



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret–
Faculté Sciences de la Nature et de la Vie
Département Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Toxicologie et Sécurité Alimentaire

Présenté par :

-Mlle ABDALI Rachida

- Mlle BELHADJ Manel

Thème

Etude in vitro et in vivo des effets secondaires et de la toxicité d'un anti-inflammatoire sur des rats Wistar

Soutenu le : **01-07-2021**

Les membres de jury

Grade

Président	Mme MEDJBER Nacira	« MCB »	Université IBN Khaldoun
Encadrant	Mme ABDELMALEK Ilham	« MCB »	Université IBN Khaldoun
Co-encadrant	Mr YEZLI Wassim	« MCA »	Université IBN Khaldoun
Examinatrice	Mme BENNABI Lamia	« MCB »	Université IBN Khaldoun

Année universitaire 2020-2021

REMERCIEMENT

Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a données la santé, le courage, la volanté et la patience pour réaliser ce travail.

C'est avec un grand plaisir que nous adressons nos sincères remerciements à notre encadrante *M^{me} ABDELMALEK Ilham* pour avoir accepté de diriger ce travail. Son soutien, ces compétences, sa clairvoyance, et la qualité de son encadrement nous a été d'une aide inestimable.

Par ailleurs on remercie notre enseignant et co-promoteur *M^r YEZLI Wassim* pour son aide.

Nous tenons à remercier sincèrement les membres de jury *M^{me} L. BENNABI* et *M^{me} N. MEDJBAR* qui nous fait le grand honneur d'évaluer notre travail.

Un merci spécial à *M^{me} BOUTELDJA Rachida* pour sa disponibilité, son aide précieuse et ses valeureux conseils.

Nous tenons à remercier *M^r H. AGGAD*, Responsable de Laboratoire Reproduction des Animaux de la Ferme « Université Ibn Khaldoun -Tiaret » pour nous avoir accueillis dans son laboratoire. Ainsi que toute l'équipe du Laboratoire pour leur présence et leur gentillesse au quotidien.

Nos profond respect et gratitude s'exprime à *M^r ABDALI Mustapha* et *M^r DOUCENE Radouane* pour leur disponibilité, leurs conseils, et leur aide précieuse.

Un grand merci pour toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

*Je remercie Dieu tout puissant de m' avoir
aidé pour achever ce modeste travail que je
dédie :*

*À mes chers parents, pour tous les sacrifices
qu' ils ont consentis pour me voir réussir,
pour leur patience, leur amour, leur soutien
et leurs encouragements.*

Que ce travail leur apporte joie et fierté.

A ma unique sœur Bouchra

A mon unique frère Schahib

*A mon oncle Mustapha pour son aide
précieuse et qualitative*

A ma chère binôme Manel

Je dédie ce diplôme

À Mon père BELHADJ Mohammed

Depuis ma tendre enfance, vous êtes mon plus fort repère

Un être unique et magnifique, le meilleur des pères

Quand je pense à toi, les pleures montent avec les souvenirs

Merci pour ce que tu a été pour moi, un chemin de sérénité

*Merci à vous Grand homme, le bonheur dans ma vie vous semé ce poème
d'hommage écrit pour vous est une tendresse*

Merci pour tout mon papa je t'aime d'un amour éternel

Merci papa, aujourd'hui je marche sur tes pas de miel.

À MÈRE MÈRE

*Qui j'aime cessé de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et
de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs*

À mes chères sœurs HOUDA, CHAHDA

À mes frères ALI, AKRAM, OUSSAMA, WAHBI

*Pour ses soutiens moral et leurs conseils précieux tout au long de mes
études. À mes chères amies pour leurs aides et supports dans les moments
difficiles.*

À tout ma famille

*À ma chère binôme ABDALI RACHIDA pour sa entant et sa
sympathie*

À tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

Liste des abréviations

Liste des abréviations

- **AINS** : Anti Inflammatoire non Stéroïdien
- **AIS** : Anti Inflammatoire Stéroïdien
- **API** : Appareillage et Procédé d'Identification
- **ADH** : Arginine-Dihydrolase
- **BEA** : Bile-Esculine-Azide
- **COX-1** : cyclo-oxygénase
- **COX-2** : cyclo-oxygenase
- ***E. faecalis*** : *Enterococcus faecalis*
- ***E. coli*** : *Escherichia coli*
- **FTIR** : Spectroscopie infrarouge à transformier de Fourier
- **GI** : gastro-Intestinal
- **GRD₁** : Groupe Rats Dose 1
- **GRD₂** : Groupe Rats Dose 2
- **GRP** : Groupe Rats Pommade
- **GRT⁺** : Groupe Rats Témoin Positif
- **GRT⁻** : Groupe Rats Témoin négatif
- **H₂S** : thiosulfate
- **H₂O₂** : peroxyde d'hydrogène
- **LDC** : Lysine-décarboxylase
- **LPS**: lipopolysaccharides
- **MEB**: microscope électronique à balayage
- **MRS**: Man, Rogoza et Sharpe
- **MII** : maladie inflammatoire de l'intestin
- **ONPG** : O-nitrophénol-β-D-galactopyranoside
- **ODC** : Ornithine-decarboxylase
- **PG** : prostaglandines
- **pH** : potentiel d'hydrogène
- **SEM** : standard erreur moyenne
- **TSC** : Tryptone-Sulfite-Cyclosérine
- **TSI** : Triple Sugar Iron.

Liste des abréviations

- **TDA** : tryptophane désaminase
- **VP** : vogue proskauer
- **VF** : Viande-foie
- **UFC** : Unité formant colonie

Liste des Figures

N°	Légende	page
Figure I.1.	Répartition schématique de la flore microbienne dans les divers compartiments du tube digestif chez l'homme et le rat (Ducluzeau et Raibaud, 1989).	4
Figure I.2.	Présentation d'une inflammation (Charpentier, 2008).	6
Figure I.3.	Mode d'action des ANIS.	9
Figure II.1	présentation des formes galénique « microsphères » préparées chargées de diclofenac.	13
Figure II.2.	Protocole Expérimentale	15
Figure II.3.	Rat Wistar.	16
Figure II.4.	Protocole expérimentale (a : Induction de l'inflammation, b : Prise du médicament par voie orale, c : Mesure du diamètre de la patte, d : Autopsie des rates).	17
Figure II.5.	(A) : Ensemencement de suspension sur la gélose. (B) : Etalement de la suspension sur la surface.	18
Figure II.6.	Ensemencement en profondeur, (B) : Dessiccateur.	20
Figure III.1	Histogramme d'AUG% de différents groupes.	26
Figure III.2	Evolution des diamètres des pattes en fonction du temps	27
Figure III.3	les photos prises lors de l'autopsie.	28
Figure III.4	Résultat de l'identification dans la galerie Api 20E	30
Figure III.5	Dénombrement des bactéries à Gram négatif « <i>E.coli</i> ».	32
Figure III.6	Dénombrement d' <i>Enterococcus sp.</i>	33
Figure III.7	Dénombrement de <i>Lactobacillus spp</i>	34
Figure III.8	Dénombrement de <i>Clostridium spp</i>	35

Liste des tableaux

N°	Légende	page
TableauI.1.	Matériels et produits utilisés au cours de l'étude	14
TableauIII.1.	Caractères macroscopique, microscopique et biochimique des germes isolés de la matière fécale « + : test positif - : test négatif ».	31

Liste des annexes

Annexe I	Analyses microbiologique
Annexe II	Composition des milieux de culture

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction Générale.....	1
----------------------------	---

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Introduction	3
I.2. La barrière intestinale.....	3
I.2.1. Présentation générale de l'appareil digestif	3
I.2.2. Le microbiote intestinal	3
I.2.3. Fonction du microbiote intestinal	4
I.2.4. Les principaux facteurs influençant la composition et la fonction du microbiote intestinal	5
I.3. Généralité sur les anti-inflammatoire	5
I.3.1. L'inflammation	5
I.3.2. Les anti-inflammatoires	6
I.3.3. Classification des anti-inflammatoires	6
I.3.4. les effets indésirables des AINS	10
I.3.5. Le diclofénac.....	11

Chapitre II : Partie Expérimentale

II.1 INTRODUCTION.....	13
II.2. MODE OPERATOIRE.....	14
II.2.1. Lieu de travail	14
II.2.2. Matériels et produits utilisés	14
II.2.3. Le protocole expérimentale	15
II.2.4. L'activité antiinflammatoire	16
II.2.5. Recherche et dénombrement de quelques bactéries intestinales	17
II.2.5.1. Préparation de la suspension bactérienne.....	17
II.2.5.2. Recherche et dénombrement de quelques bactéries intestinales à Gram négatif	18
II.2.5.3. Recherche et dénombrement de quelques bactéries à Gram positive	19
II.2.6. Détermination des Caractéristiques de souches obtenues	20
II.2.6.1. Caractères morphologiques	20
II.2.6.1.1. Examen macroscopique	20

Sommaire

II.2.6.1.2.Examen microscopique	20
II.2.6.1.3.Identification biochimique	21
II.2.7. Analyse statistique.....	25
Chapitre III : Résultats et Discussion	
III.1. Tests in vivo	26
III.2. Etude de l'effet du diclofénac sodique sur la composition du microbiote intestinal	29
III.2.1. Identification des bactéries recherchées	29
III.2.2. Dénombrement des bactéries à Gram négatif au niveau de la matière fécale...	32
III.2.3. Dénombrement des bactéries à Gram positif au niveau de la matière fécale...	33
III.3. Conclusion	36
Conclusion Générale.....	37
Références bibliographiques.....	39
Annexe.....	43

Introduction Générale

En pharmacie galénique, plusieurs voies d'administration sont utilisées y compris la voie orale qui est la plus adoptée pour la plupart des principes actifs car c'est la voie la plus pratique, la moins coûteuse et elle ne provoque pas des douleurs à l'administration (**Canselier et Poux, 2014**). Cependant, elle présente des limites liées à la façon dont le médicament traverse le tube digestif. Dans le cas des médicaments administrés par voie orale, la phase d'absorption peut débuter au niveau de la bouche ou de l'estomac mais, habituellement, la plupart des médicaments sont absorbés au niveau de l'intestin grêle. Le médicament passe par la paroi intestinale et le foie avant d'être transporté jusqu'au le cible par la circulation sanguine (**Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2016**)

Le microbiote intestinal humain constitue un écosystème complexe, le microbiote est reconnu pour son effet sur la santé de l'homme. Il contribue au murissage du système immunitaire et assure une barrière directe contre le colonialisme par des agents pathogènes (**Landman et Quévrain , 2016**).

Le déséquilibre de l'ensemble des bactéries qui constituent la flore intestinale est responsable sur la prévalence de plusieurs maladies modernes. Ces maladies sont notamment les allergies, les maladies inflammatoires de l'intestin et des troubles métaboliques et dégénératifs (**Doré et Corthier, 2010**).

Cette dysbiose est traduit souvent par une baisse importante du nombre de bactéries présentes dans notre flore intestinale, une augmentation des mauvaises bactéries au détriment des bonnes bactéries et une flore intestinale héritée naturellement pauvre en bonnes bactéries (**Landman et Quévrain, 2016**).

L'échantillonnage du microbiote (fécal ou associé à la muqueuse) est très important dans l'organisation d'une étude. Bien que l'étude de la microflore fécale puisse apparaître moins relevante que celle du microbiote associé à la muqueuse, l'analyse du microbiote fécal reste informative. Pour cela, dans cette présente étude on va induire l'inflammation (œdème) sur les rats winstar par injection de formaldéhyde (1%) sur la patte gauche et traiter ensuite par une forme galénique préparée « microsphère » chargée d'un anti-inflammatoire « dichlofénac ». Ce dernier à des effets secondaire très notable et qui peuvent être associées au déséquilibre du microbiote intestinal. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet préventif de dichlofénac vis-à-vis l'altération du microbiote intestinal au cours d'induction de

Introduction Générale

l'inflammation et le traitement via le dénombrement des principales bactéries incriminées dans la flore intestinal.

Le compte rendu de ce mémoire sera présenté en trois chapitres :

- **Le premier chapitre** offre une synthèse bibliographique sur le microbiote intestinal, des généralités sur les anti-inflammatoires et ses effets sur la flore intestinale.
- **Le chapitre 2** comprend les protocoles utilisés dans la partie expérimentale de ce travail : in vivo, analyse de la matière fécale et le dénombrement des bactéries.
- **Le 3^{ème} Chapitre** présente les résultats obtenus et ses interprétations.

Et On termine par une conclusion générale qui résume les principaux résultats obtenus.

I.1. INTRODUCTION

Notre tube digestif abrite pas moins de 10^{12} à 10^{14} micro-organismes. Cet ensemble de bactéries, virus, parasites et champignons non pathogènes constitue notre microbiote intestinal (ou flore intestinale).

Le rôle du microbiote intestinal est de mieux en mieux connu, il joue un rôle dans les fonctions digestive, métabolique, immunitaire et neurologique. En conséquence, la dysbiose, c'est-à-dire l'altération qualitative et fonctionnelle de la flore intestinale, est une piste sérieuse pour comprendre l'origine de certaines maladies, notamment celles sous-tendues par des mécanismes auto-immuns ou inflammatoires. Cette thématique est devenue centrale pour la recherche biologique et médicale.

I.2. LA BARRIÈRE INTESTINALE

I.2.1. Présentation générale de l'appareil digestif : L'appareil digestif est composé du tube digestif proprement dit et des organes digestifs. Le tube digestif est divisé en plusieurs sections allant de la bouche à l'anus en passant, dans l'ordre, par l'œsophage, l'estomac, le duodénum, jéjunum, l'iléon, le colon et le rectum. Les organes digestifs accessoires sont les glandes salivaires, le pancréas, le foie, et la vésicule biliaire (Sherwood, 2006).

I.2.2. Le microbiote intestinal : Microbiote définit l'ensemble des espèces bactériennes chez l'Homme qui colonisent toutes les surfaces du corps humain exposées à l'environnement extérieur. L'organe le plus colonisé est le tractus intestinal où le côlon à lui seul contient plus de 70% de tous les micro-organismes du corps humain (Ley et al., 2006). Ainsi, 10^{13} à 10^{14} microorganismes cohabitent pacifiquement dans notre tractus gastro-intestinal avec la muqueuse, l'épithélium intestinal mais aussi le système immunitaire mucosal (Whitman et al., 1998).

Microbiote intestinal participe en effet pleinement au fonctionnement du système immunitaire intestinal : ce dernier est indispensable au rôle barrière de la paroi intestinale, soumise dès la naissance à un flot d'antigènes d'origine alimentaire ou microbienne. Ainsi, des bactéries comme *Escherichia coli* luttent directement contre la colonisation du tube digestif par des espèces pathogènes, par phénomène de compétition et par production de substance bactéricides (bactériocines). Parallèlement, dès les premières années de vie, le microbiote est nécessaire pour que l'immunité intestinale apprenne à distinguer espèces *amies* (commensales) et pathogènes.

