

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A/Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de

Magister

En Microbiologie Appliquée

Présenté par : M^r SEBBANE Hillal

Thème

Essai de mise au point d'un yaourt infantile anti-diarrhéique

Devant le jury:

M^{elle} LOUAILECHE .H :	Présidente	Professeur	Université de Béjaia
M^{me} SADOON. D :	Rapporteur	Professeur	Université de Béjaia
M^{me} ZEBBOUDJ. A :	Examinatrice	Maître de conférences	Université de Béjaia
M^r ATMANI. D :	Examineur	Maître de conférences	Université de Béjaia
M^{me} AMRANE.Y :	Invitée	Docteur en Médecine	Béjaia

2007

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A la mémoire de mes grands parents (paternels et maternels) et à la mémoire de mon unique et seul oncle que Dieu, le tout puissant, les accueille dans son vaste paradis ;

A ma très chère et magnifique famille ;

A tous mes amis ;

A toutes les victimes du printemps noir ;

A tous ceux qui me sont chers.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie Appliquée au sein de l'équipe de Microbiologie du Lait et des Probiotiques.

Mes remerciements les plus sincères et les plus chaleureux s'adressent à ma promotrice Madame SADOUD D., Professeur à l'université de Béjaia, qui n'a jamais épargné ni son temps ni ses efforts pour me conseiller et m'orienter vers le meilleur. Qu'elle puisse trouver ici mes plus profondes gratitude.

Je remercie Mademoiselle LOUAILECHE H., Professeur à l'université de Béjaia, qui nous a fait l'honneur de présider le jury.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame ZEBBOUDJ A., Maître de conférences à l'université de Béjaia, d'avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur ATMANI D., Maître de conférences à l'université de Béjaia, pour nous avoir honoré par sa présence et d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'aimerais remercier également Madame AMRANE Y., Docteur en Médecine de nous avoir accueilli au niveau de son laboratoire pour réaliser les coupes histologiques et d'avoir accepté notre invitation.

Je remercie aussi Monsieur le Doyen de la faculté, pour tous les privilèges qui nous ont été accordés, d'être disposé pour nous écouter et de nous avoir autorisé à travailler dans l'animalerie.

Je n'oublie pas dans mes remerciements toute l'équipe du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (Mr SEBBANE; Mr SADOUD; Mr BENDJEDOU ; Mr BELHADI ; Mme FERRADJI, Melle BENDALI, Mr TOUATI; Mr SAHNOUNE et Mr MOUSSI...), pour leurs conseils et leurs aides.

Je remercie également Monsieur AMROUCHE, Monsieur MOKRANI , techniciens au laboratoire de microbiologie et Monsieur MANKOU et tous les agents de sécurité de l'université de Béjaia , pour leur soutien et disponibilité et de nous avoir facilité le travail.

Mes sincères reconnaissances vont à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Sommaire

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

Partie bibliographique

I. Lait infantile et le lactosérum	
1. Lait maternel	3
1.1. Composition du lait maternel	3
1.2. Protéines du lait maternel	3
1.2.1. Caséine du lait maternel	4
1.2.2. Protéines solubles du lait maternel.....	5
2. Le lait et le lactosérum	6
2.1. Le lactosérum	
2.1.1. Composition du lactosérum	6
2.1.2. Valorisation du lactosérum dans l'alimentation infantile	7
2.1.3. Formulation des lait infantiles.....	8
II. Le yaourt et les probiotiques	9
1. Le yaourt	9
1.1. Définition	9
1.2. Ecosystème du yaourt.....	9
2. Le yaourt et les probiotiques	10
III. Diarrhées et <i>Escherichia coli</i>	12
1. Gastro-entérites aiguës	13
2. Diarrhées à <i>E. coli</i>	13
2.1. Différentes diarrhées à <i>E. coli</i>	13
2.1.1. Diarrhée à EHEC.....	13
2.1.2. Diarrhée à ETEC	14
2.1.3. Diarrhée à EIEC	14
2.1.4. Diarrhée à EAEC	14
2.1.5. Diarrhée à EPEC	15
3. Traitement et prévention des diarrhées	16

IV. Le tube digestif du lapin.....	20
------------------------------------	----

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

I. Isolement et identification des souches	22
1. Origine des souches utilisées	22
2. Milieux de culture utilisés	22
3. Détermination de l'acidité Dornic	22
4. Protocole d'identification des bactéries thermophiles du yaourt	23
4.1. Isolement et purification des souches	23
4.2. Conservation et entretien des souches	25
4.3. Identification des souches.....	25
5. Préparation du lait 1 ^{er} âge (lait écrémé additionné de lactosérum)	28
5.1. Reconstitution du lait écrémé	28
5.2. Préparation du lactosérum	29
5.2.1. Préparation de solution de présure	29
5.2.2. Emprésurage	29
5.3. Préparation du mélange 50/50 lactosérum/lait (v/v)	29
II. Réalisation des rapports <i>Lb. bulgaricus/Sc. thermophilus</i>	30
1-Mise au point des préferments	30
2-Mise au point des différents rapports <i>Lb. bulgaricus/Sc. thermophilus</i>	32
III. Etude de l'antagonisme in vitro à l'égard d' <i>Escherichia coli</i> entéropathogène (EPEC).....	33
1. Test des puits	33
2. Etude de l'antagonisme en culture mixte avec les ferments du yaourt	33
III. Etude in vivo de l'effet antagoniste des ferments de yaourt à l'égard d'EPEC	35
1. Réalisation des préferments des souches utilisées	35
2. Recueil des selles	36
3. Inoculation des lapins	36
4. Méthodes d'évaluation	36

5. Dissection des lapins	37
6. Analyses statistiques	39
VI. Coupes histologiques	41
Résultats et discussion	
I. Isolement et identification des souches	
1. <i>Escherichia coli</i> entéropathogène (EPEC)	43
2. Les bactéries du ferment du yaourt	44
2.1. Identification du genre.....	44
2.2. Identification de l'espèce	45
II. Recherche du meilleur rapport <i>Lb. bulgaricus/Sc. thermophilus</i>	46
1. Rapport <i>Lb. bulgaricus /Sc. thermophilus</i> de 1/1	47
2. Rapport <i>Lb. bulgricus/Sc. thermophilus</i> de 1/2	48
3. Rapport <i>Lb. bulgaricus /Sc. thermophilus</i> de 2/1	49
III. Effet antagoniste <i>in vitro</i> de <i>Lb. bulgaricus</i> et <i>Sc. thermophilus</i> (dans un rapport de 2/1) à l'égard d'EPEC	51
1. Résultats du test des puits.....	51
2. Méthode directe en culture mixte	53
2.1 Culture pure	54
2.2. Culture mixte	54
VI. Etude <i>in vivo</i>	57
1. Dénombrements fécaux d' <i>E. coli</i>	57
2. Dénombrement d' <i>E. coli</i> dans l'intestin et le côlon des lapins	63
VII : Résultats des coupes histologiques	64
Conclusion	68
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau I : Composition en pourcentage des matières azotées du lactosérum.....	7
Tableau II : Exemples de microorganismes probiotiques étudiés	11
Tableau III : Les différents rapports <i>Lb. bulgaricus</i> / <i>Sc. thermophilus</i> mis au point dans le lait50/50(lait écrémé /lactosérum).....	32
Tableau IV : Différentes combinaisons réalisées pour l'étude de l'antagonisme <i>in vitro</i> des ferments du yaourt envers EPEC	34
Tableau V : Etape de la circulation (Déshydratation, éclaircissement et imprégnation	41
Tableau VI :Etape de la coloration histologique	42
Tableau VII : Résultats des tests d'identification d' <i>E. coli</i>	43
Tableau VIII : Aspects culturels de <i>E. coli</i> sur milieux gélosés.....	43
Tableau IX : Résultats des tests physiologiques des deux souches du yaourt isolées à partir du ferment lyophilisé.....	44
Tableau X : Résultats de la fermentation des sucres.....	45
Tableau XI : Dénombrement d' <i>E. coli</i> dans l'intestin et le côlon des lapins	63

Liste des tableaux en annexes

Annexe 1 : Données bibliographiques

Tableau I : Composition du lait de divers mammifères et vitesse de croissance de la progéniture

Tableau II : Composition protéique du lait humain.

Tableau III: Composition du lait de vache

Tableau IV: Composition protéique du lait

Tableau V : Comparaison entre la DBO_5 du lait et de ses dérivés

Tableau VI : Composition type de lactosérums doux et acide

Tableau VII : Teneurs indicatives du lait de femme, du lait de vache et des préparations infantiles destinées aux nourrissons de 4 à 6 mois.

Tableau VIII : Tableau d'identification de *Lactobacillus bulgaricus*.

Tableau IX : Tableau d'identification de *Streptococcus thermophilus*.

Annexe 2 : Résultats

Tableau I : Résultats de la mesure d'acidité en culture pure d'EPEC (témoin)

Tableau II: Résultats de la mesure d'acidité en culture mixte d'EPEC avec 3.10^7 /ml en ferments du yaourt

Tableau III: Résultats de la mesure d'acidité en culture mixte d'EPEC avec 3.10^8 /ml en ferments du yaourt.

Tableau IV: Résultats de la mesure d'acidité en culture mixte d'EPEC avec 3.10^9 /ml en ferments du yaourt.

Tableau V: Résultats des dénombrements d'EPEC (en log UFC) en culture pure.

Tableau VI : Résultats des dénombrements d'EPEC (en log UFC) dans la 1^{ère} combinaison.

Tableau VII : Résultats des dénombrement d'EPEC(en log UFC) dans la 2^{ème} combinaison

Tableau VIII : Résultats des dénombrement d'EPEC(en log UFC) dans la 3^{ème} combinaison

Tableau IX: Résultats *in vivo* des dénombrements d'*E. coli* des lapins non traités en log UFC/g de selle.

Tableau X: Résultats *in vivo* des dénombrements d'*E. coli* des lapins traités en log UFC/g de selles.

Tableau XI: Résultats des dénombrements de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* au rapport Lb/Sc de 1/1.

Tableau XII : Résultats des dénombrements de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* au rapport Lb/Sc de 1/2.

Tableau XIII: Résultats des dénombrements de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* au rapport Lb/Sc de 2/1.

Tableau XIV: Résultats de l'analyse de la variance de dénombrement de *E. coli* dans les selles des lapins au 1^{er} jour du traitement de la diarrhée.

Tableau XV: Résultats de l'analyse de la variance de dénombrement de *E. coli* dans les selles des lapins au 2^{ème} jour du traitement de la diarrhée.

Tableau XVI: Résultats de l'analyse de la variance de dénombrement de *E. coli* dans les selles des lapins au 3^{ème} jour du traitement de la diarrhée.

Tableau XVII: Résultats de l'analyse de la variance de dénombrement de *E. coli* dans les selles des lapins au 4^{ème} jour du traitement de la diarrhée.

Tableau XVIII: Résultats de l'analyse de la variance de dénombrement de *E. coli* dans les selles des lapins de 5^{ème} jour du traitement de la diarrhée.

Tableau XIX: Résultats de l'analyse de la variance de dénombrement de *E. coli* dans les selles des lapins au 9^{ème} jour du traitement de la diarrhée.

Tableau XX: Résultats de test de Student de dénombrement de *E. coli* dans les selles des lapins au cours de la période du traitement.

Tableau XXI: Diamètres des zones d'inhibition des surnageants de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* de l'antagonisme indirect des ferments du yaourt envers EPEC.

Annexe 3 : Composition des milieux de culture

Tableau I : MRS_C

Tableau II : M17

Tableau III : Milieu de fermentation des sucres pour *Sc. thermophilus*.

Tableau IV : Milieu de fermentation des sucres pour *Lb. bulgaricus*.

Tableau V : Milieu pour hydrolyse de la gélatine.

Tableau VI : Bouillon nutritif.

Tableau VII : VRBG (Gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre).

Tableau VIII : BCPL (Gélose lactosée au pourpre de bromocrésol).

Liste des figures

Figure 1: Les étapes de la virulence d'EPEC.....	16
Figure 2 : Action compétitive pour les sites d'adhésion par les probiotiques	19
Figure 3 : Appareil digestif du lapin.....	20
Figure 4 : Système d'amplification de la surface de la muqueuse intestinale.....	21
Figure 5: Protocole expérimental d'isolement, de purification et de caractérisation de caractérisation des souches du ferments du yaourt	24
Figure 6 : Protocole de sélection du meilleur rapport <i>Lb. bulgaricus/Sc. thermophilus</i>	31
Figure7 : Les différentes étapes de la dissection des lapins	38
Figure 8 : Photographie de <i>Lb. bulgaricus</i>	45
Figure 9 : Photographie de <i>Sc. thermophilus</i>	45
Figure 10 : Courbes de croissance de <i>Lb. bulgaricus</i> et <i>Sc. thermophilus</i> dans le rapport 1/1(au départ)	48
Figure 11: Courbes de croissance de <i>Lb .bulgaricus</i> et <i>Sc. thermophilus</i> dans le rapport de 1/2 (au départ)	49
Figure 12 : Courbes de croissance de <i>Lb. bulgaricus</i> et <i>Sc. thermophilus</i> dans le rapport de 2/1 (au départ)	50
Figure13 : Témoin du test des puits des bouillons MRS et M17	51
Figure14 : Test de puits avec le surnageant natif de <i>Lb. bulgaricus</i>	52
Figure15 : Test de puits avec le surnageant natif de <i>Sc. thermophilus</i>	52

Figure 16 : Les résultats de dénombrement des cellules d'EPEC viables dans les différentes combinaisons en culture mixte avec les ferments du yaourt et dans la culture témoin.....53

Figure 17 : Courbes de l'acidité Dornic dans les différentes combinaisons en culture mixte avec les ferments du yaourt et dans la culture témoin.....53

Figure18: Evolution des comptes fécaux d'*E. coli* dans les selles des lapins.....58

Figure 19: Photographies des coupes histologiques de l'intestin de lapins..... 66

Figure 20: Photographies des coupes histologiques du côlon de lapins..... 67

Liste des abréviations

Bf : *Bifidobacterium*

Bfp : Bundle-forming pili

E. coli : *Escherichia coli*

EAEC : *Escherichia coli* entéroagrégative

EHEC : *Escherichia coli* entérohémorragique

EIEC : *Escherichia coli* entéroinvasive

EPEC : *Escherichia coli* entéropathogène

ETEC : *Escherichia coli* entérotoxigène

GEA : Gastro-entérites aiguës

Lb. bulgaricus : *Lactobacillus bulgaricus*

MDa : Mégadalton

MS : Matières sèches

ORL : Otho-rhino-laryngologie

REPEC : Rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* (*Escherichia coli* entéropathogène des lapins)

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

Sc. thermophilus : *Streptococcus thermophilus*

Tir : Translocated intimin receptor

UFC : Unité formant colonies

Il : interleukine

TNF : Tumor necrosis factor

INF : Interféron

Introduction

A la naissance, les êtres humains sont « stériles ». Cet état dure un à deux jours, puis un grand nombre de microorganismes s'installe dans les cavités de l'hôte tel que le tube digestif. La flore microbienne du tube digestif se divise en flore dominante (*Bifidobacterium* et *Bacteroides*), flore sous-dominante (en particulier *Lactobacillus*) et en flore contaminante potentiellement pathogène. Cette microflore forme un écosystème dynamique et complexe dans lequel on dénombre, 10^{14} germes/g de selle appartenant à plus de 400 espèces. La flore endogène du tractus digestif est présente de façon permanente dans l'intestin et exerce de nombreuses fonctions physiologiques (fermentation, assimilation, synthèse de nutriments et stimulation du système immunitaire) ainsi qu'un effet de barrière face à la colonisation par des microorganismes pathogènes (Robin et Rouchy, 2001 ; Vizoso Pinto *et al.*, 2006).

Un changement quelconque dans la composition de cette flore peut conduire à des maladies dont la gravité varie selon les individus et l'agent causal.

Parmi la liste longue des maladies, les diarrhées bactériennes constituent un motif fréquent de recours aux soins. Dans les pays en développement, elles participent pour une grande part à la mortalité infantile et à la dénutrition chronique. Les diarrhées constituent la première cause de morbidité chez les enfants avant l'âge de 5 ans et restent un problème majeur dans le Monde surtout dans les pays en développement, dont on évalue de 5 à 10 millions par an, le nombre de morts par diarrhée infantile (Diouf *et al.*, 1990., Dupeyron 1997 ; Aumaître *et al.*, 2004).

Selon Benbernou et ses collaborateurs (2000), l'OMS estime le nombre d'épisodes diarrhéiques qui frappe annuellement les enfants de moins de 5 ans à 1,3 milliards (moins la Chine) et à 3,5 millions le nombre de décès attribuables à ces maladies. En Algérie, elles sont considérées comme la première cause de mortalité infantile et la 2^{ème} cause de morbidité après les infections respiratoires aiguës. En Algérie en 1999, 21692 enfants de moins de cinq ans ont été hospitalisés pour diarrhée dont 1374 décéderont par déshydratation. L'incidence est de 2,5 épisodes de diarrhée par enfant et par an, soit 10 millions de cas.

Théoriquement, l'éradication du germe causal par un antibiotique ciblé semble être une excellente approche du problème de la diarrhée. En pratique, cependant, on ne connaît pas le germe et on devrait donc recourir à un antibiotique à large spectre, dont l'efficacité sera toutefois limitée, par le fait que des résistances bactériennes émergent et que d'autres étiologies sont possibles (Urbain *et al.*, 2001).

Les effets probiotiques de la consommation des laits fermentés, surtout le yaourt qui est le plus consommé dans le Monde, ont été décrits dans plusieurs études.

Cependant, l'administration d'un lait infantile 1^{er} âge fermenté par *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* est-elle capable de modifier l'écosystème microbien du tube digestif du nourrisson afin de lutter contre les diarrhées infantiles ?

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude. Le principe consiste à traiter la diarrhée à *Escherichia coli* entéropathogène (EPEC) fortement impliquée dans les diarrhées en Algérie chez les enfants de moins de deux ans, par l'administration d'un lait 1^{er} âge à base de lactosérum, fermenté par un ferment de yaourt afin de lutter contre ce type de diarrhée.

Après confirmation de l'espèce des bactéries du ferment industriel de yaourt, la recherche du meilleur rapport *Lb. bulgaricus/Sc. thermophilus* permettra l'optimisation de la croissance de ces bactéries dans le lait 50/50.

L'étude *in vitro*, de l'effet antagoniste des bactéries du yaourt envers EPEC, sera réalisée par la méthode indirecte (test des puits) et par la méthode directe en utilisant des cultures mixtes d'EPEC avec des *inocula* croissants en ferments de yaourt avec le rapport entre les deux espèces, sélectionné au préalable.

Une expérimentation *in vivo*, sera effectuée sur des lapins holoxéniques rendus diarrhéiques par EPEC et traités avec le lait additionné de lactosérum mis au point et fermenté par *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Les coupes histologiques sur les intestins et les côlons des lapins utilisés seront effectuées afin de vérifier l'efficacité des ferments du yaourt sur la restructuration des villosités intestinales pour confirmer l'hypothèse de l'effet anti-diarrhéique des ferments du yaourt administrés et de leur effet thérapeutique contre ce type de diarrhée.

I. Lait infantile et lactosérum

1. Lait maternel

1.1. Composition du lait maternel

Le lait représente l'aliment idéal pour les nouveau-nés de mammifères, mais pour un temps limité et dans certaines conditions seulement d'état des réserves initiales, de comportement et de milieu de vie. Son intérêt nutritif se restreint encore s'il est destiné aux membres d'une autre espèce (John, 1995).

En effet, le tableau I (annexe1) montre clairement la différence dans la composition du lait de divers mammifères dont il ressort que le lait humain est le plus riche en lactose (70g/l) et le plus pauvre en cendres et protéines : 2 et 9g/l respectivement alors que les laits des autres espèces sont très riches en cendres et en protéines (Bunge, 1898).

La croissance du nourrisson est plus lente que celle des autres mammifères, ce qui permet de comprendre que les laits de ces derniers soient plus riches en protéines et en minéraux (en calcium notamment). C'est sur ces lacunes que doit se porter l'attention en nutrition humaine, non pas pour déprécier les autres laits, mais pour les utiliser avec discernement. En nutrition infantile, la composition du lait maternel est une sorte d'étalon, tout composé qui s'y trouve possède à priori une utilité nutritionnelle ou immunitaire (John, 1995).

1.2. Protéines du lait maternel

Le tableau II (annexe 1) montre la composition protéique du lait humain. La teneur en protéines du lait de femme (en moyenne de 10,60g/l) est nettement inférieure à celle des autres mammifères. Néanmoins, elle est parfaitement adaptée aux besoins du nourrisson en raison d'une excellente absorption et d'une parfaite adéquation du profil de ses acides aminés. Les protéines peuvent être partagées en deux grandes fractions d'après leur précipitation en milieu acide (pH 4,6). La fraction des caséines coagule dans ces conditions tandis que les autres protéines restent solubles (protéines sériques ou protéines du lactosérum). Ces dernières représentent environ 2/3 des

protéines totales du lait humain avec un pourcentage de 65%. Ce partage permet de définir un quotient formé par le rapport protéines solubles /caséines qui est voisin de 65:35, voire 70:30 et il peut être de 80:20 pour quelques auteurs. Pour certaines protéines sériques (immunoglobulines) qui ne relèvent pas de l'apport nutritif ce rapport pourrait être en termes nutritionnels fixé à 40:60, les caséines étant presque totalement assimilables (John,1995).

Selon Lara-Villoslada *et al.* (2005), le rapport protéines sériques/caséines est le déterminant dans les allergies chez les souris de 3 semaines. Les souris nourries avec un lait de vache modifié (rapport caséines/protéines sériques de 40:60), sont moins allergiques que celles nourries avec le lait de vache natif. En effet, le plasma des souris alimentées avec du lait de vache modifié présentent un niveau des IgG₁, de β -lactoglobuline plus bas que celles alimentées avec du lait

La formulation industrielle d'un lait infantile avec une teneur élevée en protéines n'a aucun intérêt, au contraire elle provoquerait des stress métaboliques et excrétoires chez l'enfant. C'est pour cette raison que la réduction de la teneur en protéines dans un lait infantile avec un rapport protéines sériques/caséines modifié (60:40 ou 50:50) est une source protéique beaucoup plus assimilable par les nourrissons (Dupon, 2003).

1.2.1. Caséines du lait maternel

Les caséines du lait de femme sont très spécifiques et ne représentent que 40% (1/3) des protéines contre 80% dans le lait de vache. Les caséines forment des micelles beaucoup plus petites que celles du lait de vache et il s'agit surtout de la caséine β dont l'hydrolyse conduit à des peptides (caséomorphine) à propriétés opioïdes et de la caséine κ hautement glycosylée, dont la fraction C terminale a des effets bifidogènes. Le pourcentage élevé de protéines solubles (60% de protéines totales) et la petite taille des micelles de caséines expliquent la coagulation plus fine du lait de femme dans l'estomac du nourrisson formant des floculats fins, qui contribuent à une vidange gastrique plus rapide ce qui permet une meilleure digestibilité du lait de femme par les nourrissons (Laurent, 2002 ; Turck, 2005).

Les micelles de caséines du lait humain sont beaucoup plus petites que celles du lait de vache. Une taille de 65 nm d'une micelle de caséine a pu être estimée par microscopie électronique (Lonnerdal, 1985).

1.2.2. Protéines solubles du lait maternel

L' α -lactalbumine : représente la plus grande quantité (environ 52% de protéines solubles et 34% de protéines totales) et elle existe dans tous les laits qui contiennent du lactose, étant le coenzyme de la synthétase qui catalyse la formation du lactose dans la glande mammaire. **La lactoferrine** (une glycoprotéine) représente un sixième environ des protéines du lactosérum (22 %) et elle peut fixer deux atomes de Fe^{3+} . Elle joue probablement un rôle primordial dans l'absorption intestinale du fer chez le nourrisson. Comme cette protéine n'est pas complètement dégradée au cours de la digestion et garde donc la capacité de fixer réversiblement le fer dans l'intestin, les bactéries fer dépendantes du tube digestif, particulièrement les Entérobactéries dont *Escherichia coli*, sont privées d'un nutriment essentiel à leur croissance, possédant ainsi un pouvoir bactériostatique puissant. **Le lysozyme** est une enzyme hydrolysant des liaisons glycosidiques particulières qui interviennent notamment dans la configuration des parois bactériennes. Le lait humain possède, grâce au lysozyme, un effet bactériolytique puissant de l'ordre de 100 à 10 000 fois plus élevé que chez d'autres mammifères. **L'albumine sérique** (sanguine) est aussi présente dans le lait à des taux intermédiaires entre la lactoferrine et le lysozyme (John, 1995).

Par contre, la **β -lactoglobuline** est absente dans le lait de femme ou se trouve sous forme de traces selon l'alimentation de la mère. Elle peut être incriminée dans l'allergie chez les nourrissons recevant du lait infantile quand leur muqueuse intestinale est très perméable (Laurent, 2002).

2. Lait et lactosérum

2.1. Le lactosérum

Le lactosérum est le sous-produit liquide provenant de la fabrication des fromages. Chaque fois qu'un industriel ou un artisan met en œuvre un litre de lait pour fabriquer un fromage, il y a production de 0,6 à 0,9 litre de lactosérum, généralement rejeté dans les eaux résiduaires. La question de la valorisation du lactosérum se pose de façon cruciale car son rejet engendre des effets polluants, entre autres par la consommation de l'oxygène dans les cours d'eau (Jacquet Violleau, 1999).

Le lactosérum est une matière noble et riche tant en qualité qu'en quantité. 4,2 milliards de litres de lactosérum représentent 290000 tonnes de matières sèches dont environ 38000 tonnes de protéines et 218000 tonnes de lactose auxquelles il conviendrait d'ajouter les vitamines et certains minéraux (APRIA, 1973).

2.1.1. Composition du lactosérum

Le lactosérum est la phase liquide se séparant du caillé lors de la transformation du lait en fromage ou de la production de caséine. Un lactosérum « acide » est obtenu après coagulation du lait par précipitation des caséines à leur pH isoélectrique qui est de 4,6. L'acidification peut être obtenue par fermentation lactique ou mixte. Par contre, si la coagulation du lait provient de la déstabilisation des micelles de caséines sous l'action de la présure, le lactosérum obtenu est dit « doux ». Le lactosérum est donc un milieu dilué complexe dont la composition dépend du lait d'origine et du procédé de coagulation des caséines. Le tableau VI (annexe 1) montre la composition des deux types de lactosérum (Jacquet Violleau, 1999).

