du XXe siècle. Edition : De-Boeck. Rouen. 436P.

Friedewald WT, Levy RI et Fredrickson DS.(1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *ClinChem* .**18**, 499-502.

Gibson GR et Rastall A. (2004).When we eat, which bacteria should we be feeding. *ASM News*. **70**, 224-231.

Gilliland SE. (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*.**87**, 175-188.

Gimpl G et Katja G B. (2011). Probes for studying cholesterol binding and cell biology.*Steroids*.**76**, 216-231.

Gropper SS, Smith JL et Groff JL. (2005) .Advanced Nutrition and Human Metabolism.Edition: 4th Wadsworth, Thomson Learning.United States of America.608 p.

Havel RJ. (1987). Lipid transport function of lipoproteins in blood plasma.*Am J Physiol*. 253: EI-E5.

Hayashi. (2006). La ruminococcine C, caractérisation génétique. *Ange pujol*.**1**,156-159.

Hobbs H, Brown MS, Russell DW, et Goldstein JL. (1987). Deletion in the gene for the low-density-lipoprotein receptor in a majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* .**317**: 734-737.

Holdeman et al .(1977). In: Bergey D H, David R. (2010).Bergey's manual of systematic Bacteriology .International journal of systematic bacteriology . **3**, 238-252.

Idris I et Al-Ubaidi F. (2010). Discordance between non-HDL cholesterol and LDL cholesterol levels in patients with diabetes without previous cardiovascular events . *Diabetes and Metabolism* .**36**, 299–304.

Jactot B. (1990). Définir, dépister, prévenir .Colloque International/cholestérol et prévention primaire .23-24 Février ,153-154.

Keys A. (1970). Coronary heart disease in seven contries.Circulation. **52** Suppl 1:186-198.

Leitersdorf E, Tobin EJ, Davignon J, et Hobbs H. (1990). Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population. *J Clin Invest.* **85**, 1014-1023.

Luc G, Lecerf JM , Bard JM , Hachulla E , Fruchart JC et Devulder B.(1991). Cholesterol and atherosclerosis.**96**, 33-42.

Moore WC, Jonson J et Holdemanl V. (1976).Emendation of Bacteroidaceae and Butyrivibrio and description of desulfomonas gen .

Morozova S, Suc-Royer I et Auwerx J. (2004). Modulateurs du métabolisme du cholestérol et avenir du traitement. *Medicine/Sciences de l'athérosclérose.* **20**, 685-690.

Mourot J et Hermier D. (2001).Lipids in monogastric animal meat. *Reprod Nutr Dev.* **41**, 109-118.

Pereira DI, Cartney A.L et Gibson GR. (2003).An *in vitro* study of the probiotic potential of a bile-salt hydrolysing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol lowering properties. *Appl Environ Microbiol.* **69**, 4743-4752.

Philippe F. (2003). Intérêts et place du traitement hypolipémiant en prévention cardiovasculaire chez le sujet âgé. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie.* **52**, 246–253.

Raisonnier A. (2003).Lipides et lipoprotéines. *Faculté de Medecine.* 40-42.

Ramare et al (1993). La ruminococcine C, caractérisation génétique . *Ange pujol.***1** ,156 p.

Rawn LD. (1990). *Traité de Biochemie.* Edition : De Boeck-Weasmael. Bruxel.1146 p.

Repa JJ et Mangelsdorf DJ. (2000). The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **16**, 459-481.

Resta SC. (2009). Effects of probiotics and commensales on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling. *J Physiol.* **587**:4169-4174

Rog T, Pasenkiewicz-Gierula M, Vattulainen I et Karttunen M. (2009). Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochim Biophys Acta* 1788(1):97-121.

Simard J, Moorjani S, Vohl MC, Couture P, Torres AL, Gagné C, et Lupien PJ. (1994). Detection of a novel mutation (stop 468) in exon 10 of the low-density lipoprotein receptor gene causing familial hypercholesterolemia among French Canadians. *Human molecular genetics.* **3**, 1689-1691.

