



Journal Homepage: -www.journalijar.com
**INTERNATIONAL JOURNAL OF
 ADVANCED RESEARCH (IJAR)**

Article DOI:10.21474/IJAR01/8921
 DOI URL: <http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/8921>



RESEARCH ARTICLE

ÉVALUATION DE L'EFFET PROTECTEUR DU LAIT DE CHÈVRE FERMENTÉ PAR LE KÉFIR ET ENRICHÉ À LA CAROUBE CONTRE L'ULCÈRE GASTRIQUE INDUIT PAR L'ÉTHANOL CHEZ LE RAT.

Sana M'hir¹, Kais Rtibi², Lamia Ayed¹, Moktar Hamdi¹, Lamjed Marzouki² and Hichem Sebai².

1. Laboratoire d'Écologie et de Technologie Microbienne, Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie, Boulevard de la terre, BP 676 1080 Tunis, Tunisie.
2. Laboratoire de Physiologie Fonctionnelle et Valorisation des Bioressources-Institut Supérieur de Biotechnologie de Béja, B.P. 382-9000, Béja, Université de Jendouba, Tunisie.

Manuscript Info

Manuscript History

Received: 20 February 2019
 Final Accepted: 22 March 2019
 Published: April 2019

Key words:-

kéfir, caroube, lait de chèvre, ulcère gastrique, probiotique, aliment fonctionnel.

Abstract

La caroube ou fruit de caroubier est traditionnellement utilisée contre les plaies et l'ulcère gastro-duodéal. Le kéfir du lait est consommé pour ces actions bénéfiques sur la flore intestinale et le transit gastro-intestinal. Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antiulcéreuse du lait de chèvre fermenté par le kéfir et enrichi à la caroube chez le rat. Pour cela, les boissons testées (extrait aqueux de caroube, la boisson de kéfir ou le mélange) ont été administrées par voie intra-gastrique durant deux semaines. La famotidine ou molécule de référence a été utilisée comme le témoin positif à la dose de 10mg/kg et le groupe non traité a reçu de l'eau distillée à 10mL/kg. Le dernier jour, une heure après, 1ml d'éthanol (80%) a été administré aux animaux pour provoquer l'ulcère pendant deux heures. Ensuite, les rats ont été sacrifiés. L'estomac de chaque rat a été ouvert pour évaluer les ulcères. L'indice d'ulcère a été exprimé et le pourcentage de protection a été calculé. Les altérations associées ont été mesurées dans les surnageant par des méthodes biochimiques. A 200 mg/kg, l'extrait aqueux de caroube a induit une protection de la muqueuse de 53%, contre 32% pour le kéfir seul à la dose de 20 mL/kg. Alors que, le mélange kefir-caroube (20mL/kg) a montré une action préventive plus importante de 81%. Cette puissante protection est accompagnée par une augmentation du taux de protéines et une régulation des médiateurs cellulaires. La mise au point d'un bio-médicament contre l'ulcère gastrique à base d'un mélange de caroube et de kéfir pourrait être envisageable.

Copy Right, IJAR, 2019., All rights reserved.

Introduction:-

Dans le passé, les aliments étaient reconnus principalement pour leur apport en substances nutritives nécessaires au fonctionnement normal du corps. Cependant, au cours de ces deux dernières décennies, les consommateurs sont passés du simple besoin de satisfaire la faim à la consommation d'aliments pour le maintien du bien-être et la réduction des risques de maladies (Niva, 2007, Bogue et Sorenson, 2001). On appelle un aliment fonctionnel: un

Corresponding Author:-Sana M'hir.

Address:-Laboratoire d'Écologie et de Technologie Microbienne, Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie (INSAT), Boulevard de la terre, BP 676 1080 Tunis, Tunisie.

aliment ou denrée alimentaire dont les avantages physiologiques au-delà de leurs fonctions nutritionnelles de base ont été démontrés scientifiquement (Verbeke 2005).

Le kéfir est un lait fermenté acidulé, produit principalement à partir des laits de vache, de brebis et de chèvre par des « grains de kéfir ». Ce lait fermenté traditionnellement véhicule la réputation d'être bénéfique à la santé (Prado et al. 2015). Ces grains ont été décrits comme étant de "petites masses ridées, à consistance gélatineuse, de grosseur variable" (Jamotte, 1974), des "granules irréguliers gélatineux, blanchâtres ou jaunâtres, de la taille d'une noix" (Kosikowski, 1982) ou encore de "petites masses blanches élastiques, en forme de chou-fleur" (Pidoux, 1984).

Les études publiées sur la composition microbienne de grains de kéfir mettent en lumière une microflore complexe vivant en symbiose. Plusieurs groupes microbiens ont été cités: des streptocoques mésophiles, des leuconostocs, des lactobacilles mésophiles ou thermophiles, des levures et des bactéries acétiques (Prado et al. 2015).