Les lactosérums ont globalement une composition identique à celle du lait privé de sa caséine et de sa matière grasse. La matière sèche des lactosérums représente 0,7 % contre 915 à 940 ml d'eau. Globalement, les matières sèches contenues dans le lactosérum sont riches et pour 100g des matières sèches il y a : 70 à 80g de lactose; 10 à 14g de matières azotées; 7 à 12g de matière minérale; 0,05 à 0,6g de matières grasses et acidité 1,5 à 4g. Le pourcentage des matières azotées des lactosérums retrouvées

dans 10 à 14g dans 100g de matières sèches est donné dans le tableau I (APRIA, 1973).

Tableau I : Composition en pourcentage des matières azotées du lactosérum

Matière azotée (10 à 14g/100g de MS) de lactosérum	%
Azote non protéique	35
Protéines solubles	65
➤ Immunoglobulines	10
➤ β -lactoglobuline	55
➤ α -lactalbumine	20
➤ Sérum albumine	5
➤ Protéoses peptones	10

2.2.2. Valorisation du lactosérum dans l'alimentation infantile

De nombreux chercheurs ont étudié la mise au point de produits de remplacement du lait maternel. Ces produits doivent présenter une valeur nutritionnelle égale à celle du lait humain, pour être incorporés à des formules d'aliment pour bébés ainsi que pour être utilisés en alimentation mixte. Pour fabriquer de tels substituts du lait humain à partir du lait de vache, il est nécessaire d'utiliser les composants du lactosérum. D'après les tableaux I, III et IV (annexe 1), les principales différences entre le lait humain et le lait de vache sont la composition en protéines, composition en glucides et enfin la composition en minéraux dont on trouve trois fois moins de minéraux dans le lait humain que dans le lait de vache.

La déminéralisation du lactosérum est généralement réalisée par électrodialyse et par l'échange d'ions qui ne réduisent pas la teneur en vitamines (Boudier et Luquet, 1970).

2.2.3. Formulation des laits infantiles

La différence entre lait de vache et lait humain réside non seulement dans le rapport protéines sérique / caséines (60/40 dans le lait humain contre 20/80 dans le lait de vache) mais aussi dans les proportions de certaines protéines. Bien qu'au cours de la formulation des laits infantiles, le rapport protéines sériques/caséines est ramené au niveau autorisé, la concentration de β -lactoglobuline (absente dans le lait maternel) reste toujours élevée par rapport à l' α -lactalbumine (la plus abondante des protéines sériques du lait humain) (Turck, 2005).

Les travaux actuels portent sur l'enrichissement des laits infantiles en α -lactalbumine. En effet d'après Lien (2003), un lait infantile enrichi en α -lactalbumine (riche en tryptophane) contribue d'une part à la réduction de l'apport en caséine et à l'augmentation du pourcentage en protéines sériques dans la formulation et d'autre part à enrichir les laits infantiles en tryptophane qui est typiquement l'acide aminé limitant dans les formulations des laits infantiles. Cet enrichissement de ces dernières par l' α -lactalbumine conduit à l'augmentation de la concentration de tryptophane dans le sérum sanguin des enfants.

II. Le yaourt et les probiotiques

1. Le yaourt

1.1. Définition

Le yaourt est le lait fermenté grâce à l'action conjointe de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. Cette fermentation développe une activité lactasique, une hydrolyse partielle du lactose et une acidité Dornic de 80 à 100°D (environ pH4) qui provoque la coagulation de la caséine (Adrian, 1995).

Selon le guide Algérien de la répression des fraudes, le yaourt est un lait fermenté par le développement de deux bactéries lactiques spécifiques du yaourt (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) qui doivent êtreensemencées simultanément et doivent se retrouver vivantes dans le produit mis en vente (Boularak, 2005).

1.2. Ecosystème du yaourt

Les bactéries du yaourt font partie des bactéries lactiques. Elles peuvent avoir des formes en bâtonnets ou en cocci. Elles sont Gram +, immobiles et ne sporulent pas. Elles ont un métabolisme anaérobie facultatif, certaines sont des anaérobies strictes et ne produisent pas de catalase (Drouault et Corthier, 2001).

L'association des deux espèces : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* lors de la fermentation du yaourt est bénéfique pour les deux espèces, mais elle n'est pas indispensable pour leur survie. Cette interaction positive en culture mixte est liée à la différence en facteurs de croissance. *Sc. thermophilus* ne possède pas d'enzymes protéolytiques extracellulaires. Il a donc besoin d'acides aminés et peptides qui lui sont apportés grâce à l'activité protéolytique de *Lb. bulgaricus* qui présente une activité protéinasiq ue liée à sa membrane cellulaire. En revanche, la production de CO₂ et de l'acide formique par *Sc. thermophilus* au cours de la fermentation stimule la croissance de *Lb. bulgaricus* (De Roissart et Luquet, 1994; Kurultay *et al.*, 2005).

Le changement de température peut influencer sur la fermentation et peut favoriser l'une ou l'autre souche de ferment du yaourt. Effectivement, si la fermentation se déroule à une température au dessous de 43°C, cela va favoriser la croissance de *Streptococcus thermophilus*. La croissance de *Lb. bulgaricus* est favorisée à une température au dessus de 43°C (Lamontagne, 2002).

2. Le yaourt et les probiotiques

Elie Metchnikoff fut le premier à étudier l'effet des probiotiques, après constatation des peuples Caucasiens et leur consommation fréquente de laits fermentés, il suppose que l'acide lactique produit lors de la fermentation des produits laitiers pourrait prévenir les infections intestinales conduisant ainsi à la longévité de ces populations. Depuis, plusieurs chercheurs se sont intéressés aux effets probiotiques de la consommation des laits fermentés et du yaourt sur la santé (Heller, 2001).

Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants qui, une fois ingérés en quantité convenable, auront des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte en améliorant son équilibre microbien intestinal. Ce sont principalement des bactéries et des levures présentes ou non dans la microflore intestinale résidente. Les plus étudiés et utilisés sont les genres *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Bifidobacterium* qui appartiennent au groupe des bactéries lactiques, mais aussi *Enterococcus*, *Propionibacterium* et les levures (Moreau, 2001).

Selon Zurich (2002), les probiotiques doivent répondre à certaines exigences :

- Résistance à l'acidité gastrique, à la bile et à la flore intestinale
- Capacité de coloniser transitoirement la muqueuse intestinale
- Absence de pathogénécité

Le yaourt présente un intérêt probiotique pour le consommateur. La plupart de ses propriétés sont liées à l'ingestion des ferments vivants, dont certains peuvent survivre lors du transit digestif. *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* sont résistants à l'acidité gastrique, aux sels biliaires et à la flore intestinale. Ces ferments se retrouvent à des concentrations importantes, à différents niveaux du

tube digestif mais ne peuvent s'installer durablement dans les intestins (Dilmi Bouras et Sadoun, 2002).

Tableau II : Exemples de microorganismes probiotiques étudiés (Zurich, 2002)

Genres	Espèces
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i> <i>rhamnosus</i> <i>reuteri</i> <i>bulgaricus</i> <i>lactis</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>bifidum</i> <i>breve</i> <i>infantis</i> <i>longum</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>boulardii</i>

En plus de la survie des ferments du yaourt dans le tractus digestif, d'autres effets probiotiques peuvent être rattachés à la consommation du yaourt. Effectivement la consommation du yaourt est bénéfique pour les personnes ayant une intolérance au lactose (Martini *et al.*, 1987 ; Heyman *et* Ménard, 2002).

Une étude clinique sur des enfants diarrhéiques de 3 à 36 mois en Algérie, a montré une nette diminution et régression de la diarrhée avec moins de perte de poids chez les enfants recevant du yaourt uniquement. Seulement 14% des enfants qui recevaient du yaourt ont montré une perte de poids, contre 45% de perte de poids chez ceux recevant que du lait. Ces résultats attestent des avantages cliniques de la consommation du yaourt dans la lutte contre la diarrhée (Boudraa *et al.*, 1990).

Le yaourt et d'autres laits fermentés sont bénéfiques dans le traitement et la prévention de plusieurs types de diarrhées, ils modifient la microflore intestinale, stimulent et régulent l'activité du système immunitaire (Cathy et Saloff, 1995).

La plupart des bactéries lactiques utilisées dans la production des laits fermentés, synthétisent des métabolites tels que : le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, des acides organiques et des bactériocines ayant des activités antibactériennes à l'égard des bactéries pathogènes (Saavedra, 2001 ; Bourlioux *et al.*, 2002 ; Sullivan et Nord, 2005).

III. Diarrhées et *Escherichia coli*

1. Gastro-entérites aiguës

Les gastro-entérites aiguës (GEA) sont la première cause de décès des enfants dans les pays en voie de développement. Dans le Monde, le nombre de morts par diarrhée infantile est évalué à 5 à 10 millions par an. Malgré le niveau de vie élevé des Etats Unis, il est estimé que dans ce pays la diarrhée est responsable chaque année de 500 décès chez les enfants de moins d'un an. Dans les pays en voie de développement, les GEA de l'enfant sont en général plurifactorielles et résultent de la malnutrition, du sevrage précoce, de l'absence d'eau potable et des mauvaises conditions d'hygiène (Dupeyron, 1997 ; Courouble *et al.*, 2000).

Selon Diouf *et al.* (1990), les maladies diarrhéiques constituent à Dakar, la première cause de morbidité chez l'enfant de moins 5 ans, tandis que la malnutrition affecterait à des degrés divers plus de 60 % des enfants d'âge préscolaire. L'association diarrhée, malnutrition représente une préoccupation constante dans la pratique hospitalière quotidienne.

La gravité de ces infections est surtout liée à la déshydratation qui les accompagne. C'est en partie par une plus grande rapidité dans le diagnostic et la mise en œuvre des thérapies que l'on pourra diminuer l'incidence de ces infections. Trois groupes d'agents peuvent être responsables des diarrhées aiguës infectieuses : virus, bactéries et parasites. Comme ils peuvent se trouver associés dans une même selle au cours d'épisodes diarrhéiques (Dupeyron, 1997).

En effet, une étude épidémiologique, clinique et étiologique Ivoirienne sur les causes des diarrhées aiguës des enfants, a montré que sur les 101 enfants hospitalisés et admis pour une GEA : 92,1% étaient des malnutris. Les GEA s'accompagnaient de fièvre dans 31,7% des cas, de déshydratation dans 16,9% des cas dont 2% de déshydratation sévère. La diarrhée aiguë était associée à des maladies dans 60 % des cas dont 20,8% d'infections pulmonaires, 19,9% d'anémie, 11,9% d'infections ORL, 7,9% de paludisme et 3,8% des enfants avaient reçu des déparasitants avant l'admission ou la consultation. L'examen microbiologique des selles a permis d'isoler

chez 38 enfants: 20% de rotavirus, 6% de *Candida albicans*, 5% d'EPEC, 5% de *Salmonella*, 1% de *Shigella*, et 1% d'*Entamoeba histolytica* (Niangué-Beugré, 2006).

2. Diarrhées à *E. coli*

E. coli a été caractérisé pour la première fois par Theodor Escherich au début du 20^{ème} siècle. C'est un bacille, Gram - appartenant à la famille des Enterobacteriaceae et c'est le plus abondant des anaérobies facultatifs de l'appareil digestif de l'homme et des animaux (plus de 10⁸ UFC/g de selles). Il appartient au groupe des coliformes qui se caractérise par sa capacité de fermenter le lactose avec production de gaz et d'acide (Harris, 2006).

En se basant sur la sérotypie et les syndromes des maladies, les groupes d'*E. coli* virulents se divisent en : entérohémorragique (EHEC), entérotoxigène (ETEC), entéroinvasive(EIEC) entéroaggrégative (EAEC) , entérotoxigène (EPEC) (Nataro et Kaper, 1998).

2.1. Différentes diarrhées à *E. coli*

2.1.1. Diarrhée à EHEC

Actuellement, ces germes sont très étudiés. Ils sont responsables d'une diarrhée sanglante et de colites hémorragiques. Souvent la souche incriminée est *E. coli* O157H7 mais d'autres sérotypes peuvent être également mis en cause. Les EHEC secrètent une toxine proche de celle de *Shigella dysenteriae*. L'incidence de cette infection est croissante surtout en Amérique du nord, touchant particulièrement les enfants de moins de cinq ans et les adultes de plus de 65 ans. La viande hachée mal cuite et le lait cru seraient les principales sources d'infection. La gravité de l'infection vient de la possibilité de complications redoutables, syndrome urémique hémolytique. Les réservoirs sont surtout les bovins, ovins, caprins. Ils sont qualifiés de pathogènes émergents (Donnenberg *et* Whittam, 2001 ; Lema *et al.*, 2001 ; Garmendia *et al.*, 2005).

2.1.2. Diarrhée à ETEC

Les ETEC sont transmis par l'ingestion d'eau et d'aliments contaminés. Ils sont la principale cause de diarrhée chez l'enfant, surtout avant cinq ans, dans les pays en développement. Ils représentent aussi une des causes les plus importantes de diarrhée du voyageur. Les bactéries ingérées adhèrent à l'épithélium intestinal par un facteur d'attachement (fimbriae) et secrètent des entérotoxines (une toxine thermostable ST et une toxine thermolabile LT) qui vont être responsables d'une diarrhée aqueuse, s'accompagnant de nausées et vomissements, de douleurs abdominales, parfois de fièvre et de malaise général. L'évolution est brève, reliée seulement à l'élimination de la toxine car il n'y a pas de lésions histologiques (OMS, 2006).

2.1.3. Diarrhée à EIEC

Les EHEIC ont une parenté étroite avec les Shigelles, aussi bien morphologiquement que physiologiquement. Elles produisent la même vérotoxine avec un tableau dysentérique voisin. Les EIEC ont la capacité d'envahir les cellules épithéliales au niveau du côlon avec une multiplication intracellulaire provoquant la mort cellulaire. La dysenterie engendrée est caractérisée par la présence d'un mucus sanglant dû à la destruction des cellules du côlon et l'invasion est précédée par une diarrhée aqueuse (Hance *et al.*, 1998 ; Harris, 2006).

2.1.4. Diarrhée à EAEC

La diarrhée à EAEC est répandue dans les pays en voie de développement, les EAEC sont responsables de diarrhées persistantes et sont considérés comme des entéropathogènes émergents. Les EAEC possèdent des propriétés agrégatives (sous forme de briques empilées) dues à des fimbriae codées par un gène situé sur un plasmide de 60 MDa, provoquant une nécrose des pôles apicaux des microvillosités. Par l'intermédiaire de ce même plasmide, les EAEC peuvent synthétiser une toxine thermostable EAST1 possédant une homologie fonctionnelle partielle de 50% avec la

toxine thermostable ST des ETEC ce qui tend à confirmer les similarités pathogéniques entre les ETEC et les EAEC (Aumaître *et al.*, 2004).

2.1.5. Diarrhée à EPEC

Escherichia coli entéropathogène (EPEC) est la cause principale des diarrhées infantiles dans les pays en développement. Les germes responsables appartiennent en général à des sérotypes particuliers tel que O111B4. La transmission est interhumaine. La diarrhée peut être sévère et prolongée : selles aqueuses accompagnées d'une grande quantité de mucus, fièvre, vomissements. Le pouvoir pathogène est lié à l'adhésion aux anthérocytes, créant une destruction progressive de ceux-ci, associée ou non à l'action d'une cytotoxine (Knutton *et al.*, 1991 ; Cleary *et al.*, 2004).

La dose d'EPEC nécessaire pour causer l'infection ou la diarrhée se situe entre 10^5 à 10^{10} (Assous *et al.*, 1999 ; Harris, 2006).

Le mécanisme de virulence d'EPEC se résume en quatre étapes distinctes. Au départ, EPEC synthétise des facteurs déterminants dans la virulence qui sont codés par des gènes plasmidiques et chromosomiques. Ils sont présentés par : (Bfp) (bundle-forming pili), facteur d'adhésion intime et EspA filaments (surface-associated filaments). En second stade, les cellules d'EPEC adhèrent aux cellules épithéliales via Bfp et EspA filament qui est suivi par l'injection de Tir (translocated intimin receptor) ce qui conduit à la perte des microvillosités et la dépolymérisation d'actine. Au troisième stade, il y a perte des EspA filaments de la surface de la bactérie et l'adhésion de la bactérie est maintenue par une nouvelle structure formée par l'accumulation d'actine qui se lie au facteur d'adhésion intime via le Tir. Durant le quatrième stade, l'accumulation des éléments de cytosquelette au niveau du site d'attachement conduit au changement de la forme de cellule épithéliale caractéristique dû à l'infection d'EPEC. Les molécules ainsi transloquées, provoquent la perturbation des mécanismes des cellules épithéliales due à la perte d'intégrité du fonctionnement de la mitochondrie conduisant aux pertes d'électrolytes et éventuellement à la mort cellulaire (figure 1) (Collington *et al.*, 1998 ; Vallance *et al.*, 2000 ; Clarke *et al.*, 2003)

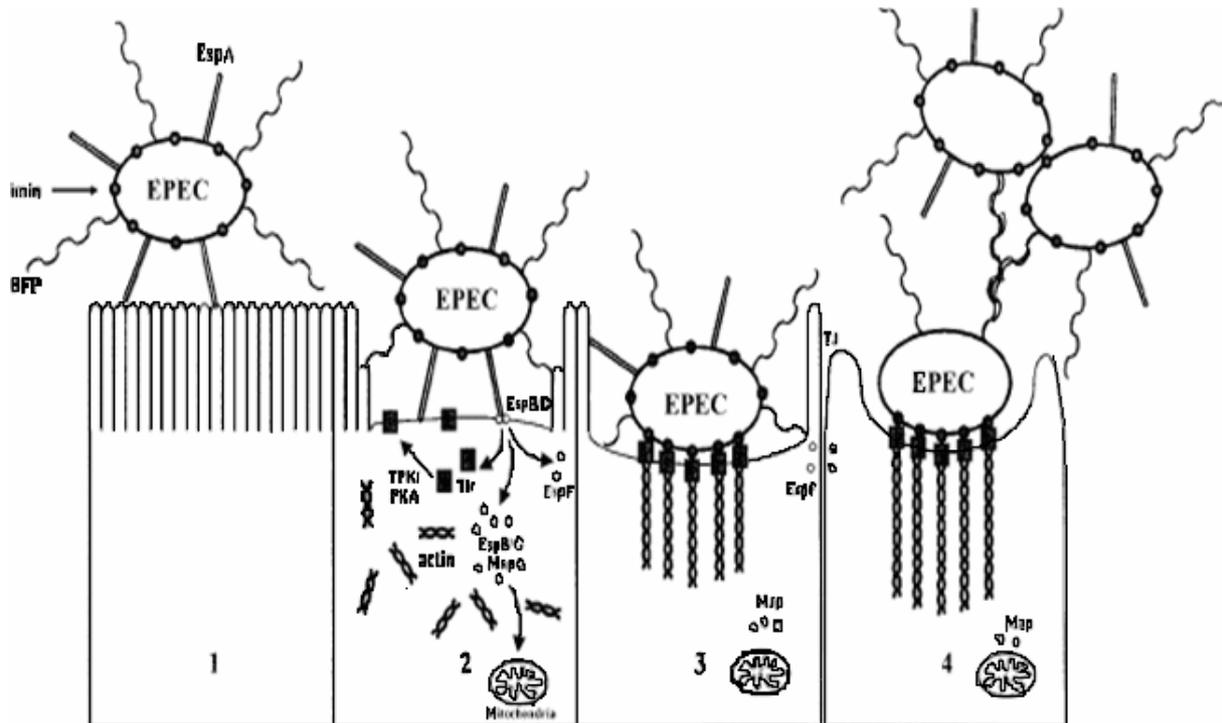


Figure 1: Les étapes de la virulence d'EPEC (Clarke *et al.*, 2003).

Selon Eberlin (1997), chez les EPEC, la colonisation s'effectue en deux étapes ; dans un premier temps, l'adhésion des bactéries aux microvillosités est assurée par l'intervention d'une adhésine plasmidique. Il s'ensuit une altération des microvillosités avec des bactéries adhérentes en chapelets sous forme de microcolonies. Dans un second temps, se produit une interaction plus étroite avec destruction des microvillosités.

2. Traitement et prévention des diarrhées

Selon Bocquet *et al.*(2002), la diarrhée est due à un déséquilibre entre l'absorption et la sécrétion intestinales d'eau et d'électrolytes, ce qui conduit à une importante perte de ces derniers. Depuis toujours, l'administration de liquide par voie orale en cas de diarrhée fait partie des remèdes traditionnels. Il y a 3000 ans, un médecin indien « Sushruta » recommandait déjà à ses patients présentant une diarrhée de boire de grandes quantités d'eau avec des morceaux de sel. La réhydratation orale et la réalimentation précoce constituent l'essentiel du traitement, où la réhydratation orale restaure l'équilibre hydroélectrique alors que la réalimentation précoce diminue

la fréquence et la durée des anomalies de la perméabilité intestinale évitant ainsi l'altération de l'état nutritionnel tout en réduisant la durée de la diarrhée. La place du traitement médicamenteux est secondaire.

L'objectif principal du traitement de la diarrhée est d'en réduire la gravité et notamment les complications telles que la déshydratation et la dénutrition. Le traitement repose essentiellement sur l'utilisation de solutions de réhydratation orales, la réalimentation précoce et les *probiotiques* ayant démontré une efficacité dont les *Lactobacillus* (Cézard *et al.*, 2002)

Selon la société Canadienne de Pédiatrie (2003), il faut éviter le recours systématique aux antibiotiques, compte tenu du risque d'aggravation du problème déjà considérable d'antibiorésistance des entéropathogènes.

Les probiotiques peuvent prévenir et guérir les diarrhées en entrant en compétition avec les agents pathogènes pour les sites de fixation des cellules épithéliales (figure 2). Ils peuvent inhiber aussi la croissance des bactéries pathogènes par production de bactériocines (De Roos et Katan, 1988).

Les probiotiques comme ceux qui se trouvent dans le yaourt, peuvent aider dans le traitement et la prévention de la diarrhée. L'effet préventif et curatif des bactéries du genre *Lactobacillus* sur la diarrhée est très étudié chez les enfants. L'administration orale de 10^9 UFC/ml de *Lactobacillus* réduit efficacement la durée de la diarrhée. L'effet probiotique de *Lactobacillus* peut être dû à la stimulation de la réponse immunitaire, l'élaboration des substances antimicrobiennes et la compétition aux sites d'attachement aux entérocytes (Corneluis *et al.*, 2002).

Certaines bactéries lactiques dont *Lb. bulgaricus* sont utilisées dans la prévention ou le traitement des diarrhées infectieuses et des troubles digestifs liés à la prise d'antibiotiques. Les diarrhées associées à la prise d'antibiotiques constituent un problème fréquent qui touche environ 20 % des patients hospitalisés et auxquels on administre des antibiotiques. Plusieurs essais ont montré l'efficacité des bactéries lactiques dans la prévention des perturbations liées à la prise d'antibiotiques. En effet, l'administration de *Lb. acidophilus* associée à un traitement antibiotique par l'ampicilline permet de prévenir ce genre de diarrhée (Drouault et Corthier, 2001 ; Heyman et Ménard, 2002).

L'étude menée en Algérie par Boudraa *et al.* (1994), a montré l'efficacité du traitement et de prévention de la diarrhée infantile chez les nourrissons ayant reçu du lait fermenté par *Bf. breve* et *Sc. thermophilus* par rapport au groupe qui n'a reçu que du lait infantile.

Les formes aiguës de diarrhée ne nécessitent pas souvent un traitement médical approfondi. Etant donné que la diarrhée induit des pertes d'eau importantes, il faut lutter de préférence contre la déshydratation en recourant à une solution de réhydratation par voie orale, d'un anti-diarrhéique et d'un antispasmodique en cas de douleurs abdominales. Les loperamides possèdent une action anti-diarrhéiques par deux mécanismes : inhibition de la motricité intestinale et diminution des sécrétions hydroélectriques. Les décès survenus après son utilisation ont conduit à contre indiquer formellement ce médicament avant l'âge de deux ans. Dans les formes sévères (fièvre, sang dans les selles, diarrhée très abondante), le suivi médical est indispensable. Le retour à une alimentation normale doit ensuite s'effectuer en douceur et devrait prévoir notamment une consommation de laits fermentés, afin de rétablir l'équilibre de la flore intestinale (Marteau *et al.*, 2001 ; Uhlen *et al.*, 2004).

En effet, une étude réalisée au Bangladesh sur 203 enfants âgés de plus de 2ans, montre que le traitement avec le probiotique *Lactobacillus paracasei* STII est efficace uniquement sur les diarrhées causées par les infections autres que celles à Rotavirus (Salminen, 2005).

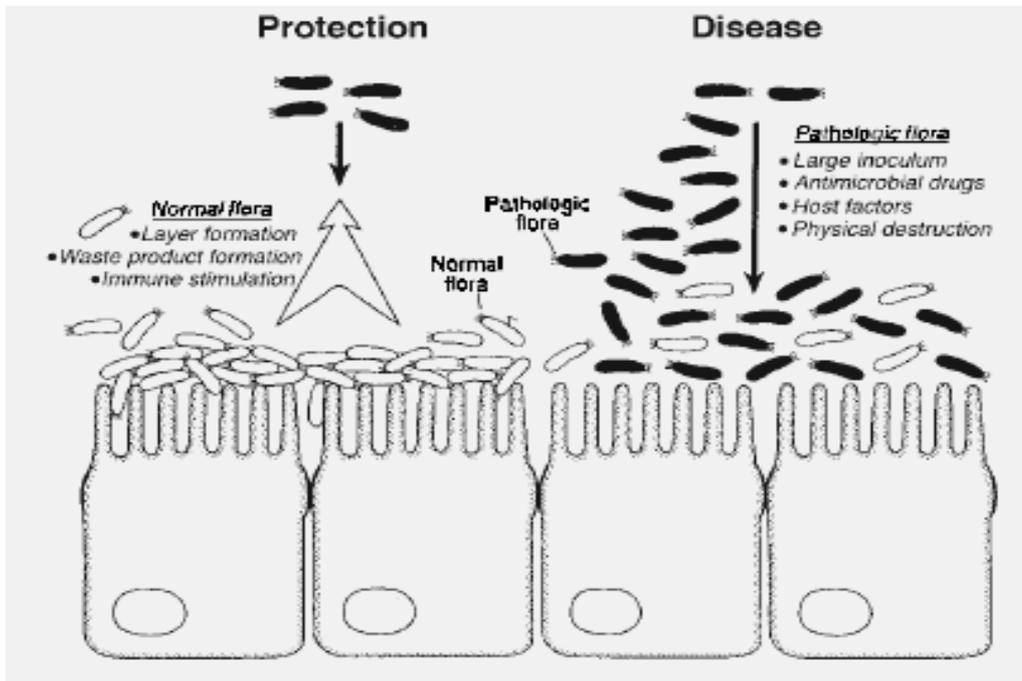


Figure 2 : Action compétitive pour les sites d'adhésion par les probiotiques (Lu et Walker, 2001).