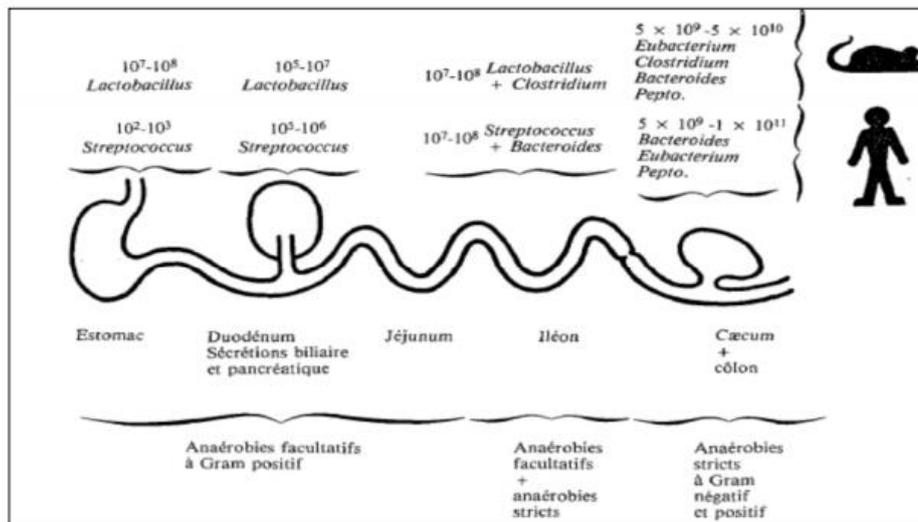


Figure I.1. Répartition schématique de la flore microbienne dans les divers compartiments du tube digestif chez l'homme et le rat (Ducluzeau et Raibaud, 1989).

I.2.3. Fonction du microbiote intestinal : Microbiote intestinal exerce de nombreuses fonctions physiologiques dont les répercussions sur l'hôte sont pour la plupart bénéfiques (Gérard et Donadille, 2007).

- Digestion, absorption et métabolisme : Des matériaux alimentaires non digestibles (fibres de polysaccharides végétaux) sont dégradés par le microbiote via la fermentation et on observe des bioconversions de substance en micronutriment assimilables bénéfique pour la santé. La conséquence la plus spectaculaire est la production de gaz (flatulence) (Corthier, 2008). Le microbiote peut participer au métabolisme de médicaments qui vont subir des processus de modifications proches de ceux des hormones stéroïdiennes.

- La production d'acides aminés tels que la lysine ou la thréonine par le microbiote intestinal va faire de lui une importante source de vitamine K et B pour l'organisme (Stephani et al., 2011).

- Fonction immunitaire : L'acquisition du microbiote permet la maturation du système immunitaire avec une tolérance vis-à-vis de notre propre microflore qui joue un rôle adjuvant pour la tolérance des protéines alimentaires (Bigard, 2007) et les interactions avec les cellules épithéliales ont des rôles essentiels pour le maintien de la santé de l'hôte (Gérard et Donadille, 2007).

- Fonction physiologique : En absence du microbiote, le tube digestif n'atteint pas sa maturité et reste atrophié : l'épaisseur de la muqueuse, la taille des villosités et des bordures en brosse sont réduites ainsi que l'angiogenèse (développement du réseau sanguin) (Corthier, 2006).

○ Fonction de protection : Le microbiote résident exerce un fort antagonisme vis-à-vis des bactéries en transit avec le bol alimentaire (**Corthier, 2006**) en s'opposant à la colonisation de l'intestin par des micro-organismes pathogènes comme *Clostridium difficile*. Cette capacité de protéger le tube digestif par la production de facteurs antibactériens est appelée "effet de barrière" ou "résistance à la colonisation" (**Lu et Walker, 2001**).

I.2.4. Les principaux facteurs influençant la composition et la fonction du microbiote intestinal : La composition et les facteurs du microbiote du tractus gastro-intestinal sont influencés par divers facteurs:

- Le mode d'accouchement. En effet, les enfants nés par voie vaginale présente un microbiote proche du microbiote vaginal et fécal de leur mère, tandis que, ceux nés par césarienne sont exposés à l'environnement hospitalier et au microbiote cutané de la mère (**Biasucci et al., 2010**).
- Le changement des conditions physiologiques de l'hôte (âge, état de santé,...).
- La composition du régime alimentaire (**Den Besten et al., 2013**).
- Des paramètres physico-chimiques (le pH intestinal, la motricité...).
- Des circonstances environnementales (contamination par les pathogènes, antibiothérapie, chimiothérapie, climat, stress, hygiène ...) (**Hopkins et al., 2002**).

Pour des raisons évidentes, certains antibiotiques, antiviraux et antifongiques perturbent l'équilibre de cet écosystème. On sait aussi que la pression sur le microbiote favorise la dissémination de souches bactériennes résistantes. En revanche, il est moins connu que près d'un quart des médicaments non-antibiotiques peuvent aussi perturber le microbiote (dysbiose). Dans certains cas, cette dysbiose explique certains effets indésirables observés. Dans ce travail, on va tester l'effet d'un anti-inflammatoire sur le microbiote. Pour cela, il est nécessaire de faire un rappel bibliographique sur cette classe thérapeutique.

I.3. GENERALITE SUR LES ANTI-INFLAMMATOIRE :

I.3.1. L'inflammation :

La réaction inflammatoire c'est une réponse physiologique à une agression (allergie, infection, blessure...), fait intervenir un réseau complexe de médiateurs et de cellules impliqués de façon variable en fonction de l'agent causal, du site et de l'individu lui-même. Elle a pour objectif de reconnaître, détruire et éliminer toutes les substances qui lui sont étrangères (**Levet, 2011**). Les réactions inflammatoires sont déclenchées dans le but de

défendre l'organisme contre une agression. Lorsqu'elles sont visibles, elles se manifestent classiquement par 4 signes cliniques : rougeur, douleur, tuméfaction (gonflement) et augmentation de la chaleur locale (**Charpentier, 2008**).

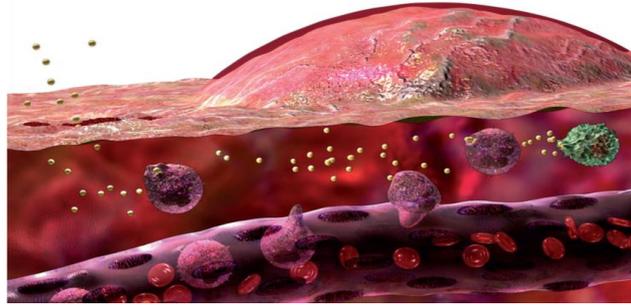


Figure I.2 : Présentation d'une inflammation (**Charpentier, 2008**).

I.3.2. Les anti-inflammatoires :

Les anti-inflammatoires sont des médicaments de structures très diverses utilisés pour suspendre ou ralentir le processus inflammatoire. Celui-ci peut être localisé ou généralisé, devenu exagéré, chronique ou associé à des phénomènes immunologiques quel qu'en soit la cause (**Charpentier, 2008**).

I.3.3. Classification des anti-inflammatoires :

Les anti-inflammatoires se répartissent en deux grandes classes : les anti-inflammatoires stéroïdiens (ou corticoïdes) et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (ou AINS) :

a. Anti-inflammatoire stéroïdiens (AIS) : Ils constituent une vaste famille de médicaments (dérivés du cortisol, hydrocortisone et cortisone) et leurs dérivés synthétiques. Les glucocorticoïdes de synthèse permettent d'obtenir une meilleure activité anti-inflammatoire et la dissociation entre les effets anti-inflammatoires et les effets physiologiques cortisoniques. Ils sont utilisés depuis plusieurs dizaines d'années dans la prise en charge de nombreuses pathologies présentant une composante inflammatoire (**Faure, 2009**).

✚ Action sur les métabolismes :

Glucides : À partir des protéines tissulaires, la néoglucogenèse est stimulée par les AIS, causant une augmentation de la formation hépatique du glucose et une diminution de l'utilisation du glucose périphérique, entraînant une augmentation de la glycémie, avec la possibilité de développement d'un diabète.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Protides : Les AIS provoquent une augmentation du catabolisme protidique et une diminution de la synthèse protéique. Ils s'entraînent une atrophie musculaire et l'apparition de vergetures, et une ostéoporose chez l'adulte à cause d'une raréfaction de la trame protéique de l'os (en cas d'utilisation prolongée) et un trouble de croissance chez l'enfant.

Lipides : Les AIS provoquent une élévation de l'absorption intestinale des lipides, de la réserve et de la biosynthèse des acides gras, qui entraînent une hypercholestérolémie, une augmentation de la masse lipidique avec une répartition des dépôts graisseux au niveau de la face et du tronc.

Eau et électrolytes : Les AIS ont les mêmes actions à celle de l'aldostérone (hormone minéralocorticoïde) et causant :

- une rétention hydrosodée causant des œdèmes, une prise de poids et une hypertension artérielle.
- une fuite des ions potassium provoquant des crampes, des myasthénies et des troubles cardiaques.
- une mobilisation et une élimination du calcium ayant pour conséquences une décalcification accrue par les effets synergiques sur la trame osseuse, et des douleurs osseuses, fractures, une ostéoporose chez l'adulte et un arrêt de croissance chez l'enfant.

✚ **Action anti-inflammatoire, immunosuppressive et antiallergique (B. Charpentier, 2008):**

• **Action anti-inflammatoire :** L'administration des glucocorticoïdes naturels à forte dose aux conditions physiologiques normales et les dérivés synthétiques étudiés pour développer ces activités, présentent des propriétés anti-inflammatoires plus puissantes et rapides avec une action antalgique importante en thérapeutique et une activité antipyrétique annexe. Tous bloquent la réaction inflammatoire par inhibition de la libération des médiateurs de la phase vasculaire : une diminution de libération de l'histamine et blocage de la phospholipase A2 provoquant la production de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires (première étape de synthèse des prostaglandines et leucotriènes). Ils diminuent l'afflux cellulaire vers la zone d'inflammation dans la phase cellulaire. Ils agissent aussi sur la phase tissulaire, en ralentissant les phénomènes de cicatrisation, par la réduisant de la prolifération des fibroblastes et la formation du collagène.

• **Action immunosuppressive** : une diminution du nombre de lymphocytes en s'opposant à leur prolifération et minoration de la réaction Ag-Ac (antigène- Anticorps), provoqué par les AIS. Cette activité est recherchée en thérapeutique dans le cas de leucémie lymphoïde ou de maladies auto-immunes, en général, cet effet secondaire diminue la résistance de l'organisme à l'infection et augmenté la virulence des germes (bactéries, virus, affection mycosique et parasitaire).

• **Action antiallergique** : L'action anti-inflammatoire et immunosuppressive des AIS provoquent une diminution de la production de l'histamine et de l'ensemble des réactions anaphylactiques.

b. Anti inflammatoires non stéroïdiens d'action rapide Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) représentent l'une des classes les plus courantes de médicaments utilisés dans le monde entier, avec une utilisation estimée à > 30 millions par jour. Les AINS exercent des effets anti-inflammatoires (pour les inflammations d'origines rhumatismales et ostéo-articulaires), analgésiques (contre la douleur) et antipyrétiques (contre la fièvre), qui agissent en bloquant la formation des prostaglandines (PG) « des substances responsables de l'inflammation » (Hörl, 2010). Leurs effets secondaires sont susceptibles de toucher tous les appareils de l'organisme. La plupart se montrent bénins, mais certains peuvent avoir des conséquences graves (Pillon, 2014).

✚ **Mode d'action des AINS** : Le principal effet biologique des AINS est l'inhibition de la prostaglandine ou cyclo-oxygénase qui est l'enzyme clé de la synthèse des prostaglandines (PGs) et de la thromboxane (Thiéfin, 2003).

Les prostaglandines sont des eicosanoïdes exerçant une action purement locale. Mais leur distribution quasi ubiquitaire leur permet d'intervenir dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Elles sont synthétisées à partir de l'acide arachidonique (lui-même issu des phospholipides membranaires) grâce à la cyclo-oxygénase (Cox), dont il existe deux iso-enzymes (Coffer, 2010).

La COX-1 : est exprimée de façon constitutive dans la plupart des cellules et tissus de mammifères tels que la vésicule séminale, les plaquettes et l'endothélium. Dans des conditions de repos, il remplit des fonctions réglementaires continues appelées « tâches ménagères ». Les prostaglandines produites par l'activité COX-1 remplissent des fonctions telles que la

Chapitre I : Synthèse bibliographique

protection gastro-rénale, la différenciation des macrophages, l'agrégation plaquettaire et la production de mucus.

Dans des conditions inflammatoires, des études moléculaires ont démontré que l'expression de l'ARNm et de la protéine COX-1 ne change pas, confirmant leur rôle limité dans le processus inflammatoire. La COX-1, cependant, reste pertinente à la fois expérimentalement et cliniquement en raison des effets indésirables déclenchés par l'inhibition non sélective des enzymes de la cyclooxygénase par certains AINS.

La COX-2 : est une enzyme inductible sollicitée par les lésions tissulaires et d'autres stimuli tels que : (le lipopolysaccharide (LPS)). Il est actif sur les sites des blessures et dans une variété de tissus tels que l'endothélium vasculaire et les cellules endothéliales synoviales rhumatoïdes médiatrices des réponses inflammatoires, douloureuses, fébriles et cancérogènes.

Une augmentation multiple des niveaux de COX-2 se produit dans les processus inflammatoires déclenchant une synthèse accrue des prostaglandines pro-inflammatoires. Initialement considéré comme exclusivement de nature inductible, les études ont montré que la COX-2 a certains rôles constitutifs ou régulateurs (Osafó Agyare, 2017).

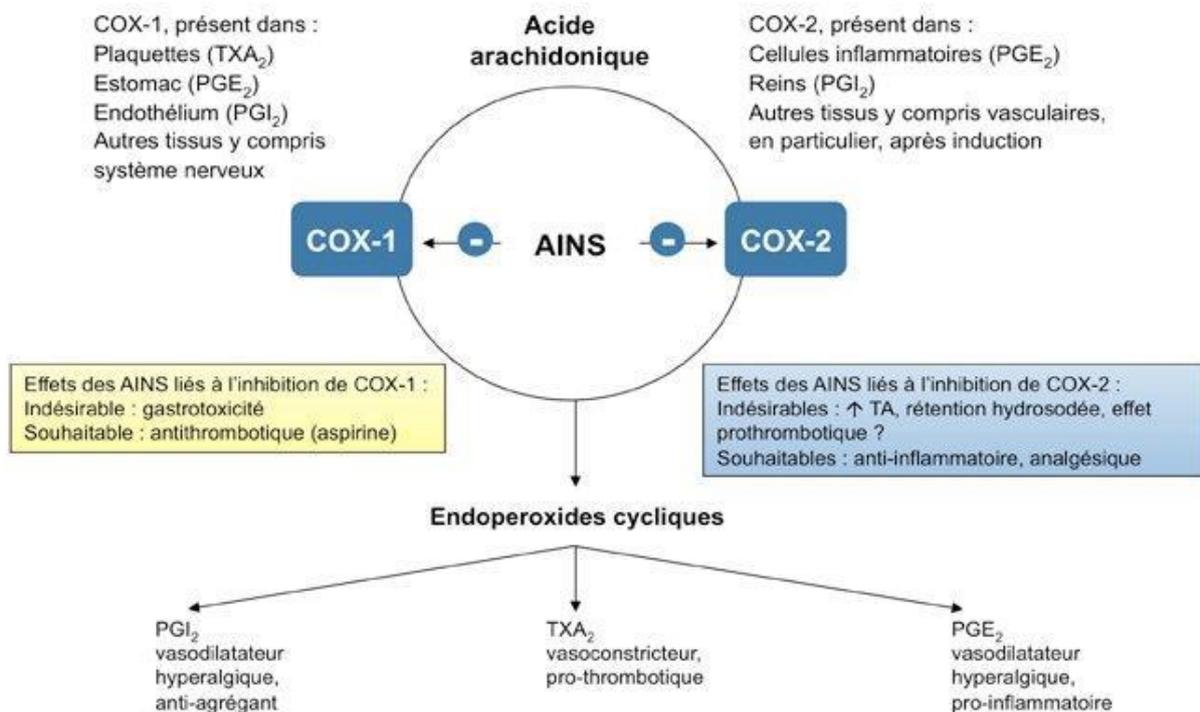


Figure I.3 : Mode d'action des ANIS(Osafó Agyare, 2017).