Depuis quelques années, les études scientifiques commencent à s'intéresser aux avantages du kéfir, entre autres son effet anti-tumoral (Gao et al 2013 ; Rizk et al 2009), anti-allergénique (Wei-Sheng et al 2010), anti-inflammatoire (Diniz et al 2003 ; Lee et al 2007), la stimulation des sécrétions gastriques et la formation des acides chez les patients atteints de tuberculose pulmonaire, le traitement des ulcères duodénaux et peptiques (Farnworth and Mainville, 2008)). Les effets santé du kéfir au lait de chèvre ont fait l'objet d'un nombre conséquent d'études. On peut citer: Satir and Guzel-seydim 2015, Quiros et al. 2005. La consommation du kéfir est répandue en Europe de l'Est avec une production industrielle. IL est aussi consommé en Argentine, Taiwan, au Portugal, en Turkiye et en France (Farnworth, 2005). En Tunisie, sa consommation artisanale où les grains sont fournis auprès des particuliers qui consomment le lait pour ses potentialités bénéfiques pour la santé.

Le caroubier est un arbre essentiellement méditerranéen d'importance écologique et industrielle. Largement répandu en Afrique du Nord, notamment en Tunisie, au Maroc et en Algérie (Rjeb 1995, Naghmouchi et al. 2009). La gousse de caroube est riche en carbohydrates. Elle contient également des composés phénoliques, les éléments minéraux et les vitamines. Traditionnellement, la caroube est utilisée pour le traitement des affections gastro-intestinales, en particulier les diarrhées grâce à la présence des tanins (Loab et al. 1989). Des études très récentes ont montré les effets bénéfiques de la caroube (Durazzo et al, 2014, Rtibi et al 2017) tels que son rôle protecteur contre l'ulcère induit chez des rats (Rtibi et al 2016), le traitement de l'hypercholestérolémie (Hassanein et al. 2015), ses propriétés antioxydantes *in vitro* et *in vivo* (Rtibi et al. 2015a, Sebai et al. 2013), contre le diabète (Rtibi et al 2017) et le cancer (Corsi et al. 2002).

Jusqu'à présent, la combinaison de la caroube avec le kéfir, n'a pas été mentionné dans la littérature pour le traitement des ulcères gastriques. Dans ce contexte, cette étude s'est intéressée à évaluer l'effet gastro-protecteur du lait de chèvre fermenté par le kéfir et enrichi à la caroube.

Matériel et Méthodes:-

Préparation de l'extrait aqueux de la caroube

La caroube utilisée dans cette étude a été récoltée au niveau de la région de Tabarka, durant le mois d'octobre 2017, dont l'espèce est « *Ceratonia siliqua* ».

Les gousses de caroube ont été séchées dans l'étuve à une température de $50 \pm 5^\circ\text{C}$ pendant 72 heures. Ensuite, les pépins et la pulpe ont été séparés. Les pulpes ont été broyées rigoureusement dans un mortier traditionnel métallique puis avec un mixeur électrique (Rtibi et al 2016). La poudre ainsi obtenue sera ultérieurement utilisée pour le traitement des animaux.

Origine et maintenance des grains de kéfir

Les grains du kéfir appartiennent à la collection du Laboratoire d'Écologie et de Technologie Microbienne (INSAT, Tunis). Le centre a acquit ces grains en 2012 auprès de particuliers Tunisiens (utilisation artisanale). Ces grains ont été transmis de particulier à particulier. Les grains ont été cultivés dans du lait UHT avec un taux d'ensemencement de 5% à 25°C . Le lait a été renouvelé quotidiennement. Lors du renouvellement du lait, les grains ont été rincés à l'eau stérile et égouttés. Ces manipulations d'entretien des grains se faisaient à température ambiante (Pop et al. 2014).

Préparation du lait fermenté

Les grains, ont été cultivés dans du lait de chèvre, préalablement pasteurisé à 85 °C pendant 15 min.

Une boisson est préparée à base du lait de chèvre et de la pulpe de caroube fermentée par les grains de kéfir (5%). Pour cela, 5g des grains sont ajouté à un mélange de 90ml du lait de chèvre et 10ml de l'extrait de caroube. Le mélange est incubé pendant 18 à 24h à une température de 25°C.

Le dénombrement des groupes microbiens a été effectué pour 3 échantillons :

1. Kéfir 5% (lait de chèvre + grains de kéfir) : échantillon K
2. Caroube fermenté par les grains de kéfir (5%) : échantillon C
3. Mélange (90ml lait de chèvre + 10ml extrait de caroube) fermenté par les grains de kéfir (5%) : échantillon KC

Les groupes microbiens présumés, ont été isolés à partir de 0,1 ml de lait fermenté (ou l'extrait de caroube, cas de l'échantillon C) par étalement, sur boîtes de Pétri sur des milieux de culture gélosés sélectifs : les lactobacilles sur gélose MRS additionné du carbonate de calcium (5 g/l) (37 °C pendant 48h), les lactocoques sur gélose M17 (37°C pendant 48h) et les levures sur gélose PDA (30 °C pendant 48h) (Ninane, 2008).

Une prise de 1ml a été diluée dans un tube de 9ml d'eau physiologique, des dilutions décimales de 10⁻¹ à 10⁻⁵ de la suspension mère ont été ensuite réalisées de la même manière.

Animaux et alimentation

Les expériences ont été effectuées sur des rats mâles de souche Wistar, dont le poids corporel varie entre 200 et 220g. Ces animaux ont été mis dans des cages en polycarbonate à raison de 6 par cage et maintenue dans des conditions standards de l'animalerie [Luminosité (12h lumière/ 12h obscurité), température (22± 2°C) et une hygrométrie de (60-70%)]. Ils sont nourris d'un régime alimentaire standard sous forme de bouchons provenant de la société industrielle de Badr, Utique, Tunisie. L'eau et l'alimentation étant fournies à volonté durant toute la durée de traitement.