IV. Le tube digestif du lapin

L'appareil digestif chez les mammifère est composé en générale d'une succession de compartiments dont la muqueuse est en contact avec le bol alimentaire : la bouche, l'oesophage, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum puis iléon), le cæcum, le côlon (proximal et distal), puis le rectum aboutissant à l'anus. Celui du lapin est très particulier : l'intestin grêle représente une faible part du tractus digestif (56% de la longueur et 12% du volume de l'ensemble intestin grêle-cæcum-côlon), alors que le cæcum est très développé : en volume, il représente 90% de l'ensemble intestin grêle-cæcum côlon, alors que pour la plupart des espèces domestiques, il compte seulement pour 4 à 11% de cet ensemble (figure3).

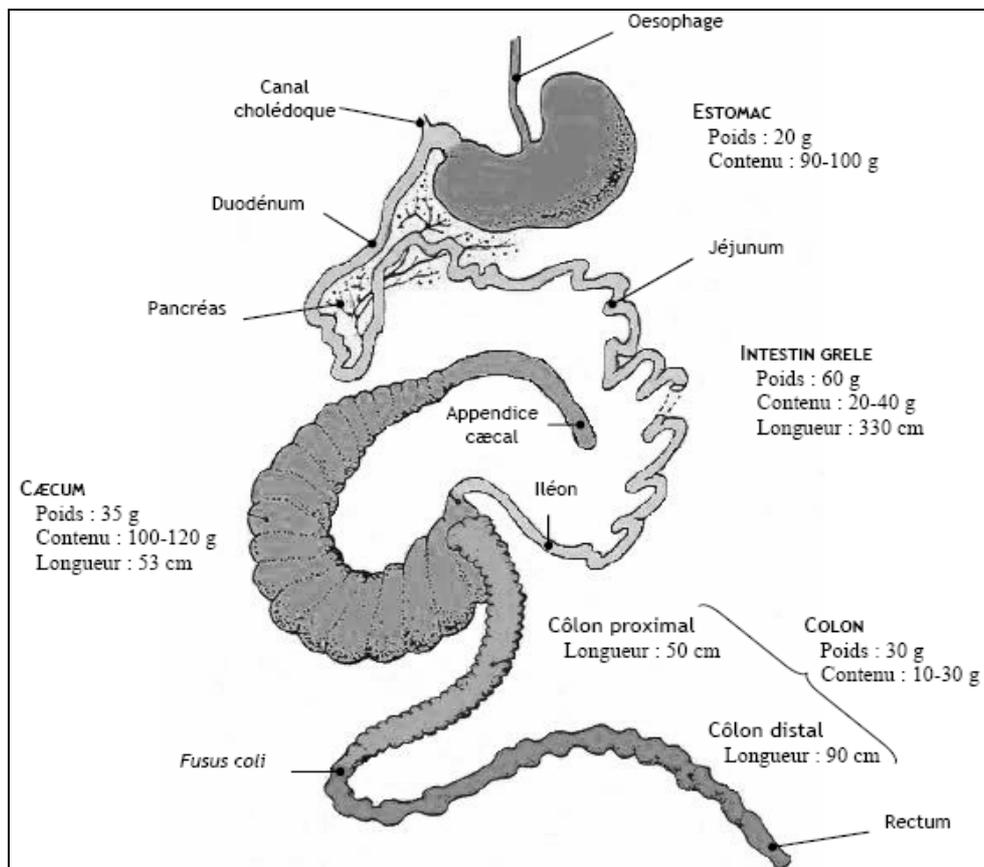


Figure3 : Appareil digestif du lapin (Lebas *et al.*, 1997).

L'intestin grêle représente une augmentation considérable de la surface d'échange entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. Au plan anatomique, il mesure environ 3 mètres de long chez l'adulte, et est replié en anses intestinales. Il est classiquement divisé en 3 parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. A la surface de

la paroi intestinale, les valvules conniventes, replis circulaires macroscopiques, participent également à l'augmentation de la surface d'échange. Puis, la muqueuse présente d'innombrables petites évaginations de quelques centaines de μm appelées villosités. Au niveau cellulaire, les entérocytes présentent à leur surface apicale une multitude de replis : les microvillosités (figure4).

Le pH de l'estomac du lapin adulte oscille entre des valeurs de 1,5 et 2,6. Cette acidité gastrique a un rôle dans la digestion (dénaturation des protéines, activation du pepsinogène...), mais également dans l'inactivation des microorganismes ingérés (Gallois, 2006). Aussi les microorganismes probiotiques qui traversent cette barrière sont intéressants du fait de leur acidotolérance.

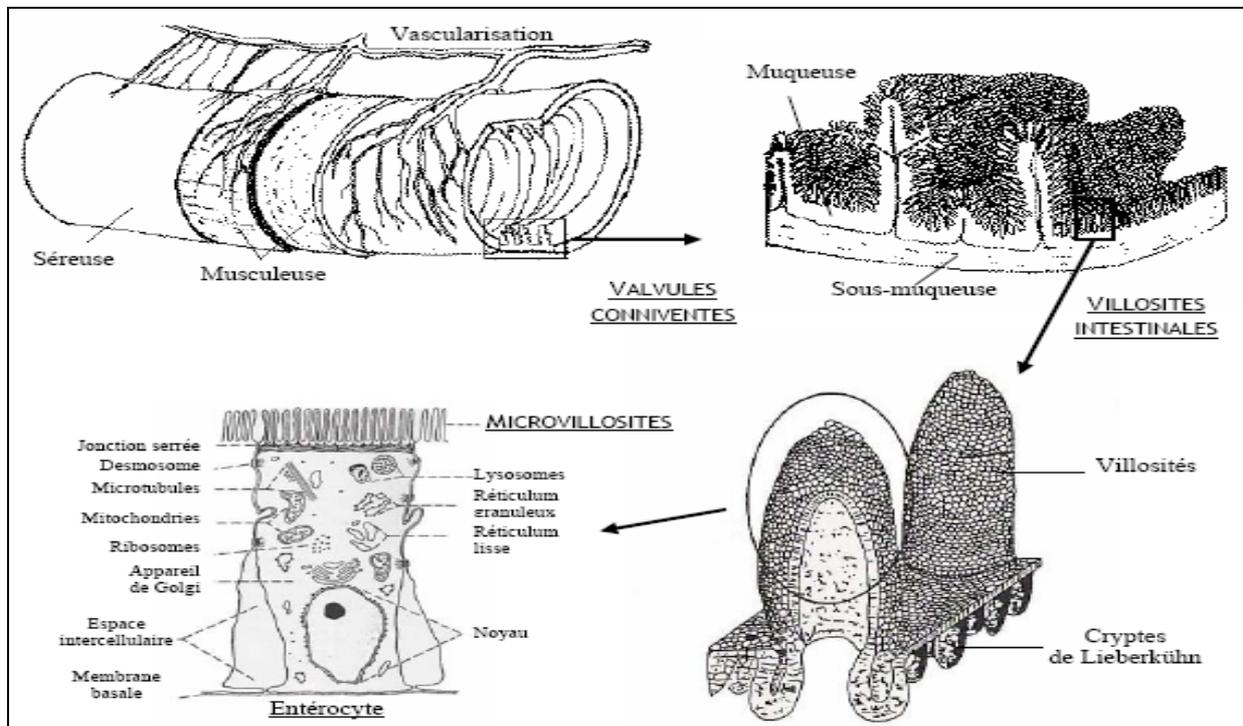


Figure 4: Systèmes d'amplification de la surface de la muqueuse intestinale (Gallois, 2006).

I. Isolement et identification des souches

1. Origine des souches utilisées

Les souches tests (bactéries lactiques du yaourt) sont isolées à partir d'un ferment de yaourt industriel lyophilisé (YOFLEX). Elles vont subir des tests d'identification afin de confirmer leur appartenance aux deux bactéries spécifiques du yaourt (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*).

La souche cible EPEC O111B4 appartenant à la collection des souches bactériennes du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (Université de Béjaia) a été isolée par Hamma en 2001. Cette souche va subir quelques tests de caractérisation tels que : production d'indole, formation de H₂S et fermentation de mannitol. L'aspect cultural est aussi pris en compte sur gélose BCPL, EMB et VRBG. Un test de sérotypage sera aussi effectué à l'aide d'un sérum anti-EPEC O111B4 fourni par l'Institut Pasteur d'Alger.

3. Milieux de culture utilisés

La culture de *Streptococcus thermophilus* est réalisée sur bouillon et gélose M17 (pH 6, 8) et incubée en aérobiose à 43°C.

La culture de *Lactobacillus bulgaricus* est effectuée sur bouillon et gélose MRS (pH ajusté à 5,4) et l'incubation est réalisée en anaérobiose à 43°C.

La culture d'EPEC (*Escherichia coli* entéropathogène) se fait sur bouillon et gélose nutritive pour le protocole de revivification. Les géloses VRBG et BCPL sont utilisées pour le dénombrement d'EPEC lors de la standardisation et au cours de dénombrement d'EPEC pour les études *in vitro* et *in vivo*.

4. Détermination de l'acidité Dornic.

Un échantillon de 10 ml de lait est placé dans un bécher de 100 ml en présence de 0,1 ml de phénolphaléine à 1% dans l'alcool à 95%.

L'échantillon est titré avec de la soude N/9 jusqu'au virage au rose de la couleur de l'échantillon. La coloration rose doit persister au moins 10 secondes (Joffin et Joffin, 2000).

Expression du résultat

L'acidité du lait peut être exprimée de plusieurs façons, mais la plus utilisée est le degré Dornic. Il correspond au nombre de 1/10 de ml de soude Dornic N/9 nécessaires pour assurer le virage de la phénolphtaléine, elle est donnée par la formule suivante :

$$A = V \times 10$$

Où A = Acidité Dornic

V : le volume en millilitre de la soude versé

4. Protocole d'identification des bactéries thermophiles du yaourt

4.1. Isolement et purification des souches

L'isolement des souches thermophiles est réalisé à partir du ferment lyophilisé thermophile du yaourt (-Y-041030-YO-FOLX, lot n° 2647986).

Deux caractères physiologiques sont utilisés pour l'isolement des souches mixtes : l'acidité des milieux d'isolement et le type d'incubation, c'est ainsi que l'utilisation du bouillon MRS dont le pH est ajusté à une valeur de 5,4 et additionné de 0,05% de chlorhydrate de cystéine comme agent réducteur permet d'isoler *Lactobacillus bulgaricus* (Coeuret *et al.*, 2003) .

Le bouillon M17 dont le pH est ajusté à une valeur de 6,8 est utilisé comme milieu de base pour l'isolement de *Streptococcus thermophilus* à partir du ferment lyophilisé (Espinosa *et al.*, 1994).

Le schéma d'isolement et de purification des deux souches est présenté dans la figure 5.

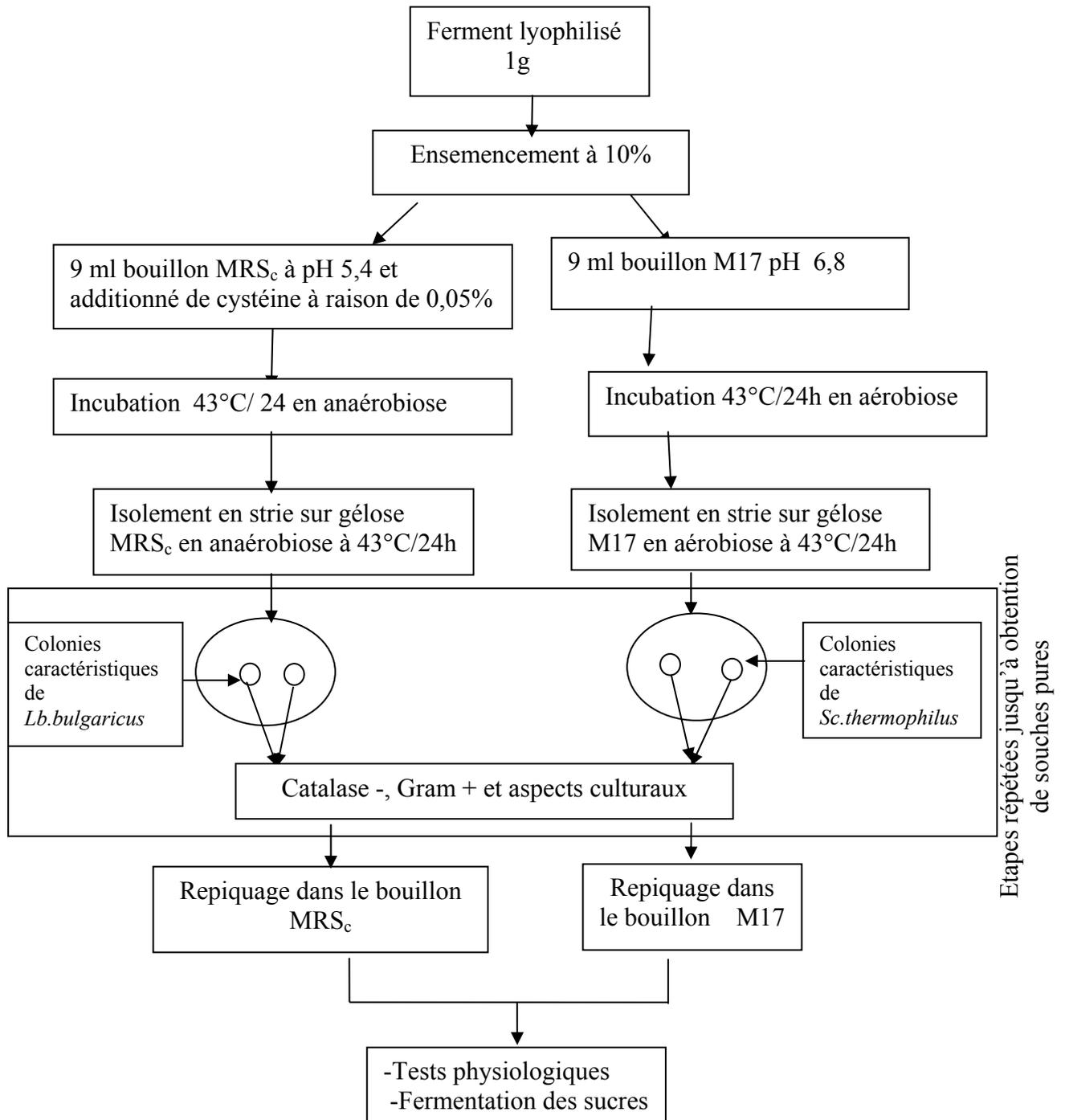


Figure 5: Protocole expérimental d'isolement, de purification et de caractérisation des souches du ferments du yaourt

La purification des souches est réalisée comme suit :

Sur gélose M17 : *Streptococcus thermophilus* donne des colonies blanchâtres, rondes et plates (Petrasxéne et Lapied, 1981).

Suivant cet aspect, 2 à 3 colonies sont prélevées et ensemencées dans du bouillon M17 et incubées à 43°C/18h. Au terme de cette incubation, un autre isolement est réalisé par la méthode des quadrants sur gélose M17 incubée à 43°C/24h. A l'issue de cette incubation, la pureté des souches est confirmée par la coloration de Gram et le test de la catalase.

Sur gélose MRS : *Lactobacillus bulgaricus* se développe en donnant des colonies lenticulaires de 1 à 4mm de diamètre (Larpent *et al.*, 1997).

2 à 3 colonies bien isolées présentant ces caractéristiques sont prélevées et repiquées dans 10 ml de bouillon MRS. Pour renforcer l'anaérobiose, 0,05 % du chlorhydrate de cystéine sont ajoutés, l'incubation se fait à 43°C/18h. A la fin de cette incubation, un isolement est effectué par strie sur gélose MRS, incubée à 43°C/24h en anaérobiose. La pureté des souches est vérifiée par la coloration de Gram et test de la catalase.

4.2. Conservation et entretien des souches

Une fois que la pureté des souches est vérifiée, une partie des souches subit un repiquage dans les bouillons MRS et M17 additionnés de 15% de glycérol. Après 18h d'incubation à 43°C, les souches sont congelées à -18°C.

L'autre partie des souches est repiquée sur gélose inclinée (MRS et M17) et incubée à 43°C/24h. Au terme de cette incubation, une partie des tubes est conservée à 4°C et l'autre partie est utilisée pour le reste de l'expérimentation. Un repiquage des souches tous les mois sur des bouillons et sur des géloses inclinées est nécessaire pour entretenir les souches

4.3. Identification des souches

Tous les tests d'identification sont réalisés à partir des cultures fraîches et pures de chaque souche impliquée dans l'étude (*Sc. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*).

4.3.1. Production de CO₂ à partir de glucose

2 à 3 colonies caractéristiques de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* sont prélevées à partir des géloses MRS et M17 et inoculées dans du MRS et M17 liquide à 0,5% de glucose contenant chacun une cloche de Durham et dont la surface est couverte par une couche d'huile de vaseline stérile. La production de CO₂ se traduit par la formation de gaz dans la cloche.

4.3.2. Croissance en anaérobiose

Les géloses MRS et M17 sont coulées dans des boîtes de Pétri puis inoculées en profondeur avec une suspension fraîche de 18h de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* respectivement. Ces boîtes sont incubées à 43°C/48h dans une jarre d'anaérobiose. La croissance en anaérobiose se traduit par la formation de colonies.

4.3.3. Formation de H₂S

L'ensemencement est effectué par piqûre en culot d'une gélose inclinée de TSI à partir d'une suspension bactérienne fraîche de 18h prélevée à partir du bouillon MRS et M17 respectivement. Le dégagement de H₂S se traduit par une coloration noire due au sulfure de Fer.

4.3.4. Liquéfaction de la gélatine

Un tube contenant de la gélatine est ensemencé avec 1ml d'une suspension bactérienne. Après 48h d'incubation à 43°C, la lecture est réalisée après refroidissement des tubes à 4°C. La persistance d'une liquéfaction à 4°C traduit la protéolyse de la gélatine.

4.3.5. Thermorésistance

Ce test est réalisé uniquement pour *Sc. thermophilus*. Une suspension bactérienne de 1 ml est inoculée dans le bouillon M17 et soumise à un chauffage de 65°C/30min. Après 18 h d'incubation à 43°C, un repiquage sur gélose M17 est effectué.

La formation d'un trouble dans le bouillon et la présence de colonies sur gélose après cette incubation témoignent de la thermorésistance de la souche.

4.3.6. Croissance en différentes concentrations de NaCl

Des milieux MRS et M17 sont préparés avec 2 et 4 % de NaCl. 1ml d'une suspension bactérienne est inoculé dans chaque milieu.

Au terme d'une incubation de 24h à 43°C, la croissance se traduit par un trouble.

Un tube à essai contenant 9ml de milieu hypersalé (M17 avec 6,5% de NaCl) est inoculé avec 3 colonies bien séparées de *Sc. thermophilus* cultivées sur gélose M17 préalablement incubée à 43°C/24h. Après une incubation de 24h à 43°C, l'absence de trouble traduit la l'absence de streptocoque du groupe D (Bourgeois et Leveau, 1981).

4.3.7. Croissance à différents pH

Des milieux MRS et M17 sont préparés et ajustés à des pH de 3,3 et 7 pour le MRS et 9,6 pour le M17. Des tubes de 9ml de chaque milieu sont inoculés avec 1 ml d'une suspension bactérienne fraîche, après une incubation de 18h à 43°C, la croissance se traduit par un trouble.

4.3.8. Fermentation des sucres

Un isolement en stries suivi d'une incubation à 43°C/48h en anaérobiose et aérobiose sont nécessaires pour avoir de grosses colonies bien isolées de culture fraîche de 0,1ml de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* .

Au terme de cette incubation, des colonies bien isolées et bien développées sont prélevées tout en évitant de gratter la gélose, ces dernières sont lavées et inoculées dans des tubes de 9 ml de milieu spécifique de fermentation des sucres pour *Lb. bulgaricus* sans sucre (voir annexe) et milieu M17 sans sucre pour *Sc. thermophilus*, additionnés d'un indicateur de coloration (rouge de chlorophénol) et un ml des différents sucres à 2 %. L'incubation est réalisée à 43°C/24 à 48h en anaérobiose par l'ajout d'une couche d'huile de vaseline. La fermentation des sucres se traduit par un virage du rouge au jaune significatif de l'acidification du milieu.

5. Préparation du lait 1^{er} âge (lait écrémé additionné de lactosérum)

5.1. Reconstitution du lait écrémé

La poudre de lait écrémé est préparée à raison de 10% dans de l'eau distillée. L'eau distillée utilisée pour la reconstitution de la poudre du lait écrémé est autoclavée à 120°C/20min. Pour une meilleure solubilisation de la poudre du lait, l'eau distillée stérile est mise dans un bain Marie réglé à 45°C.

Une fois la poudre de lait bien solubilisée, le lait reconstitué est stérilisé à 110°C/10min.

A l'issue de cette période de traitement et pour éviter le phénomène de caramélisation, le lait est rapidement refroidi.

Pour contrôler la stérilisation du lait, un ensemencement en masse de ce dernier est effectué sur gélose nutritive dont une partie des boîtes est mise à 43°C/24h et l'autre partie à 37°C/24h. L'efficacité du traitement se traduit par l'absence de coagulation du lait incubé à température ambiante et l'absence de colonie sur le milieu gélosé.

5.2. Préparation du lactosérum

5.2.1. Préparation de solution de présure

27g de présure bovine en poudre sont solubilisés dans un litre d'eau distillée stérile auquel on ajoute une pincée de NaCl. Une stérilisation par filtration sous vide est réalisée avec des filtres stériles de 0,45µm de porosité.

5.2.2. Emprésurage

Un litre du lait écrémé stérile reconstitué à 10% est chauffé à 30°C/1h. Un emprésurage est effectué à partir de la solution stérilisée de présure à raison de 1%. Après homogénéisation, la coagulation enzymatique est effectuée à 43°C pendant une nuit. Après cette période d'incubation, récupérer le surnageant qui représente le lactosérum doux dans des flacons stériles et le chauffer à 60°C/30min pour inactiver la présure (Veisseyre, 1975a). Pour confirmer la stérilisation du lactosérum, un ensemencement en masse de ce dernier est effectué sur gélose nutritive.

5.3. Préparation du mélange 50/50 lactosérum/lait (v/v)

Le rapport 50/50 lait écrémé /lactosérum (v/v) utilisé pour l'étude a été obtenu par Asselate (2006) dont la composition théorique en caséine/protéines sériques de ce mélange est adaptée aux aptitudes nutritionnelles du nourrisson. Ainsi, 50ml de lactosérum stérile sont versés dans des flacons stériles contenant chacun 50ml de lait écrémé reconstitué stérile. Homogénéiser le tout par des retournements successifs.

La stérilisation du mélange 50/50 est testée par un ensemencement en surface sur gélose nutritive et une incubation du milieu à température ambiante pendant 24h.

II. Réalisation des rapports *Lb. bulgaricus/Sc. thermophilus*

A partir des souches pures conservées de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* un isolement est effectué par stries sur géloses MRS et M17. Après 24h d'incubation à 43°C, deux colonies bien isolées sont repiquées sur bouillons MRS et M17 et incubées à 43°C pendant 18h (figure 6).

1-Mise au point des préferments

Au terme de cette incubation, un autre isolement par strie est effectué sur gélose MRS et M17 et incubé à 43°C/24h. A l'issue de cette période d'incubation, deux colonies bien isolées sur chaque boîte sont repiquées dans un tube à essai contenant 9 ml du mélange 50/50 lait /lactosérum (v/v) puis ces derniers sont incubés à 43°C/18h.

Après cette période d'incubation, un dénombrement sur gélose MRS et M17 est effectué pour chaque souche.