Sugino K, Murakami G and Musushita S. (1986). HPLC – Method for quantification of cholesterol epoxides in spray-dried egg. *Agric food chem.* **34**, 36-39.

Suty AC. (1994). Cholestérol et phytothérapie: mythe ou réalité. Etudes de deux plantes: le guggul et la luzerne. *Th Pharm Nancy* **1** .**43**, 114 P.

Turpin G et Bruckert E. (1999). *Hypercholestérolémie*. Edition : Masson. Paris. 99p.

Matthan NR, Pencina M, LaRocque JM et al. (2009). Alterations in cholesterol absorption/synthesis markers characterize Framingham offspring study participants with CHD. *J Lipid Res.* **50**, 1927-1935.

Whitney EJ, Krasuski RA, et Personius BE. (2005). A randomized trial of a strategy for increasing high-density lipoprotein cholesterol levels: effects on progression of coronary heart disease and clinical events. *Ann Intern Med.* **142**, 95–104.

Glossaire

Amphiphile : terme qualifiant les molécules qui ont une partie hydrophobe et une autre partie hydrophile.

Athérogène : une substance qui produit l'athérome.

Entérocyte : est une cellule de l'épithélium de la muqueuse intestinale.

Eroxysome : est une organelle cytoplasmique entourée d'une membrane et renfermant des enzymes (oxydases, catalase, etc.).

Estérifier : transformer en ester, en un corps résultant de l'action d'un acide sur un alcool avec élimination d'eau.

Acide glycolique : est un acide provenant de l'oxydation du glycol.

Leucine : est un acide aminé qui se forme lors de la putréfaction des matières protéiques.

Mévalonate : est l'unité métabolique précurseur des terpènes, utile lors de la biosynthèse des caroténoïdes.

Micelle : est une particule en suspension dans une solution colloïde, composée d'un agrégat de molécules.

Phylogénitique : qui concerne la phylogénèse, science étudiant la formation et le développement des espèces animales et végétales.

Jéjunum : est la partie de l'intestin grêle entre le duodénum et l'iléon.

Annexes

Annexe I

BHIB (bouillon)

❖ Extrait du cœur du cerveau.....	17, 5g
❖ Peptone.....	10g
❖ Glucose.....	2g
❖ Chlorure de sodium.....	5g
❖ Disodium.....	2,5g

PH 7,4 (+/- 0,2)

BHIB réduit (bouillon)

❖ BHIB.....	37g
❖ Cystéine.....	0,5g
❖ Résazurine.....	0, 04g

BHIB – cystéine ou réduit

❖ BHIB.....	37g
❖ Extrait de levure.....	05g
❖ Cystéine.....	0,5g
❖ Résazurine.....	0,04g

Annexe II

Tableau I : Représentation du poids corporel (gramme) des lapins.

Lot âge	Lapin	35 jours	40 jours	45 jours	50 jours	55 jours	62 jours	69 jours	79 jours	86 jours
Témoin	01	610	795	910	1230	1450	1515	1650	1740	1710
	02	385	655	850	1225	1485	1675	1860	2100	2075
	03	380	475	620	935	1040	1230	1400	1630	1660
	MOY	458	642	793	1130	1325	1473	1637	1823	1815
Non traité	01	735	880	1050	1425	1655	1855	1960	2290	2370
	02	575	700	860	845	975	1115	1230	1610	1790
	03	400	460	610	1180	1310	1490	1615	1795	1870
	MOY	570	680	840	1150	1313	1487	1602	1898	2010
Traité	01	560	705	875	1110	1315	1265	1175	1480	1565
	02	660	870	1005	1325	1415	1510	1630	1780	1840
	03	380	485	650	915	1050	1255	1275	1590	1695
	MOY	533	687	843	111	1260	1343	1360	1617	1700

Tableau II : Résultats du premier dosage des paramètres biologiques.