Induction de l'ulcère

L'ulcère gastrique a été induit par une administration orale de l'éthanol 80% à la dose de 4g/kg, durant deux heures comme a été décrit par Rtibi et al. (2015b).

Traitement et technique d'administration

Au cours des manipulations, les rats (mâles et femelles) ont été répartis en 8 groupes de 6 rats chacun. L'extrait aqueux de la caroube et le lait du kéfir ont été utilisés à des doses croissantes à raison de 50, 100 et 200 mg/kg, PC. D'autre part, le mélange (kéfir + caroube) est administré également à différentes concentrations (50, 100 et 200 mL/kg, PC) par voie orale (*p.o.*) à l'aide d'une sonde métallique durant 14 jours. La Famotidine a été administrée par voie orale à la dose de 10 mg/kg durant la même période et considérée comme le témoin positif. Le 14^{ème} jour, une heure après le dernier traitement, les animaux ont été intoxiqués durant deux heures. Ensuite, ils ont été sacrifiés et les muqueuses gastriques ont été immédiatement prélevés et homogénéisés dans un tampon Tris-NaCl 50mM, pH 7,4. Les surnageant ainsi obtenus ont été utilisés pour les dosages biochimiques.

Prélèvement des estomacs et évaluation des lésions gastriques

Après sacrifice, les estomacs ont été lavés avec une solution saline (NaCl 0.9) et examinés pour déterminer l'aire de la gastrite en mm². Les indices d'ulcères ont été déterminés comme la somme des longueurs des lésions gastriques totales (en mm²).

Le pourcentage d'inhibition des lésions coliques est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = (ALG_{\text{contrôle}} - ALG_{\text{traité}}) / ALG_{\text{contrôle}} \times 100$$

ALG : Aire des lésions gastriques.

Les lésions au niveau de la muqueuse gastrique sont examinées macroscopiquement. Les photos des zones hémorragiques sont obtenus par une camera Photometrics Quantix digital camera.

Dosages biochimiques

Les muqueuses gastriques ont été immédiatement prélevés et homogénéisées dans un tampon Tris-NaCl 50mM, pH 7,4. Les surnageants ainsi obtenus ont été utilisés pour les dosages biochimiques.

Dosage des protéines

La teneur en protéines totales a été déterminée selon la méthode de Biuret (1949). Les protéines sériques forment un complexe bleu-violet avec les sels de cuivre en milieu alcalin. Les teneurs en protéines de différents échantillons ont été directement déterminées.

Le peroxyde d'hydrogène

La détermination de H₂O₂ a été réalisée selon Dingleton et al., (1975). Brièvement, en présence de la peroxydase, le peroxyde d'hydrogène réagit avec l'acide p-hydroxybenzoïque et le 4-aminoantipyrine conduisant à une formation quantitative d'un quinoneimine qui a une couleur rose détectée à 505 nm.

Dosage de calcium

Le calcium forme avec le complexant crésolphtaléine en milieu alcalin un composé coloré en violet dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en calcium et détecté à 570 nm (Stern and Lewis, 1957)

Détermination de fer libre

Le dosage du fer tissulaire a été effectué selon la méthode de Leardi et al. (1998). Brièvement, à pH 4,8 le fer ferrique (Fe³⁺) est libéré instantanément de la transferrine. L'acide ascorbique le réduit en fer ferreux (Fe²⁺). La ferrozine forme avec le fer ferreux, un complexe coloré soluble, mesurable à 562 nm.

Analyse statistique

Les données ont été analysées par ANOVA et exprimées sous forme de moyenne ± erreurs standards. Si $p \leq 0,05$, la différence est considérée comme significative.

Résultats:-**Dénombrement de la flore microbienne**

Les trois groupes microbiens identifiés dans le lait de kéfir sont les lactobacilles, les lactocoques et les levures ont été dénombrés par comptage des colonies développées sur les milieux de culture sélectifs (Tableau 1).

Parmi les bactéries lactiques, les lactobacilles étaient plus nombreux d'un facteur de 10000 que les coques lactiques dans le lait de kéfir. Le nombre de lactobacilles a été augmenté dans le lait de kéfir associé à l'extrait de caroube (Tableau 1).

Tableau 1:-Dénombrement des groupes microbiens kéfir, l'extrait de caroube + grain de kéfir, et le mélange (extrait de caroube + kéfir) (en UFC /ml).

	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	Levures
Lait de Kéfir (K) (fermenté par les grains de kéfir)	7,96 ^b ± 0,03	3,77 ^a ± 0,02	6,7 ^b ± 0,02
Extrait de caroube + grain de kéfir (C)	4,9 ^a ± 0,04	3,8 ^a ± 0,02	6,78 ^b ± 0,06
Mélange extrait de caroube + grain de kéfir (KC)	8,3 ^c ± 0,06	4,39 ^b ± 0,1	5,54 ^a ± 0,09

^{a-c} : différentes lettres dans la même colonne indiquent une différence significative entre les produits, (p < 0,05)

Effet de lait de kéfir, de l'extrait de caroube et du mélange sur le développement de l'ulcère et la sécrétion du mucus

Les indices de l'ulcère (en mm²) et les pourcentages d'inhibition sont résumés dans le tableau 2. L'administration par gavage de l'éthanol 80% chez les rats entraîne un développement massif d'ulcère au niveau de l'estomac.