En parallèle les tubes servant comme préferments, sont immédiatement mis dans le réfrigérateur à 4°C pour bloquer la croissance des bactéries, ils serviront à effectuer les prélèvements afin de réaliser les rapports *Lb. bulgaricus/Sc. thermophilus*

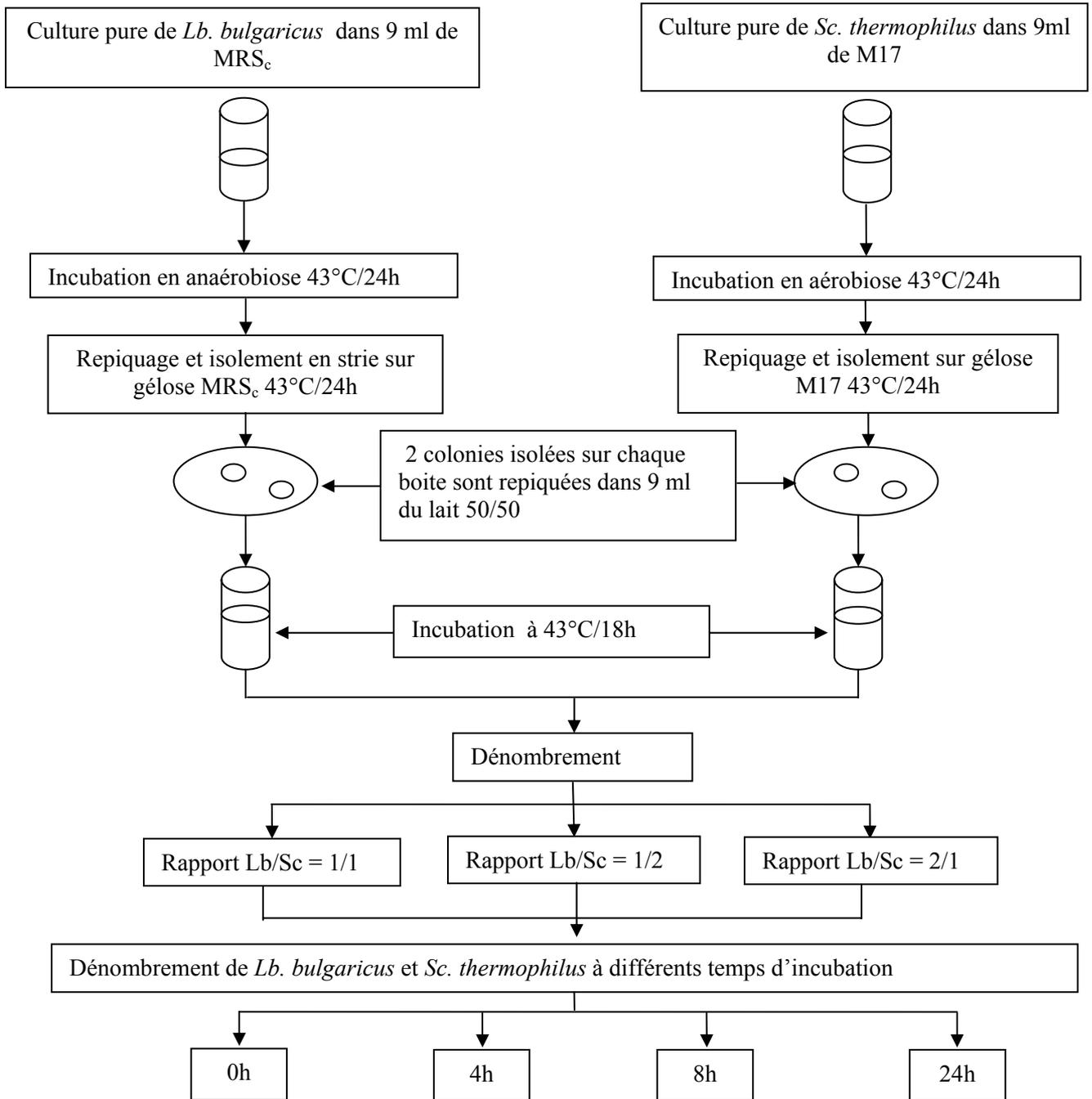


Figure 6 : Protocole de sélection du meilleur rapport *Lb. bulgaricus*/*Sc. thermophilus*

2-Mise au point des différents rapports *Lb. bulgaricus*/*Sc. thermophilus*

Une fois les résultats du dénombrement obtenus, on standardise les préferments de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* à 10^7 UFC/ml pour chaque bactérie. Trois séries de tube sont préparées, chaque série contient 4 tubes à essais de 9 ml de milieu 50/50, et inoculée avec le rapport à tester de *Lb.bulgaricus*/ *Sc.thermophilus*. Chaque tube est utilisé une seule fois pour éviter tout risque de contamination. Les différents rapports *Lb. bulgaricus*/*Sc. thermophilus* étudiés sont les suivants.

Tableau III : Les différents rapports *Lb. bulgaricus* /*Sc .thermophilus* mis au point dans le lait 50/50 (lait écrémé/lactosérum)

Rapport Lb/Sc	<i>Lb.bulgaricus</i>	<i>Sc.thermophilus</i>	Lait 50/50
1/1 Concentration réelle	1ml (10^7 UFC/ml) 10^6 UFC/ml	1ml (10^7 UFC/ml) 10^6 UFC/ml	8 ml
1/2 Concentration réelle	1ml (10^7 UFC/ml) 10^6 UFC /ml	2ml (2.10^7 UFC/ml) 2.10^6 UFC /ml	7 ml
2/1 Concentration réelle	2ml (2.10^7 UFC/ml) 2.10^6 UFC /ml	1ml (10^7 UFC/ml) 10^6 UFC /ml	7 ml

La cinétique de croissance est suivie pendant 24 heures par le dénombrement des deux souches tests sur géloses MRS et M17 à 0, 4, 8, et à 24h d'incubation. Tous les rapports seront ensemencés dans le lait 50/50 en même temps (figure 4).

Le meilleur rapport sera sélectionné en fonction de l'évolution du nombre de bactéries pour chaque souche dans chaque rapport, et le meilleur rapport sera retenu pour le reste de l'expérimentation

III. Etude de l'antagonisme *in vitro* à l'égard d'EPEC

1. Test des puits

Les surnageants des cultures fraîches de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* ont été collectés après centrifugation (8000 g, 20mn à 4°C).

- Des boîtes de Pétri en double couche sont préparées en introduisant environ 10 ml de la gélose PCA semi-molle dans les boîtes. Après solidification, recouvrir cette couche avec 5ml d'une gélose PCA semi-molle ensemencée à raison de 10^5 UFC/ml à partir d'une culture de 18h d'*E. coli*.
- Après solidification, des puits de 6 mm de diamètre sont creusés dans la gélose (Aslim *et al.*, 2005) à l'aide d'une baguette en verre stérile. Le fond des puits est scellé à l'aide de quelques gouttes de la gélose PCA (Tagg et McGiven, 1971). Après séchage des boîtes à température ambiante pendant 30 minutes, les puits sont remplis avec 100µl du surnageant natif de culture de la bactérie test.
- La diffusion du surnageant de culture (substances antibactériennes) dans la gélose est obtenue après entreposage des boîtes pendant 1 à 2h à 4°C. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 18 h à 37°C (Maragkoudakis *et al.*, 2006). L'activité antibactérienne est observée par la présence de zones d'inhibition autour des puits.
- Des témoins avec les bouillons MRS et M17 stériles sont utilisés pour confirmer que l'effet antagoniste observé ne peut être dû qu'à l'effet des substances produites par les ferments du yaourt.

2. Etude de l'antagonisme en culture mixte avec les ferments du yaourt

Pour étudier l'effet antagoniste des ferments du yaourt vis-à-vis d'EPEC, une revivification suivie d'un repiquage et d'un isolement en stries sont réalisés pour toutes les souches (tests et cible). Trois colonies bien isolées de chaque souche sont mises chacune séparément en suspension dans un tube à essai contenant 9ml de milieu 50/50. Au terme d'une incubation à 43°C/18h, on réalise le dénombrement des cellules vivantes de chaque souche sur des géloses spécifiques (MRS, M17et BCP) selon la souche.

Afin d'étudier l'effet antagoniste des ferments du yaourt au rapport *Lactobacillus bulgaricus*/*Streptococcus thermophilus* (2/1) déterminé au préalable envers *E. coli*, trois combinaisons ont été réalisées à partir des préferments des 2 espèces, *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* et l'inoculum d'*E. coli* (Tableau IV). En parallèle un témoin d'EPEC seul sans ferments du yaourt est réalisé afin d'apprécier l'antagonisme des ferments du yaourt.

Tableau IV : Différentes combinaisons réalisées pour l'étude de l'antagonisme *in vitro* des ferments du yaourt envers EPEC

Combinaison	EPEC	<i>Lb. bulgaricus</i>	<i>Sc. thermophilus</i>	Lait 50/50
1 ^{ère} combinaison Concentration réelle dans lait50/50	1ml (10^7 UFC) 10^6 UFC/ml	2ml ($2 \cdot 10^{10}$ UFC/ml) $2 \cdot 10^9$ UFC/ml/ml	1ml (10^{10} UFC/ml) 10^9 UFC/ml	6 ml
2 ^{ème} combinaison Concentration réelle dans lait 50/50	1ml (10^7 UFC/ml) 10^6 UFC/ml	2ml ($2 \cdot 10^9$ UFC/ml) $2 \cdot 10^8$ UFC/ml	1ml (10^9 UFC/ml) 10^8 UFC/ml	6 ml
3 ^{ème} combinaison Concentration réelle dans lait 50/50	1ml (10^7 UFC/ml) 10^6 UFC/ml	2ml ($2 \cdot 10^8$ UFC/ml) $2 \cdot 10^7$ UFC/ml	1ml (10^8 UFC/ml) 10^7 UFC/ml	6 ml
Témoin Concentration réelle dans lait 50/50	1ml (10^7 UFC/ml) 10^6 UFC/ml			9ml

Pour cela, trois séries de tubes contenant chacune 6 tubes de 6 ml de milieu 50/50 (lactosérum/lait écrémé) avec l'un des trois taux d'inoculation en ferments du yaourt au rapport déjà sélectionné (tableau III) et 9 ml de lait 50/50 pour le témoin sont inoculées. L'effet antagoniste est suivi par le comptage du nombre de cellules d'EPEC et la mesure d'acidité Dornic dans les différentes combinaisons qui se feront après 0 ; 6 ; 12 ; 16 ; 20 et 24h d'incubation. Chaque combinaison est réalisée en double, l'une va servir pour les dénombrements d'EPEC et, l'autre pour la mesure de l'acidité Dornic.

III. Etude *in vivo* de l'effet antagoniste des ferments de yaourt à l'égard d'EPEC

Cette étude est réalisée sur 10 lapins âgés d'un mois (race new zélandaise). Ces lapins sont répartis en 2 lots de 4 lapins. Chaque lot obéit à un traitement spécifique (type de traitement et durée de traitement), 2 lapins vont servir après dissection comme témoins, l'un comme témoin diarrhéique et l'autre comme témoin n'ayant subi aucun traitement.

Avant de procéder à l'étude de l'effet antagoniste des ferments du yaourt vis-à-vis d'*E. coli*, un dénombrement de cette dernière dans les selles des lapins est réalisé afin de déterminer le nombre initial d'*E. coli* dans la flore intestinale des lapins étudiés.

L'étude *in vivo* de l'effet antagoniste des ferments de yaourt envers EPEC se base sur le traitement de la diarrhée par administration aux lapins holoxéniques de 1 ml de lait fermenté (mélange de 0,5 ml de chaque préferment) pour avoir le rapport de *Lb. bulgaricus* /*Sc. thermophilus* retenu préalablement.

1. Réalisation des préferments des souches utilisées

Le préferment de *Sc. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* est préparé tous les jours durant toute la durée du traitement.

Préferment de *Lb. bulgaricus* : 3 colonies sontensemencées dans 9ml de mélange 50/50 et incubées à 43°C/18h. Après cette période d'incubation, on standardise l'*inoculum* de *Lb. bulgaricus* à 4.10^8 UFC/ml.

Préferment de *Sc. thermophilus* : 3 colonies sont inoculées dans 9ml de mélange 50/50 incubées à 43°C/18h. Après cette période, on standardise l'*inoculum* à 2.10^8 UFC/ml.

2. Recueil des selles

Le recueil des selles est réalisé après quelques heures de prise du traitement à l'aide d'une pince stérile dans une boîte de Pétri stérile. Avant chaque prélèvement, le lapin est placé dans une cage vide propre. Le prélèvement est immédiatement transporté au laboratoire. 1g de selles est transféré stérilement dans un tube de 9ml d'eau physiologique stérile puis homogénéisé à l'aide d'un vortex (Vortex-GENIE 2).

3. Inoculation des lapins

Lot1 : les lapins sont contaminés *per os* à l'aide d'une seringue stérile par une dose journalière de 1ml d'inoculum d'EPEC (10^6 UFC/ml de lait 50/50) jusqu'au déclenchement de la diarrhée. Puis, les lapins reçoivent 1 ml de lait 50/50 stérile (sans *E. coli*) pendant une semaine et au cours de cette période un dénombrement d'*E. coli* est réalisé pour chaque lapin.

Lot2 : les lapins sont contaminés *per os* à l'aide d'une seringue stérile par une dose journalière de 1ml d'inoculum d'EPEC (10^6 UFC/ml de lait50/50). Une fois que la diarrhée est déclenchée, on donne 0,5ml de préferment *Lb. bulgaricus* (2.10^8 /ml en moyenne) et 0,5ml de préferment *Sc. thermophilus* (10^8 cellules/ml en moyenne) pour faire un rapport de *Lb. bulgaricus*/*Sc. thermophilus* de 2/1 en nombre de cellules viables.

4. Méthodes d'évaluation

L'évolution de l'effet antagoniste des ferments du yaourt est effectuée selon deux critères :

- ❖ Suivi clinique de l'animal : cette étude a été réalisée en suivant l'évolution de la santé de l'animal tout en notant s'il y a présence de mortalité au cours de l'expérimentation.

- ❖ Etude microbiologique des selles : Pour cette dernière, un échantillon de selles fraîches des lapins est recueilli. Un dénombrement des cellules viables d'*E. coli* est réalisé tous les jours sur gélose VRBG et incubées à 43°C/24h

4. Dissection des lapins

Cette étude est réalisée dans le but de déterminer le degré de fixation d'*E. coli* sur la muqueuse intestinale des lapins dans les différents lots. Au terme des traitements administrés (12 jours), les lapins des différents lots sont disséqués. Le lapin anesthésié par un coton imbibé de chloroforme est installé sur une plaque dans une hôte. Une petite incision est réalisée au niveau du ventre par une lame de dissection stérile. La peau est soigneusement écartée à l'aide d'une pince stérile (figure 7).

1g du contenu de l'intestin grêle et 1g du contenu de côlon sont pesés séparément et mis dans 9ml d'eau physiologique pour le dénombrement d'*E. coli*. Les portions d'intestin grêle et du côlon sont conservées dans du formol à 10% pour la réalisation des coupes histologiques.



Etape1



Etape2



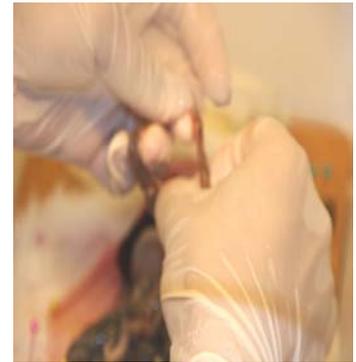
Etape 3



Etape 4



Etape 5



Etape 6



Etape7

Figure 7 : Les différentes étapes de la dissection des lapins

6. Analyses statistiques

Le traitement statistique des résultats obtenus a été effectué par analyse de la variance à un seul critère de classification (AVUC) selon le test de FISHER. Cette méthode fait apparaître l'existence ou non de différences significatives entre deux ou plusieurs traitements. Pour le calcul du facteur F, plusieurs symboles et formules sont utilisés.

Signification des symboles utilisés

x_i : résultats obtenus (nombre d'EPEC exprimé en Log UFC/g) ;

x_i : total des résultats d'un traitement ;

$x_{..}$: somme générale d'un essai ;

n_i : nombre de répétitions par bloc

p : nombre total de traitements ;

n : nombre total de répétitions ;

$\sum x_{ik}^2$: somme des carrés des résultats d'un traitement

T : somme générale des carrés des résultats d'un essai ;

Les calculs

SCE_i : (somme des carrés des écarts) = $\sum x_{ik}^2 - x_i^2 / n_i$;

SCE_r : (somme des carrés des écarts résiduelle) = $\sum SCE_i$;

C (terme correctif) = $x_{..}^2 / n$;

SCE_t (somme totale des carrés des écarts) = $T - C$

SCE_f (somme factorielle des carrés des écarts) = $SCE_t - SCE_r$

Calcul des degrés de liberté (DDL) :

$$DDL_f(\text{factoriel}) = p-1 ;$$

$$DDL_r(\text{résiduel}) = n -1$$

CM (carrés moyens) :

$$CM_f(\text{factoriel}) = SCE_f / DDL_f$$

$$CM_r(\text{résiduel}) = SCE_r / DDL_r$$

Calcul de la valeur de F :

$$F_c (F_{\text{calculé}}) = CM_f / CM_r.$$

La valeur de $F_{\text{théorique}} (F_{\text{th}})$ à deux degrés de liberté (DDL_f et DDL_r), avec un seuil de signification de 5%, s'obtient à partir des tables de F. La différence entre deux résultats n'est considérée comme significative que si la valeur de F_c est supérieure ou égale à celle de F_{th} .

Test de Student

Le test d'analyse de la variance est confirmé par le test de Student de comparaison de deux moyennes de même effectifs de deux échantillons indépendants

Signe :

\bar{x}_1 et \bar{x}_2 : moyennes arithmétiques des dénombrement d'*E.coli* des lapins du lot1 et lot2 respectivement.

SCE_1 et SCE_2 : Somme des carrés des écarts des dénombrement d'*E.coli* des lapins du lot1 et lot2 respectivement.

n : nombre des lapins dans chaque lot

Calcul de la valeur de Student (t_{Obs})

$$t_{\text{Obs}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{(SCE_1 + SCE_2) / 2(n-1)}}$$

La valeur de $t_{0,975}$ au degré de liberté (DDL de $2(n-1)$), avec un seuil de signification de 5%, s'obtient à partir des tables de t. La différence entre deux résultats n'est considérée comme significative que si la valeur de t_{Obs} est supérieure ou égale à celle de $t_{0,975}$.

VI. Coupes histologiques

Après l'enrobage en bloc de paraffine des segments d'intestins et du côlon conservés dans du formol en bloc de paraffine, des coupes histologiques de 5 μ m (à l'aide d'un microtome) sont réalisées au niveau de laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques de Dr Amrane à Béjaia selon la méthode de Hould (1984).

A partir des échantillons des intestins et des côlons des lapins disséqués (Témoin sans prise d'EPEC, témoin début de l'état diarrhéique, lapins non traités de lot1 et lapins traités du lot2). Coupe verticalement les segments des côlons et d'intestins à colorer. Les segments coupés sont mis dans des dispositifs spéciaux appelés cassettes et sont numérotés afin de les identifier. Une fois les échantillons mis dans les cassettes, la préparation des coupes est réalisée selon les étapes rapportées dans les tableaux V et VI

Tableau V : Etape de la circulation (Déshydratation, Eclaircissement et Imprégnation)

Etape	Durée
Déshydratation :	
Ethanol 1 ^{er} bain ;	10min
Ethanol 2 ^{ème} bain ;	20min
Ethanol 3 ^{ème} bain ;	20min
Ethanol 4 ^{ème} bain ;	20min
Ethanol 5 ^{ème} bain ;	40min
Acétone un seul bain ;	40min
Eclaircissement :	
Xylène 1 ^{er} bain ;	10min
Xylène 2 ^{ème} bain ;	30min
Xylène 3 ^{ème} bain ;	30min
Imprégnation :	
Paraffine 1 ^{er} bain ;	60min
Paraffine 2 ^{ème} bain ;	120min

Tableau VI : Etape de la coloration histologique (Hould, 1984).

Étapes	Durée
1-Déparaffinage : Xylène	20min
2-Alcool	20min
3-Réhydratation : Eau	10min
4-Première coloration : Hématoxyline de Harris	2à 3 min
5-Rinçage à l'eau courante	
6-Alcool acidifié (alcool+quelques gouttes de HCl)	2 émerisons
7-Rinçage à l'eau courante	
8-Eau ammoniacale (eau+quelques gouttes de NaOH)	2 émerisons
9-Rinçage à l'eau courante	
10-Deuxième coloration : Eosine	10 émerisons
11-Rinçage à l'eau courante	
12-Alcool	2à 3 secondes
13- Montage à l'Eukit	
14-Observation au microscope photonique (Gross x40)	

I. Isolement et identification des souches

1. *Escherichia coli* entéropathogène (EPEC)

Les résultats obtenus dans les tableaux VII et VIII confirment qu'il s'agit bien d'*Escherichia coli*. Le sérotypage est vérifié par le test d'agglutination sur lame (Gallois, 2006).

Tableau VII : Résultats des tests d'identification d'*E. coli*

test	résultat
Gram	-
Croissance à 44°C	+
Mobilité	+
RM/VP	+/-
Indole	+
H₂S	-

Tableau VIII : Aspects cultureux d'*E. coli* sur milieux gélosés

Milieu	Aspects cultureux
VRBG	Colonie rose ronde
BCP	Colonie jaunâtre ronde
EMB	Colonie violette foncée avec reflet métallique et un centre opaque

L'utilisation du sérum anti-*E. coli* O111B4 (Institut Pasteur d'Alger), qui a révélé une réaction positive (agglutination), a confirmé l'appartenance la souche d'*E. coli* au sérotype O111B4 incriminée dans les diarrhées des nourrissons de moins d'un an.

2. Les bactéries du ferment du yaourt

2.1. Identification du genre

Tableau IX : Résultats des tests d'identification des deux souches du yaourt isolées à partir du ferment lyophilisé

Tests	Souche 1	Souche 2
Croissance à 45°C	+	+
Croissance à 10°C	-	-
Dégradation de la gélatine	-	-
Production de H₂S	-	-
Mobilité	-	-
Catalase	-	-
Gram	+	+
Aspect au microscope optique	Bâtonnets aux bouts ronds, variable selon l'âge, présence de nombreux corps métachromatiques dans les cellules d'une ancienne culture colorée au Gram	Cellules sphériques isolées, en paires ou en longues chaînes
Production d'indole	-	-
Production de CO₂ à partir du glucose	-	-
Croissance en anaérobiose	+	+
Croissance à pH 3,3	-	x
Croissance à pH 7	+	x
Croissance à pH 9,6	x	-
Croissance à NaCl 2%	x	-
Croissance à NaCl 4%	-	-
Croissance à NaCl 6,5%(milieu hyper salé)	x	-
Thermo résistance (65°C/30min)	x	+
Résultats	<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>

+ : test positif/ - : test négatif / x : test non obligatoire

Les résultats du tableau IX, confirment l'appartenance de la souche 1 au genre *Lactobacillus* et la souche 2 au genre *Streptococcus*.

2.2. Identification de l'espèce

Les résultats de fermentation des sucres pour les deux souches mentionnés dans le tableau X, montrent qu'il s'agit de *Lactobacillus bulgaricus* (souche1) et *Streptococcus thermophilus* (souche 2).

Tableau X : Résultats de la fermentation des sucres

Sucre	<i>Souche 1</i>	<i>Souche 2</i>
Lactose	+	+
Glucose	+	+
Galactose	+	+
Saccharose	-	+
Tréhalose	-	-
Mannose	-	-
Mannitol	-	-
Raffinose	-	+
Salicine	-	-
Maltose	-	-
Sorbitol	-	-
Conclusion	<i>Lb. bulgaricus</i>	<i>Sc. thermophilus</i>

Les figures 8 et 9 représentent les photographies prises au laboratoire des deux souches obtenues après coloration de Gram (appareil numérique de type Sony-Carl Zeiss Varui.Tessar)

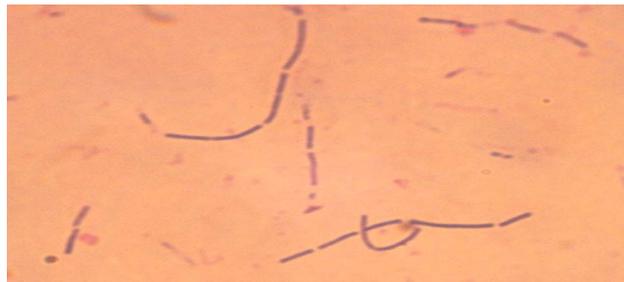


Figure 8 : Photographie de *Lb. bulgaricus* (8 x 100 x 2,1)

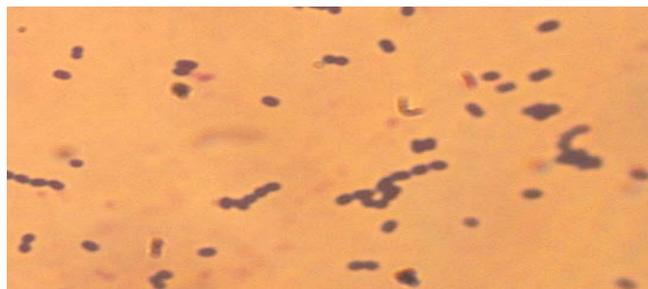


Figure 9 : Photographie de *Sc. thermophilus* (8 x 100 x 2,1)

II. Recherche du meilleur rapport *Lb. bulgaricus*/*Sc. thermophilus*

Des combinaisons entre *Lb. bulgaricus* /*Sc. thermophilus* ont été réalisées dans le milieu lait écrémé/lactosérum 50/50(V/V).

L'enrichissement du milieu par les protéines solubles du lactosérum, offre une nouvelle source protéique directement assimilable par *Sc. thermophilus* dépourvu d'endopeptidases. En plus cet enrichissement, la libération de l'acide formique lors du chauffage du lait constitue un autre facteur de croissance pour *Lb. bulgaricus*.

Le yaourt constitue un écosystème simple dont la fabrication repose sur les interactions prenant place entre les deux espèces de bactéries lactiques *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Plusieurs auteurs ont montré que le rapport 1/1 de *Lb. bulgaricus*/ *Sc. thermophilus* donne de bons résultats concernant la croissance des deux bactéries ainsi que le développement de l'arôme et texture pour un yaourt fabriqué à partir du lait écrémé (Bourgeois et Larpent, 1989 ; Canzi *et al.*, 2002 ; Courtin et Rul, 2004).

La symbiose entre les deux bactéries du yaourt lors de la fermentation consiste en la production de l'acide formique et de pyruvate ainsi qu'en la réduction du potentiel redox par *Sc. thermophilus*, ce qui va stimuler la croissance de *Lactobacillus bulgaricus*. En contre-partie, l'activité protéolytique et acidifiante de *Lb. bulgaricus* permettent la libération des acides aminés à partir des protéines (en particulier la valine) et stimulent la croissance de *Sc. thermophilus* (Cais-Sokolinska et Pikul, 2004).

Le changement du rapport *Lb. bulgaricus*/*Sc. thermophilus* peut avoir des conséquences non seulement sur la croissance des deux bactéries mais peut affecter aussi le niveau des acides aminés libres dans le lait.

En effet, selon Lamontagne (2002), un rapport 1/1 de *Lactobacillus bulgaricus* /*Streptococcus thermophilus* libère 70 mg d'acides aminés libres alors que pour un rapport 1/2 de *Lb. bulgaricus*/*Sc. thermophilus* ce niveau chute à 41 mg d'acide aminés libres.

L'activité protéolytique du ferment du yaourt en culture mixte a une grande importance dans le phénomène de synergie entre *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* en co-culture, du fait que la protéolyse de la caséine par *Lb. bulgaricus* libère des acides aminés et des peptides de faible poids moléculaire qui sont des activateurs de

croissance de *Sc. thermophilus*. A coté de la protéolyse, la diminution du pH est très rapide en culture mixte par rapport aux cultures pures (Rajagopol et Sandine, 1990).