Lot	Lapin	CHOL 1	TRIG 1	HDL 1	LDL 1
Témoins	01	0,65	0,89	0,26	0,22
	02	0,69	1,04	0,24	0,24
	03	0,67	1,2	0,22	0,21
	MOY	0,67	1,04	0,24	0,22
Non traités	01	0,43	0,65	0,18	0,12
	02	0,5	0,76	0,16	0,18
	03	0,4	0,63	0,16	0,11
	MOY	0,44	0,68	0,17	0,14
Traités	01	0,52	0,82	0,24	0,12
	02	0,5	0,78	0,19	0,15
	03	0,54	0,84	0,2	0,17
	MOY	0,52	0,81	0,21	0,15

Tableau III: Résultats du deuxième dosage des paramètres biologiques.

Lot	Lapin	CHOL 2	TRIG 2	HDL 2	LDL 2
Témoins	01	0,76	0,99	0,21	0,35
	02	0,75	0,97	0,2	0,36
	03	0,7	0,96	0,23	0,28
	MOY	0,74	0,97	0,21	0,33
Non traités	01	0,42	0,61	0,16	0,14
	02	0,54	1	0,14	0,2
	03	0,41	0,68	0,12	0,15
	MOY	0,45	0,76	0,14	0,16
Traités	01	0,63	0,82	0,17	0,3
	02	0,59	0,76	0,16	0,28
	03	0,64	0,71	0,3	0,2
	MOY	0,62	0,76	0,21	0,26

Tableau IV : Résultats du troisième dosage des paramètres biologiques.

Lot	Lapin	CHOL 3	TRIG 3	HDL 3	LDL 3
Témoins	01	0,73	1,25	0,2	0,28
	02	0,77	1,02	0,29	0,28
	03	0,78	1,1	0,27	0,29
	MOY	0,76	1,12	0,25	0,28
Non traités	01	0,51	1,05	0,16	0,14
	02	0,67	1,14	0,15	0,29
	03	0,45	1,08	0,11	0,12
	MOY	0,54	1,09	0,14	0,18
Traités	01	0,69	1,3	0,19	0,24
	02	0,91	1,47	0,29	0,33
	03	0,89	2,58	0,05	0,32
	MOY	0,83	1,78	0,18	0,3

Tableau V: Résultats du quatrième dosage des paramètres biologiques.

Lot	Lapin	CHOL 4	TRIG 4	HDL 4	LDL 4
Témoins	01	0,65	0,71	0,26	0,25
	02	0,7	1,19	0,22	0,25
	03	0,74	1,23	0,24	0,25
	MOY	0,7	1,04	0,24	0,25
Non traités	01	0,55	1,16	0,19	0,13
	02	0,88	2,26	0,17	0,26
	03	0,57	1,81	0,09	0,12
	MOY	0,67	1,74	0,15	0,17
Traités	01	1,22	1,35	0,25	0,7
	02	1,04	2,07	0,2	0,43
	03	1,49	3,73	0,05	0,69
	MOY	1,25	2,38	0,17	0,61

Tableau VI : Résultats du cinquième dosage des paramètres biologiques.

Lot	Lapin	CHOL 5	TRIG 5	HDL 5	LDL 5
Témoins	01	0,67	1,21	0,25	0,18
	02	0,75	0,94	0,28	0,28
	03	0,8	1,34	0,28	0,25
	MOY	0,74	1,16	0,27	0,24
Non traités	01	0,65	0,95	0,32	0,14
	02	0,9	1,44	0,2	0,41
	03	0,65	2,26	0,24	0,26
	MOY	0,73	1,55	0,25	0,27
Traités	01	1,31	4,43	0,04	0,81
	02	1,47	1,69	0,18	0,95
	03	1,52	4,79	0,11	0,88
	MOY	1,43	3,64	0,11	0,88

Tableau VII : Résultats du sixième dosage des paramètres biologiques.