Le prétraitement des animaux par l'extrait aqueux de caroube, le kéfir et le mélange a diminué significativement la surface étendue de l'ulcère moyenne. En effet, cette surface a été réduite significativement par rapport au groupe positif (Ethanol 80%) (Tableau 2). Une surface de $08,62 \pm 0,45 \text{ mm}^2$ est observée pour les rats traités par le mélange à une dose de 20mL/kg. Pour la même dose, cette surface est de $25,34 \pm 2,17 \text{ mm}^2$ et de $36,34 \pm 2,96 \text{ mm}^2$ pour les rats traités par l'extrait de caroube et le lait de kéfir, respectivement. La gastroprotection s'accompagne d'une augmentation significative de la sécrétion du mucus gastrique. Cette gastroprotection est plus importante chez les rats traités par les mélanges. Le volume du mucus, traité par le mélange kéfir et caroube $3,9 \pm 0,81 \text{ ml}$, alors que celui du mucus traité par la caroube ou le kéfir seul a presque la même valeur $2,80 \pm 0,32 \text{ ml}$. Le pH a augmenté significativement après le traitement par le lait du kéfir, la caroube ou le mélange. Tous ces changements ont été améliorés par la molécule de référence.

Tableau 2:-Effet de caroube, de kéfir et du mélange et la molécule de référence sur le développement de l'ulcère, la sécrétion du mucus et la variation de son pH.

Groupes		Volume du mucus (mL)	pH	Indice d'ulcère (mm ²)	Pourcentage de protection (%)
A Contrôle	50mg/kg	$4,3 \pm 0,70$	7,05	-	-
B EtOH	80%	$1,9 \pm 0,20$	4,05	$53,41 \pm 5,23$	-
EtOH + caroube					
C	50mg/kg	$2,00 \pm 0,62^{*#}$	4,50*	$51,45 \pm 3,56$	3,7
D	100mg/kg	$2,52 \pm 0,24^{*#}$	7,43 [#]	$38,34 \pm 1,78^{\#}$	28,3
E	200mg/kg	$2,80 \pm 0,32^{*#}$	7,85 [#]	$25,34 \pm 2,17^{\#}$	52,60
EtOH+ Kéfir					
F	5mL/kg	$1,86 \pm 0,77^*$	5,6*	$55,82 \pm 5,11$	-
G	10mL/kg	$2,42 \pm 0,37^*$	6,1 ^{*#}	$44,45 \pm 3,45^{\#}$	16,85
H	20mL/kg	$2,8 \pm 0,31^{*#}$	7,66 [#]	$36,34 \pm 2,96^{\#}$	31,93
EtOH+ mélange					
I	5mL/kg	$2,6 \pm 0,53^{*#}$	5,75 ^{*#}	$18,45 \pm 1,45^{\#}$	65,44
J	10mL/kg	$3,3 \pm 0,27^{*#}$	7,30 [#]	$13,00 \pm 1,01^{\#}$	75,65
K	20mL/kg	$3,9 \pm 0,81^{\#}$	7,90 [#]	$08,62 \pm 0,45^{\#}$	80,80
Famotidine	10mg/kg	$3,7 \pm 0,45^{\#}$	6,95 [#]	$16,23 \pm 3,12^{\#}$	69,61

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=6). #: $p < 0,05$: la différence est significative comparativement au groupe de l'éthanol. *: $p < 0,05$: la différence est significative comparativement au groupe de contrôle.

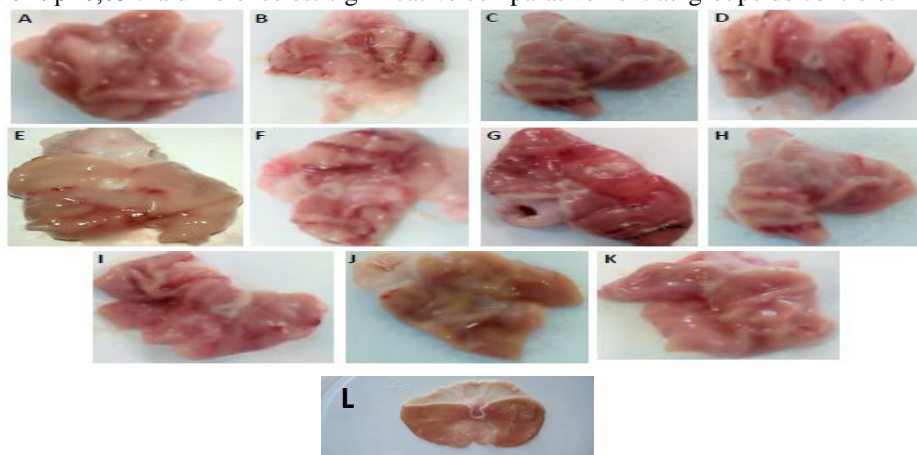


Figure 1:-Analyse macroscopique des estomacs ulcérés.

(A: contrôle; B: EtOH; C: EtOH + caroube (50mg/kg); D: EtOH+ Caroube (100mg/kg); E: EtOH + caroube (200mg/kg); F: EtOH+ kéfir (5mL/kg); G: EtOH + kéfir (10mL/kg); H: EtOH + kéfir (20mL/kg); I: EtOH+ mélange (5mL/kg); J: EtOH+ mélange (10mL/kg); K: EtOH+ mélange (20mL/kg) ; L Famotidine (10 mg/kg).