1. Rapport de *Lb. bulgaricus* /*Sc. thermophilus* de 1/1

La figure 10 qui représente les résultats des dénombrements des deux bactéries du yaourt au rapport *Lb. bulgaricus*/*Sc. thermophilus* de 1/1, montre qu'en démarrant du même *inoculum* standard de 10^6 cellules/ml pour chaque bactérie, au bout de 4h d'incubation le nombre des cellules augmente pour les deux bactéries pour atteindre $1,02 \cdot 10^8$ cellules/ml de *Sc. thermophilus* et $9,25 \cdot 10^7$ UFC/ml de *Lb. bulgaricus*.

De la 4^{ème} heure à la 24^{ème} heure de fermentation, on constate que la croissance de *Sc. thermophilus* ($2,35 \cdot 10^9$ UFC/ml) est lente par rapport à celle de *Lb. bulgaricus* ($1,6 \cdot 10^{12}$ UFC/ml).

Le nombre élevé de *Sc. thermophilus* pendant les premières heures de fermentation peut s'expliquer par le fait qu'un pH initial de 6,7 du milieu est beaucoup plus favorable à cette dernière qu'à *Lb. bulgaricus* qui est acidophile. A coté du pH, la disponibilité des acide aminés et des peptides qui sont directement assimilables par *Streptococcus thermophilus*, venant d'une part des protéines sériques et des acides aminés libérés lors du traitement thermique du lait et d'autre part de l'activité endopeptidasique de *Lb. bulgaricus*, ont stimulé la croissance de *Sc. thermophilus* qui est dépourvu de cette activité enzymatique.

La diminution de la croissance de *Sc. thermophilus* dans le reste de la période de fermentation peut s'expliquer par une acidification du milieu due à la production d'acide lactique des deux bactéries qui abaissent le pH, le milieu devient alors favorable à la croissance de *Lb. bulgaricus* et défavorable à celle de *Sc. thermophilus* qui ne tolère pas de fortes acidités.

La courbe de la corrélation (figure 1 annexe 4) entre la croissance de ces deux bactéries montre une corrélation linéaire avec un coefficient de corrélation $r = 0.90$ qui est une corrélation positive. Ce qui nous permet de dire qu'avec ce rapport il y a une synergie entre les deux bactéries.

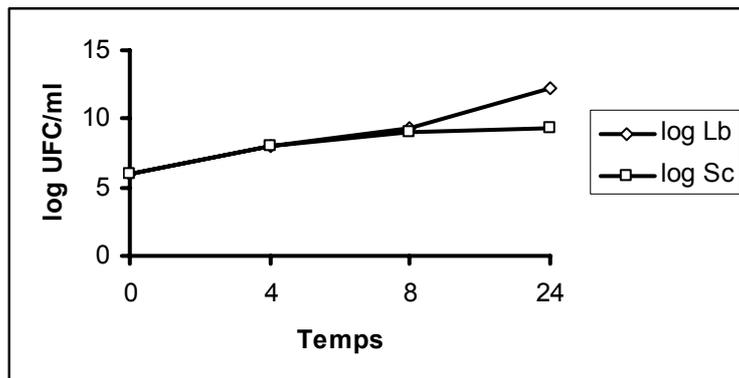


Figure 10 : Courbes de croissance de *Lb. bulgaricus* et de *Sc. thermophilus* dans un rapport de 1/1 (au départ)

2. Rapport *Lb. bulgaricus*/*Sc. thermophilus* de 1/2

La figure 11 montre qu'en démarrant d'un inoculum de 10^6 cellules/ml de *Lactobacillus bulgaricus* et $2 \cdot 10^6$ UFC/ml de *Sc. thermophilus* respectivement (rapport 1/2). Au bout de 8 heures de fermentation, ce nombre sera amené à $8,25 \cdot 10^7$ UFC/ml et $1,105 \cdot 10^8$ cellules/ml de *Sc. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* respectivement.

Après 24h d'incubation, le nombre de *Lb. bulgaricus* ($6,15 \cdot 10^8$ cellules/ml) est 6 fois supérieur à celui de *Sc. thermophilus* (10^8 UFC/ml), ceci peut être attribué aux bas pH du milieu qui est défavorable à *Sc. thermophilus*.

Le coefficient de corrélation de $r = 0,967$ (figure 2 en annexe 4) a été enregistré pour ce rapport, ce qui permet de suggérer qu'il y a une bonne synergie de croissance entre les bactéries du yaourt.

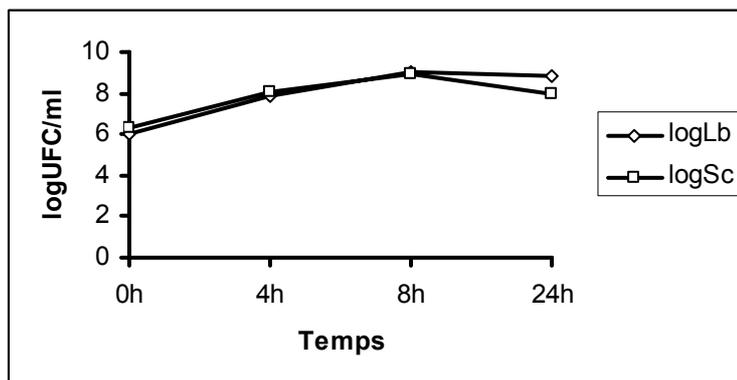


Figure 11: Courbes de croissance de *Lb. bulgaricus* et de *Sc. thermophilus* dans un rapport de 1/2 (au départ)

3. Rapport *Lb. bulgaricus* /*Sc. thermophilus* de 2/1

Les résultats mentionnés dans la figure 12, montrent qu'il semble y avoir une meilleure symbiose entre les deux bactéries avec ce rapport, du fait qu'en démarrant d'un rapport de 2/1 *Lb. bulgaricus*/*Sc. thermophilus* d'inocula standard de $2 \cdot 10^6$ UFC/ml et 10^6 cellules/ml respectivement, un rapport presque de 1/1 (de $1,15 \cdot 10^7$ UFC/ml de *Lb. bulgaricus* et $9,5 \cdot 10^6$ UFC/ml de *Sc. thermophilus*) est atteint à la 4^{ème} heure d'incubation. Ce rapport de 1/1 de *Lb. bulgaricus* /*Sc. thermophilus* se maintient jusqu'à la 24^{ème} heure d'incubation pour atteindre un maximum de $5 \cdot 10^9$ UFC/ml de *Lb. bulgaricus* et $5,5 \cdot 10^9$ UFC/ml de *Sc. thermophilus*. Cette bonne symbiose découle du fait qu'avec ce rapport d'inocula, il siège une harmonie et une interaction bénéfique réciproque pour les deux bactéries du yaourt.

Le coefficient de corrélation $r = 0,999$, montre qu'il y a une bonne symbiose entre les deux bactéries lors de la fermentation du lait 50/50 par rapport aux autres rapports d'inoculation testés entre les deux bactéries.

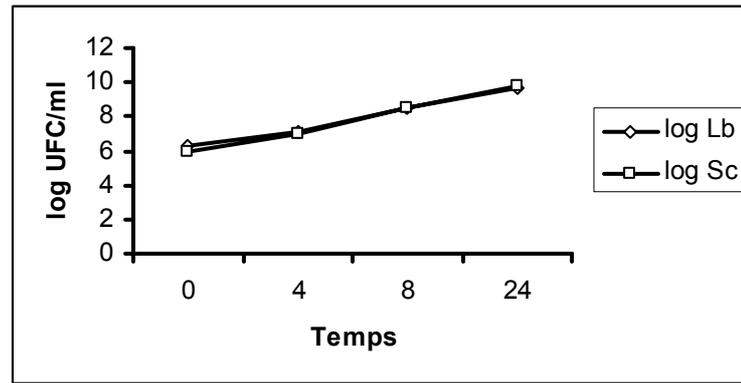


Figure 12 : Courbes de croissance de *Lb. bulgaricus* et de *Sc. thermophilus* dans un rapport de 2/1 (au départ)

Les résultats obtenus avec le rapport 1/1 de *Lb. bulgaricus* /*Sc. thermophilus* sont en corrélation avec ceux obtenus par Courtin et Rul (2004), qui ont étudié les interactions entre les bactéries d'un yaourt fabriqué à partir d'un lait écrémé avec un rapport 1/1 de *Lb. bulgaricus* /*Sc. thermophilus* avec un inoculum standard de 5.10^6 UFC/ml pour chaque. Ce rapport a été maintenu durant toute la période d'incubation.

L'action caséolytique des lactobacilles stimule le développement des Streptocoques. Lorsque l'acidification du milieu devient défavorable aux Streptocoques, ces derniers seront remplacés par les lactobacilles (Veisseyre, 1975b).

Jiwoua *et al.*(2003), ont montré que le pouvoir d'acidification (pH et acidité Dornic) des souches sauvages de *Sc. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* en culture mixte variait selon le taux et le rapport d'inoculation de ces dernières.

Selon Rajagopol et Sandine (1990), l'activité protéolytique et le pouvoir d'acidification en culture mixte au rapport 1/1 des bactéries du yaourt sont beaucoup plus élevés que dans le cas de culture pure. Le nombre élevé de *Sc. thermophilus* en culture associée dans ce rapport peut être due au fait que ce dernier est plus compétitif que *Lb. bulgaricus* envers le substrat.

Les résultats des courbes de croissance des deux bactéries dans les différents rapports testés, montrent que la meilleure symbiose entre les deux bactéries lors de la fermentation du yaourt infantile semble être obtenue avec un rapport *Lactobacillus bulgaricus* / *Streptococcus thermophilus* de 2/1 et c'est ce rapport qui va être utilisé pour la suite de l'expérimentation.

III. Effet antagoniste *in vitro* de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* (dans un rapport 2/1) à l'égard d'EPEC.

Le rapport de *Lb. bulgaricus* /*Sc. thermophilus* de 2/1 qui permet la meilleure symbiose entre les deux bactéries au cours de la fermentation du lait 50/50 est testé *in vitro* en présence d'EPEC pour la mise en évidence de son effet antibactérien.

1. Résultats de test des puits

Les figures 14 et 15 montrent la présence des zones d'inhibition autour des puits remplis de surnageant de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus*, par contre avec les témoins des bouillons stériles utilisés (MRS et M17) présentés dans la figure 13, aucune zone d'inhibition n'a été observée. Cependant, des diamètres de zones d'inhibition de 7,5mm et 10,5mm (en moyenne) ont été enregistrés respectivement dans les surnageants de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus*. Ce qui peut témoigner de la production de substances antibactériennes par les ferments du yaourt et éventuellement par la présence de bactériocine, renforçant ainsi l'hypothèse d'effet probiotique des ferments du yaourt.



Figure13 : Témoin du test des puits des bouillons MRS et M17

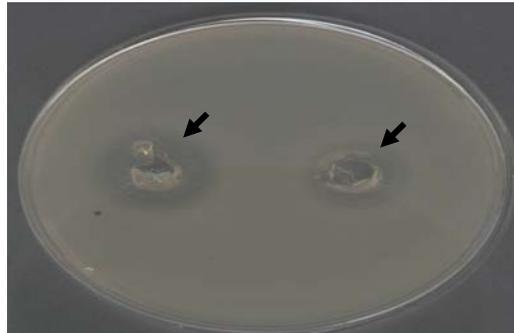


Figure14 : Test de puits avec le surnageant natif de *Lb. bulgaricus*

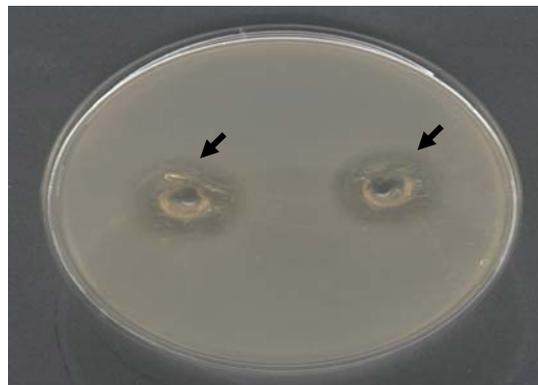


Figure15 : Tests de puits avec le surnageant natif de *Sc. thermophilus*

2. Méthode directe en culture mixte

Les figures 16 et 17 montrent respectivement les courbes de croissance d'EPEC et la mesure d'acidité Dornic, en culture pure et en culture mixte d'EPEC avec les différents taux d'inoculation de bactéries du yaourt.

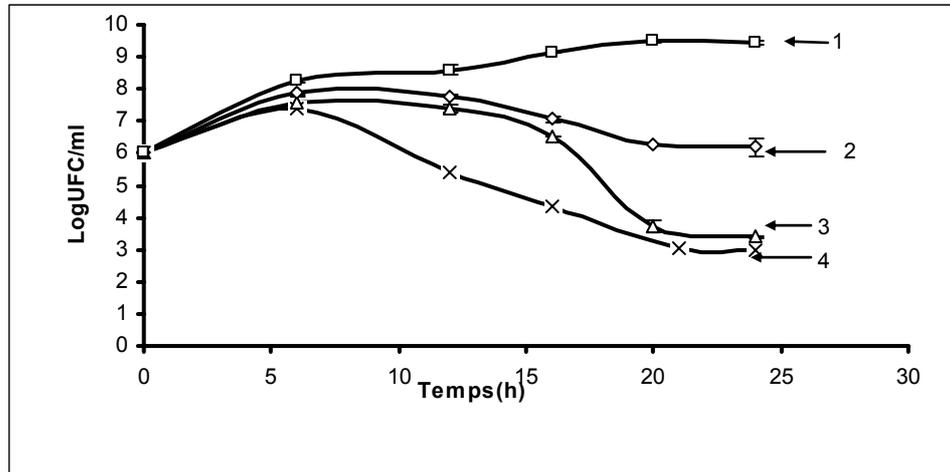


Figure 16 : Courbes de croissance d'EPEC dans les différentes combinaisons en culture mixte avec les ferments du yaourt (au rapport 2/1 de *Lb.bulgaricus/Sc.thermophilus*) et dans la culture témoin

Légende :

- 1 : Témoin (10^6 cellules/ml d'EPEC sans ferment)
- 2 : 10^6 cellules/ml d'EPEC+ 3.10^7 /ml de ferment du yaourt
- 3 : 10^6 cellules/ml d'EPEC+ 3.10^8 /ml de ferment du yaourt
- 4 : 10^6 cellules/ml d'EPEC+ 3.10^9 /ml de ferment du yaourt

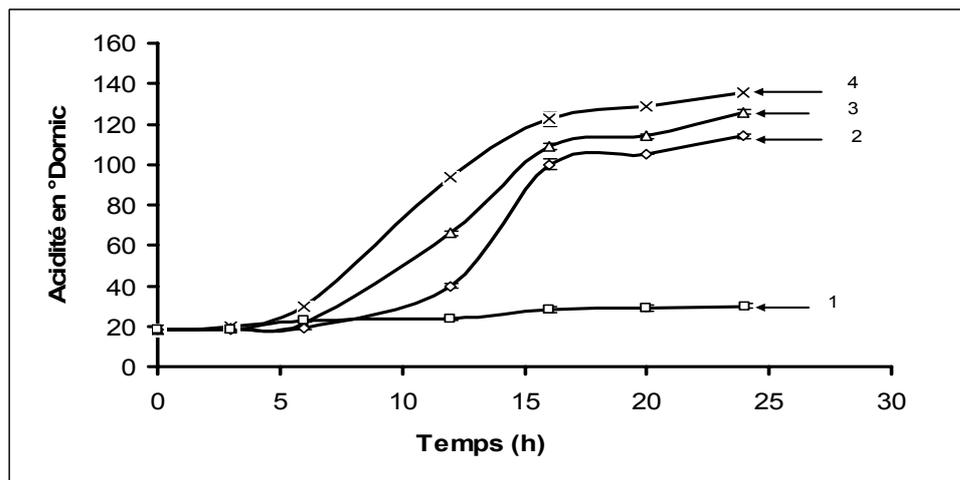


Figure 17 : Courbes d'acidité Dornic dans les différentes combinaisons en culture mixte avec les ferments du yaourt et dans la culture témoin

2.1 Culture pure

Le nombre de cellules viables d'EPEC en culture pure ne cesse d'augmenter durant toute la période d'incubation passant ainsi de 10^6 UFC/ml à 0 h à $2,75 \cdot 10^9$ UFC/ml après 20 h d'incubation, soit une augmentation de plus de 3 log. Cette période d'incubation représente la fin de la phase exponentielle de la croissance.

La figure 17 qui représente l'acidité Dornic enregistrée en culture pure d'EPEC et en culture mixte avec les ferments du yaourt, montre que l'acidification du milieu par EPEC en culture pure est faible par rapport à celle enregistrée en culture mixte.

2.2. Culture mixte

Le nombre de cellules d'EPEC est inversement proportionnel au taux d'inoculation en ferment du yaourt inoculé en culture mixte, mais l'acidité Dornic mesurée est proportionnelle au taux d'inoculation en ferment du yaourt.

L'augmentation de l'*inoculum* en ferment du yaourt en culture mixte semble avoir un effet direct sur la diminution du nombre d'EPEC et sur la concentration en acide lactique produit ainsi que sur le pH du milieu. Cela suggère que l'effet inhibiteur exercé par les ferments du yaourt sur EPEC pourrait être dû à l'abaissement du pH.

Avant 6 heures d'incubation, le nombre d'EPEC a augmenté dans toutes les cultures mixtes. L'effet antagoniste des ferments n'apparaît qu'après 6 heures d'incubation et va s'accroître à mesure que la fermentation en culture mixte se prolonge dans le temps.

Après 24 heures d'incubation, on a enregistré une diminution de 1,665 ; 4,21 et 4,445 (en log UFC) dans les cultures mixtes, de $3 \cdot 10^7$ UFC/ml, $3 \cdot 10^8$ UFC/ml et $3 \cdot 10^9$ UFC/ml respectivement par rapport au nombre d'EPEC dénombré à la 6^{ème} heure d'incubation. Par rapport à t_0 , ces taux de réduction sont respectivement de 2,61 et de 3,05 (en log UFC) dans les cultures mixtes de $3 \cdot 10^8$ UFC/ml et $3 \cdot 10^9$ UFC/ml en ferments du yaourt.

L'effet du taux d'inoculation en ferment du yaourt sur l'acidité du milieu a pu être observé. En effet après 24 heures d'incubation, une augmentation de 118°D, 107,5°D et 96°D a été observée successivement dans la culture mixte de 3.10^9 UFC/ml, 3.10^8 UFC/ml et 3.10^7 UFC/ml en ferment du yaourt.

Les coefficients de corrélation (figures 4, 5 et 6 en annexe 4) des différentes combinaisons de cultures mixtes utilisées, montrent des corrélations négatives entre l'acidité Dornic et le nombre d'EPEC survivants en culture mixte. L'augmentation du taux d'inoculation des ferments du yaourt engendre une augmentation de la production d'acide lactique, ce qui permet d'accentuer l'effet inhibiteur du pH sur la survie d'EPEC dans les cultures mixtes. Cependant, un coefficient de corrélation ($r = -0,41$) a été enregistré dans la combinaison 1(3.10^7 cellules/ml en ferment du yaourt et 10^6 UFC/ml d'EPEC) en montrant que l'effet inhibiteur du pH à l'égard d'EPEC est très faible. En revanche, les coefficients de $r = -0,695$ et $r = -0,901$ enregistrés respectivement dans la culture mixte de 3.10^8 UFC/ml et de 3.10^9 UFC/ml en ferments du yaourt montrent des meilleurs effets inhibiteurs.

En plus de l'effet antagoniste du pH à l'égard d'EPEC, l'hypothèse d'une éventuelle production de substances antibactériennes par les ferments du yaourt n'est pas à exclure.

En effet, en 1998, Ivanova *et al.* ont caractérisé une bactériocine produite par la souche *Sc. thermophilus* 81 dans le bouillon MRS en présentant une activité vis-à-vis de 3 souches qui appartiennent aux 6 souches cibles d'*E. coli*.

Aslim *et al.* (2005), ont attribué l'effet antagoniste de 6 souches tests de *Lactobacillus bulgaricus* sur *E. coli* au pH et à la production de peroxyde d'oxygène (H_2O_2) mais pas aux bactériocines. En effet, les surnageants neutralisés des cultures de *Lb. bulgaricus* n'ont pas présenté de zones d'inhibitions.

Selon Sreekumar et Hosono (2000), la réduction du nombre d'*E. coli* en culture mixte avec *Lb. acidophilus* peut être attribuée à la réduction du pH de 6,5 à 4,2 après 12h de fermentation.

L'acide lactique est responsable de l'inhibition de *Bacillus subtilis*, *E. coli* et *Staphylococcus aureus* par *Lactobacillus* ssp isolée à partir du yaourt commercial. L'inhibition des coliformes par les ferments industriels de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* est à nouveau due à la formation d'acide lactique (DeVuyst et Vandame, 1994).

A l'issue des résultats de cette étude, les cultures mixtes avec des taux d'inoculation de 3.10^8 et 3.10^9 /ml de ferment du yaourt au rapport sélectionné (2/1) de *Lb. bulgaricus* /*Sc. thermophilus* donnent un effet antagoniste comparable à l'égard d'EPEC. Pour l'étude *in vivo* sur des lapins holoxéniques, le taux de 3.10^8 cellules/ml de ferments du yaourt a été retenu pour ensemercer le lait50/50.

VI. Etude *in vivo*

1. Dénombrements fécaux d'*E. coli*

Généralement, la flore intestinale des lapins est composée d'Entérobactéries et de germes anaérobies. Les dénombrements d'*E. coli* dans la flore fécale native des lapins ont donné une moyenne de $1,2 \cdot 10^2$ UFC/g respectivement et de $2,24 \cdot 10^3$ UFC/g de selles pour le lot s 1 et 2.

Selon Marlier *et al.*(2003); Coudert et Licois (2005), la flore bactérienne intestinale normale des lapins est dans son ensemble très mal connue, mais au moins la pauvreté de la flore colibacillaire devrait encore être retenue comme caractéristique constante de la flore fécale des lapins ; d'autres microorganismes pouvant varier fortement d'un animal cliniquement sain à l'autre. Toute augmentation de la flore colibacillaire intestinale au-delà de 10^4 cellules/g d'*E. coli* de contenu caecal est anormale chez le lapin. Cependant les colibacilles entéropathogènes du lapin (REPEC) sont comparables aux EPEC humains. Ils s'attachent à la muqueuse intestinale, provoquent l'effacement des microvillosités, ne produisent pas d'entérotoxines thermostables ou thermolabiles connues et ne sont pas entéro-invasives.

Au niveau des deux lots, la diarrhée a été provoquée par administration quotidienne, *per os*, de 10^6 cellules/ml d'EPEC. Une augmentation du nombre d'*E. coli* a été notée durant tous les jours de l'expérimentation jusqu'à déclenchement de la diarrhée (4^{ème} jour).

Après déclenchement de la diarrhée, les lapins du lot 2 reçoivent *pers os*, 1ml du lait 50/50 contenant en moyenne $3 \cdot 10^8$ UFC/ml de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* pour le lot 2 (lot traité) et 1ml de lait 50/50 stérile pour le lot 1 (lot non traité).

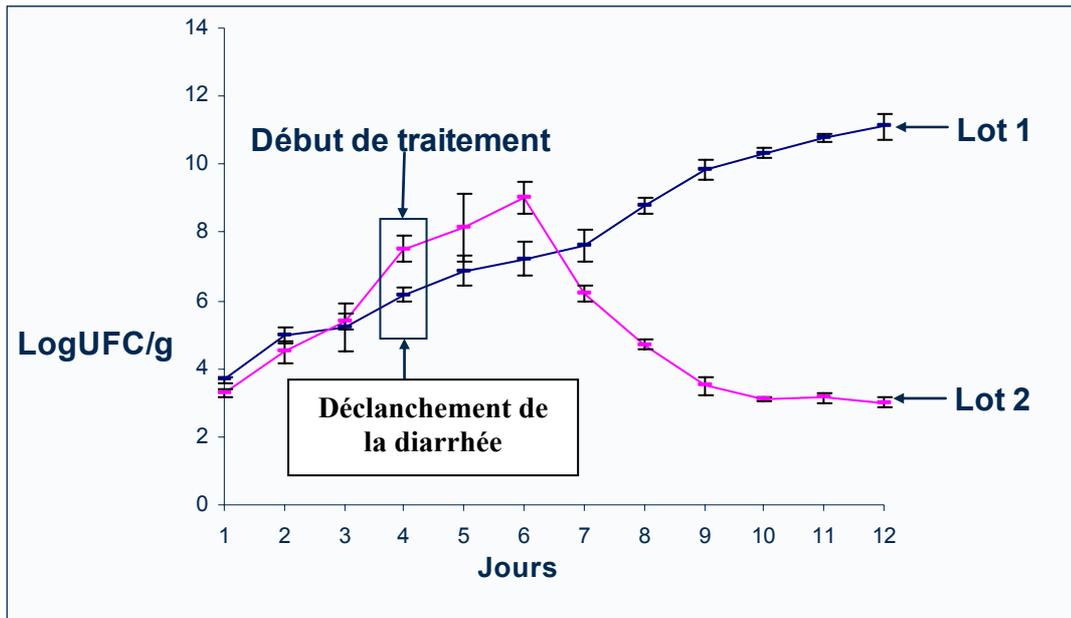


Figure18 : Evolution des comptes fécaux d'*E. coli* dans les selles des lapins.

Légende :

Lot1 : Lapins non traités

Lot2 : Lapins traités

La figure 18, montre l'évolution des comptes fécaux d'*E. coli* dans les selles des lapins des deux lots, avant et après traitement.

Le nombre d'*E. coli* continue à augmenter au cours des 48h de traitement, passant de $3,2 \cdot 10^7$ UFC/g à 10^9 UFC/g Pour le lot 2 et de $1,5 \cdot 10^6$ UFC/g à $1,68 \cdot 10^7$ UFC/g pour le lot1, ce qui semble indiquer que le nombre des bactéries du yaourt n'a pas encore assez d'effet après cette période de traitement (48h) et que le nombre d'*Escherichia coli* continue à augmenter et à proliférer au niveau de l'épithélium intestinal des lapins des deux lots. Ce qui semble indiquer que l'activité antagoniste des bactéries du yaourt n'est pas atteinte après 48h du traitement et que le nombre de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* survivants lors du transit nécessaire pour faire barrière à l'installation d'*E. coli* au niveau de l'épithélium intestinal n'a pas été atteint, ce qui peut être à l'origine de la persistance de la diarrhée chez les lapins du lot2.