Les AINS sont des acides faibles résorbés dès l'estomac se fixant de façon importante sur l'albumine plasmatique (d'où les interactions). Ils sont métabolisés par le foie et éliminés par le rein sous forme de métabolites. Les différences entre les AINS sont relatives à leur pharmacocinétique et aux effets secondaires.

I.3.4. les effets indésirables des AINS :

La muqueuse gastro-duodénale possède un ensemble de mécanismes de défense et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont un effet délétère sur la plupart d'entre eux. Il en résulte une muqueuse moins apte à faire face à une charge acide, même réduite. Non seulement l'acide blesse la muqueuse en diffusant en retour à partir de la lumière pour provoquer une acidose tissulaire, mais il sert également à augmenter l'absorption des médicaments. Bien que la plupart des travaux expérimentaux ait été réalisés avec des salicylates, il est désormais admis que presque tous les AINS sont capables de provoquer des lésions des muqueuses. Ces composés semblent causer des dommages gastro-duodénaux, par deux mécanismes principaux (**Maier et al, 2018**):

- Une perturbation physicochimique de la barrière muqueuse gastrique et une inhibition systémique de la protection de la muqueuse gastrique, par l'inhibition de l'activité cyclo-oxygénase de la muqueuse gastro-intestinale (GI).
- Une réduction de la synthèse et de la sécrétion de mucus et de bicarbonate, une altération du flux sanguin de la muqueuse et une augmentation de la sécrétion acide représentent les principales conséquences de la déficience en prostaglandine (PG) induite par les AINS.

Des travaux récents ont démontré qu'après l'administration d'AINS, les neutrophiles adhèrent à l'endothélium vasculaire, ce qui réduit la perfusion de la muqueuse et libère des médiateurs qui endommagent les tissus. Les PG étant des modulateurs bien établis de la réponse inflammatoire, il est évident que les AINS induisent des dommages au tractus gastro-intestinal par un mécanisme identique à celui par lequel ils exercent leur action anti-inflammatoire (**Scarpignato, 1995**). Les AINS peuvent avoir des propriétés antibactériennes qui affectent directement la composition du microbiote intestinal (en affectant le métabolisme/la croissance bactérienne et/ou en induisant la mort des cellules microbiennes).

Les AINS peuvent altérer les propriétés physiologiques ou les fonctions des organes de l'hôte, par exemple en modifiant l'environnement intestinal, en changeant l'intégrité et la perméabilité de la muqueuse et en interférant avec le métabolisme de l'hôte et des microbes, ce qui peut, à son tour, précipiter dans la dysbiose (**Maseda et al, 2019**).

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Les effets secondaires les plus couramment rapportés de l'utilisation des AINS sont les symptômes gastro-intestinaux, y compris les gaz, les ballonnements, les douleurs à l'estomac, la constipation et la diarrhée parce qu'ils perturbent les enzymes qui protègent la muqueuse intestinale (Viana et al, 2021).

Les AINS peuvent causer des ulcères et des saignements dans l'estomac parce qu'ils bloquent l'enzyme Cox-1 et perturbent la production de prostaglandines, qui protègent l'estomac contre les dommages muqueux. Ce sont quelques-uns des effets secondaires les plus courants de l'utilisation d'AINS. En fait, environ 15 % des patients qui prennent des AINS à long terme développent un ulcère gastro-duodénal, qui est une plaie dans la muqueuse de l'estomac, de l'œsophage inférieur ou de l'intestin grêle.

Les AINS non seulement causer des fuites intestinales, ils peuvent être l'un des plus grands obstacles à la récupération de celui-ci parce qu'ils augmentent la perméabilité intestinale, ce qui signifie qu'ils font fuir l'intestin pire. Cela signifie qu'ils élargissent les jonctions serrées dans la paroi cellulaire intestinale qui permettent aux particules alimentaires et autres toxines d'entrer dans la circulation sanguine (Takuya et al., 2016).

Les AINS peuvent également entraîner une réaction en chaîne qui entraîne des affections telles que la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn. Les AINS sont associés à des hospitalisations pour colite grave chez des patients atteints d'une maladie inflammatoire de l'intestin (MII) et de rechutes de MII (Amy, 2020).

Les modifications de la composition du microbiote intestinal sont très variables selon le type d'AINS. Les AINS entraînent une perturbation de la vascularisation intestinale et une modification des marqueurs inflammatoires, ce qui impacterait en particulier le microbiote de l'intestin grêle. Par exemple, l'administration de *Lactobacillus acidophilus* et de *Bifidobacterium adolescentis* a permis d'inhiber la formation d'ulcère iléal, suggérant le rôle de la composition du microbiote intestinal dans la formation de certaines lésions intestinales induites par les AINS.

I.3.5. Le dichlofenac : Dans notre travail, on va étudier l'effet du diclofénac sur le microbiote. Le dichlofénac est un anti-inflammatoire non-stéroïdien (AINS) utilisé pour soulager la douleur. Il est utilisé pour traiter de nombreuses situations douloureuses, y compris la douleur postopératoire aiguë.

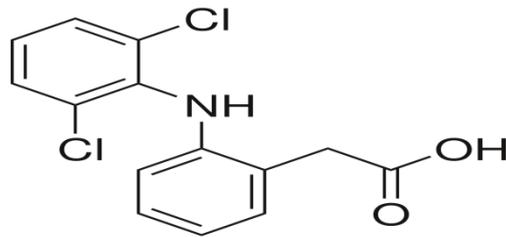


Figure I.3. Structure chimique développée du diclofénac

Derry et *al* montre que le diclofénac oral en dose unique soulage efficacement la douleur chez les adultes souffrant de douleur modérée à sévère après une procédure chirurgicale. Deux patients sur cinq souffrant de douleur postopératoire modérée à sévère traitée par une dose unique de diclofénac ressentent un soulagement de la douleur d'au moins 50 %, ce qui n'aurait pas été le cas avec un placebo. Une forme de diclofénac, le sel de potassium, est plus efficace à la même dose qu'une autre forme de diclofénac, le sel de sodium. L'incidence d'effets indésirables n'a pas été significativement différente du placebo dans ces études de dose unique (Derry et al, 2009).

Le diclofénac peut causer des dommages à la fonction de barrière de la muqueuse de l'intestin grêle. Il peut également entraîner un raccourcissement des villosités, un amincissement de la muqueuse, l'ablation des microvillosités et l'élargissement de la jonction intercellulaire serrée comme changement morphologique caractéristique (Shuo, 2009)(Hirofumi M., 2011).

II.1 INTRODUCTION

In vivo est une étude réalisée au sein d'un organisme. Il s'agit donc d'études principalement utilisées dans le domaine de la biologie et de la recherche médicale. Les tests sur animaux et les essais cliniques sont des formes de recherche in vivo. Il est souvent plus approprié d'observer les effets finaux et totaux d'une expérience sur le sujet vivant. Ces tests permettent d'évaluer les effets d'un matériau sur des organes loin de l'organe cible, car ils sont beaucoup plus proches de la clinique. Ils permettent ainsi d'évaluer la toxicité des métabolites et de déterminer leur biocompatibilité.

Les tests réalisés sur des animaux de laboratoire peuvent ne pas avoir de rapport avec l'espèce humaine, l'effet néfaste peut passer inaperçu s'il est non recherché donc non évalué ; timing incorrect de l'essai (l'effet délétère se manifeste après les périodes d'observation) l'évaluation et l'interprétation des résultats peut être difficile.

L'objectif de notre travail est d'évaluer l'effet d'un anti-inflammatoire « diclofenac » sur le microbiote intestinal. L'anti-inflammatoire testé a été enrobé dans une forme galénique « médicament » synthétisée par des étudiantes « N. Taher et M. Nacef » en Master II Chimie Organique encadrées par notre directrice de mémoire « Dr I. Abdelmalek ». Cette forme galénique « microsphères » a été préparée par la technique de la microencapsulation utilisant l'éthylcellulose comme matière d'enrobage et le diclofénac de sodium comme agent active. Ces particules ont été bien caractérisées par microscope optique, FTIR et DRX.



Figure II.1 présentation des formes galéniques « microsphères » préparées chargées de diclofénac. (par microscope grossissement 40)

II.2. MODE OPERATOIRE

II.2.1. Lieu de travail :

Cette présente étude a été réalisée au sein du Laboratoire de Reproduction des Animaux de la Ferme (institut de vétérinaire), situé à l'ITMA.

II.2.2. Matériels et produits utilisés :

Tableau II.1. Matériels et produits utilisés.

Milieux de culture	Produits et réactifs	Matériels et appareillages
Gélose Mac Conkey	Violet de Gentian	Tubes à essai
Gélose Bile Esculine Azide (BEA)	Fuschine Lugol	Boîtes de Pétri Pipettes Pasteur
Gélose Man Rogosa et Sharp (MRS)	Alcool Eau distillée	Micropipettes Anse de platine
Gélose Tryptone-Sulfite-Cyclosérine (TSC)	Eau physiologique Peroxyde d'oxygène (H ₂ O ₂)	Pinse Lame
Milieu Mannitol Mobilité	Disque Oxydase	Etuve
Milieu Urée Indole	Disque ONPG	Bain Marie
Milieu Viande Foie	Réactifs de Kovacs	Balance
Milieu TSI	Réactifs de TDA	Autoclave
Milieu Clarck et Lubs	Réactifs VPI et VPII	Agitateur magnétique
Milieu ADH	Réactifs Rouge de	thermique
Milieu LDC	Méthylène	Vortex
Milieu ODC	Huile de paraffine Huile d'immersion	Dessiccateur Microscope optique
		Glerie API 20E Spectrophotomètre

II.2.3. Le protocole expérimentale :

L'organigramme suivant présente la procédure expérimentale suivie au cours de cette étude :

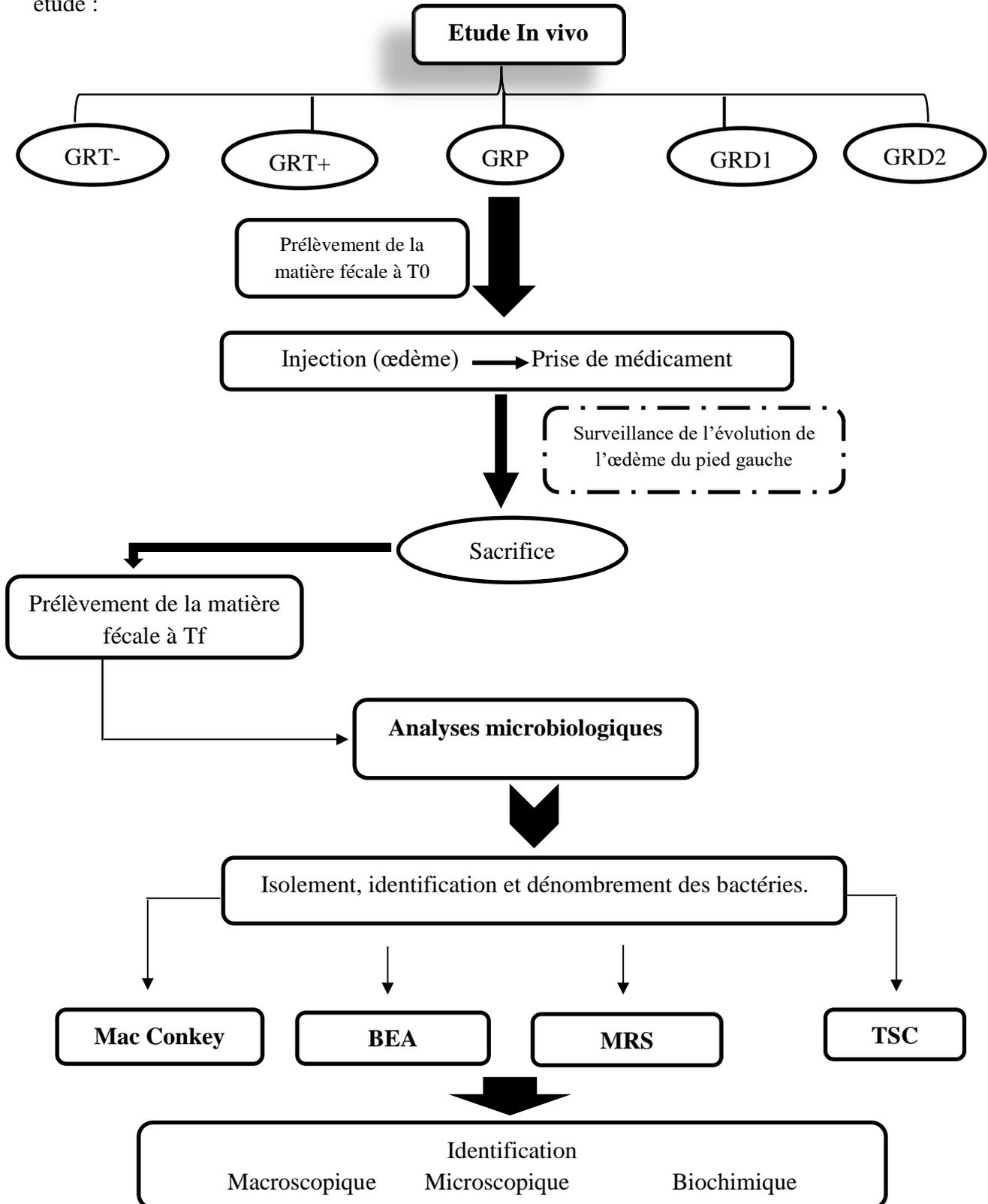


Figure II.2. Protocole Expérimentale

II.2.4. L'activité antiinflammatoire :

Les expériences in-vivo de l'activité anti-inflammatoire ont été réalisées sur 13 rats de laboratoire de souche Wistar, de sexe male et de poids compris entre 299g (\pm 2g) fournis par l'institut Pasteur, Alger. Ces rats sont utilisés après une période d'adaptation d'une semaine au sein de laboratoire de reproduction des animaux de la ferme (institut de vétérinaire), Tiaret à température ($T=25$) dont ils ont l'accès libre à l'eau et à l'alimentation. Ils ont été répartis en 5 lots :

Lot témoin-: constitué de 2 rats (injectés par l'eau physiologique).

Lot témoin +: constitué de 2 rats (injectés par le formol 1%, sans traitement).

Lot test: constitué de 3 rats (injectés par le formol 1%, traité par 20mg de microsphères.).

Lot test : constitué de 3 rats (injectés par le formol 1%, traité par 40mg de microsphères.).

Lot Référence : constitué de 3 rats (injectés par le formol 1%, traité par une pommade commerciale (Diclofénac)).



Figure II.3. Rat Wistar.

• Induction de l'inflammation et traitement

Les rats sont mis à jeun 18h avant l'essai puis ils ont été injectés dans la face plantaire de la patte gauche par 1mL de solution de formol dilué à 1% dans l'eau distillée pour induire un œdème dans la patte gauche sauf le témoin négatif reçoit une injection de 1ml d'eau physiologique.

Après 2h de l'induction de l'inflammation, les rats des lots « essai » reçoivent par voie orale des doses du traitement (20mg/j et 40mg/j), les doses ont été données aux rats d'essai pendant 5jours avec accès libre à l'eau et à 30g de nourriture/jour.