L'examen macroscopique des muqueuses gastriques est illustrée par la figure 1. Une muqueuse abîmée, des lésions hémorragiques importantes et profondes de couleur rouge foncée ont été observées chez les rats du groupe (ulcère) qui sont soumis à l'éthanol (4g/kg) et sans aucun traitement préliminaire (Figure 1B). Contrairement à l'estomac sain (contrôle) qui ne présente aucune de ces caractéristiques (Figure 1A). Des lésions de moins en moins importantes ont été observées pour des estomacs traités avec des concentrations croissantes de l'extrait de caroube (50, 100 et 200mg/ml) pour C, D, et E, respectivement.

D'une façon générale, des lésions modérées ont été observées aux seins des estomacs traités (E, H, I) : avec, E: EtOH et caroube à 200mg/kg, H: EtOH et kéfir à 20mL/kg; I: EtOH et le mélange kéfir caroube à 5mL/kg. Les lésions sont rétablis avec une dose dépendante lors du traitement par le mélange kéfir-caroube (Figure 1 I, J, k). La figure 1k est comparable à celle du contrôle. Le mélange testé a un effet important contre l'ulcère.

Effet de lait de kéfir, de l'extrait de caroube, et du mélange sur la variation des paramètres biochimiques

Dans la présente étude, l'effet de l'éthanol (80 %), du lait de kéfir et de l'extrait aqueux de caroube a été étudié sur le niveau des médiateurs intracellulaires tels que le calcium, le fer et le H₂O₂ au niveau de la muqueuse intestinale (Tableau 3). Une augmentation significative du volume du mucus gastrique a été observée (Tableau 2).

Le prétraitement des animaux par l'extrait aqueux de caroube, le kéfir ou le mélange à des doses croissantes protège d'une manière significative et dose-dépendante contre tous ces changements induits par l'EtOH.

Le prétraitement par les différents boissons: l'extrait aqueux de caroube, lait de kéfir et le mélange avec les différentes doses montre une augmentation de taux des protéines. Cette augmentation se fait d'une manière significative et dose-dépendante. La même action de protection a été observée chez le groupe des rats traités par la famotidine (10mg/kg de poids corporel) (Figure 1 L).

Tableau 8:-Effet de caroube, de kéfir, du mélange et la molécule de référence sur la variation des paramètres biochimiques suite à l'intoxication des rats par l'éthanol 80%.

Groupes	Protéines (mg/mL)	H ₂ O ₂ (mmol/mg protéines)	Calcium (µmol/mg protéines)	Fer (µmol/mg protéines)
A Control	23,98 ± 4,34	8,25 ± 1,33	18,00 ± 0,56	35,00 ± 4,27
B EtOH	14,65 ± 5,34	18,34 ± 2,76	06,15 ± 0,06	16,56 ± 2,45
EtOH + caroube				
C 50mg/kg	33,22 ± 4,62 ^{*#}	17,45 ± 3,21 [*]	18,34 ± 3,24 [#]	15,44 ± 2,35 [*]
D 100mg/kg	33,78 ± 3,65 ^{*#}	12,63 ± 2,00 [#]	22,43 ± 1,02 [#]	37,54 ± 4,41 [#]
E 200mg/kg	36,86 ± 6,72 ^{*#}	10,34 ± 1,76 [#]	28,00 ± 4,24 ^{*#}	38,71 ± 6,22 [#]
EtOH+ Kéfir				
F 5mL/kg	38,53 ± 6,77 ^{*#}	17,48 ± 3,66 [*]	09,57 ± 1,28 [*]	21,22 ± 3,69 [*]
G 10mL/kg	39,45 ± 4,67 ^{*#}	15,33 ± 1,34 [*]	24,64 ± 4,46 [#]	34,32 ± 3,76 [#]
H 20mL/kg	45,81 ± 7,41 ^{*#}	12,78 ± 1,94 [#]	35,66 ± 6,46 ^{*#}	42,54 ± 5,21 [#]
EtOH+ mélange				
I 5mL/kg	24,75 ± 4,83 [#]	16,55 ± 2,00 [*]	20,12 ± 4,77 [#]	36,36 ± 4,54 [#]
J 10mL/kg	46,34 ± 6,23 ^{*#}	5,42 ± 0,62 [#]	28,00 ± 5,52 ^{*#}	45,53 ± 4,27 ^{*#}
K 20mL/kg	53,23 ± 3,81 ^{*#}	2,77 ± 0,21 ^{*#}	36,55 ± 6,18 ^{*#}	56,65 ± 6,67 ^{*#}
Famotidine 10mg/kg	20,23 ± 1,56 [#]	11,54 ± 1,33 [#]	16,49 ± 1,44 [#]	32,90 ± 1,38 [#]

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=6). #: p<0,05 : la différence est significative comparativement au groupe de l'éthanol. *: p<0,05 : la différence est significative comparativement au groupe de contrôle.

Discussion:-

Dans le but d'étudier l'effet gastroprotecteur du mélange lait de kéfir enrichi à la caroube, un modèle d'ulcération a été appliqué chez les rats, celui des lésions induites par l'éthanol (80%). L'indice d'ulcère et le volume de muqueuse ont été déterminés. L'influence de ce traitement sur les médiateurs cellulaires, à savoir le H₂O₂, le Fer et le calcium a été également étudiée.