Lot	Lapin	CHOL 6	TRIG 6	HDL 6	LDL 6
Témoins	01	0,55	0,59	0,21	0,22
	02	0,6	0,81	0,21	0,23
	03	0,61	0,82	0,22	0,23
	MOY	0,59	0,74	0,21	0,23
Non traités	01	1,23	0,79	0,25	0,82
	02	1,04	1,66	0,15	0,56
	03	0,93	0,56	0,3	0,52
	MOY	1,07	1	0,23	0,63
Traités	01	0,77	2,1	0,18	0,17
	02	0,77	1,26	0,18	0,34
	03	0,91	2,56	0,12	0,28
	MOY	0,82	1,97	0,16	0,26

Tableau VIII: Résultats du septième dosage des paramètres biologiques.

Lot	Lapin	CHOL 7	TRIG 7	HDL 7	LDL 7
Témoins	01	0,72	1,27	0,21	0,25
	02	0,66	1,02	0,18	0,28
	03	0,75	1,11	0,23	0,3
	MOY	0,71	1,13	0,21	0,28
Non traités	01	1,56	2,49	0,11	0,95
	02	1,23	1,94	0,2	0,64
	03	1,4	1,04	0,32	0,87
	MOY	1,4	1,82	0,21	0,82
Traités	01	0,31	0,46	0,2	0,02
	02	0,51	1,1	0,15	0,14
	03	0,75	1,95	0,19	0,26
	MOY	0,52	1.17	0.18	0,14

Résumé

L'administration d'une alimentation riche en cholestérol cause son augmentation dans le sang, chez les lapins. Le cholestérol est un élément vital pour la survie cellulaire mais un taux élevé dans le plasma est souvent associé à l'apparition de maladies cardiovasculaires.

L'étude réalisée sur 09 lapins réparti en lots, lot témoin nourri avec une alimentation modérée, lot non traité ; avec une alimentation supplémentée de jaune d'œuf et un lot traité recevant une alimentation supplémenté de jaune d'œuf et de *Ruminococcus gnavus E1*. Les niveaux sériques du cholestérol, HDL, LDL et triglycérides ont été évalués. Les résultats enregistrés montrent que la concentration du cholestérol chez le lot traité diminue lors de l'administration de *Ruminococcus gnavus E1*. Une diminution du taux de LDL a également été observée. Cependant, aucune différence dans taux du cholestérol du lot témoin n'a été retrouvée. En conclusion, *Ruminococcus gnavus E1*: 1) entraîne une diminution du taux de cholestérol total, 2) influence sur le taux de HDL, 4) diminue le taux de LDL et 5) influence aussi sur le taux des triglycérides.

Mots clés: cholestérol, hypercholestérolémie, lapin, *Ruminococcus gnavus E1*.

Summary

The administration of a diet rich in cholesterol cause its increase in blood in rabbits. Cholesterol is vital for cell survival but a high plasma level is often associated with the development of cardiovascular disease.

The study of 12 rabbits divided into lots, lot fed control diet with a moderate, non-treated plot, with a diet supplemented with egg yolk and a lot treated receiving a diet supplemented with egg yolk and *Ruminococcus gnavus E1*. Serum levels of cholesterol, HDL, LDL and triglycerides were assessed. The recorded results show that the concentration of cholesterol in the treated group decreased during the administration of *Ruminococcus gnavus E1*. A decrease in LDL was also observed. However, no difference in cholesterol levels from the control group was found. In conclusion, *Ruminococcus gnavus E1*: 1) causes a decrease in total cholesterol, 2) influence on HDL, 4) decreases LDL and 5) also affect the triglyceride levels.

Keywords: cholesterol, rabbit, hypercholestérolémie, *Ruminococcus gnavus E1*.