Les rats du lot référence ont été traité par une pommade commerciale « Voltarène (Diclofénac) ».

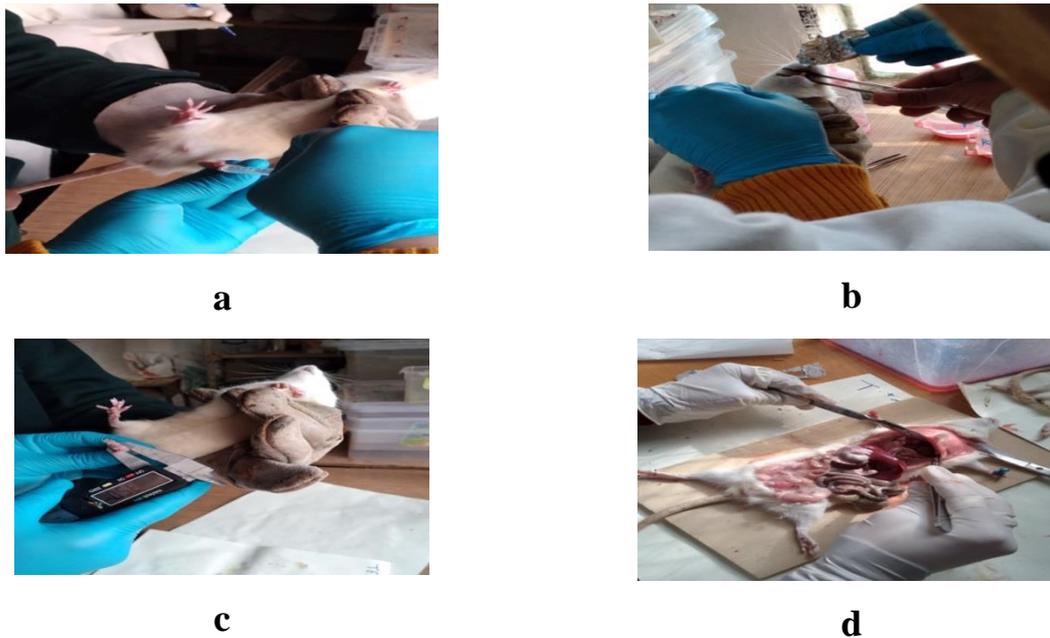


Figure II.4. Protocole expérimental (a : Induction de l'inflammation, b : Prise du médicament par voie orale, c : Mesure du diamètre de la patte, d : Autopsie des ratés).

- **Evaluation du processus inflammatoire**

Le suivi de l'évolution de l'œdème se fait en mesurant le volume des pattes des rats à l'aide d'un pied à coulisse digital avant et après l'injection du formol, le prélèvement de la matière fécale pendant 5 jours a été réalisé chaque jours avant la prise du médicament.

- **Sacrifice des animaux et autopsie**

Après le cinquième jour du test, tous les rats sont sacrifiés par l'abattage pour évaluer après autopsie l'effet du traitement sur leur organisme.

Pour évaluer l'effet d'anti-inflammatoire « Diclofénac sodique » sur la flore intestinale, nous avons recherché quelques bactéries incluses dans la dysbiose intestinal. Cette recherche basée sur l'isolement, l'identification et le dénombrement des germes au niveau de la matière fécale. En effet, 1g de la matière fécale fraîche a été prélevé au début d'expérimentation (**T₀**) et le jour de sacrifice (**T_f**) où ils ont été conservés dans 9 mL d'eau physiologique et dans des conditions stériles à -20°C.

Les principales bactéries intestinales recherchées dans la matière fécale sont : *Escherichia coli*, *Enterococcus spp*, *Clostridium spp*, *Lactobacellus spp*.

II.2.5. Recherche et dénombrement de quelques bactéries intestinales

II.2.5.1. Préparation de la suspension bactérienne La suspension bactérienne a été préparée à partir de la matière fécale. 1g de matière fécale a été dissout dans 9 mL d'eau

physiologique (0,9%). Le mélange a été homogénéisé par un vortex ensuite il a été laissé pour précipiter. A partir de cette dernière deux différentes dilutions décimales ont été préparées jusqu'à (10^{-1} et 10^{-2}).

II.2.5.2. Recherche et dénombrement de quelques bactéries intestinales à Gram négatif

✚ Recherche et dénombrement d'*Escherichia coli* sur milieu Mac Conkey :

Escherichia coli est un bacille à Gram négatif Aero-anaérobie facultatif appartenant à la famille des entérobactéries (Enterobacteriaceae), colonise le tube digestif de l'homme et des animaux. Elle représentant 80 % de la flore intestinale de l'homme. La majorité des souches de *E. coli* sont inoffensives, quelques-unes seulement sont pathogènes (Mariani-Kurkdjian et al, 2016).

La recherche et le dénombrement de cette bactérie a été effectué au niveau de la matière fécale des rats. On submerge la surface du milieu Mac Conkey en boite de pétri par 0,1 mL de la suspension bactérienne et on le répartit uniformément par étalement à l'aide d'un râteau stérile (Figure II.5). Les boites sont incubées à 37°C pendant 24h.

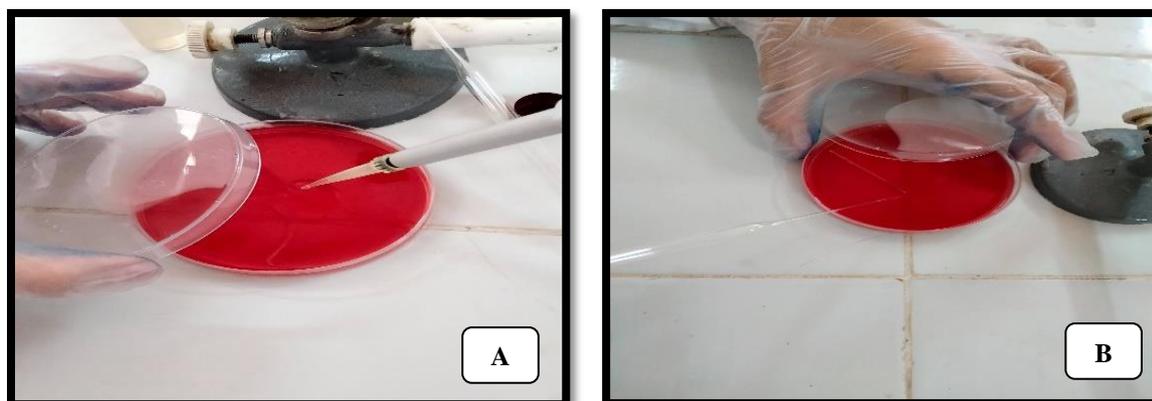


Figure II.5 : (A) : Ensemencement de suspension sur la gélose. (B) : Etalement de la suspension sur la surface.

Une étude macroscopique (l'aspect des colonies, couleur et la forme) a été effectuée sur les colonies bactériennes qui apparaissent après l'incubation. Par la suite, une identification et un dénombrement des colonies ont été effectués.

❖ Identification d'*Escherichia coli* par la galerie Api 20 E

La galerie Api 20 E comporte 20 microtubes contient des substrats déshydratés pour les différents tests **ONPG**, **ADH**, **ODC**, **LDC**, citrate de Simmons (**CIT**), production d'hydrogène sulfuré par réduction de thiosulfate (**H₂S**), synthèse d'une uréase (**URE**),

recherche de la tryptophane désaminase (**TDA**), recherche du pouvoir indologène (**IND**), production de l'acétone « vogue proskauer » (**VP**), gélatinase (**GEL**), recherche des glucides : glucose (**GLU**), arabinose (**ARA**), mannose (**MAN**), inositol (**INO**), sorbitol (**SOR**), Mannose (**RHA**), saccharose (**SAC**), mélioïdose (**MEL**), amygdaline (**AMY**) sont indiqués au-dessous de chaque microtube. Ces derniers sont remplis avec une suspension bactérienne standardisée à l'échelle de 0,5 Mc Farland. La lecture des réactions traduit par un virage de couleur soit libre ou par l'addition des réactifs.

II.2.5.3. Recherche et dénombrement de quelques bactéries à Gram positive

Recherche et dénombrement d'*Enterococcus spp* dans la gélose BEA

Enterococcus spp sont commensales du tube digestif de l'homme et des animaux. Il peut coloniser la peau, la région périnéale et le vagin, par contamination de voisinage. Comme les entérocoques, cette espèce peut se rencontrer dans l'environnement : (eaux usées, eau douce, sol), et contaminer les aliments (**Archambaud et Danielle, 2007**)

Leur dénombrement s'effectue par étalement en surface sur la gélose Bile-Esculine-Azide (BEA) suivi par une incubation à 37°C pendant 24 heures. L'identification de cette espèce a été réalisée par des tests culturels, microscopiques et biochimiques.

❖ Recherche et dénombrement du *clostridium spp* dans la gélose TSC

Clostridium, bactéries anaérobies sporulées comprennent plus de 150 espèces. Elles peuvent être des espèces saprophytes non pathogènes pour l'homme, des espèces saprophytes pouvant être pathogènes occasionnelles ou des espèces toxigènes très pathogènes pour l'homme ou pour des animaux. Les *Clostridium* sont des bactéries anaérobies strictes de la flore exogène, d'origine tellurique, conservant toute leur vitalité dans les sols grâce à leurs spores résistantes ; certaines espèces sont parfois commensales de l'intestin de l'homme et des animaux. Des espèces produisant des toxines sont des bactéries pathogènes spécifiques (BPS) engendrant des maladies spécifiques redoutables pour l'homme et pour les animaux. (**Dellerras, 2014**) L'ensemencement se fait en profondeur avec 1 mL de chaque dilution, et la température de milieu doit être 40°C. Incubation dans des conditions d'anaérobiose à 37°C pendant 48 heures. L'identification de ces bactéries a été réalisée par des tests culturels, microscopiques et biochimiques.

✚ Recherche et dénombrement du *Lactobacillus spp* dans la gélose MRS :

Le genre *Lactobacillus* est constitué d'un spectre large et diversifié d'espèces bactériennes qui ne sont pas pathogènes et sont considérées comme faisant partie du microbiote humain normal. Ce sont des bâtonnets à Gram positif, non sporulés, croissance anaérobie et test de catalase négatif (**Raquel et Kristina, 2014**)

L'ensemencement se fait en profondeur avec 1 mL de chaque dilution et incubation dans des conditions d'anaérobiose dans un dessiccateur (Figure II.6) à 37°C pendant 48 heures. L'identification de ces bactéries a été réalisée par des tests cultureux, microscopiques et biochimiques.



Figure II.6. (A) : Ensemencement en profondeur, (B) : Dessiccateur.

II.2.6. Détermination des Caractéristiques de souches obtenues :

Selon le manuel de Bergey de bactériologie systématique, procaryotes, les bactéries isolées dans cette étude ont été confirmées physiologiquement et biochimiquement.

II.2.6.1. Caractères morphologiques : Deux examens sont utiles dans les caractères morphologiques :

II.2.6.1.1.Examen macroscopique : Cet examen est basé sur l'observation macroscopique qui consiste à décrire l'aspect des colonies obtenues dans le milieu solide après incubation (la taille, la forme, la couleur des colonies...).

II.2.6.1.2.Examen microscopique : A partir des colonies en culture pure, un frottis bactérien est réalisé, fixé puis coloré par la coloration de Gram ensuite l'analyser par microscope.

- **Coloration de Gram :**

La coloration de Gram est la technique de coloration différentielle la plus courante, la plus importante et la plus utilisée en microbiologie. Ce test permet de différencier les bactéries en bactéries Gram positives et Gram négatives, ce qui facilite la classification et la différenciation des micro-organismes (Bejot, 2021).

II.2.6.1.3. Identification biochimique :

1. Test catalase :

 **Principe :** Le test de la catalase facilite la détection de l'enzyme catalase dans les bactéries. Le test catalase est également utile pour faire la différence entre les bactéries aérobies et anaérobies obligatoires, car les anaérobies sont généralement connus par l'absence de cette enzyme. La catalase sert à neutraliser les effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène.

La catalase accélère la dégradation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène



Cette réaction est mise en évidence par la formation rapide de bulles (Karen, 2010).

Technique:

- On dépose une goutte de H₂O₂ sur une lame à l'aide d'une pipette Pasteur.
- On place une colonie bien isolée à l'aide d'une anse stérile dans la goutte de H₂O₂.
- Résultat positive a été traduit par la formation de bulles est observée sur un fond sombre pour améliorer la lisibilité.

2-Test oxydase:

Principe :

Le test d'oxydase est conçu pour détecter spécifiquement la présence du système enzymatique terminal de la respiration aérobie appelé cytochrome C oxydase. Le cytochrome C oxydase est le dernier accepteur d'électrons H₂ dans un mécanisme respiratoire aérobie composé d'un certain nombre d'enzymes qui s'oxydent et se réduisent alternativement en donnant ou acceptant des électrons dérivés de H₂.

Le réactif sert de substrat artificiel donnant des électrons et s'oxydant ainsi en un composé violet foncé en présence de l'enzyme oxydase et d'O₂ libre. Le développement d'une

coloration violet foncé après avoir frotté l'organisme dans le disque d'oxydase contenant le réactif indique une réaction positive. (Shields et Cathcart, 2016).

Technique :

-Prenez un disque d'oxydase commercialisé imbibé par une goutte d'eau distillé dans laquelle en dépose à l'aide d'une pipette pasteur une colonie et la froter dans le disque. La lecture de résultat s'effectue par l'observation de changement de couleur dans les 30 secondes (Shields et Cathcart, 2016).

3. Test ONPG:

Principe:

Le O-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (ONPG) est structurellement similaire au lactose (c'est-à-dire que l'ONPG est un analogue du lactose), sauf que l'orthonitrophényle a été substitué au glucose.

Lors de l'hydrolyse, sous l'action de l'enzyme β -galactosidase, l'ONPG se clive en deux résidus, le galactose et l'o-nitrophénol. L'ONPG est un composé incolore : L'o-nitrophénol est jaune, fournissant une preuve visuelle de l'hydrolyse (Al-Thobaiti et al, 2021).

Technique :

-Placez un disque ONPG dans un tube stérile contenant 2mlL d'eau physiologique stérile. Le tube est inoculé avec une colonie de l'isolat à tester à l'aide d'une anse de platine puis incubé à 37°C pendant 24h.

-L'apparition d'une couleur jaune indique la capacité des bactéries à synthétiser la β -galactosidase (Al-Thobaiti et al, 2021).

4. Triple Sugar Iron (TSI) :

Principe :

La gélose Triple Sugar Iron (TSI) est utilisée pour la différenciation des microorganismes sur la base de la fermentation du glucose, du lactose et ou du saccharose et la production de sulfure d'hydrogène et de gaz (Tabak et Bensoltane, 2012).

Lecture du test TSI :

➤ Fermentation de glucose :

Culot rouge : glucose non fermenté ;

Culot jaune : glucose fermenté

➤ Fermentation du lactose : - Pente inclinée rouge : lactose non fermenté.

- Pente inclinée jaune : lactoses fermentés.

- **Production de gaz** : Apparition de gaz dans le culot.
- **Formation d'H₂S** : Formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre.

Technique :

A l'aide d'une anse stérile, ensemencée le culot par une piqure et la pente par des stries à partir des cultures pures. L'incubation de ces tubes a été réalisée à 37°C pendant 24 heures.

5. Urée- Indole :

Le milieu urée-indole est un milieu qui permet de réaliser un ensemble de résultats utiles à l'identification des bactéries.