L'éthanol est bien utilisé pour induire l'ulcère chez les rats, comme modèles expérimentaux (Miller et Henagan, 1984). Ce produit stimule la sécrétion de l'acide gastrique entraînant des dommages au niveau de la muqueuse gastrique (Figure 1B)

Les résultats se concordent avec celles des pourcentages de protection dont lesquelles le mélange lait de kéfir et l'extrait aqueux de caroube a montré un effet puissant aux concentrations de 20 ml/kg et 20 mg/kg. En effet, ces deux concentrations ont montré une activité inhibitrice la plus élevée. D'ailleurs, ces lésions ont été rétabli macroscopiquement après l'administration du mélange à une dose de 20 ml/kg (PC, *p.o.*) (Figure 1K).

Le rôle protecteur de la caroube est largement décrit dans la littérature (Rtibi et al. 2017, Ionnanis et al 2018). Ce potentiel peut être dû à la richesse de cette plante aux différents métabolites secondaires. En effet, l'analyse phytochimique de l'extrait a montré une composition riche en polyphénols dont les flavonoïdes et les tannins condensés. La composition de l'extrait aqueux a été mentionnée dans une étude précédente où les principaux composés sont le pyrogallole, la catéchine l'acide tannique au niveau de la pulpe (Rtibi et al. 2015). Ces composés phénoliques de la caroube présentent une activité anti-inflammatoire et possèdent un potentiel gastro-protecteur (Romier et al. 2009). Par ailleurs, Temiz et al (2015) discutent ce rôle protecteur en relation avec les propriétés antioxydantes de ces composés. En effet, la capacité antioxydante de ces composés phénoliques est principalement attribuée à leurs propriétés d'oxydo-réduction.

Selon De Souza Almeida et al., (2011), la participation des mécanismes antioxydants dont les actions gastroprotecteurs, est d'empêcher les dommages oxydants de la muqueuse gastrique.

Les tanins, par leur nature polyphénolique d'une part, présentent une propriété cytoprotectrice qui sont liés à l'action anti-ulcérogène des différentes plantes. D'autre part, ils peuvent neutraliser l'ulcère du fait de leur effet sur la précipitation protéique et des effets vasoconstricteurs (Arawwawala et al., 2014). Leurs actions astringentes peuvent aider à la précipitation des microprotéines sur le site de l'ulcère, formant ainsi une couche imperméable. Ainsi, ils empêchent les sécrétions intestinales et protègent la muqueuse sous-jacente des toxines et d'autres irritants (Melo et al., 2012).

L'efficacité anti-ulcère des flavonoïdes a également été confirmée. Leurs capacités de protection de la muqueuse gastro-intestinale contre des lésions produites par divers modèles expérimentaux d'ulcère et contre différents agents nécrotiques ont été mentionnées par Doronicheva et al. (2007).

De plus, une synergie a été observée en associant l'extrait aqueux de caroube avec le kéfir. En effet, un pourcentage de protection variant de 65 à 80% a été observée pour le mélange, alors que ce pourcentage est de 16 à 31% pour le kéfir seul, est de 3 à 52 % pour l'extrait de caroube. En effet, les travaux de Fahmy et Ismail 2015 mentionnent le rôle pharmacologique du kéfir contre l'ulcère induit par l'alcool. Ce rôle étant attribué à sa composition. Ce lait fermenté héberge plus que 30 espèces de bactéries lactiques, acétiques et de levures (Zubillaga et al 2001). Certains de ces bactéries ont été attribués à des bactéries probiotiques, utilisés comme aliment fonctionnel contribuent à rétablir l'équilibre microbien et le traitement des modifications gastro-intestinales (Lam et al. 2007). En général les bactéries lactiques sont plus abondantes (10⁸ –10⁹ UFC/ml) que les levures (10⁵ –10⁶ UFC/ml) et les bactéries acétiques sont de l'ordre de (10⁵ –10⁶ UFC/ml) (Garrote et al., 2001).

Le kéfir est bien utilisé en Russie pour le traitement du cancer et aussi comme remède pour les patients souffrant de problèmes gastriques (Koroleva 1988).

Selon la littérature, la population microbienne trouvée dans les grains du kéfir se manifeste essentiellement par une microflore banale, composée de bactéries lactiques et de levures, accompagnées généralement de bactéries acétiques et/ou de microcoques. L'association caroube et lait de kéfir, une association prébiotique –probiotique encore appelé association synbiotique améliorant l'implantation de la microbiote intestinale puisque une inflammation est une

cause ou une conséquence d'un microbiote intestinal altéré. Cette combinaison de prébiotique et de probiotique montre des effets synergiques (Reddy et al., 2011). Cette association (échantillon KC) montre un nombre important de *Lactobacillus* de $8.3 \pm 0,06 \log$ UFC/ml, plus élevée que ceux dénombrés dans le lait (K) $7,96 \pm 0.03 \log$ UFC/ml. Une telle association n'a pas été citée dans la littérature pour le traitement des ulcères gastriques. Il est à noter que le lait et les produits laitiers ont été reportés bénéfiques pour la santé et présente des propriétés gastroprotectrices (Yoo et al., 2018). La thérapie par le lait de chèvre pour le traitement des ulcères est rare, bien que le concept d'aliment fonctionnel soit attribué au lait de chèvre (Ribeiro and Ribeiro, 2010).