Pour le lot 1 (lot non traité), le nombre d'*E. coli* continue d'augmenter durant toute la période de l'expérimentation avec persistance de la diarrhée. Pour le lot 2, une diminution du nombre d'*E. coli* a pu être notée après le 3^{ème} jour de traitement et jusqu'au dernier jour du traitement. Cela signifie que l'effet antagoniste in vivo de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* ne s'exerce qu'après 72 heures de traitement avec 3.10^8 cellules/ml de ferments du yaourt.

Les résultats de l'étude statistique (tableau XVI en annexe 2) montrent qu'après le 3^{ème} jour du traitement de la diarrhée, le nombre d'*E. coli* dans les selles des lapins augmente mais avec un niveau plus élevé dans le lot 2 par rapport au lot 1 montrant une différence significative ($F_c(26,244) > F_{0,99}(12,2)$), ce qui peut confirmer que l'effet anti-diarrhéique du yaourt administré n'est pas encore atteint et que le nombre de *Escherichia coli* continue d'augmenter dans l'intestin des lapins avec un nombre probablement plus élevé chez les lapins du lot 2.

Au 4^{ème} jour de traitement, les résultats statistiques montrent une différence significative des comptes fécaux d'*E. coli* ($F_c(10,673) > F_{0,999}(29,2)$), une différence significative d'*E. coli* a pu être notée avec une diminution du nombre dans le lot 2 contre une augmentation du nombre dans le lot 1. Cette diminution significative du nombre de *E. coli* des deux lots continue jusqu'au 9^{ème} jour de traitement ($F_c(1495,47) > F_{0,999}(29,2)$).

Les résultats du test de Student (Tableau XX en annexe 2) montrent une différence significative dans le nombre d'*E. coli* des deux lots ($t_{obs} > t_{0,975}$), ce qui conforte les résultats de test de l'analyse de la variance.

Les résultats de cette étude statistique, confirment que la diminution du nombre d'*E. coli* dans le lot 2 est due à l'effet antagoniste des ferments du yaourt administré.

Effectivement, selon (Dilmi Bouras et Sadoun, 2002), l'administration du yaourt aux lapins conduit à une présence à des concentrations élevées de *Streptococcus thermophilus* et *Lb. bulgaricus* dans l'estomac, dans le duodénum et dans le gros intestin. Le nombre de *Sc. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* reste important tant que les lapins consomment du yaourt. Les ferments du yaourt résistent aux agressions du tube digestif et le parcourent vivants mais sans s'implanter durablement.

Ces résultats nous laissent supposer que la prise quotidienne de 3.10^8 UFC/ml en ferments du yaourt a permis l'augmentation du nombre des ferments du yaourt survivants dans le tube digestif réduisant ainsi le nombre d'*E. coli* et conduisant à la disparition progressive de la diarrhée chez les lapins du lot 2, alors que ceux du lot 1 ayant reçu du lait infantile stérile exempt de bactéries lactiques, a favorisé le développement d'*E. coli* et donc la persistance de la diarrhée. En parallèle, le lapin pris comme témoin ne recevant ni *E. coli*, ni yaourt infantile et soumis au même régime alimentaire que ceux des lots 1 et 2, n'a présenté aucun signe de diarrhée. Cela peut supposer que le régime alimentaire (salade avec des suppléments en légume) auquel sont soumis les lapins n'a aucun effet sur le déclenchement de la diarrhée et le seul facteur était bien l'EPEC.

La consommation du yaourt contenant un nombre supérieur à 10^7 UFC/g de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, permet aux bactéries du yaourt de rester actives durant leur transit digestif mais ne peuvent coloniser l'intestin (Piaia *et al.*, 2003).

En plus de l'effet de la survie des ferments du yaourt sur la diminution de *Escherichia coli*, d'autres hypothèses peuvent être prises en compte, notamment celle de la production de substances antibactériennes et l'inhibition des sites de fixations d'*E. coli*.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Hamma (2001) et Laribi (2001) qui ont observé une diminution significative ($p < 0,05$) du nombre d'*E. coli* dans les selles des souris après la période de traitement qui a suivi le déclenchement de la diarrhée, en utilisant du lait infantile fermenté avec *Bifidobacterium adolescentis* associé à *Lb. acidophilus* et du lait infantile fermenté par *Bf. bifidum* respectivement. Selon les mêmes auteurs, cette diminution peut être due soit au contact direct des bactéries soit à une compétition des sites de fixation, ou à la production de bactériocine par les bactéries lactiques.

D'après Laribi (2001), l'administration de surnageant de culture de 10^9 UFC/ml de *Bf. adolescentis*, était bien suffisant pour assurer un effet antagoniste vis-à-vis d'*Escherichia coli* dans la flore intestinale des souris.

Récemment, Asselate (2006), a noté une diminution significative ($p < 0,05$) du nombre d'*E. coli* chez les lapins ayant reçu 1ml de *Lb. acidophilus* par rapport au groupe témoin qui reçoit 1ml de lait infantile (lait/ lactosérum _(v/v) de 50/50) stérile pendant la période qui suit le traitement de la diarrhée.

D'autres auteurs ont attribué l'effet probiotique du yaourt à l'augmentation de l'assimilation du lactose chez l'hôte. Selon Drouault et Corithier (2001), le yaourt a des effets positifs sur la digestion du lactose dans le cas de déficiences en lactase. Le lactose non digéré dans l'intestin grêle conduit à des flatulences, spasmes intestinaux et diarrhées osmotiques.

Une étude menée en double aveugle et contrôlée par un placebo a montré que l'administration du lait infantile fermenté par *Sc. thermophilus* et *Bf. breve* à des nourrissons a permis de diminuer la sévérité des épisodes diarrhéiques par rapport à un lait infantile standard. Ce qui suggère que l'effet des probiotiques, notamment ceux de *Sc. thermophilus*, peut être un moyen prometteur dans la lutte contre la diarrhée qui demeure un problème récurrent en pédiatrie (Bourlioux, 2005).

Certains probiotiques augmentent l'expression de mucines et modifient la glycosylation apicale des cellules. Cet effet pourrait être lié à l'inhibition de l'adhérence épithéliale de diverses bactéries pathogènes (AFSSA, 2005).

Corneluis *et al.* (2002) suggèrent que les lactobacilles ont un excellent effet sur le traitement de la diarrhée, la réduction de leur durée et les fréquences des diarrhées. Cet effet peut être dû à la stimulation du système immunitaire, l'inhibition et concurrence aux sites d'attachement des entéropathogènes et à la production de substances antimicrobiennes.

Effectivement selon Lu et Walker (2001), plusieurs mécanismes peuvent être utilisés par les probiotiques pour empêcher la colonisation intestinale par les bactéries pathogènes. Ces mécanismes consistent en une concurrence aux sites de fixations épithéliales, aux nutriments, et à la production de substances antimicrobiennes, d'acides gras volatiles et à la modification chimique de l'acide biliaire, créant ainsi un environnement défavorable à la croissance des bactéries pathogènes.

La motilité intestinale joue un rôle important dans la réduction de la croissance des microorganismes pathogènes dans l'intestin. Les probiotiques pourraient avoir des effets positifs sur la motilité de l'intestin en réduisant le temps de transit des microorganismes pathogènes (Amrouche, 2005).

Selon le même auteur, la paroi des bactéries lactiques a un effet adjuvant sur la réponse immunitaire chez la souris et l'homme. Le peptidoglycane, l'acide teichoïque et le contenu cytoplasmique de bactéries lactiques stimulent la production de certaines cytokines (IL-1, IFN- γ , IL-6, TNF- α), l'activité du macrophage et la prolifération des cellules de Peyer. De même un phosphopolysaccharide extracellulaire produit par *Lb.bulgaricus* OLL1073R-1 stimule la fonction phagocytaire des macrophages *in vivo* et *in vitro* (Amrouche, 2005).

2. Dénombrement d'*E. coli* dans l'intestin et le côlon des lapins

Au terme des différents traitements, les lapins sont disséqués afin d'évaluer le nombre d'*E. coli* présent dans les intestins grêles et des côlons, les résultats de dénombrement d'*E.coli* dans le contenu intestinal et colique sont donnés dans le tableau XI.

Tableau XI: Dénombrement d'*E. coli* dans l'intestin et le côlon des lapins.

Lapins	Côlon (UFC/g)	Intestin grêle (UFC/g)
Témoin sans prise d'EPEC	$2,4.10^3$	$2,05.10^3$
Témoin début diarrhée	$1,62.10^5$	$1,496.10^5$
Lot 1	$9,05.10^8$	$6,89.10^8$
Lot2	$1,28.10^3$	$1,20.10^3$

Ces résultats semblent confirmer l'hypothèse selon laquelle les ferments du yaourt administrés ont exercé un effet antagoniste envers l'implantation d'*E. coli* entéropathogène dans la flore intestinale.

Ces résultats montrent également que le nombre d'*E. coli* est un peu plus élevé dans le côlon que dans l'intestin grêle, cela peut être attribué aux conditions environnementales régnant dans les deux compartiments car le côlon est plus favorable à la croissance d'*E.coli* que l'intestin grêle.

Selon Fortun-Lamothe et Gidenne (2003), jusqu'à la fin de la première semaine suivant la naissance, la partie antérieure du tube digestif du lapin est presque stérile. La flore stomacale augmente légèrement et se situe aux environ de 10^4 à 10^6 bactéries (par gramme de contenu frais) à partir de 30^e jour, dans l'intestin est de 10^6 à 10^7 bactéries /g et elle atteint dans le caecum et le côlon 10^7 à 10^9 /g.

VII : Résultats des coupes histologiques de l'intestin et du côlon

Les photos de différentes coupes histologiques, montrent que les villosités intestinales (figure 19) sont plus touchées que les cryptes coliques (figure 20) (témoin début diarrhéique, témoin non traité et témoin traité) par rapport aux profils des villosités observées chez le témoin n'ayant reçu ni EPEC, ni ferments du yaourt.

Ces observations sont faciles à distinguer au niveau des coupes histologiques des intestins des lapins (témoin diarrhéique et traité) qui montrent, que les villosités d'intestin grêle de lapins diarrhéiques sont de petites tailles et déchiquetées aux extrémités supérieures avec absence d'intégrité histologique le long du profil de la villosité. Par contre les villosités intestinales du lapin traité permettant d'observer de grandes villosités avec une restructuration histologique apparente par rapport au témoin diarrhéique, ce qui atteste de l'effet bénéfique attendu des ferments du yaourt administrés durant la période de traitement. Même si les conditions environnementales au niveau de l'intestin grêle ne sont pas propices pour les ferments du yaourt, cela n'a pas empêché les bactéries administrées d'exercer leur effet bénéfique souhaité en amont au niveau de l'intestin grêle, permettant un meilleur rétablissement de l'état diarrhéique qui commence au niveau de l'intestin grêle.

Les photos des coupes histologiques effectuées au niveau des côlons (figure 20) de témoin diarrhéique et lapin traité, montrent que pour le même individu on constate que les cryptes coliques sont très touchées par rapport à celles des intestins. Cela peut être dû aux conditions régnant dans les deux compartiments du tube digestif dans lequel le côlon est plus favorable à la croissance d'*E. coli*.

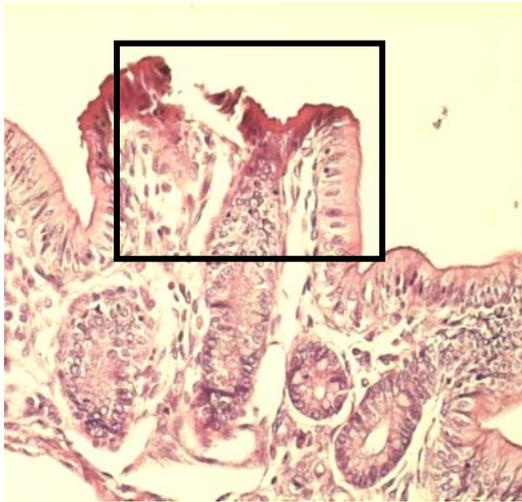
Chez l'homme il existe une augmentation progressive de la densité microbienne de l'estomac au côlon, de 10^3 /g de matières dans l'estomac et le duodénum, la densité passe à 10^4 /g dans le jéjunum, à 10^8 /g dans l'iléon et s'élève à 10^{11} /g dans le côlon (Regnault, 2002).

Les EPEC induisent des lésions spécifiques d'attachement- effacement à la surface des cellules épithéliales intestinales de l'iléon, du caecum et du côlon qui sont les segments intestinaux concernés par les EPEC chez le lapin, elles sont caractérisées

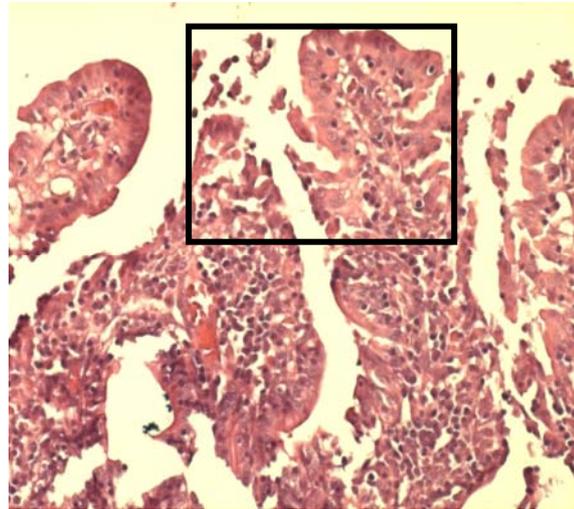
par un attachement intime « pedestal » dans lesquels sont enchâssées les bactéries (Coudert et Licois, 2005).

Selon les mêmes auteurs, une différence de la structure des villosités intestinales a pu être observée entre un animal sain et un autre atteint par des lésions d'entéro-effacement, montrant le changement des structures des villosités ainsi que les bactéries enchâssées au niveau du pedestal (Coudert et Licois, 2005).

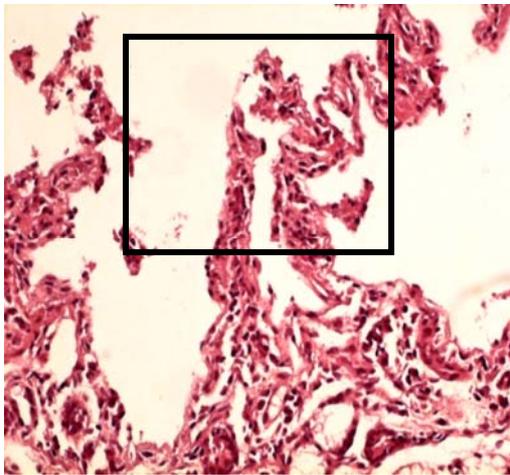
Les cryptes du côlon du lapin traité avec les ferments du yaourt montrent une restructuration très apparente. Elles sont de grandes tailles par rapport au témoin non traité, les cryptes coliques sont presque effacées et de petites tailles. Cela suppose que cette restructuration a été favorisée par les ferments du yaourt. Il semble avoir exercé leur effet antagoniste à l'égard d'EPEC en inhibant sa prolifération au niveau de l'épithélium, permettant de stopper le processus d'effacement des microvillosités causé par EPEC. Ainsi ces microvillosités se sont restructurées, développées et ont augmenté de taille en l'absence de stress causé par la fixation et la prolifération d'EPEC.



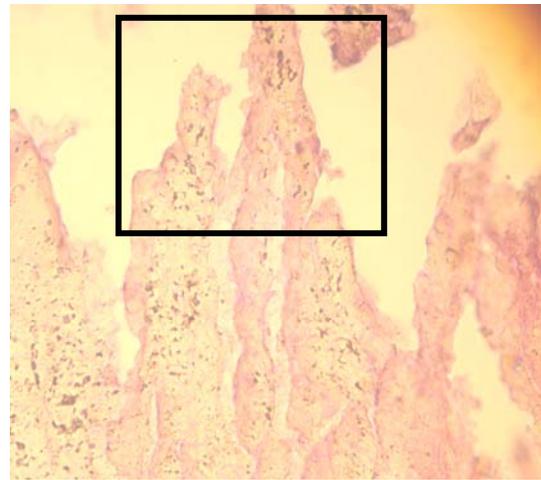
A : témoin sans prise d'EPEC



B : début de l'état diarrhéique



C : lapin non traité



D: lapin traité avec *Sc.thermophilus* et *Lb.bulgaricus*

Figure 19: Photographies des coupes histologiques de l'intestin de lapins (Gross 8x 40x 2,5)

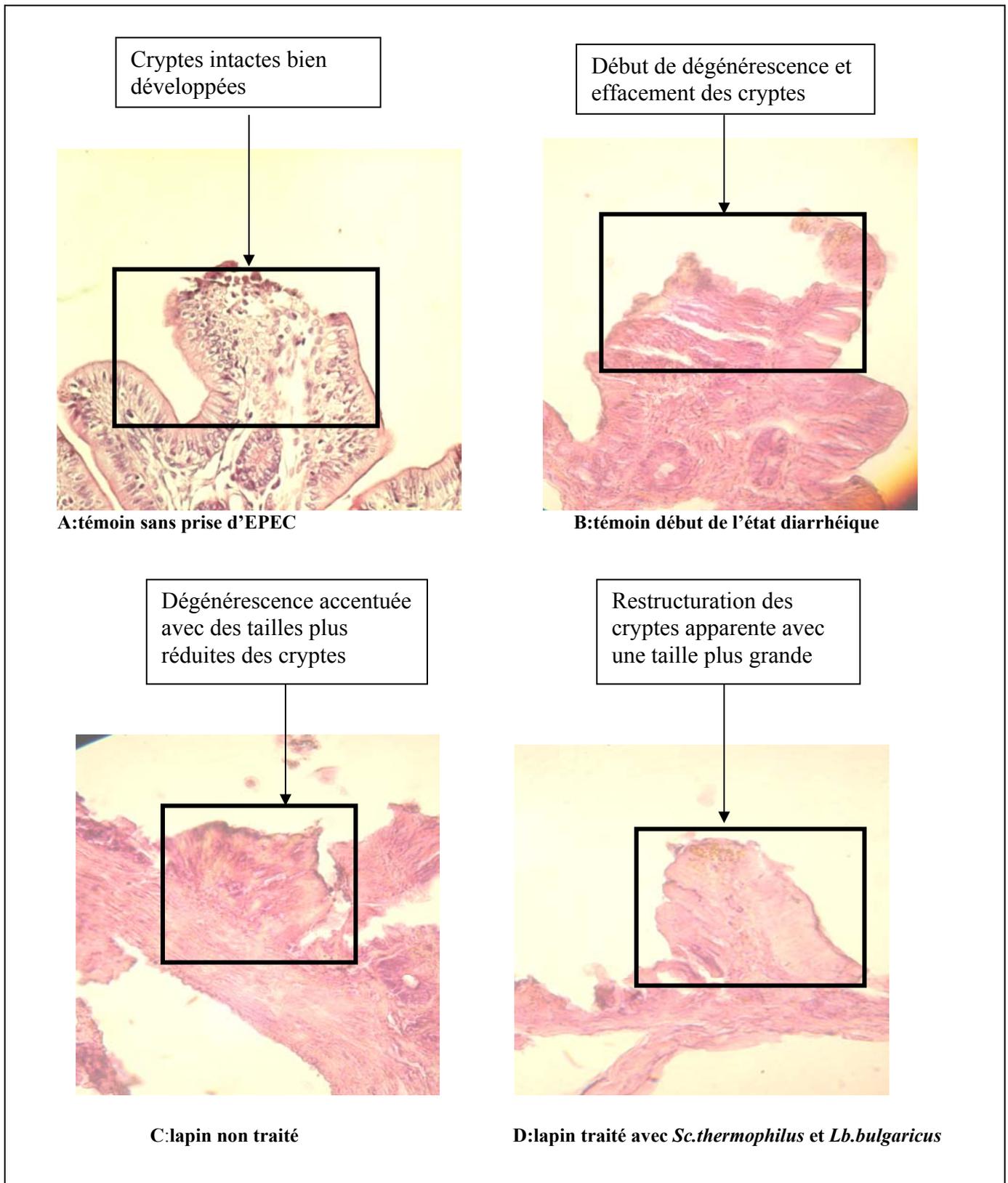


Figure 20: Photographie des coupes histologiques du côlon de lapins (Gross 8x40x2, 5)

Conclusion

Dans cette étude, des ferments industriels de yaourt ainsi qu'une souche d'*Escherichia coli* entéropathogène (EPEC) O111B4 ont été utilisés.

Les résultats d'identification des bactéries du ferment de yaourt et de la bactérie cible, montrent qu'il s'agit de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* qui sont les deux bactéries spécifiques du yaourt et d'*Escherichia coli* entéropathogène O111B4 (EPEC).

Le rapport 2/1 de *Lb. bulgaricus*/ *Sc. thermophilus* a été sélectionné comme le rapport qui permet une bonne synergie entre les deux bactéries du yaourt lors de la fermentation du lait 1^{er} âge mis au point en additionnant 50% de lait écrémé et 50% de lactosérum (lait 50/50). Le rapport 2/1 est retenu pour le reste de l'expérimentation pour l'inoculation du lait 50/50.

Les résultats des tests des puits des surnageants des ferments du yaourt montrent des zones d'inhibitions autour des puits. Ce qui pourrait s'expliquer entre autre par la présence de substances antibactériennes dans le surnageant, produites par les ferments du yaourt.

L'effet antagoniste *in vitro* des ferments de yaourt à l'égard d'EPEC a été étudié en utilisant une culture pure d'EPEC (10^6 UFC/ml) et des cultures mixtes de 10^6 UFC/ml d'EPEC avec des niveaux croissants en ferments du yaourt ($3 \cdot 10^7$ UFC/ml, $3 \cdot 10^8$ UFC/ml et $3 \cdot 10^9$ UFC/ml). Le dénombrement d'EPEC et l'acidité Dornic dans les différentes combinaisons ont été pris en compte pour l'évaluation de l'effet antagoniste des ferments du yaourt à l'égard d'EPEC.

L'inoculum de $3 \cdot 10^8$ UFC/ml de ferment de yaourt a été sélectionné. Pour la même période d'incubation (24 heures), une inhibition de plus de 2 log d'EPEC a été observée. A l'inverse, une augmentation de plus de 3 log du nombre d'EPEC est enregistrée en culture pure d'EPEC.

L'effet antagoniste *in vivo* des ferments de yaourt (rapport et taux d'inoculation sélectionnés) envers EPEC, a porté sur deux lots de lapins, holoxéniques, comportant 4 lapins chacun et deux témoins dont l'un est utilisé comme témoin n'ayant reçu aucune prise d'EPEC et le deuxième sera pris comme témoin diarrhéique au début de la diarrhée.

Après provocation de la diarrhée chez les deux lots, un traitement de cette dernière a été effectué. Il consiste en l'administration quotidienne de 1ml de lait 50/50 contenant 3.10^8 cellules/ml de ferments de yaourt pour le lot2 et 1ml de lait 50/50 stérile pour le lot1 (lot non traité).

L'augmentation du nombre d'*E. coli* (de 2 log) après 3jours de traitement pour le lot 2, indique que l'effet antagoniste des ferments de yaourt n'a pas encore eu lieu durant cette période de traitement. L'effet antagoniste n'apparaît qu'après 4 jours de traitement où le nombre d'*E. coli* commence à diminuer et continue de baisser jusqu'au dernier jour du traitement (9^{ème} jour).

Les comptes fécaux d'*E. coli* chez les lapins du lot1 (traité avec 50/50 stérile), ont montré une augmentation du nombre d'*E. coli* durant toute la période de traitement ce qui signifie que la composition du lait 50/50 stérile n'a pas d'effet sur la réduction du nombre d'*E. coli*, permettant la persistance de la diarrhée chez ses lapins et témoignant de l'effet antagoniste des ferments du yaourt à l'égard d'EPEC.

Les résultats de dénombrement d'*E. coli* dans le contenu intestinal (l'intestin grêle et le côlon) des différents lapins disséqués ont montré des nombres élevés chez les lapins du lot 1(non traité) par rapport aux lapins du lot 2.

L'analyse de la variance a montré une différence significative entre le traitement et le lait stérile durant toute la période de l'expérimentation.

La restructuration des villosités chez les lapins du lot 2 traités aux ferments du yaourt a pu être observée par rapport à celles du lot1 (non traités).

Le traitement de la diarrhée par un lait infantile à base de lactosérum fermenté par les ferments de yaourt est d'un intérêt économique considérable. Cependant, la composition précise de ce genre de produit doit être soigneusement étudiée afin d'éviter d'éventuelles toxicités chez le nourrisson. Cette approche aura des perspectives nouvelles dans le traitement et la prévention des diarrhées infantiles et par extension dans la protection de l'environnement, ouvrant ainsi une voie nouvelle dans la valorisation du lactosérum en Algérie.

Références bibliographiques

Adrian J., Potus J et Frangne R., 1995. La science alimentaire de a à z . Edit Lavoisier Technique et Documentation : 455.

AFSSA., 2005. Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte : 47.

Amrouche T., 2005. Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des Bifidobactéries. Analyse *in vitro* et étude *in vivo* des mécanismes moléculaires impliqués. Thèse de doctorat en Sciences et Technologie des aliments .Université Laval : 16-49.

APRIA.,1973. Les lactosérums. Traitements et utilisation. Edit Lavoisier Technique et Documentation : 1-43.

Aslim B., Yuksedag Z.N., Sarikaya E et Beyatli Y., 2005. Detremination of the bacteriocin like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkist dairy products. LWT-Swiss Society of Food Science and Technology, 38:691-694.

Asselat A., 2006. Intérêt de la mise au point d'un lait écrémé 1^{er} âge fermenté au *Lactobacillus acidophilus* dans la lutte antidiarrhéique à EPEC. Mémoire de Magister en microbiologie appliquée. Université A.Mira de Béjaia : 43-58.

Assous M.V., Basse-Guerineau A.L., Bourhy H., Dhoter .R et Paugam A., 1999. Microbiologie et pathologie infectieuse. Ed. De Boeck et Larcier : 255.

Aumaître H., Lecaillon E., Ollivier S et Bouchaud O., 2004. Diarrhées bactériennes. EMC-Chirurgie,1 :437-454.

Benbernou L., Boudinar F., Chaou M., GranGaud J.P., Kaddache Ch., Khiari M.E., Lamdjadani N., Merbout G., Ouamar O., Zebiri A et Zeroual Z., 2000. Guide de prise en charge de la diarrhée chez l'enfant. Ministère de la santé et la population. Direction de la prévention. Sous direction de santé maternelle et infantile : 1-45.