Technique :

Comprend trois étapes (**Boussena S., 2020**) :

- A partir d'une culture pure ensemencer le milieu d'urée indole par une colonie bactérien à l'aide d'une anse de platine stérile, cette étape est suivie par une incubation à 37°C pendant 24 heures. Une lecture directe de l'uréase, enzyme hydrolysant l'urée, une alcalinisation du milieu traduit par une coloration rouge.
- Après la lecture de l'urée, on procède à la lecture de l'indole sur le même tube. L'indole produit est révélé par le réactif de Kovacs, si l'espèce bactérienne est indole (+); un anneau rouge apparait à la surface du milieu, si elle est indole (-); il y a un anneau jaune ou le milieu demeure inchangée.
- La présence de tryptophane désaminase (TDA) est mise en évidence par addition de perchlorure de fer qui provoque une coloration brun rouge du milieu en cas de réaction positive.

6. Mannitol mobilité :

Principe

Ce milieu permet en 24 heures l'étude de deux caractères biochimique (fermentation du mannitol) et morphologique (la mobilité de la souche).

Technique

A l'aide d'une anse de platine ensemencé le milieu par une piqure central. Incuber les tubes à 37°C pendant 24 heures.

Grâce à la présence d'un indicateur de pH le rouge de phénol, la lecture de l'utilisation du mannitol est possible. L'utilisation du mannitol acidifie le milieu qui peut ainsi être révélé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune) (Boussena S., 2020).

7. Citrate de Simmons :

Le citrate est l'unique source de carbone, la plupart des bactéries peuvent cataboliser ce substrat. Leur utilisation est une utilisation aérobie, et se traduira par une alcalinisation du milieu.

Technique

A l'aide d'une anse de platine, la pente estensemencée par une strie longitudinale, à partir d'une culture pure. Ne pas visser le bouchon à fond, afin de permettre les échanges gazeux (en particulier élimination du dioxyde de carbone). Incubation 24h à 37°C (Boussena S., 2020).

8. Milieu Clark et Lubs :

Principe :

Ce milieu permet l'étude de la voie de fermentation du glucose (test VP). L'étude de cette voie permet de différencier les bactéries de la famille des Enterobacteriaceae.

► Test VP (Voges-Proskauer) :

Ce test permet la mise en évidence de la production d'acétoïne (ou 3-hydroxybutanone) au cours de la fermentation butylène glycolique : en présence d'une base forte (soude ou potasse) et d' α -naphtol, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné (Boussena S., 2020).

Technique

Ensemencer le bouillon Clark et Lubs par une suspension bactérienne pur à l'aide d'une anse de platine stérile, après 24 heures à 37°C, ajouter 2 gouttes de KOH à 10% et d'Alpha-naphtol (Réaction de Voges-Proskauer).

8. Recherche de l'activité Arginine Dihydrolase (ADH), Lysine Décarboxylase (LDC) et Ornithine Décarboxylase (ODC)

Présente la capacité des bactéries à dégrader un acide aminé « Arginine ». Le métabolisme du glucose se traduit par un virage au jaune, si la souche dégrade l'arginine elle produit une amine qui va augmenter le pH du milieu et on observe un virage de couleur au violet (Hariri et al, 2009)

Technique :

Ensemencer le milieu additionné d'arginine par une suspension bactérienne, puit incubé à 37°C pendant 24 heures.

Lysine Décarboxylase (LDC), et Ornithine Décarboxylase (ODC) :

Chez les bactéries à métabolisme fermentatif, fermentent le glucose, ce qui entraîne une acidification du milieu qui se traduit par une coloration jaune. L'alcalinité due à l'amine entraîne le virage de l'indicateur au violet. (Elhachemi et al., 2018)

Technique :

A l'aide d'une anse de platine stérile, ce test est réalisé par l'ensemencement d'une colonie bactérienne dans des bouillons « ODC, LDH », » puit incubation à 37° pendant 24 heures.

9. viande-foie (V.F) :

Le milieu V.F est pour but d'étude du besoin en O₂ (ce milieu ne contient pas de nitrate). La gélose V.F est un milieu semi-solide. (HAMDALI,2020)

Technique : À partir d'une culture pure ensemencer le milieu à l'aide d'une pipette boutonnée. L'introduire jusqu'au fond du tube puis remonter en décrivant des tours de spire très serrés.

II.2.7. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur type.

Le logiciel STATISTICA (version 6.1, Stat,Tulsa.OK) a été utilisé pour l'analyse statistique des données. La comparaison entre les cinq groupes expérimentaux a été effectuée via ANOVA à un facteur, et complétée par le test LSD. Une valeur de $p < 0.05$ a été retenue comme seuil de signification.

III.1. Tests in vivo :

Dans le but d'évaluer l'activité anti-inflammatoire de la dichlofénac sodique encapsulée sur des rats Wistar qui ont subi une inflammation provoquée expérimentalement par injection de formol 1% au niveau de leurs pattes gauches. Les pourcentages d'augmentation d'œdèmes ont été calculés par l'expression suivante :

$$\%AUG = \frac{dt - d0}{d0}$$

dt: présente le diamètre de la patte œdémateuse, d0 :présente le diamètre de la patte.

L'évolution des pourcentages d'augmentation et des diamètres des pattes sont représentés sur figures III.1 et III.2 respectivement.

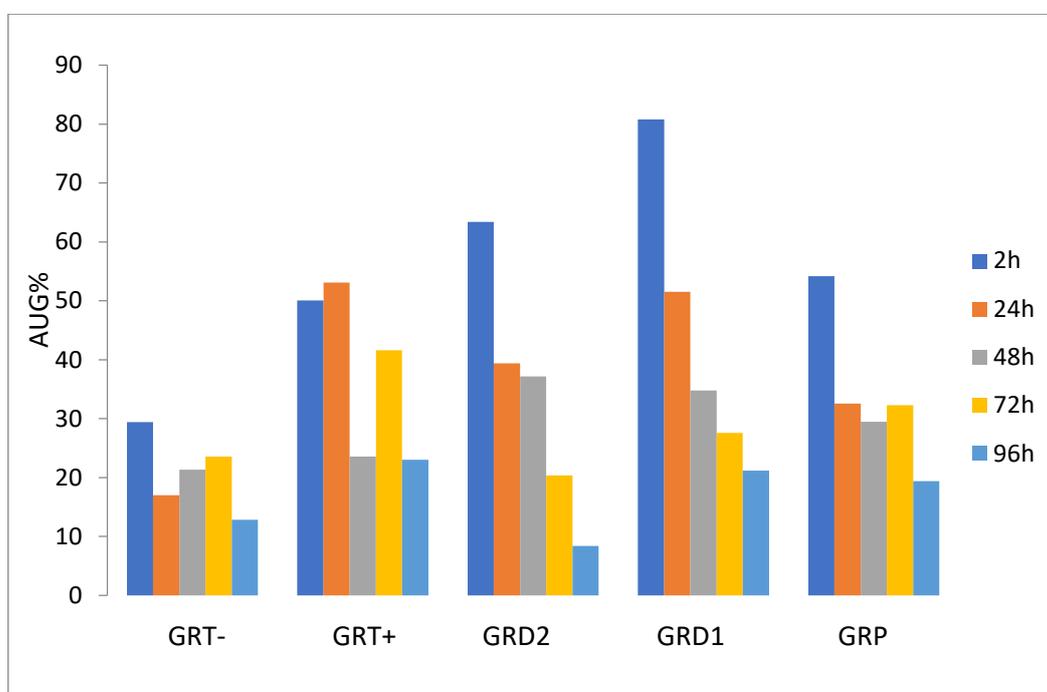


Figure III.1: Histogramme d'AUG% de différents groupes.

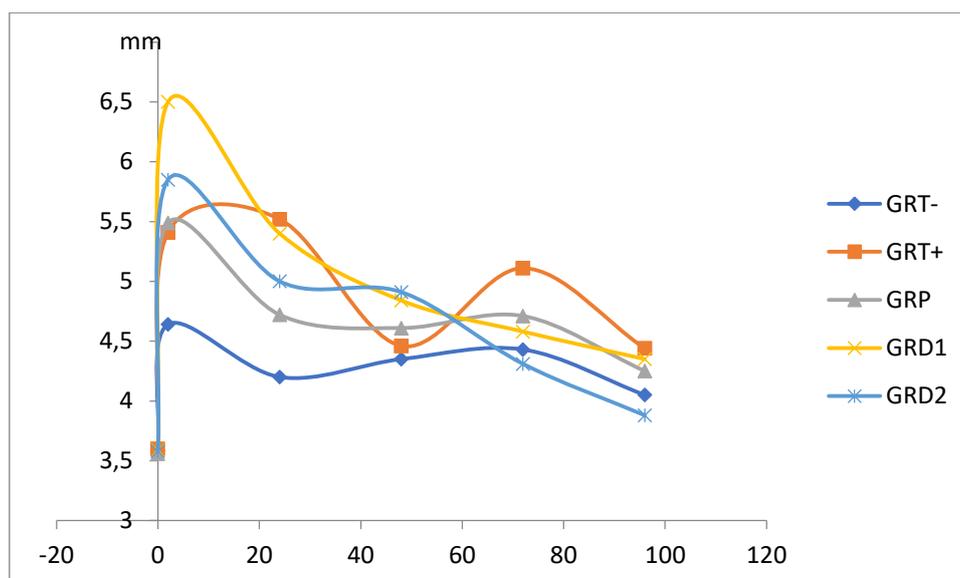


Figure III.2: Evolution des diamètres des pattes en fonction du temps.

L'œdème apparaît dès la deuxième heure de l'injection par le formol 1%. On note que :

- le groupe GRT- « rats injecté par l'eau physiologique » ne présente pas une évolution notable de diamètre de la patte.
- Le groupe GRT+ « rats injecté par le formol et non traité » ne présente pas une évolution significative de diamètre de la patte.
- Les groupes « essais et référence » présente une diminution de diamètre après la prise du médicament (GRD1 et GRD2) ou l'application de la pommade (GRP).

En conclusion, durant la période du traitement (4jours), on a remarqué une diminution démonstrative de l'œdème sur les rats du lot essai dès la première prise du médicament, d'une autre part, les rats du lot témoin positive montrent à leur tour une réponse immunitaire vis-à-vis l'inflammation mais d'une manière moins importante en comparant avec celle du lot essai pour revenir presque à leur état initial au bout du quatrième jours.

• **Résultat de l'autopsie :** Sur la figure suivante, on présente les photos des organes qui sont principalement touchés.



Lot T-



Lot T+



Lot Test (20mg)



Lot Test (40mg)



Lot référence (pommade commercial)

Figure III.3 : les photos prises lors de l'autopsie.

Au cours de l'autopsie, nous remarquons que les rats des groupes GRT-, GRT+ et GRP ne présente aucune lésion. Par contre, l'autopsie a révélé un ulcère au niveau de l'estomac sans aucune remarque durant le traitement pour les groupes essais. Ces lésions sont considérées comme des effets secondaires du principe actif utilisé. On note que les rats du groupe GRD1 (40mg) présentent un ulcère gastrique très important et notable par rapport à celle noté chez les rats du groupe GRD2 (20 mg). Donc, la dose de 20mg administré est une dose convenable contrairement à la dose 40mg.

III.2. Etude de l'effet du diclofénac sodique sur la composition du microbiote intestinal

L'évaluation de l'effet du « Diclofénac sodique » sur la composition de la flore intestinale a été réalisée en comparant la composition de la matière fécale des groupes des rats à temp final (Tf). Nous avons isolé, identifiés et dénombrés les principales bactéries à Gram positive « *Enterococcus spp*, *Lactobacillus spp*, *Clostridium spp* », et à Gram négatif « *Escherichia coli* » au niveau de la matière fécale des 5 groupes expérimentaux. L'identification est basée sur des critères morphologiques et biochimiques.

III.2.1. Identification des bactéries recherchées

Les résultats d'identification morphologique et biochimiques obtenus sont présentés dans le **tableau III.1**. L'examen macroscopique sur le milieu Mac Conkey révèle des colonies roses entouré d'un halo opaque de la même couleur, dû à la précipitation des biliaire « lactose + », et pour le milieu BEA, fourni des petites colonies opaques entourées d'un halo noir. Concernant les bactéries cultivées sur le milieu MRS montrent des colonies blanchâtres légèrement allongé et celle isolée dans le milieu TSC démontre des colonies entourées d'un halo noir, dû à la réduction du sulfite en précipite de sulfure de fer.

En revanche, l'examen microscopique a été réalisé par la coloration de Gram montre que les colonies apparaissent dans le milieu Mac Conky sont des bactéries bacilles à Gram négatif. On outre les colonies cultivées dans les milieux MRS, TSC sont des bacilles à Gram positif et celle isolé du milieu BEA sont des coques à Gram positif.

Les bactéries apparaissent sur les milieux de culture ont été soumises à des tests biochimiques réalisés soit par des tests classique (Catalase, Oxydase, ONPG, TSI, Urée-Indole, Mannitol Mobilité, Citrate de Simmons, VP, ADH, LDC, ODC et V. F), soit à l'aide de la galerie Api 20E (pour *E.coli*).

Les résultats obtenus sur le milieu Mac Conky indique que la bactérie isolée possède les enzymes β -galctosidase (ONPG), et les décarboxylase LDC, ODC, Indole, et dépourvue le H_2S , l'Uréase (URE), et TDA, et elle n'utilise pas le citrate comme unique source de carbone.

Cette espèce utilise dans son métabolisme tous les sucres sauf l'inositol et l'amygdaline. Ces résultats confirment que les colonies obtenues sont des colonies d'*E.coli*.



Figure III.4 : Résultat de l'identification dans la galerie Api 20E

Les résultats obtenus ont été analysés à l'aide de logiciel d'identification « **apiweb** » (<http://apiweb.biomerieux.com>)

Les résultats d'identification des bactéries isolées sur milieu MRS, montrent que ces derniers sont des anaérobies qui ne possèdent pas l'enzyme de la catalase, oxydase, β -galactosidase, et elle n'utilise pas le citrate comme unique source de carbone, ainsi cette espèce utilise le glucose dans son métabolisme. Ces résultats confirment les caractères d'identification de *Lactobacillus spp.*

Les bactéries isolées dans le milieu BEA et les résultats d'identification biochimique confirment que la bactérie est de genre *Enterococcus spp.*, cette bactérie ne possède pas l'enzyme de la catalase, β -galactosidase, et possède le mannitol, elle utilise le glucose dans son métabolisme, et n'utilise pas le citrate comme unique source de carbone, et dépourvue de l'oxydase et l'urée. Cette espèce est de type respiratoire aeroanaérobie.

Les résultats d'identification obtenus à partir des bactéries isolées sur milieu TSC, révèlent des bactéries anaérobies, dépourvue de l'enzyme catalase, oxydase, et l'urée, elle utilise le glucose dans sans métabolisme, et le citrate comme une seule source de carbone, et elle possède l'enzyme ONPG. Ces résultats montrent que la bactérie isolée c'est *Clostridium spp.*

Chapitre III : Résultats et Discussions

Tableau III.1. Caractères macroscopique, microscopique et biochimique des germes isolés de la matière fécale « + : test positif - : test négatif ».