Seule l'étude conduite par Fahmy et Ismail (2015), l'administration du lait de vache fermenté par les grains du kéfir empêche le développement d'ulcère chez des rats. Ses effets physiologiques sont attribués à ses propriétés anti-oxydants et anti-apoptotiques. Orhan et al. (2012) montre que la consommation du kéfir chez les rats empêche l'induction de l'ulcère avec une augmentation du mucus gastrique secrété, ce qui est en accord avec nos résultats.

Conclusion:-

La combinaison de la caroube et le kéfir permet de réduire fortement l'ulcère gastrique induit par l'éthanol chez des rats. Cet effet serait lié à leurs compositions caractérisées par la présence des composés bioactifs. Sous réserve d'analyses plus poussées, la mise au point d'un bio-médicament contre l'ulcère gastrique à base d'un mélange de caroube et de kéfir pourrait être envisageable.

References:-

1. Arawwawala, L.D.A.M., Arambewela, L.S.R. et Ratnasooriya, WD. (2014). Effet gastroprotectrice de piper betle linn feuilles cultivées au sri Lanka. Article de recherche originale: expérimental, 5(1) : 38-42.
2. Corsi, L., Avallone, R., Cosenza, F., Farina, F., Baraldi, C., Baraldi, M. (2002). Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia*, 73(7) : 674- 684.
3. Digeon B, Ferry JP, Rouillet A.(1975) Automatic assay of blood sugar by Trinder's method. *Ann Biol Clin*. 33:3-13.
4. Diniz, R., Garla, L., Schneedorf, J., and Carvalho, J. C. (2003). Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix. *Pharmacol. Res.* 47 : 49-52.
5. De Souza Almeida ES, Filho VC, Niero R, Classen BK, Balogun SO, De Oliveira MDT (2011). Pharmacological mechanisms underlying the anti-ulcer activity of methanol extract and canthin-6-one of *Simaba ferruginea* A. St-Hil. in animal models 12;134(3):630-6. doi: 10.1016/j.jep.2011.01.009.
6. Doronicheva, N., Yasui, H., Sakurai, H. (2007). Chemical structure-dependent differential effects of flavonoids on the catalase activity as evaluated by a chemiluminescent method. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(2) : 213- 217.
7. Durazzo, A., Turfani, V., Narducci, V., Azzini, E., Maiani, G., & Carcea, M. (2014). Nutritional characterisation and bioactive components of commercial carobs flours. *Food Chemistry*, 153 : 109-113.
8. Farnworth, E.R., 2005. Kefir—A Complex Probiotic. *Food Science Technology Bulletin: Functional Foods* 13 May.
9. Farnworth ER, Mainville I (2008) Kefir - A Fermented Milk Product. In: Farnworth, E. R. (2th ed.), *Handbook of Fermented Functional Foods* (2 ed). CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, p. 89-127.
10. Gao, J., Gu, F., Ruan, H., Chen, Q., He, J., and He, G. (2013). Induction of apoptosis of gastric cancer cells SGC7901 in vitro by a cell-free fraction of Tibetan kefir. *Int. Dairy J.* 30 : 14-18
11. Garrote G.L., Abraham A. G. & De Antoni G. L. (2001). Chemical and microbial characterisation of kefir grains. *J. Dairy Res.* 68 : 639-652
12. Hollander D, Taranawski A, Krause WJ, Gergely H. (1985). Protective effect of sucralfate against alcohol-induced gastric mucosal injury in the rat. *Gastroenterol.* 88 : 366-374.
13. Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, Constantina P. Kapnissi-Christodoulou. Polyphenols in carobs 52018). A review on their composition, antioxidant capacity and cytotoxic effects, and health impact Ioannis J. Stavrou, Atalanti Christou, Constantina P. Kapnissi-Christodoulou. *Food chemistry* 269 : 355-374.
14. Koroleva NS (1988). Kefir and kumy starters. *IDF Bulletin* 1988; 227: 96-100.
15. Lam EK, Tai EK, Koo MW, Wong HP, et al., Enhancement of gastric mucosal integrity by *Lactobacillus rhamnosus*. *GG. Life Sci.* 80 (2007) 2128-2136.