Bocquet A., Bresson J.L., Briend A., Chouraqui J.P., Darmaun D., Dupont C., Frelut M.L., Ghisolfi J., Goulet O., Putet G., Rieu D., Turck D et Vidailhet M., 2002. Traitement nutritionnel des diarrhées aiguës du nourrisson et du jeune enfant. Archives de pédiatries ,9 :610-619.

Boudier J.F et Luquet F.M., 1970. Le lactosérum dans l'alimentation infantile .Utilisation des lactosérums en alimentation Humaine et Animale. APRIA N°21 : Ed. Lavoisier Technique et Documentation : 1-12.

Boudraa G., Touhami M., Pochart P., Soltana R., Mary JY et Desjeux JF., 1990. Effect of feeding yogurt vesrsus milk in children with persistance diarrhea . Journal Of Pediatrics Gastroenterological and Nutrition, 11 :509-512.

Boularak A., 2005. Guide des déterminations analytiques des laits et produits laitiers. Direction Générale du contrôle Economique et de la Répression des Fraudes : 8.

Bourgeois C.M et Leveau J.Y., 1981. Techniques d'analyses et de contrôles dans les industries agro-alimentaires. Le contrôle microbiologique. Ed. Technique et Documentation ,Tome 3 :106-123.

Bourgeois C et Larpent J.P., 1989. Microbiologie alimentaire. Ed Lavoisier .Technique et documentation. Tome 2 : 191-205.

Bourlioux P., 2005. L'écosystème microbien intestinal n'a pas fini de nous surprendre. Yaourts & Laits fermentés, lettre 21 :1-6.

Bourlioux P., Berihold K., Francisco G et Véronique B., 2002. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host .report on the Danone Symposium « The intelligent intestine » .American Journal of Clinical Nutritional, 78:675-683.

Bunge, 1898 in John L., 1995, Le lait Humain. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine .Code FAO : 86 AGRIS : S01.

Cais-Sokolinska D et Pikul J., 2004. Proportion of the microflora of *Lactobacillus* and *Streptococcus* genera in yoghurts of different degrees of condensation. Bulletin of The Veterinary Institut in Pulawy, 48 : 443-447.

Canzi E., Casiraghi M.C., Zanchi R., Gandolfi R., Ferrari A., Brighenti F., Bosia R., Crippa A., Maestri P., Vesely R et Salvadori B.B., 2002. Yogurt in the diet of the elderly: a preliminary investigation into its effects on the gut ecosystem and lipid metabolism. Lait 82:713-723.

Cathy J et Saloff C., 1995. Diarrhea and fermented milk. Danone World News Letters, 8 :6-22.

Cézard J.P., Chouraqui J.P., Girardet J.P et Gottrand., 2002. Traitement médicamenteux des diarrhées aiguës infectieuses du nourrisson et de l'enfant. Archives de pédiatries, 9 :620-628.

Clarke S.C., Haigh R.D., Freestone P.P.E et Willaims P.H., 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli* a global pathogene. Clinical Microbiology. 3(16):365-378.

Cleary J., Lai L-C., Shaw R.K., Straatman-Iwanowska A., Donnenberg M.S., Frankel G et Knutton S., 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. Microbiology, 150 :527-538.

Coeuret V., Dubernet S., Bernardeau M., Gueguen M et Vernoux J.P., 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. Lait 83 :296-306.

Collington G.K., Booth I.W et Knutton S., 1998. Rapid modulation of electrolyte transport in Caco-2 cell monolayers by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infection. Gut, 42:200-207.

Corneluis W., Van N., Chris F., Michelle M., Garrisson et Dimitri A., 2002. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: A meta-analysis; *Pediatrics*, 1(109): 678-683.

Coudert P et Licois D., 2005. Pathologie et Hygiène au 8^{ème} Congrès Mondial de Cuniculture. *Cuniculture Magazine*, 32 :63-69.

Courouble G., Duffillot D., Sans A., Malpote E., Berchel C et Nicolas M., 2000. Enquête sur les gastro-entérites aiguës infantiles au CHU de Pointe-à-Pitre/Abymes de Guadeloupe de novembre 1997 à mars 1998. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 93 :58-61.

Courtin P et RUL F., 2004. Interaction between microorganism in a simple ecosystem. Yogurt bacteria as a study model. *Lait* 84:125-134.

De Roissart H ; Luquet F.M., 1994. Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Ed. Loriga, 2 : 148.

De Roos et Katan., 1988. Effect of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 405-411.

DeVuyst L et Vandame E.J., 1994. Antimicrobial potential of Lactic acid bacteria in Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Ed. Blanckie Academic and Professional, 98-99.

Dilmi Bouras A. et Sadoun D., 2002. Survie des ferments du yaourt dans le tube digestif du lapin. *Lait* 82 : 247-253.

Diouf S., Sarr M., Sy H., Abdallahi.C et Fall M., 1990. Malnutrition et diarrhée chez l'enfant au CHU de Dakar. Aspects cliniques, épidémiologiques et biologiques. *Médecine d'Afrique Noire*, 2 (37):29-32.

Donnenberg M.S et Whittam T.S., 2001. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation*, 5(107):539-548.

Drouault S et Corthier G., 2001. Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinar Research*, 32:101-117.

Dupeyron C., 1997. Les diarrhées aiguës bactériennes. Causes et mécanismes. *Développement et Santé* : 128.1-9.

Dupon C., 2003. Protein requirements during the first year of life. *American journal of Clinical Nutrition*, 77:1544-1549.

Eberlin T., 1997. Les infections microbiennes. *Physiopathologie*. Ed. Nathan. Tome 2:32.

Espinosa A., Medina L.M., Jordano R.,1994. Comparative study of M17 media for enumeration of *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* in fermented milks. *Microbiologie-Aliments –Nutrition*, International College Alexandre Teissier, 12 : 49-51.

FAO., 1998. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. (<http://www.fao.org/docrep/T4280F/T4280F00.htm#Contents>).

Fortun-Lamothe L et Gidenne T., 2003. Besoins nutritionnels du lapereau et strategies d'alimentation autour du sevrage. *INRA Productions Animales*, **1**(16) :39-47.

Gallois M., 2006. Statut nutritionnel du lapereau: Maturation des structures et des fonctions digestives et sensibilité à une infection par une souche entéropathogène *Escherichia coli*. Thèse doctorat en qualité et sécurité des aliments. Institut National polytechnique de Toulouse : 172.

Garmendia J., Frankel G et Cripin V.F., 2005. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infection And Immunity*, **5**(73) : 2573-2585.

Guiraud J et Galzy.P., 1980. Les bactéries. Analyses microbiologiques dans les industries alimentaires. Ed. Usine : 82.

Hamma S., 2001. Contribution à l'amélioration de l'effet antibactérien de *Bifidobacterium bifidum* vis-à-vis d'*Escherichia coli* entéropathogène, responsable des diarrhée infantile : association de lactobacillus acidophilus. Thèse de Magister en biochimie-microbiologie. Université A.Mira de Béjaia : 100-108.

Hance P., Teyssou R., Nicand E et Buisson Y., 1998. Sources alimentaires des diarrhées bactériennes. Toxi-infections alimentaires collectives. Médecine thérapeutiques. Pédiatries, **1**(1) : 25-30.

Harris L.J., 2006. *Escherichia coli*. Department of Food Sciences and Technology .University of California-Davis. Class Notes PHR150:1-10.

Heller J.K., 2001. Probiotic bacteria in fermented foods. Product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, **73**:374-395.

Heyman M et Ménard S., 2002. Probiotic microorganisms. How they affect intestinal pathology. *Cellular Molecular Life Sciences*, **59**:01-15.

Hould., R.,1984. Techniques d'histologie et cytopathologie. Ed. Gérardie: 65-76.

Ivanova I., Miteva V., Stefanova T.S., Pantev A., Budakov I., Donova S., Moncheva P., Nikolova I.,Dousset X., et Boyaval P.,1998. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81 .*International Journal of Food Microbiology*, **42** :147-158.

Jacquet Violleau V., 1999. Déminéralisation par électrodialyse en présence d'un complexant : application au lactosérum. Thèse doctorat science agroressources .Université Toulouse : 47-48.

Jiwoua Ngounou C., Ndjouen R., Mbofung C.M.F et Noubi L., 2003. Mise en évidence de la biodisponibilité du calcium et du magnésium au cours de la fermentation du lait par des bactéries lactiques isolées du lait caillé de Zébu. *Journal of Food Engineerin*, **57** :301-304.

Joffin C et Joffin J.N., 2000. Microbiologie alimentaire. 5^e édition. Collection., Biologie Technique : 175.

John L., 1995. Le lait humain. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine .Code FAO : 86 AGRIS : S01.

Knutton S., Phillips A.D., Smith H.R., Gross R.J., Shaw R., Watson P et Price E.,1991. Screening for Enteropathogenic *Escherichia coli* in infants with Diarrhea by the Fluorescent-Actin Staining Test. Infection and Immunity, **1**(59):365-371.

Kurultay S ; Ökstiz Ô et Kaptan B., 2005. Determination of the effects of different amino acids, sodium formate and their combinations on some growth characteristics of mixed and single cell cultures of yogurt bacteria. Journal of Tekirdag Agricultural Faculty ,**2** (2):153-160.

Lamontagne M ., 2002. Produits laitiers fermentés. In Science et Technologique du Lait Ed. Ecole polytechnique de Montréal : 443-469.

Lara-Villoslada F., Olivares M et Xaus J., 2005. The Balance between Caseins and Whey Proteins in Cow's Milk determines its Allergenicity. Journal of Dairy Science, **5**(88) :1654-1660.

Laribi S., 2001. Etude *in vivo* et *in vitro* de l'activité antibactérienne de *Bifidobacterium adolescentis* à l'égard d'*Escherichia coli* entéropathogène. Mémoire de Magister en biochimie-microbiologie. Université A.Mira de Béjaia : 50-54.

Larpent J.P., 1989. Les bactéries lactiques in **Bourgeois C.M et Larpent J.** Microbiologie alimentaires. Les fermentations alimentaires .Tome 2. Ed. Lavoisier. Technique et Documentation : 3-14.

Larpent J.P., Marie P.C., Germonville A., Jacquet M et Thétas J.L.,1997. Microbiologie alimentaire. Ed .Technique et Documentation : 792-799.

Laurent C., 2002. Le lait maternel, aspects pratiques. Institut Co-Naître. D'après une conférence donnée auprès de personnels de PMI.

Lebas F., Coudert P., De Rochambeau H et Thébault R.G, 1997. The rabbit-Husbandry. Health and production. FAO. ISBN 92-5-103441-9.

Lema M., Williams L et Rao D.R., 2001. Reduction of fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. Small Ruminant Research, **39**:31-39.

Lien E.L., 2003 .Infants formulas with increased concentrations of α -Lactalbumin .American Journal of Clinical Nutrition, **77**:1555-1558.

Lonnerdal B., 1985. Biochemistry and physiological function of human milk proteins. American journal of Clinical nutrition, **42**:1299-1317.

Lu L et Walker A.W., 2001. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *American Journal of Clinical Nutrition* ,73:1124-1130.

Maragkoudakis P.A., Zoumpopoulou G., Miaris C., Kalantzopoulos G., Pot B et Tsakalidou E., 2006. Probiotic potential of *Lactobcillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*,16 : 189-199.

Marlier D., Dewrée R., Delleur V., Licois D., Lassence C., Poulipoulisa A et Vindevogel H., 2003. Description des principales étiologies des maladies digestives chez le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*). *Annal Médecine Veterinaire* , 147:385-392.

Marteau P.R., Vrese M., Celtier C.J et Schrezenmeir J., 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73.430-436.

Martini C.M., Bollweg L.G., Levitt D.M et Savaiano A.D.,1987. Lactose digestion by yogurt β -galactosidase. Influence of pH and microbial cell integrity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 45 : 432-436.

Moreau M.C., 2001. Les probiotiques. Des microorganismes bénéfiques pour notre système immunitaire. *Cholé-Doc* ,63 :1-6.

Nataro J.P et Kapper J.B., 1998. Diarrhegenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology*, 11 (1) : 142-201.

Niangué-Beugré N.N., Couitchéré.L., Oulai.S.M., Cissé.L et Enoh.J., 2006.Aspects épidémiologiques cliniques et éthiologiues des diarrhées aigués des enfants agés de 1mois à 5 ans reçus dans le service de pédiatrie de CHU de Treichville au Cote d'Ivoire. Lettre à la rédaction. *Archives de pédiatries*, 13 : 395-398.

OMS., 2006. Relevé épidémiologique hebdomadaire. *Weekly Epidemiological Record*. ,11(81) :97-104.

Petransxiene D et Lapied L., 1981. La qualité bactériologique du lait .Ed Technique et Documentation : 182-187.

Piaia M., Antoine J-M., Mateos-Guardia J-A., Leplingard A et Lenoir-Winkoop I., 2003. Assesment of the benefits of live yogurt. Methods and markers for in vivo studies of the physiological effects of yogurt cultures. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 15: 79-87.

Rajagopol .S.N. et Sandine W.N., 1990. Associative Growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lcatobacillus bulgaricus* in skim milk. *Journal of Dairy Science*, 4 (73):894-899.

Regnault J.P., 2002. Elements de microbiologie et d'immunologie. Flores commensales. Ed. Décarie : 11

Robin M.J et Rouchy A., 2001. Les probiotiques. *Nutrithérapie Info* :1-4.

Saavedra J.M, 2001. Clinical application of probiotic agents. *American Journal of Clinical Nutrition*, 37 :1147-1151.

Salminen S., 2005. Des probiotiques comme moyen plus spécifiques et plus efficace de lutte contre les anomalies de la microflore intestinale. *Yaourt& Lait fermenté*. Lettre 25 :1-6.

Société Canadienne de Pédiatrie., 2003. Le traitement de la diarrhée. *Pediatrics Child Health* ,8(7):463-466.

Sreekumar .O et Hosono.A., 2000. Effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal Flora and Fecal Enzymes of rats and *in vitro* Inhibition of *Escherichia coli* in coculture. *Journal of Dairy Science*, 83:931-939.

Sullivan A et Nord C.E., 2005. Probiotics and gastrointestinal diseases. *Journal of International Medicine*, 257:78-92.

Tagg J.R et McGiven A.R., 1971. Assay system for bacteriocins . *Applied Microbiology.*, 21(5): 943.

Turck D., 2005. Allaitement maternel. Les bénéfices pour la santé de l'enfant et de sa mère. Unité de gastrologie, hépato-gastrologie et nutrition, CHRU de Lille Hôpital Jeanne-de Flandre. *Archives de pédiatrie*, 12 :145-165.

Uhlen S.,Toursel F.,Gottrand F et l'association française de pédiatrie ambulatoire.,2004. Traitement des diarrhées aiguës. Les habitudes de prescription des pédiatres libéraux. *Archives de Pédiatrie*, 11 :903-907.

Urbain D., Belaiche J., VOS D.M ., Fiassé R., Hiele M., Huijchebaert S., Jacobs F., Malonne H., Speelman P., Van Gompel A., Van Gossum A et Van W.E., 2001. Le traitement de la diarrhée aiguë. Evaluation critique par un groupe interuniversitaire et recommandation .Partie II: Revues des options thérapeutiques. *Louvain Medicine*, 120:362-372.

Vallance B.A et Finlay B.B., 2000. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli* .*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 16 (97) :8799-8806.

Veisseyre R., 1975a. Principes fondamentaux de la technologie des fromages. *Téchnologie du lait*. Ed .Maison Roustique : 431.

Veisseyre R., 1975b. Technologie des laits fermentés et des laits spéciaux. *Technologie du lait*. Ed. Maison Roustique : 329-330.

Vizoso Pinto M.G., Franz C.M.A.P., Schillinger U et Holzapfel H.W., 2006. *Lactobacillus* spp. With *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International Journal of Food Microbiology*,105 : 208-214.

Xanthopoulos V., Petridis d., Tzanetakis N., 2001. Characterization and classification of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* strains isolated from traditional Greek yogurts.*Journal of Food Science*, 5(66) :747-752.

Zurich C.B., 2002. Le rôle des probiotiques dans la prévention et le traitement de la gastro-entérite aiguë chez l'enfant. *Paediatrica*, 5 (13) :50-53.

Annexes1 : Données bibliographiques

Tableau I : Composition du lait de divers mammifères et vitesse de croissance de la progéniture (Bunge, 1898)

Espèces	Nombre de jours pour doubler le poids de naissance	Teneur du lait (g/litre)			
		Lipides	Protéines	Lactose	Cendres
Femme	180	38	9	70	2
Jument	60	19	25	62	5
Vache	47	37	34	48	7
Renne	30	169	115	28	-
Chèvre	19	45	29	41	8
Brebis	10	74	55	48	10

TABLEAU II : Composition protéique du lait humain (g/litre) (John,1995)

Protéines	Moyennes	Valeurs extrêmes
Protéines totales	10.60	7.30-20.00
Caséines	3.70	1.40-6.80
Protéines solubles	6.90	4.00-10.00
α-lactalbumine	3.60	1.40-6.00
Lactoferrine	1.50	1.00-3.20
Lysozyme	0.12	0.04-.21
Albumine sérique	0.50	0.20-0.97
IgA sécrétoires	1.00	0.60-1.60
IgG	0.01	-
IgM	0.01	-

Tableau III : Composition du lait de vache (FAO, 1998).

	Lait de vache
Valeur energetique (kCal/litre)	705
Proteines (g/l)	32,0 g/l
Caseines	26,0
Proteines solubles	6,0
α - lactoglobuline	2,7
β - lactalbumine	1,5
lactoferrine	Traces
lysozyme	Traces
albumine sérique	0,3
Immonoglobulines	0,7
IgA sécrétoires	-
IgG	-
IgM	-
IgD	-
Glucides (g/l)	48,0 g/l
Lactose	48,0
oligosaccharides	-
Lipides (g/100g de matières grasses)	35 g/l
Triglycerides	96,0 - 98,0
Diglycerides	0,3 - 1,6
Monoglycerides	Traces
Phospholipides	0,2 - 1,0
Cérébrosides	Traces
Stérols	0,2 - 0,4
Acides gras libres	0,1 - 0,4

Tableau IV: Composition protéique du lait (John,1995)

Noms	% des protéines
<u>Caséines</u>	75-85
Caséine α_{s1}	39-46
Caséine α_{s2}	8-11
Caséine β	25-35
Caséine κ	8-15
caséine γ	3-7
<u>Protéines du lactosérum</u>	15-22
β -lactoglobuline	7-12
α -lactalbumine	2-5
Sérum albumine	0,7-1,3
Immunoglobulines (G1, G2, A, M)	1,9-3,33
Protéose-peptone	2-4

Tableau V : Comparaison entre la DBO₅ du lait et de ses dérivés (Jacquet Violleau,1999)

Produits	DBO (mg/l)	Pourcentage de contribution à la DBO ₅ de		
		Matières grasses	Protéines	Lactose
Lait	104000	31,5	36,4	44,5
Babeurre	68000	4,2	48,2	46,7
Lactosérum	34000	5,9	20,6	70,8

Tableau VI : Composition type de lactosérums doux et acide (g/l) (Jacquet Violleau, 199)

	Lactosérum doux	Lactosérum acide
Matières sèches	71	65,8
Matières grasses	2,0	0,4
Lactose	49,0	44,0
Azote non protéique	0,5	0,2
Protéines	8,0	7,0
Acide lactique	2,0	5,0
Acide citrique	1,3	0,3
Minéraux	5,0	8,0
Dont phosphore	0,41	0,65
(entre autres) calcium	0,47	1,25
potassium	1,45	1,48
sodium	0,5	0,53
chlorure	2,19	2,09

Tableau VII : Teneurs indicatives du lait de femme, du lait de vache et des préparations infantiles, destinées aux nourrissons à 4-6 mois (Turck., 2005)

Pour 100ml	Lait de vache	Préparation pour nourrissons avec 12,6-15g de poudre (dilués dans 100ml)	Lait de femme mature
Protides (g)	3,7	1,5-1,9	1
Caséine (%)	80	60-80 ^a 44-50 ^b	40
Lipides (g)	3,5	2,6-3,8	3,5
Acide linoléique (mg)	90	350-740	350
Acide α linoléique (mg)	Traces	30-100	37
Glucide (g)	4,5	6,7-9,5	7,5
Lactose (%)	100	47-100	85
Dextrine-maltose (%)	0	1.1-2.6	0
Autres sucres	Aucun	Amidon , fructose, glucose saccharose	Oligosaccharides
Sels minéraux (mg)	900	250-500	210
Sodium (mg)	48	16-28	16
Calcium (mg)	125	43-93	33
Calcium/phosphate	1,25	1,2-1,9	2
Fer (mg)	0,03	0,7-1	0,05

a: préparation à protéines non modifiées/b : préparations à protéines adaptées

Tableau VIII : Tableau d'identification de *Lactobacillus bulgricus*

Caractère	Résultat	Référence
Production de CO ₂ à partir du glucose Culture à 15°C Culture à 45°C Arginine Esculine Culture sur Teepol 0.4%	- - + - - *	Guiraud et Galzy (1980)
Lactose Arabinose Mélbiose Rhamnose Raffinose Mannose Tréhalose Xylose Sorbitol Saccharose Salicine	+ - * - - - - - - - -	Bourgeois et Larpent (1989)
Glucose Galactose Maltose	+ + -	Xanthopoule et al (2001)

Tableau IX : Tableau d'identification de *Streptococcus thermophilus*

Caractère	Résultat	Référence
Croissance à 10°C	-	Guiraud et Galzy (1980)
Croissance à 45°C	+	
Croissance à Ph 9,2	*	
Croissance à pH 9,6	-	
Croissance à Na Cl 2%	-	
Croissance à Na Cl 4%	-	
Croissance à Na Cl 6,5%	-	
Résistance thermique (60°C/30min)	+	
Croissance sur lait « bleu »	-	
Arginine	-	
Résistance au Tellurite	*	
Réduction de TTC	*	
Lait tournesolé	AC	
Lactose	+	
Maltose	-	
Mélibiose	*	
Arabinose	*	
Acétoïne	*	
Cellubiose	*	
Gélatinase	*	
Hydrolyse d'amidon	*	
Glucose	+	
Galactose	v	
Sacharose	+	Bourgeois et Larpent (1989)
Mannose	*	
Tréhalose	-	
Mannitol	*	
Raffinose	+/-	

V : variable

* : non déterminé

AC : Acidification Coagulation

Annexes 2: Résultats

Tableau I : Résultats de la mesure d'acidité en culture pure d'EPEC (témoin)

Temps (heure) Acidité Dornic (°D)	Essai 1	Essai 2	Moyenne
0	18	18	18
3	19	18	18.5
6	23	22	22.5
12	23	24	23.5
16	29	27	28
20	30	28	29
24	31	29	30

Tableau II: Résultats de la mesure d'acidité en culture mixte d'EPEC avec $3.10^7/ml$ en ferments du yaourt

Temps (heure) Acidité Dornic (°D)	Essai 1	Essai 2	Moyenne
0	18	18	18
3	18	19	18.5
6	20	21	20.5
12	39	41	40
16	98	102	100
20	105	105	105
24	115	113	114

Tableau III: Résultats de la mesure d'acidité en culture mixte d'EPEC avec $3.10^8/ml$ en ferments du yaourt

Temps (heure) Acidité Dornic (°D)	Essai 1	Essai 2	Moyenne
0	19	18	18.5
3	20	18	19
6	22	20	21
12	67	65	66
16	110	108	109
20	115	113	114
24	127	125	126

Tableau IV: Résultats de la mesure d'acidité en culture mixte d'EPEC avec $3.10^9/ml$ en ferments du yaourt

Temps (heure) / Acidité Dornic (°D)	Essai 1	Essai 2	Moyenne
0	19	17	18
3	18	21	19.5
6	29	30	29.5
12	93	95	94
16	120	125	122.5
20	128	130	129
24	137	135	136

Tableau V: Résultats de dénombrement d'EPEC (en log UFC) dans la culture pure

Temps (h)	Essai1	Essai2	Moyenne
0	6	6	6
6	8,2	8,3	8,25
12	8,69	8,47	8,58
16	9,13	9,145	9,1375
20	9,5	9,45	9,475
24	9,4	9,48	9,44

Tableau VI : Résultats de dénombrement d'EPEC (en log UFC) dans la 1^{ère} combinaison.

Temps (h)	Essai1	Essai2	Moyene
0	6	6	6
6	7,88	7,85	7,865
12	7,78	7,8	7,79
16	7	7,1	7,05
20	6,3	6,28	6,29
24	6	6,4	6,2

Tableau VII : Résultats de dénombrement d'EPEC(en logUFC) dans la 2^{ème} combinaison

Temps (h)	Essai1	Essai2	Moyenne
0	6	6	6
6	7,7	7,5	7,6
12	7,3	7,5	7,4
16	6,5	6,54	6,52
20	3,6	3,88	3,74
24	3,37	3,41	3,39

Tableau VIII : Résultats de dénombrement d'EPEC(en logUFC) dans la 3^{ème} combinaison

Temps (h)	Essai1	Essai2	Moyenne
0	6	6	6
6	7,4	7,39	7,395
12	5,37	5,38	5,375
16	4,3	4,32	4,31
20	3	3,04	3,02
24	2,9	3	2,95

Tableau IX: Résultats *in vivo* des dénombrements d'*E. coli* des lapins non traités en log UFC/g de selle.

Jours	Lapin 1	Lapin 2	Lapin 3	Lapin 4	Moyenne
1	3,689	3,778	3,591	3,623	3,67025
2	5,267	4,98	4,672	5,041	4,99
3	4,956	5,093	4,596	6,255	5,225
4	6,448	5,966	6,021	6,276	6,17775
5	6,802	6,51	6,653	7,505	6,8675
6	7,455	6,738	6,875	7,822	7,2225
7	7,83	7,086	7,415	8,161	7,623
8	9,012	8,511	8,763	8,88	8,7915
9	9,676	10,247	9,623	9,79	9,834
10	10,34	10,519	10,176	10,3	10,33375
11	10,643	10,848	10,838	10,76	10,77225
12	10,709	11,645	10,973	11,102	11,10725

Tableau X: Résultats *in vivo* des dénombrements d'*E. coli* des lapins traités en log UFC/g de selles.