Milieux de cultures		Mac Ckanky	BEA	MRS	TSC
Tests					
Macroscopique		Colonies roses entourées d'un halo opaque	Petites colonies incolores entourées d'un halo noir	Colonies blanchâtres légèrement allongées	Colonies entourées d'un halo noir
Microscopique		Bacilles à Gram négative	Coques à Gram positive	Bacilles à Gram positive	Bacilles à Gram positive
	Catalase	+	-	-	-
	Oxydase	-	-	-	-
	ONPG	+	-	-	+
	Citrate	-	-	-	+
	ADH	+	+	+	+
	ODC	-	-	-	-
	LDC	+	-	+	+
	VP	-	+	-	-
TSI	Glucose	+	+	+	+
	Saccharose ou Lactose	+	+	+	-
	H ₂ S	-	-	-	+
Urée Indole	Urée	-	-	-	-
	Indole	+	-	-	-
	TDA	-	-	-	-
Mannitol Mobilité	Mannitol	+	+	-	-
	Mobilité	Mobile	Mobile	Immobile	Mobile
	VF	Aeroanaerobie facultatif	Aeroanaerobie	Anaerobie	Anaerobie

III.2.2. Dénombrement des bactéries à Gram négatif au niveau de la matière fécale

✚ Dénombrement d'*Escherichia coli*.

Les résultats du dénombrement d'*E.coli* à T0 et Tf sont présentés dans la **figure III.5** par le logarithme décimal (\log_{10}). Ces dernières ne révèlent aucune différence significative entre les cinq groupes expérimentaux à T0.

On outre le dénombrement d'*E.coli* à Tf signale une réduction significative ($p < 0,05$) chez les rats ayant reçu le diclofénac (GRD1) par rapport le groupe témoin GRT+ ($4,27 \pm 0,32$ UFC/g contre $4,91 \pm 0,19$ UFC/g respectivement).

En revanche aucune différence significatif n'a été présenté entre le groupe témoin négatif ($4,5 \pm 0,32$ UFC/g) et les groupes GRD1 ; GRD2 ; DRP.

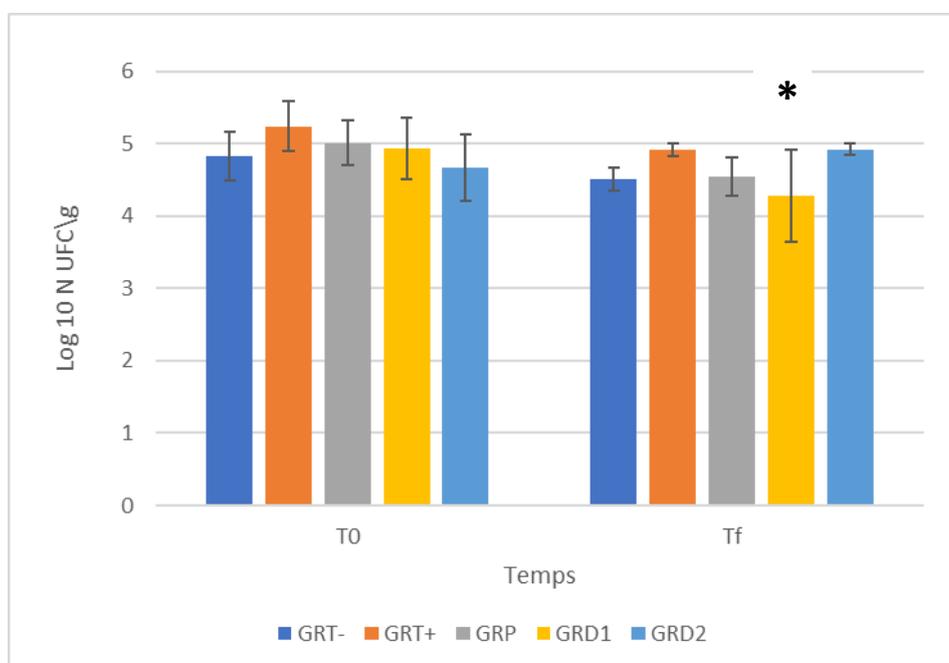


Figure III.5: Dénombrement des bactéries à Gram négatif « *E. coli* ».

(Les résultats sont exprimés sous forme moyennes \pm SEM avec $n= 4$).

*différence significative entre groupe GRD1 vs GRT+

Selon les résultats obtenus en remarque que la dose D1 du Diclofénac sodique provoque une diminution du nombre d'*E.coli* de la flore intestinale. Ces résultats sont confirmés par K. Mazumdar et al. montrent que le diclofénac sodique possède un effet inhibiteur contre *E.coli*. Cette réduction est traduite par la capacité de diclofénac d'inhiber la synthèse de l'ADN d'*E.coli* par l'inhibition similaire de l'incorporation de la 3H-thymidine dans *E.coli* étant

donné le rôle central de l'ADN dans la régulation des processus biochimiques (Mazumdar et al., 2009).

Un autre papier a montré que le mécanisme proposé de l'activité antibactérienne du Dichlofénac est l'inhibition de la synthèse de l'ADN d'*E.Coli* ou la modification de l'activité membranaire de la souche. (Matejczyk al., 2020)

Plusieurs études d'observation humaine à grande échelle a mis en évidence des corrélations entre le microbiote intestinal et la prise de différentes classe de médicaments y compris les anti-inflammatoires. (Rizkallah et al, 2010; Rogers et al, 2016; Walsh et al 2018).

III.2.3. Dénombrement des bactéries à Gram positif au niveau de la matière fécale

✚ Dénombrement des *Enterococcus spp.*

Les résultats d'évaluations du nombre *Enterococcus spp* à T0 et à Tf au niveau de la matière fécale sont représentés dans la **Figure III.6**. Ces résultats révèlent une diminution significative avec un $p < 0,05$ de GRD2 contre GRP dont $4 \pm 0,04$ UFC/g vs $4,63 \pm 0,5$ UFC/g respectivement.

En parallèle aucune différence n'a été signalée entre les groupes GRT-, GT+ vs GRD1 dont $4,20 \pm 0,32$ UFC/g vs $4,38 \pm 0,29$ UFC/g et $4,31 \pm 0,27$ UFC/g respectivement.

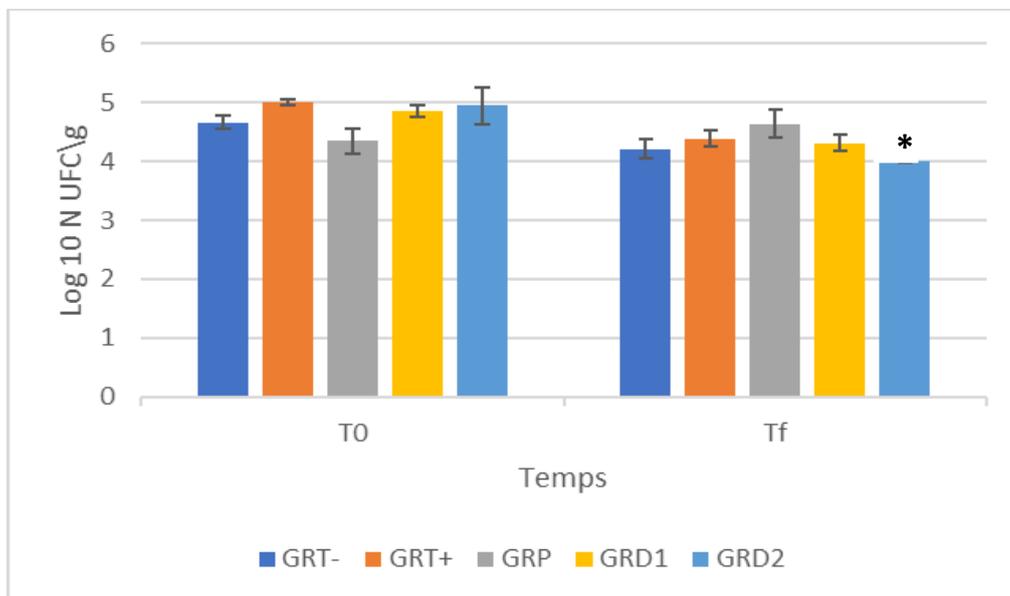


Figure III.6. Dénombrement d'*Enterococcus spp.*

(Les résultats sont exprimés sous forme moyennes \pm SEM avec $n= 4$).

* Différence significative entre groupe GRD 2 vs GRP.

L'utilisation d'AINS peut affecter la composition de la flore intestinale et l'activité métabolique par effet direct sur le microbiote en inhibant ou en facilitant la croissance microbienne, induisant la mort cellulaire et/ou influençant le métabolisme microbien ou par un effet indirect en interagissant avec l'hôte par exemple en changeant le métabolisme, l'environnement intestinal, l'intégrité de la muqueuse et perméabilité. (Maseda D et al., 2020).

Des études animales ont montré que l'administration des AINS provoque des changements importants dans le microbiote tel que la diminution de l'abondance des bactéries Gam négatives. (Otani K et al., 2017).

En 2013, Milani et al démontrent l'activité antibactérienne des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) « diclofénac » sur *E. faecalis* et il cite de même que le mécanisme exact de l'activité antibactérienne de diclofénac n'est pas clair cependant, des études ont proposé l'inhibition de la synthèse d'ADN des bactéries ou l'altération de l'activité membranaire. (Milani A.M et al., 2013)

Dénombrement des *Lactobacillus spp.*

Les résultats obtenus après le comptage des *Lactobacillus spp* sur le milieu solide à partir de T0 et Tf sont représenté dans la **figure III.7**. Les résultats révèlent une augmentation significative contre GRT- ($3,335 \pm 0,77$ UFC/g) versus GRD1 ($4,10 \pm 0,18$ UFC/g). Aucune différence significative n'a été détectée entre les 05 groupes à T0.

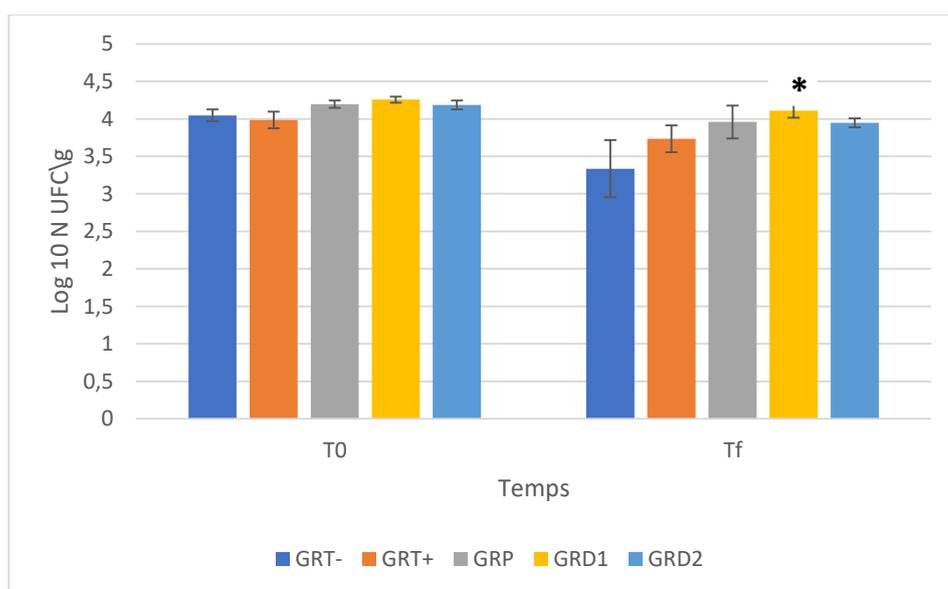


Figure III.7 : Dénombrement de *Lactobacillus spp*
Les résultats sont exprimés sous forme moyennes \pm SEM avec $n= 4$).

* Différence significative entre groupe GRD1 vs GRT-.

Rogers et al ont montré que la composition du microbiote est influencée différemment par l'utilisation des anti-inflammatoires combinés ou non avec les antisécroaires. Ils affectent directement l'abondance relative des bactéries à gram positifs (**Rogers et al., 2016**).

L'augmentation du nombre des *Lactobacillus spp* peut s'expliquer par l'effet antagoniste de la matrice utilisé dans la formulation du médicament « ethylcellulose ». En effet, il est connu que *Lactobacillus spp* est une bactérie commensale présente dans les milieux riches contenant des substrats glucidiques tels que les muqueuses intestinales, orales et vaginales des humains et des animaux. Plusieurs effets ont été documentés de cette espèce par Todorov et al tels que l'activité anti-tumorale, augmentation des cellules immunitaires de l'hôte, effet inhibiteur sur la production d'immunoglobulines E, et la protection contre l'infection. (**Todorov et al.,2011**). Contrairement à notre résultat, Jimenez-Serna et Sanchez ont montré une faible inhibition des AINS contre *Lactobacillus spp* et ils l'ont expliquée par la présence d'un efflux multidrogue non spécifique dans cette bactérie. (**Jimenez-Serna et Sanchez, 2011**).

Dénombrement des *Clostridium spp*

Les résultats d'évaluation du nombre de *Clostridium spp* isolée à partir de la matière fécale est représenté dans la figure. Dénombrement des *Clostridium spp* à T0 et Tf ne révèle aucune différence significative entre les 05 groupes d'expérimentation.

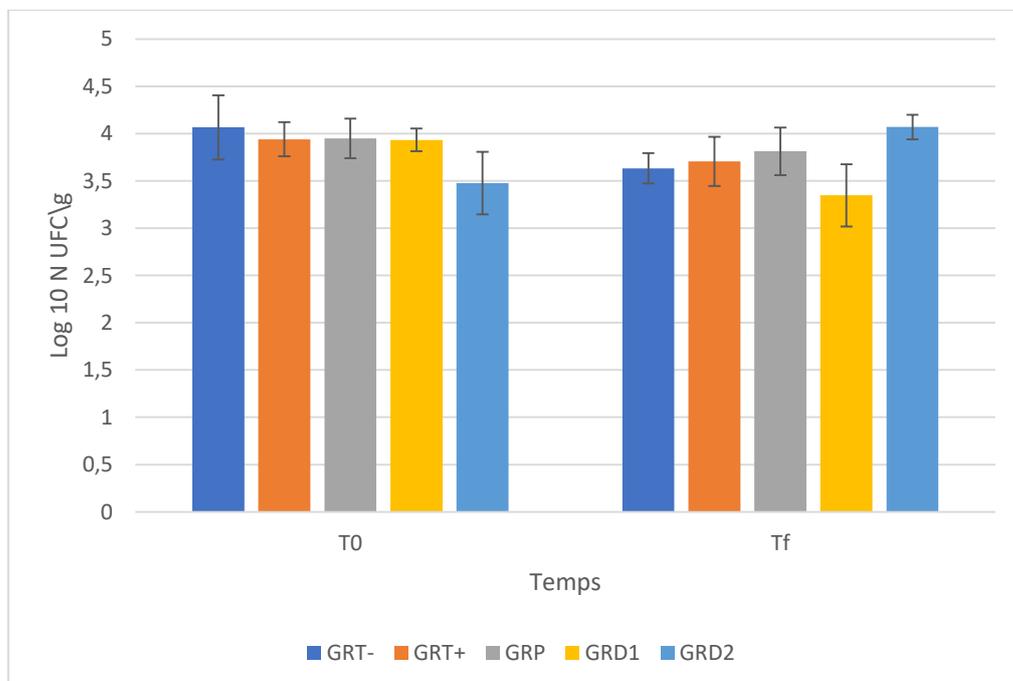


Figure III.8. Dénombrement de *Clostridium spp*

Les études du microbiote intestinal consacrées aux rhumatismes inflammatoires chez l'homme sont encore peu nombreuses, révélant cependant des dysbioses qui pourraient participer au déclenchement ou à l'entretien de la maladie.