16. Lee M, Ahn K, Kwon O, Kim M et al., (2007). Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. *Immunobiol.* 212 647-654.
17. Leardi A, Caraglia M, Selleri C, Pepe S, Pizzi C, Notaro R. 1998. Desferioxamine increases iron depletion and apoptosis induced by ara-C of human myeloid leukaemic cells. *Br J Haematol.*102:746–52.
18. Loeb JH, Vandenplas Y, Wursch P, Guesry P (1989). Tannin-rich carob pod for the treatment of acute-onset diarrhea. *J. Paediatr. Gastroenterol. Nutr.* 8 (4) (1989) 480–485.
19. Miller T A, Henagan JM, Indomethacin decreases resistance of gastric barrier to disruption by alcohol. *Dig. Dis. Sci.* 29 (1984) 141–149.
20. Naghmouchi, S., Khouja, M. L., Romero, A., Tous, J., Boussaid, M. (2009). Tunisian carob (*Ceratonia siliqua* L.) populations: Morphological variability of pods and kernel. *Scientia Horticulturae*, 121(2), 125-130.
21. Orhan YT, Karagözü C, Sarioğlu S, Yılmaz O, Murat N, Gıdener S. (2012) A study on the protective activity of kefir against gastric ulcer. *Turk J Gastroenterol.* 2012 Aug; 23(4):333-8.
22. Prado M.R., Garcia L, Vandenberghe, Rodrigues, Castro, Soccol V. 2015 Milk kefir : composition, microbial cultures, biological activities and related products. *Frontiers in Microbiology.* 6 : 1177.
23. Pop C , Apostu S , Salanta L , Rotar AM, Sindic M , Mabon N , Socaciu C. 2014. Influence of Different Growth Conditions on the Kefir Grains Production, used in the Kefiran Synthesis . *Bulletin UASVM Food Science and Technology* 71(2)
24. Quirós, A., Hernández-Ledesma, M., Ramos, L., Recio, I. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine Kefir. *Journal of Dairy Science*, 88, 3480–3487.
25. Reddy RS, Swapna LA, Ramesh T, Singh TR, (2011) Bacteria in oral health – Probiotics and Prebiotics. A Review. *Int J Biol Med Res.* 2, 1226 -1233.
26. Rtibi, K., Jabri, M. A., Selmi, S., Souli, A., Sebai, H., El-Benna, J., Amri, M., & Marzouki, L. (2015a). Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) inhibit human neutrophils myeloperoxidase and in vitro ROS-scavenging activity. *Rsc Advances*, 5(102), 84207-84215.
27. Rtibi, K., Jabri, M. A., Selmi, S., Souli, A., Sebai, H., El-Benna, J., Amri, M., & Marzouki, L. (2015b). Gastroprotective effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) against ethanol-induced oxidative stress in rat. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 292.
28. Rtibi, K., Selmi, S., Grami, D., Amri, M., Eto, B., El-Benna, J., Sebai, H., & Marzouki, L. (2017). Chemical constituents and pharmacological actions of carob pods and leaves (*Ceratonia siliqua* L.) on the gastrointestinal tract: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 93 : 522-528.
29. Rtibi, K., Selmi, S., Grami, D., Saidani, K., Sebai, H., Amri, M., Eto, B., Marzouki, L. (2017). *Ceratonia siliqua* L. (immature carob bean) inhibits intestinal glucose absorption, improves glucose tolerance and protects against alloxan-induced diabetes in rat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(8) : 2664-2670
30. Rejeb M N (1995). Le caroubier en Tunisie: Situations et perspectives d'amélioration. Dans *Quel avenir pour l'amélioration des plantes?* Edit. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris,79–85.
31. Ribeiro AC, , Ribeiro SDA, 2010. Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Research* 89, 225–233.
32. Rizk, S., Maalouf, K., and Baydoun, E. (2009). The Antiproliferative effect of kefir cell-free fraction on HuT-102 malignant T lymphocytes. *Clin. Lymphoma Myeloma* 9 : 198–203.
33. Romier B, Schneider Y J, Larondelle Y, During A, (2009). Dietary polyphenols can modulate the intestinal Inflammatory response, *Nutr. Rev.* 67 : 363–378.
34. Satir, G., Güzel-Seydim, Z.B. (2015). Influence of Kefir fermentation on the bioactive substances of different breed goat milks. *LWT - Food Science and Technology*, 63 (2) 852-858.
35. Sebai H, Souli A, Chehimi L, Rtibi K, Amri M, El-Benna J, Sakly M. (2013) In vitro and in vivo antioxidant properties of Tunisian carob (*Ceratonia siliqua* L.), *J. Med. Plant Res.* 7 : 85–90.
36. Souli A, Sebai H, Chehimi L, Rtibi K, Tounsi H, Boubaker S, Sakly M, El-Benna J, Amri M (2015). Hepatoprotective effect of carob against acute ethanol induced oxidative stress in rat. *Toxicology and Industrial Health.* Sep;31(9):802-10. doi: 10.1177/0748233713475506.
37. Selmi S, Rtibi K, Grami D, Sebai H, Marzouki L. (2017). Protective effects of orange (*Citrus sinensis* L.) peel aqueous extract and hesperidin on oxidative stress and peptic ulcer induced by alcohol in rat. *14;16(1):152.* doi: 10.1186/s12944-017-0546-y.
38. Stern J, Lewis WH. 1957. The colorimetric estimation of calcium in serum with o-cresolphthalein complexone. *Clin Chim Acta.* 2:576–80.
39. Temiz M A, , Temur A, and Çelik I, Antioxidant Role and Hepatoprotective Effects of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Seeds against Ethanol-Induced Oxidative Stress in Rats, *J.Food Nutr. Res.*, 2015, 3, 57–61.

40. Verbeke, W (2005). Consumer acceptance of functional foods: Socio-demographic, cognitive and attitudinal determinants. *Food Quality and Preference*, 16: 45-57.
41. Yoo JH, Lee JS, Lee YS, Ku S, Lee HJ. (2018). Protective effect of bovine milk against HCl and ethanol-induced gastric ulcer in mice *J. Dairy Sci.* 101:1-13
42. Zubillaga M, Weill R, Postaire E, Goldman C, et al. (2001), Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutri Res.* 21 : 569-557.