La plupart des études ont démontré que le taux des *Firmicutes*, notamment des espèces *Clostridium*, était diminué lors du traitement avec des AINS (Xue et al, 2014). Néanmoins, on ne sait pas si ces modifications représentent un phénomène primaire ou ces bactéries joueraient un rôle dans l'évolution d'œdème, ou si elles constituent un phénomène secondaire ou une dysrégulation immunitaire ou une inflammation entrainerait des modifications des bactéries isolées. La différence entre les populations de bactéries commensales étant constante, il est logique de présumer qu'il joue un rôle dans la pathogénie d'œdème.

III.2.4. Conclusion :

Le microbiote influence fortement le développement et le maintien de l'homéostasie immunitaire, agit comme une barrière contre l'invasion des pathogènes et fournit à l'hôte des contributions nutritionnelles. Les modifications de la composition microbienne (dysbiose) qui est confirmée dans notre étude peuvent détruire ces relations mutualistes et influencer la physiologie de l'hôte, compromettant ainsi son état de santé. La dysbiose intestinale a été associée à d'importantes maladies humaines, notamment des troubles auto-immuns et ou auto-inflammatoires, comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, des troubles métaboliques, comme l'obésité et le diabète de type 2, des allergies et des troubles neurologiques

Conclusion

Conclusion Générale

Les effets secondaires des anti-inflammatoires non stéroïdiens est un sujet majeur qui occupe différents travaux de recherche de la santé publique dans ces dernières décennies, cela est dû principalement à la large utilisation de cette classe médicamenteuse par toutes les catégories humaines « enfant, jeune ou âgés ». En effet, l'administration de ce type de médicament doit être bien contrôlée et dirigée car il est mis en évidence une influence directe des médicaments sur le microbiote intestinal.

Il est connu que le microbiote intestinal exerce des fonctions majeures pour la physiologie de la voie métaboliques, d'effet barrière et de maturation du système immunitaire donc une dysbiose peut impliquer de nombreuses pathologies humaines, notamment digestives et métaboliques.

Dans cet axe que notre travail s'intéresse à l'évaluation de l'effet secondaire du diclofénac de sodium sur la flore intestinale. De ce fait, des études in-vivo et in-vitro ont été réalisées sur des rats Wistar œdémateux traité par des doses journalières « 20mg et 40mg » pour voir les altérations qualitatives et quantitatives du microbiote intestinal.

L'autopsie a révélé des ulcérations au niveau de l'estomac des rats traités par le diclofénac.

Les résultats obtenus à la fin du traitement démontrent que l'administration du diclofénac induit à des altérations sur le dénombrement de quelques bactéries composés du microbiote intestinal. En effet, le dénombrement d'*E.coli* dans la matière fécale à T_f indique une diminution significative chez les rats traités par une dose étudiée par rapport au groupe GRT+. De même, pour l'*Enterococcus spp*, une diminution a été notée dans le groupe GRD2 par rapport au groupe GRP, par contre le dénombrement de *Lactobacillus spp*. montre une augmentation de nombre de bactéries par rapport au groupe GRT-. Le dernier dénombrement de la souche *Clostridium spp* ne présente aucune différence entre les cinq groupes étudiés.

L'ensemble des résultats montre que l'utilisation du diclofénac sodique a une influence directe sur le microbiote intestinal causant la dysbiose qui apparaît par l'altération des nombres de quelques souches ce qui nous permet de dire que l'administration répétée non contrôlée de ce médicament peut causer différentes maladies tels que la maladie inflammatoire chronique de l'intestin.

Conclusion

Comme perspectives, on souhaite réaliser l'étude qualitative et quantitative de différentes souches de la flore intestinale et réaliser les coupes histologiques des différents organes principalement l'intestin pour voir l'effet du diclofénac sur sa structure membranaire.

Références bibliographiques

A

- Al-Thobaiti B.M., Abada E., El-Gayar K., Modern Journal of Microbial Biology, 2021, 3(1),1-17.
- Amy Myers, Free Gut Recovery Recipes, 2020.
- Archambaud M., Danielle C., « Fiche Technique Bacteriologie », 2007, Association déclarée à la Préfecture de la Haute-Garonne, N° 8-543.

B

- Bajolet O., Ciocan D.,Vallet C., De Champs C., Guillard T., Brasme L., Thieffin G., Cadiot G., Bureau-Chalot F., Healthcare Infections Society, 2013, Doi : [https://doi.org/ 10:1016/ j.jhin. 2012.10.016](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2012.10.016).
- Begard M.A, microflore intestinale mieux comprendre son rôle dans a survenue des MICI. Service de gastro-entérologie et nutrition, 2007.
- Bejot J., « GRAM DE COLORATION », Encyclopædia Universalis, site en ligne, 2021.
- <https://www.universalis.fr/encyclopedie/coloration-de-gram/>.
- Boussena S., « Manuel des Travaux Pratiques de Bactériologie », 2020, Institut des Sciences Vétérinaires, Département de Productions Animales, université Biskra.
- Biasucci G., Rubini M., Riboni S., Morelli L., Bessi E., Retetangos C., Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut, Early Human Development, 2010, 86(1), 13-15.

C

- Canselier J-P, Poux M, « Techniques de l'Ingenieur "Principe de formulation» », 2004, 67-90, 2ème edition ; Paris.
- Corthier C., Thomas M., Langella P., Le microbiote intestinal : une composante santé qui évolue avec l'âge, Innovations Agronomiques, 2013, 33, 37-46.
- COFER, Collège Français des Enseignants en Rhumatologie. Item 174 : Prescriptions et surveillance des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens, 2010.
- Charpentier B., « Guide du préparateur en pharmacie », 2008, 3ème édition, Masson Elsevier édition, p888.

D

- Dellerras C., « Pratique en Microbiologie de Laboratoire », 2014, Ed : Lavoisier, Paris ISBN : 978-2-7430-1565-7.

Références bibliographiques

- Den Besten G., Van Eunen K., Groen A. K., Venema K., Reijngoud D.J., Bakker B. M., The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism, *Journal of Lipid Research*, 2013, 54(9), 2325-2340.
- Derry P., Derry S., Moore R. A., McQuay H.J., Single dose oral diclofenac for acute postoperative pain in adults, *Cochrane Database Syst Rev*, 2015, 7, doi:10.1002/14651858.
- Doré J., Corthier G., *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 2010, 34, 7-16.

E

- Elhachemi S., Sahnoune A., Homrani A., Nemiche S., *Adv. Biores.*, 2018, 9(3), 108-122.

F

- Faure. S, Anti-inflammatoires stéroïdiens, *Actualités Pharmaceutiques*, 2009, 48(487), 51-56.

G

- Gerard P., Bernalier-Donadille A., Les fonctions majeures du microbiote intestinal, *Cahier de Nutrition et de Diététique*, 2007, 42, 28-36.

H

- HAMDALI H., « Microbiologie général, Filière industrie Agroalimentaire », 2020, Ecole Supérieur de Technologie de Fkih Ben Salah.
- Hariri A., Ouis N., Sahnouni F., Djilali B., *Rev. Microbiol. Ind. San et Environ*, 2009, 37-55.
- Hirofumi M., Osamu S., Tsuyochi K., Yumiko N., Kanho R., The pathophysiology of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced mucosal injuries in stomach and small intestine, *J Clin Biochem Nutr.*, 2011, 48(2), 107-111.
- Hopkins M. J., Sharp R., Macfarlane G. T., Variation in human intestinal microbiota with age, *Digestive and Liver Diseases*, 2002, 34, 12-18.
- Hörl W. H., Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and the kidney, *Pharmaceutiques*, 2010, 3(7), 2291-2321.

K

- Kaloustian J., Hadji-Minaglou F., « Pharmacie galénique », 2016, 9e éd. Elsevier Masson, pp.129-153, 2012.
- Karen R., *American Society for Microbiology*, 2010, 1213 (1), 1-4.

Références bibliographiques

L

- Landman C., Quévrain E., La Revue de médecine interne, 2016, 37, 418–423
- Levet E., “Anti-inflammatoires non stéroïdiens : Facteurs de risque d’aggravation des infections bactériennes. Connaissance par le pharmacien d’officine de ce risque potentiel”, 2011, Univ. Limoges, p. 89.
- Ley R.E., Peterson P.A, Gordon J.I, Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine, Cell, 2006, 124(4), 837-48.
- Lu L., Walker W.A, Pathogen and physiologic interaction of bacteria with the gastrointestinal epithelium, Am J Clin Nutr, 2001, 1124-1130.

M

- Maier L., Pruteanu M., Kuhn M., Zeller G., Telzerow A., Anderson E., Brochado A., Fernandez K., Dose K., Mori H., Patil K., Bork P., Typas A., Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria., Nature, 2018, 555(7698), 623-628.
- Mariani-Kurkdjian P., Bonacorsi S., Bingen E., Bactériologie Médicale, 2016, 149–161. DOI: 10.1016/B978-2-294-74616-1.00015-7.
- Maseda D., Ricciotti E., Crofford L., Pharmaceutical Research, 2019, 149, Doi:10.1016/J.Phrs. 2019. 104456.
- Matejczyk M., Ofman P., Browska K.D., Swisłocka R., Lewandowski W., Journal of environmental sciences, 2020, 91, 128-141).
- Mazumdar K., Dastidar S.G., Park J.H., Dutta N.K., Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, 28, 881–891.
- Milani A.M., Balaei-Gajan E., Rahimi S., Moosavi Z., Journal of Dentistry, 2013, 10 (1), 16-22).

O

- Osafo. N. A., Obiri D. D, Antwi. A. O, Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, 2017,6-15.
- Otani, K., Tanigawa, T., Watanabe, T., Shimada, S., Kawaguchi, S., Takahashi, Y., Digestion, 2017, 95 (1), 22–28.).

P

- Pillon. F., Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, Actualités Pharmaceutiques, 2014, 53(334), 43-46.

R

- Raquel M. M., Kristina G. H., Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(1): 30–36.

Références bibliographiques

S

- Sherwood L., « physiologie humaine », 2006, De boeck, 2ème édition.
- Shields P., Cathcart L., American Society for Microbiology, 2016, 1-9
- Shuo Z., Bin L., Jian-min S., Fang-ming C., Li-na M., Wei-feng W., Lei-min Y., Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on small intestinal barrier function in rats, *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 2009, 48(1), 7-44.
- Stephani J., Radulovic K., Niess J.H., Gut microbiota, probiotics and inflammatory bowel disease, *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, 2011, 59, 161-177.
- Scarpignato C., Digestive Diseases, Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: How Do They Damage Gastrointestinal Mucosa, *Digestive Diseases*, 1995; 13, 9–39.

T

- Tabak S., Bensoltane A., *Nature & technologie*, 2012, 6, 71-79.
- Thiéfin G., Complications gastro-intestinales des anti-inflammatoires non stéroïdiens et de l'aspirine à faible dose, *Gastroentérologie Clin Biol*, 2003, 27(5) ,498-510.
- .Todorov S.D. , Furtado D.N., Isay Saad S.M., Melo Franco B.D.M, *NEW MICROBIOLOGICA*, 2011, 34, 357-370.).
- Takuya K., Mio H, Shingo I., Sumio O., Effect of Intestinal Flora on Protein Expression of Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters in the Liver and Kidney of Germ-Free and Antibiotics-Treated Mice, *Pharmaceutics*, 2016, 13 (8), 2691-2701.

V

- Viana A.S., Silva P.M., Nogueira E., Tavares L., Tomasetto R., Fiho A., *International journal of Microbiology*, 2021, <https://doi.org/10.1155/2021/8823775>.

W

- Walsh J., Griffin B.T., Clarke G., Hyland N. P., *British Journal of Pharmacology*, 2018, 175, 4415–4429), (Rogers M.A.M., Aronoff D.M., *Clin Microbiol Infect*, 2016, 22, 178–178.), (Rizkallah M.R., Saad R., Aziz R.K., *Curr. Pharmacogenomics Pers Med*, 2010, 8, 182–193).
- Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J., Prokaryotes: the unseen majority, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(12): 6578.

X

- Xue Y., Zhang Y., Wang H., Hu J., Du M., Zhu M-J., *Infection and Immunity*, 2014, 82(5), 1921–1930).

Annexe I : Analyse microbiologique

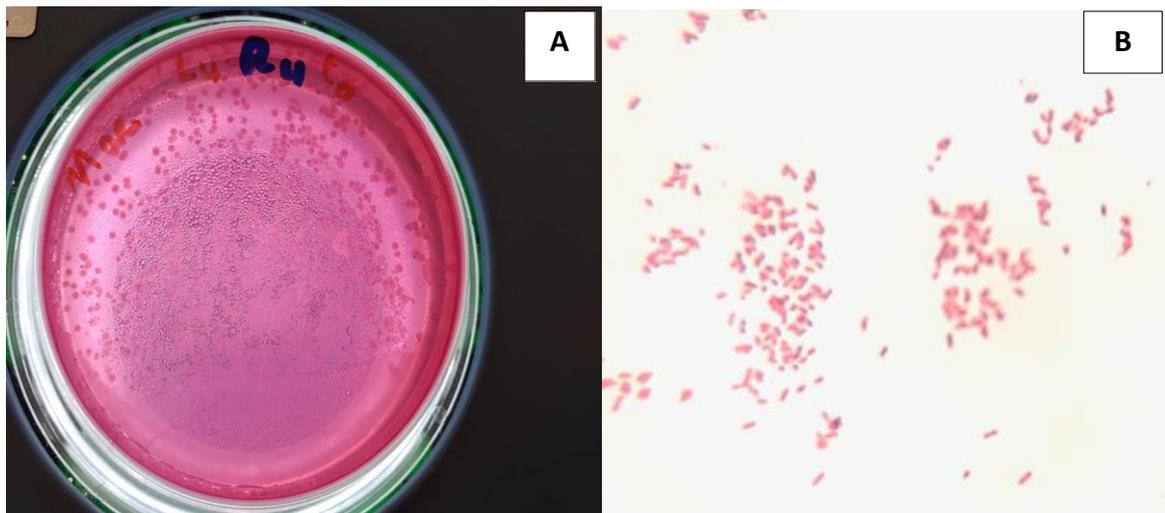


Figure01 :(A) Aspet des colonies d'*Escherichia coli* sur le milieu Mac Conkey (B) Aspet microscopique des colonies.

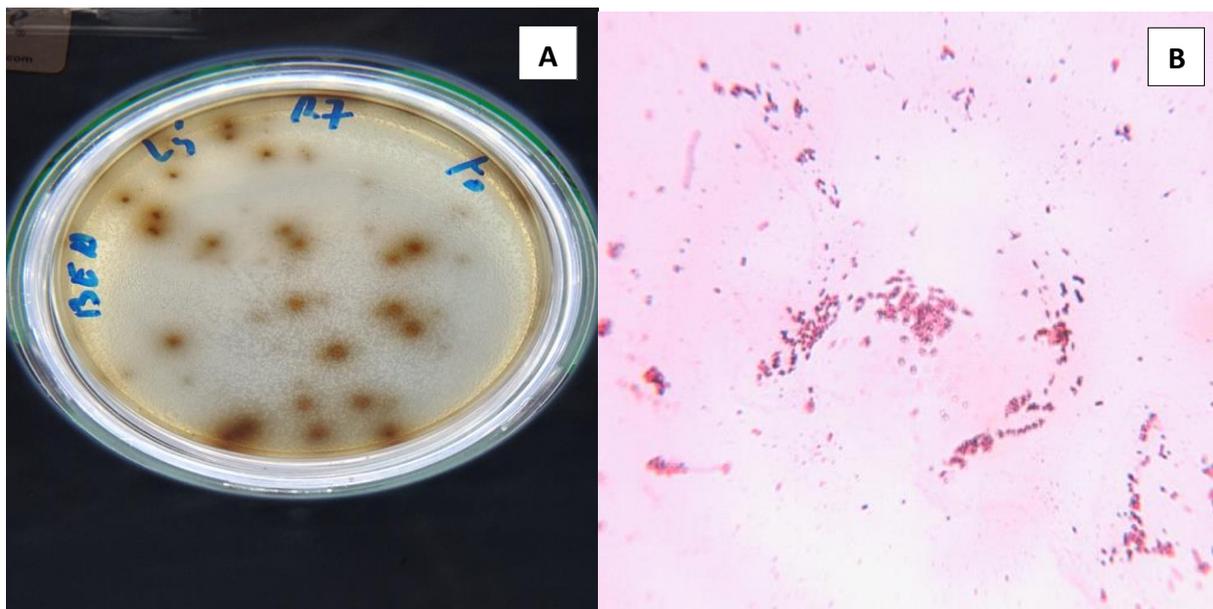


Figure02 :(A) Aspet des colonies des *Enterococcus spp* sur le milieu BEA (B) Aspet microscopique des colonies.

Annexe I : Analyse microbiologique

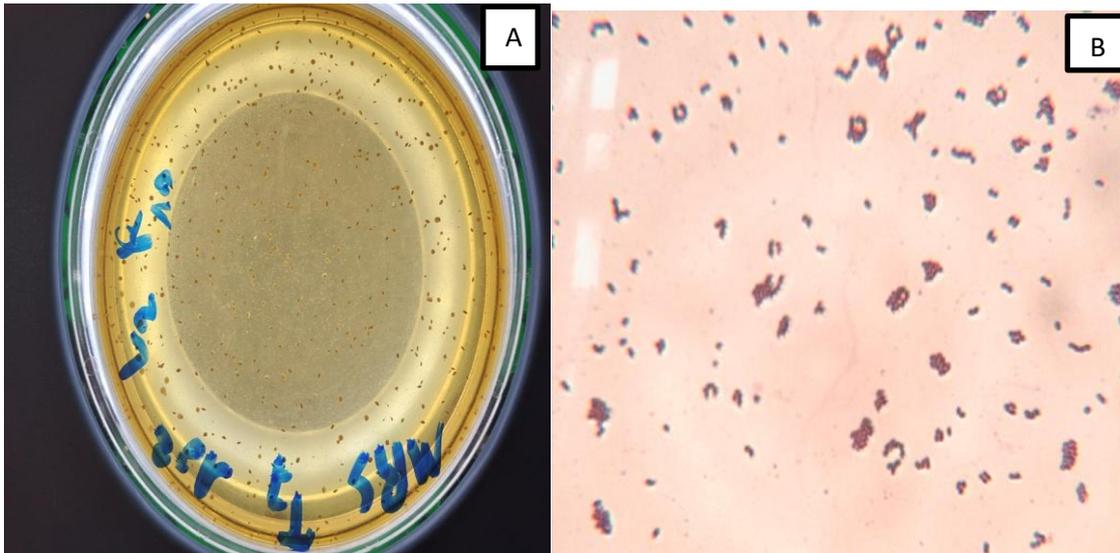


Figure03 :(A) Aspet des colonies des *Lactobacillus spp* sur le milieu MRS (B) Aspet microscopique des colonies.

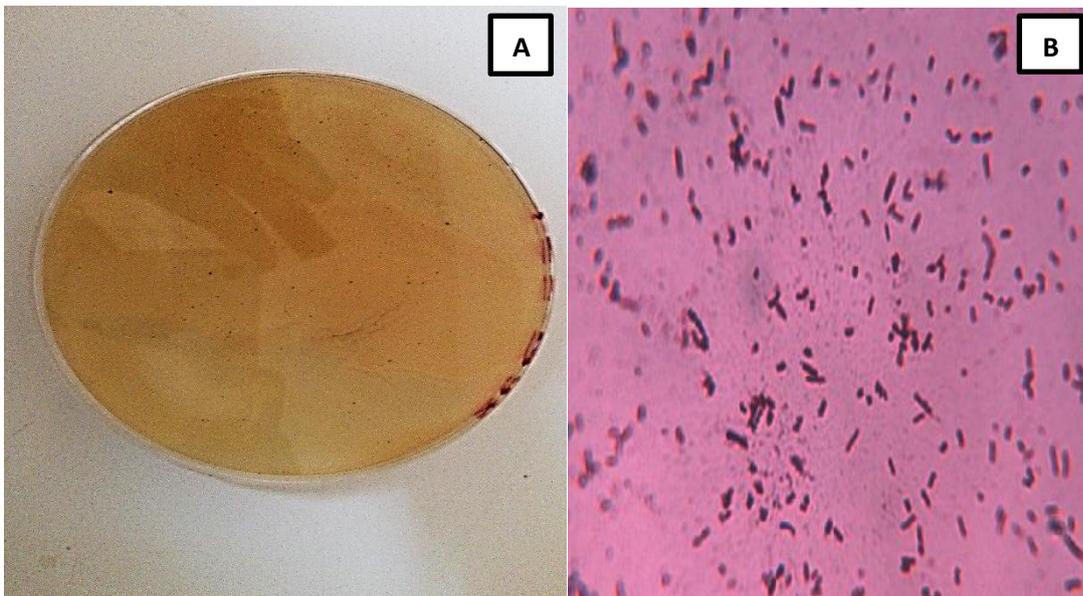


Figure03 :(A) Aspet des colonies de *Clostridium spp* sur le milieu TSC (B) Aspet microscopique des colonies.

Annexe I : Analyse microbiologique



Figure04 : Résultat d'identification d'*E.coli* par galerie Api 20E

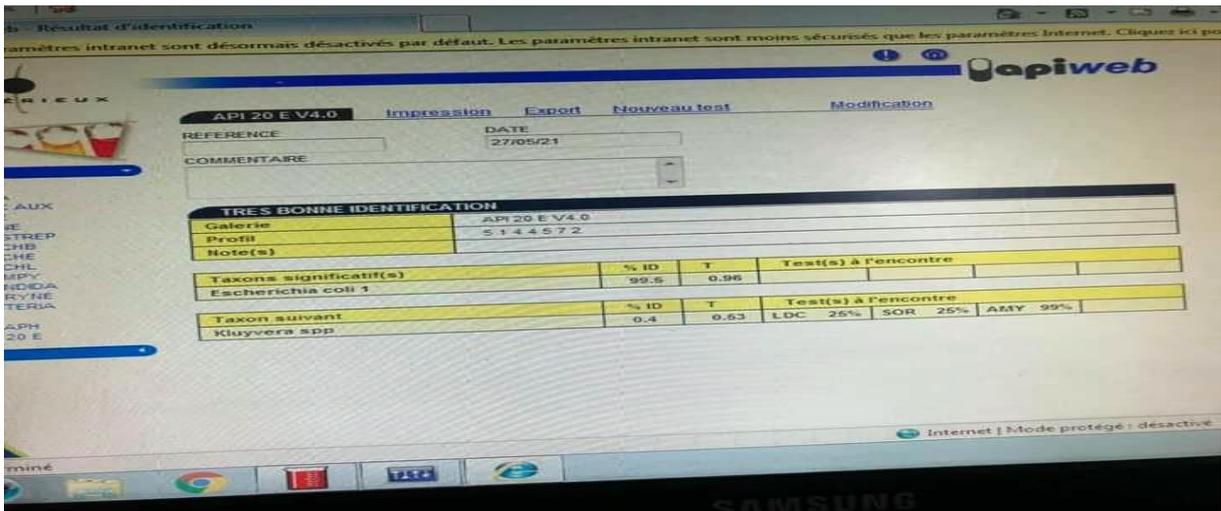
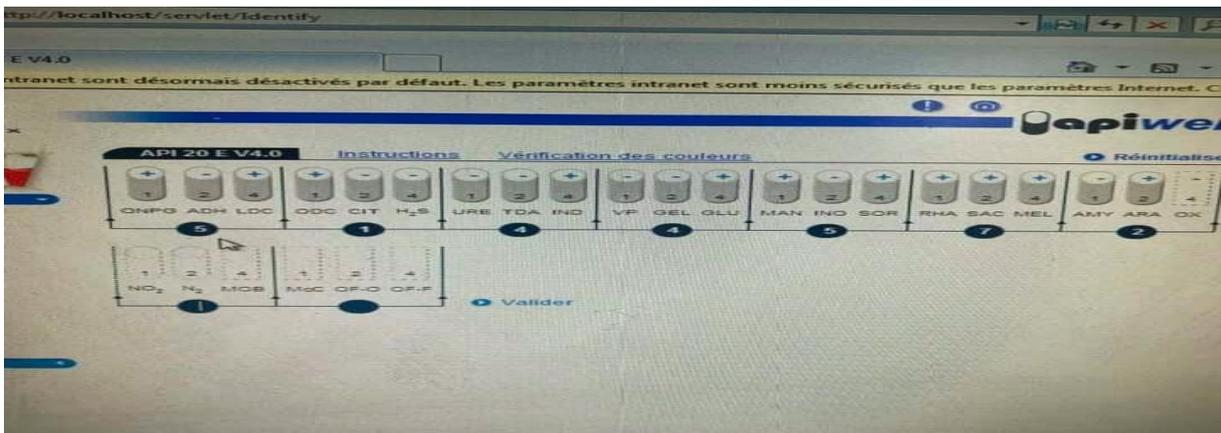


Figure05 : Fiche de résultats de galerie Api 20E

Formule de dénombrement après culture sur milieu solide :

$$N = (C/V) F \text{ (UFC/g)}$$

C : nombre de colonies, V : Volume prélevé, F : Facteur de dilution

Annexe I : Analyse microbiologique

Tableau01 : Résultats d'identification par galerie Api20E

Tests	Composants actifs	Réactions/Enzymes	Résultats Négatif	Résultats positif
ONPG	2-nitrophénol. β D galactopyranosidase	β galactosidase (ortho nitro phényl β D galactopyranosidase)	Incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	orange	Jaune Rouge
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Orange	Jaune Rouge
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge orange
CIT	Trisodium citrate	Utilisation de citrate	Jaune	Bleu Vert pale
H ₂ S	Sodium thiosulfate	Production d'H ₂ S	Incolore/ Grisatre	Dépot noir
URE	Urée	Uréase	Orange	Jaune Rouge
TDA	L-tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune Marron	Rougeatre
IND	L-tryptophane	Production d'indole	Incolore/Vert pale	Rose
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétoine (Vogel Proskauer)	Incolore	Rose/Rouge
GEL	Gélatine origine bovine	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	Fermentation/oxidation du glucose	Bleu/Bleu vert	Jaune/Jaune gris
MAN	D-mannitol	Fermentation/oxidation du mannitol	Bleu/bleu vert jaune	Vert jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxidation du inositol	Bleu	Vert jaune
SOR	D-sorbitol	Fermentation/oxidation du sorbitol	Bleu	Vert jaune
RHA	L-mannose	Fermentation/oxidation du mannose	Bleu	Vert jaune
SAC	D-saccharose	Fermentation/oxidation du saccharose	Bleu	Vert jaune
MEL	D-melibiose	Fermentation/oxidation de melibiose	Bleu	Vert jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxidation d'Amygdaline	Bleu	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation/oxidation d'arabinose	Bleu	Jaune

Annexe II : Composition des milieux de cultures

Tableau 01: Composition du milieu Mac Conkey .

Composants	quantité
Peptone pancréatique de gélatine	17,0 g
Tryptone	1,5 g
Peptone pepsique de viande	1,5 g
Lactose	10,0 g
Sels biliaires	1,5 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Rouge neutre	30,0 mg
Cristal violet	1,0 mg
Agar agar bactériologique	13,5 g

Tableau 02 : Composition du milieu BEA (gélose Bile Esculine Azide)

Composants	quantité
Tryptone	17g
Pepton	3g
Extrait de levure	5g
Citrate de fer et d'ammonium	10g
Chlorure de sodium	5g
Esculine	1g
Citrate de fer et d'ammonium	0,5g
Azoture de sodium (NaN ₃)	0,15g
Agar	15g

Tableau 03 : Composition du milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe)

Composants	quantité
Polypeptone	10,00 g
Extrait de viande	10,00 g
Extrait autolytique de levure	5,00 g
Glucose	20,00 g
Tween 80	1,08 g
Phosphate dipotassique	2,00 g
Acétate de sodium	5,00 g
Citrate d'ammonium	2,00 g
Sulfate de magnésium	0,20 g
Sulfate de manganèse	0,05 g
Agar agar bactériologique	15,00 g

Annexe II : Composition des milieux de cultures

Tableau 04 : TSC (Tryptone-Sulfite-Cyclosérine)

Composants	quantité
Tryptone	15,0 g
Peptone papaïnique de soja	5,0 g
Extrait autolytique de levure	5,0 g
Métabisulfite de sodium	1,0 g
Citrate ferrique ammoniacal	1,0 g
D cyclosérine	0,4 g
Agar agar bactériologique	15,0 g

Résumé :

Dans notre travail, on a étudié l'effet du diclofénac sodique sur la flore intestinale par les tests in-vivo et in vitro sur les rats wistar œdémateuses. L'œdème a été initialement induit dans la patte gauche des rats par une injection de formol à 1%. Ensuite, un traitement préparé a été donné aux rats pour suivre le diamètre de l'œdème. A la fin du traitement Tf, la matière fécale des rats a été prélevée et analysée.

Les résultats obtenus à la fin du traitement démontrent que l'administration du diclofénac induit à des altérations sur le dénombrement de quelques bactéries composés du microbiote intestinal. En effet, le dénombrement d'*E.coli* dans la matière fécale à Tf indique une diminution significative chez les rats traités par une dose1 par rapport au groupe GRT+. De même, pour l'*Enterococcus spp*, une diminution a été notée dans le groupe GRD2 par rapport au groupe GRP, par contre le dénombrement de *Lactobacillus spp*. montre une augmentation de nombre de bactéries par rapport au groupe GRT-. Le dernier dénombrement de la souche *Clostridium spp* ne présente aucune différence entre les cinq groupes étudiés.

Mots Clés : diclofénac, l'œdème, le microbiote, la dysbiose.

الملخص :

درسنا في عملنا تأثير ديكلوفيناك الصوديوم على البكتيريا النافعة عن طريق الاختبارات في الجسم الحي وفي المختبر على فئران ويستار المتورمة. تم إحداث الوذمة في البداية في مخلب الفئران الأيسر بحقنة 1% فورمالين. بعد ذلك ، تم إعطاء علاج مُجهز للفئران لتتبع قطر الوذمة. في نهاية علاج Tf، تم أخذ براز الفئران وتحليلها. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها في نهاية العلاج أن إعطاء ديكلوفيناك يؤدي إلى تغييرات في بعض البكتيريا المكونة من الجراثيم المعوية. في الواقع، يشير عدد *E. coli* في المادة البرازية في Tf إلى انخفاض عند الفئران المعالجة بالجرعة 1 مقارنة بمجموعة GRT+. وبالمثل، بالنسبة لـ *Enterococcus spp* ، لوحظ انخفاض في مجموعة GRD2 مقارنة بمجموعة GRP ، ومن ناحية أخرى تعداد *Lactobacillus spp*. يظهر زيادة في عدد البكتيريا مقارنة بمجموعة GRT-. أظهر العدد الأخير لسلسلة *Clostridium spp* عدم وجود فرق بين المجموعات الخمس المدروسة.

الكلمات الدالة : ديكلوفيناك. انتفاخ. بكتيريا نافعة. اختلاف التركيب المعوي