Jours	Lapin 1	Lapin 2	Lapin 3	Lapin 4	Moyenne
1	3,128	3,397	3,299	3,19	3,2535
2	4,839	4,64	4,363	4,132	4,4935
3	5,414	5,125	5,662	5,319	5,38
4	7,599	7,975	7,429	7,035	7,5095
5	8,865	6,649	8,6	8,439	8,13825
6	8,998	9,685	8,531	8,863	9,01925
7	6,21	6,525	6,012	6,028	6,19375
8	4,69	4,752	4,518	4,845	4,70125
9	3,521	3,139	3,564	3,74	3,491
10	3,11	3,136	3,166	3,033	3,11125
11	3,312	3,079	3,127	3,02	3,1345
12	3,198	2,977	2,988	2,856	3,00475

Tableau XI : Résultats des dénombrements de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* au rapport Lb/Sc de 1/1.

Temps (h)	Essai 1		Essai 2		Moyenne	
	log UFC (Lb)	log UFC (Sc)	log UFC (Lb)	log UFC (Sc)	log UFC (Lb)	log UFC (Sc)
0	6	6	6	6	6	6
4	7,95	8,04	7,99	7,98	7,97	8,01
8	9,30	8,98	9,26	9,06	9,28	9,02
24	12,45	9,41	11,95	9,33	12,2	9,37

Tableau XII : Résultats des dénombrements de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* au rapport Lb/Sc de 1/2.

Temps (h)	Essai 1		Essai 2		Moyenne	
	log UFC (Lb)	logUFC (Sc)	logUFC (Lb)	log UFC (Sc)	logUFC (Lb)	log UFC (Sc)
0	6	6,30	6	6,30	6	6,30
4	7,97	7,98	7,85	8,1	7,91	8,04
8	8,97	8,97	9,07	8,93	9,02	8,95
24	8,50	7,77	9,08	8,23	8,79	8

Tableau XIII: Résultats des dénombrements de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* au rapport Lb/Sc de 2/1.

Temps (h)	Essai 1		Essai 2		Moyenne	
	logUFC (Lb)	log UFC (Sc)	log UFC (Lb)	log UFC (Sc)	logUFC (Lb)	log UFC (Sc)
0	6,30	6	6,30	6	6,30	6
4	6,93	7	7,19	6,96	7,06	6,98
8	8,24	8,27	8,76	8,81	8,5	8,54
24	9,72	9,71	9,66	9,77	9,69	9,74

Tableau XIV: Résultats de l'analyse de la variance de dénombrement de *E. coli* dans les selles des lapins au 1^{er} jour du traitement de la diarrhée.

Source de variation	ddl	SCE	CM	F _{obs}
Factorielle	1	3,546	3,546	34,396
Résiduelle	6	0,609	0,1015	
Totale	7	4,155	-----	

Tableau XV: Résultats de l'analyse de la variance de dénombrement de *E. coli* dans les selles des lapins au 2^{ème} jour du traitement de la diarrhée

Source de variation	ddl	SCE	CM	F _{obs}
Factorielle	1	4,393	4,393	10,673
Résiduelle	6	4,47	0,4116	
Totale	7	6,863	-----	

Tableau XVI: Résultats de l'analyse de la variance de dénombrement de *E. coli* dans les selles des lapins au 3^{ème} jour du traitement de la diarrhée

Source de variation	ddl	SCE	CM	F _{obs}
Factorielle	1	6,456	6,456	
Résiduelle	6	1,476	0,246	26,244
Totale	7	7,932	-----	

Tableau XVII: Résultats de l'analyse de la variance de dénombrement de *E. coli* dans les selles des lapins au 4^{ème} jour du traitement de la diarrhée

Source de variation	ddl	SCE	CM	F _{obs}
Factorielle	1	4,12	4,12	
Résiduelle	6	0,83	0,138	29,855
Totale	7	4,95	-----	

Tableau XVIII: Résultats de l'analyse de la variance de dénombrement de *E. coli* dans les selles des lapins de 5^{ème} jour du traitement de la diarrhée.

Source de variation	ddl	SCE	CM	F _{obs}
Factorielle	1	33,63	33,63	
Résiduelle	6	0,187	0,0311	1090,99
Totale	7	33,817	-----	

Tableau XIX: Résultats de l'analyse de la variance de dénombrement de *E. coli* dans les selles des lapins au 9^{ème} jour du traitement de la diarrhée.

Source de variation	ddl	SCE	CM	F _{obs}
Factorielle	1	131,303	131,83	
Résiduelle	6	0,527	0,0878	1495,47
Totale	7	131,83	-----	

Tableau XX: Résultats de test de Student de dénombrement de *E. coli* dans les selles des lapins au cours de la période du traitement.

Jours de traitements	\bar{X}_1	\bar{X}_2	SCE ₁	SCE ₂	n	DDL	t _{Obs}	t _{0,975}
1 ^{er} jour	6,1777	7,509	0,1520	0,456	4	6	5,9166	2,447
2 ^{ème} jour	6,8675	8,138	0,5845	3,049	4	6	2,64	2,447
3 ^{ème} jour	7,222	9,019	0,768	0,706	4	6	5,126	2,447
4 ^{ème} jour	7,623	6,193	0,664	0,170	4	6	5,421	2,447
5 ^{ème} jour	8,791	4,70	0,136	0,057	4	6	32,25	2,447
9 ^{ème} jour	11,107	3,004	0,465	0,060	4	6	38,76	2,447

Tableau XXI: Diamètres des zones d'inhibition des surnageants de *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* de l'antagonisme indirect des ferments du yaourt envers EPEC.

<i>Lb. bulgaricus</i>					<i>Sc. thermophilus</i>				
Zone 1	Zone 2	Zone 3	Zone 4	M	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Zone 4	M
7mm	7mm	10mm	6mm	7,5mm	7mm	9mm	13mm	14mm	10,75mm

Annexes 3 : Composition des milieux de culture

Tableau I : MRS_c

Ingrédients	Quantités (g/l)
Poly peptone	10
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Glucose	20
Tween80	1,08
Chlorhydrate de cystéine	0,5
Phosphate dipotassique	2
Acétate de sodium	5
Citrate d'ammonium	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
pH 5,4	
Autoclaver à 121°C/15min	

Tableau II : Milieu M17

Ingrédients	Quantités (g/l)
Tryptone	2,5
Peptone pepsique de viande	2,5
Peptone papainique de soja	5
Extrait de levure	2,5
Extrait de viande	5
Lactose	5
Glycérophosphate de sodium	19
Sulfate de magnésium	0,25
Acide ascorbique	0,5
pH 6,8	
autoclaver à 115°C/20min	

Tableau III : Milieu de fermentation des sucres pour *Sc. thermophilus*.

Ingrédients	Quantités (g/l)
Extrait de viande	5
Peptone	5
Tryptone	10
Rouge de chlorophénol (à 0,8%dans l'éthanol)	0,04
pH7	
Autoclaver à 120°C/20min	

Tableau IV : Milieux de fermentation des sucres pour *Lb. bulgaricus*

Ingrédients	Quantités g/l
Peptone	15
Extrait de levure	5
Tween 80	1ml
Rouge de chlorophénol (à 0,8%dans l'éthanol)	0,04
Gélose	1
pH 6,5	
Autoclaver à 115°C/10min	

Tableau V : Milieu pour Hydrolyse de la gélatine

Ingrédients	Quantités (g/l)
Extrait de viande	10
Peptone	10
Chlorure de sodium	5
Gélatine	150
pH 7,4-7,6	
Autoclaver à 112-115°C/30min	

Tableau VI : Bouillon nutritif.

Ingrédients	Quantités (g/l)
Peptone	10
Extrait de viande	5
NaCl	5
pH 7,1	
Autoclaver à 120°C/20min	

Tableau VII : VRBG (Gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre)

Ingrédients	Quantités (g/l)
Peptone	7
Extrait de levure	5
Sels biliaires	1,5
Glucose	10
Chlorure de sodium	5
Rouge neutre	0,03
Cristal violet	0,002
Agar-agar	12
pH 7,4	
« Stériliser » par ébullition (15min)	

Tableau VIII : BCPL-gélose (Gélose lactosée au pourpre de bromocrésol)

Ingrédients	Quantités (g/l)
Peptone	5
Extrait de viande	3
Lactose	10
Poupre de bromocrésol	0,25
Gélose	15
pH7	
Autoclaver à 120°C/20min	

Annexe 4 : Courbes de corrélations

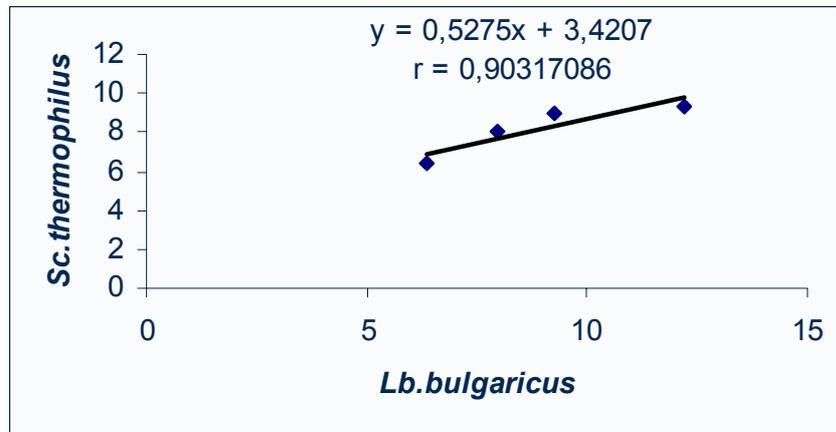


Figure 1 : Courbe de corrélation de la synergie de croissance des ferments du yaourt au rapport *Lb. bulgaricus*/*Sc. thermophilus* de 1/1.

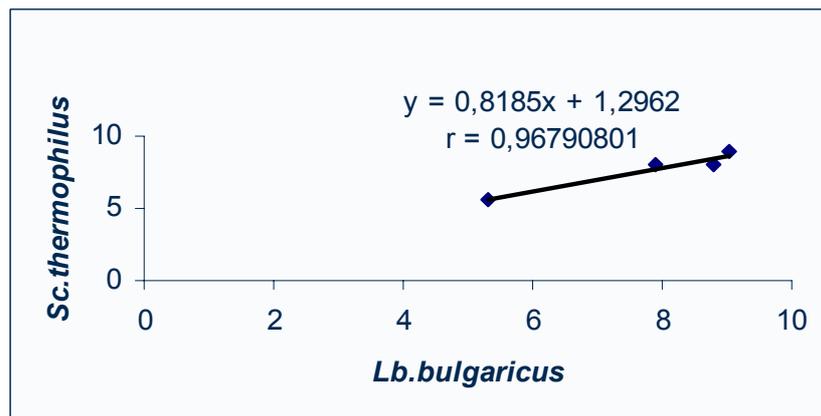


Figure 2 : Courbe de corrélation de la synergie de croissance des ferments du yaourt au rapport *Lb. bulgaricus*/*Sc. thermophilus* de 1/2.

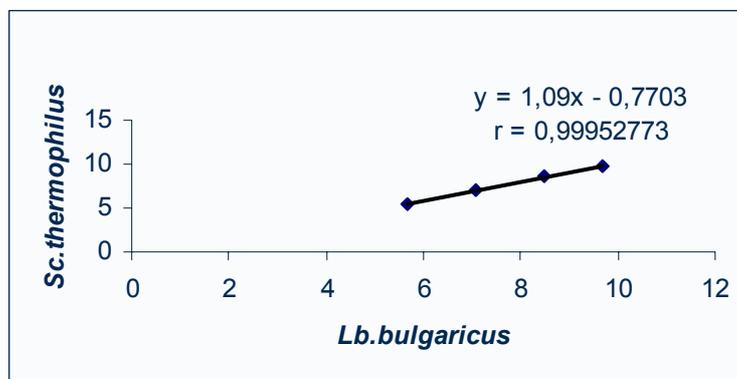


Figure 3 : Courbe de corrélation de la synergie de croissance des ferments du yaourt au rapport *Lb. bulgaricus*/*Sc. thermophilus* de 2/1.

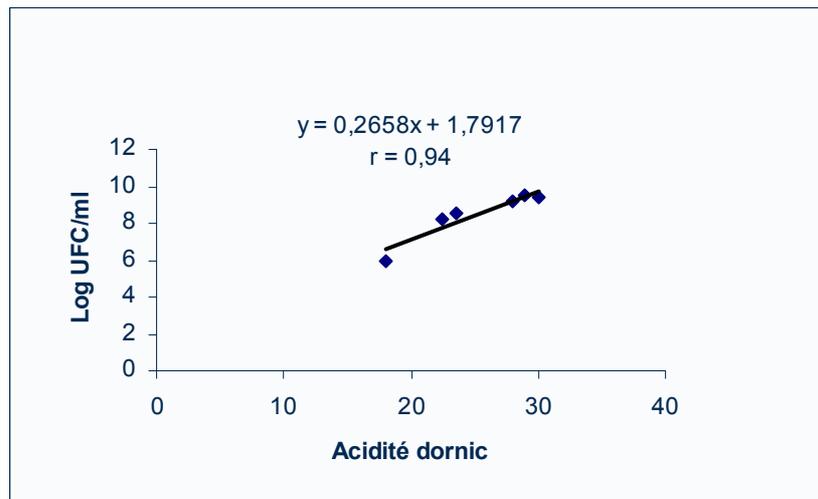


Figure 4: Courbe de corrélation entre l'acidité Dornic et le dénombrement d'EPEC dans la culture témoin.

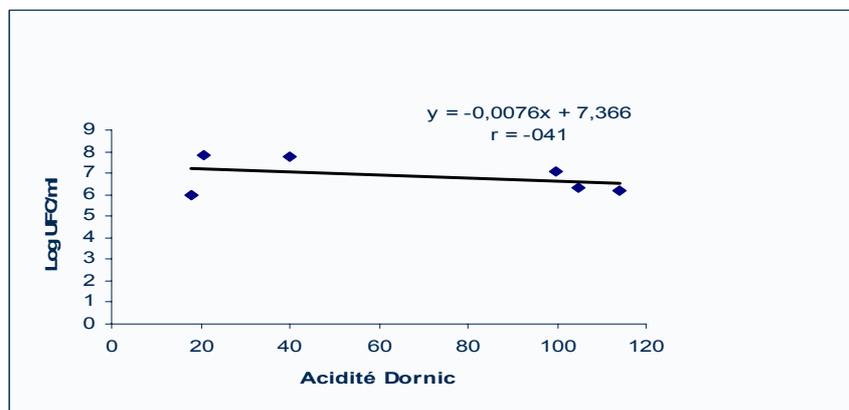


Figure 5: Courbe de corrélation entre l'acidité Dornic et le dénombrement d'EPEC dans la 1^{ère} combinaison

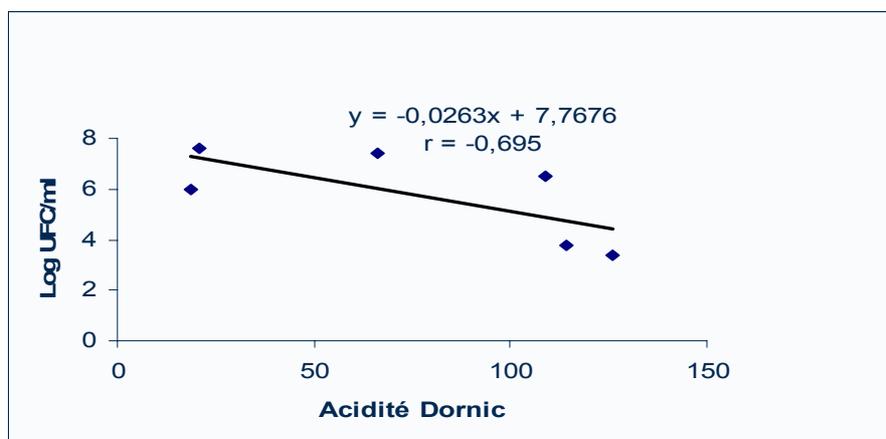


Figure 6: Courbe de corrélation entre l'acidité Dornic et le dénombrement d'EPEC dans la 2^{ème} combinaison.

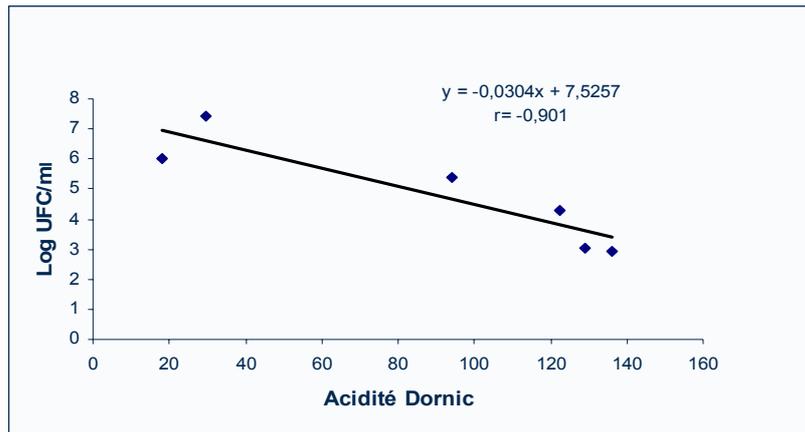


Figure 7: Courbe de corrélation entre l'acidité Dornic et le dénombrement d'EPEC dans la 3^{ème} combinaison.

Annexe 5 : Détails de la réalisation des coupes histologiques

La réalisation des coupes histologiques se fait en plusieurs étapes : la circulation, l'enrobage, la microtomie, la coloration et en fin montage à l'Eukitt.

I. La circulation

Elle-même divisée en plusieurs étapes à savoir : post-mordançage, la déshydratation, éclaircissement et en fin l'imprégnation dans la paraffine.

I.1. Post-mordançage

C'est la fixation des échantillons. Elle s'effectue dans le 1^{er} bain de circulation rempli de fixateur qui est le formol à 10%.

I.2. Déshydratation

Elle consiste à débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient. L'éthanol présente une très grande miscibilité à l'eau et c'est le plus utilisé comme agent déshydratant. La déshydratation se fait par passage des échantillons dans des bains d'éthanol à concentration croissante afin de permettre l'élimination de l'eau des tissus. Car si la déshydratation est effectuée dans un bain d'éthanol à forte concentration, cela provoquerait une réaction et un durcissement assez important du tissu. En pratique on commence par un éthanol à concentration de 70% et on augmente la concentration de 10% jusqu'à l'éthanol absolu.

I.3. Eclaircissement

Il consiste à remplacer l'éthanol (non miscible à la paraffine) dans le tissu par un solvant de la paraffine comme le xylène. Les liquides éclaircissants ont souvent un indice de réfraction assez élevé (1,5) proche de celui des protéines fixées (1,54), si bien que, à mesure que le solvant remplace l'agent déshydratant, le tissu devient transparent d'où le nom de cette étape (éclaircissement).

I.4. Imprégnation

C'est l'étape finale de la circulation et les principaux milieux d'inclusion sont la paraffine. Il existe différentes qualités de paraffine qui se différencient par leur point de fusion.

L'agitation est toujours un facteur souhaitable dans les processus faisant appel à des échanges de liquides. Régler la température du bain de paraffine en fonction de ce point de fusion (45-70°).

II. Enrobage

Ce procédé est utilisé à deux étapes successives ; au cours de l'imprégnation d'abord où la paraffine est incluse dans le tissu, et au cours de l'enrobage où le tissu est inclus dans un bloc de paraffine. Ce bloc est plus facile à manipuler que le tissu seul car on peut l'attacher à la pince de porte objet du microtome sans briser la pièce. Au cours de la coupe, la présence de paraffine au tour du tissu facilite l'opération et pour que l'on puisse vraiment tirer parti de cet avantage, il est nécessaire, toutefois, que la paraffine utilisée pour l'enrobage ait les mêmes caractéristiques que celle qui a servi à l'imprégnation. Enfin, après la coupe, on peut manipuler le tissu sans avoir à le toucher directement puisqu'il est entouré de paraffine.

III. La microtomie

La réalisation des coupes histologiques se fait à l'aide d'un microtome qui consiste à :

1. Mettre le bloc dans le porte bloc du microtome.
2. Régler le couteau de manière à dresser une face de coupe nette.
3. Réaliser des coupes épaisses pour régler l'épaisseur à 3-5 μm .
4. Procéder à la confection du ruban de coupes.

IV. Etalement des coupes

Les tissus inclus dans la paraffine sont très comprimés pendant la coupe. L'étalement des coupes peut être effectué en utilisant une plaque chauffante (à 55°C) sur laquelle les lames sont déposées et recouvertes de liquide d'étalement. A la fin de l'opération, l'excès du liquide est absorbé avec un papier buvard. Les colles sont des substances adhésives dont on induit les lames afin qu'elles y retiennent les coupes. Généralement, des solvants à base d'ovalbumine, de gélatine ou l'amidon sont utilisés.

V. Coloration

Les procédés de coloration des coupes se déroulent selon un plan général commun, quelque soit la technique employée. On distingue trois temps dans tout procédé de coloration. Il y a d'abord les étapes préparatoires à la coloration, puis celles de la coloration proprement dite et enfin, les étapes préparatoires au montage.

V.1. Le déparaffinage

Il sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent le pénétrer. Le réactif le plus utilisé pour le déparaffinage est le xylène, car c'est l'agent qui dissout le mieux la paraffine. Les coupes sont passées dans deux bains de xylène, pendant 5 à 10 minutes. Le xylène du premier bain peut être usagé tandis que le deuxième doit être pur.

V.2. Hydratation

Cette étape est nécessaire puisque la plupart des colorants sont utilisés en solution aqueuse. Leur pénétration ne peut être assurée que si les coupes sont imprégnées d'eau. Elle a donc comme objectif de retirer le xylène et le remplacer par de l'eau. L'agent utilisé est l'éthanol mais au lieu de préparer le tissu à recevoir l'agent éclaircissant en retirant l'eau, il est préparé à recevoir l'eau en retirant l'agent éclaircissant. L'éthanol est utilisé cette fois en concentration décroissante, de façon à réduire la force des courants qui sont créés par sa sortie du tissu et par l'entrée de l'eau qui peuvent entraîner le décollement des coupes. L'hydratation consiste à commencer par un bain d'éthanol absolu (3 à 5 minutes), suivi de trois bains d'éthanol à 95%, à 80% et à 70% de 5 minutes chacun. On termine l'hydratation par un traitement de 3 à 5 minutes à l'eau courante.

Les problèmes les plus fréquents rencontrés sont le décollement des coupes et l'enlèvement incomplet du xylène. A la fin du déparaffinage, la coupe paraît transparente, alors que l'imprégnation par l'éthanol la rend normalement opaque. On voit vite si l'hydratation n'a pas été bien faite, car le tissu ne s'opacifie pas aux endroits où il reste du xylène.

V.3. Coloration proprement dite

La méthode utilisée est celle de la coloration à l'hématoxyline de Harris et à l'éosine. Dans cette méthode, le noyau, élément basophile par excellence doit être coloré par une laque basique. L'éosine est une aniline acide, qui est considérée pour avoir une affinité sélective pour le cytoplasme cellulaire. Au contraire l'hématoxyline est considérée comme un colorant basique, qui par conséquent a une affinité avec les éléments acides cellulaires. Comme les noyaux sont fondamentalement des acides ribonucléiques, ils sont colorés par l'hématoxyline. Cette technique fournit aux noyaux une teinte bleu et le cytoplasme apparaît rouge.

V.4. Montage à Eukitt

En général, le montage s'effectue dans des milieux de montage résineux. Ce type de milieu est habituellement dissout dans un agent éclaircissant, mais comme le milieu de montage doit imprégner complètement le tissu pour être efficace, il faut que celui-ci ait été au préalable pénétré par l'agent éclaircissant. On utilise de nouveau ce procédé successivement à la déshydratation (éthanol) et à l'éclaircissement (xylène) des coupes avant d'en faire le montage. On appelle donc montage, l'opération qui consiste à fixer à l'aide d'une substance appropriée, une lamelle de verre sur des échantillons histologiques après coloration. Cette étape a trois objectifs : protection mécanique, production d'un spécimen à indice de réfraction homogène et enfin, protection mécanique chimique des colorants.

Résumé

Dans cette étude, *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus* ont été isolées et purifiées à partir d'un ferment industriel. Une souche d'*E. coli* entéropathogène (EPEC) O111B4 a été utilisée comme souche cible.

Le rapport *Lb. bulgaricus/Sc. thermophilus* de 2/1 est pris comme le meilleur mélange entre les deux bactéries permettant une bonne symbiose lors de la fermentation du lait 50/50 (lait écrémé /lactosérum (v/v)) et c'est ce rapport qui sera utilisé dans le reste de l'expérimentation pour l'inoculation de lait 50/50 en vue de la production d'un yaourt infantile.

L'étude *in vitro* de l'effet antagoniste des ferments du yaourt à l'égard d'EPEC a été réalisée par la méthode des tests des puits et en culture mixte. Les résultats des tests des puits des surnageants des bactéries du yaourt montrent des zones d'inhibition claires autour des puits, ce qui atteste de la présence de substances antibactériennes à l'égard d'EPEC, produites par les bactéries du yaourt. Ces constats sont reproduits en culture mixte d'EPEC avec des inocula croissants en ferments du yaourt (3.10^7 /ml, 3.10^8 /ml et 3.10^9 /ml), la dose de 3.10^8 /ml en ferments du yaourt a été retenue pour l'étude *in vivo*.

L'étude *in vivo* réalisée sur deux lots de lapins holoxéniques rendus diarrhéiques, suivie par des coupes histologiques d'intestins grêles et de côlons de différents lapins, ont mis en évidence l'effet probiotique des ferments du yaourt utilisés dans le traitement de la diarrhée. Cet effet est conjugué par la diminution du nombre d'*E. coli* dans les selles des lapins traités avec une restructuration des villosités intestinales, contre une augmentation d'*E. coli* avec des villosités plus réduites avec un aspect caractéristique de l'infection à EPEC chez les lapins non traités par les ferments de yaourt.

Mots clés : Diarrhée / EPEC / Lactosérum / Villosité / *Lb. bulgaricus* / *Sc. thermophilus* / Yaourt.

Abstract

In this study, *Lb. bulgaricus* and *Sc. thermophilus* have been isolated and purified from an industrial ferment. An enteropathogenic strain of *E. coli* (EPEC) 0111B4 has been used as target strain. *Lb. bulgaricus/Sc. thermophilus* ratio of 2/1 is taken as the best mixture between the two bacteria allowing a good symbiosis during the fermentation of the milk 50/50 (skimmed milk/ whey (v/v)) and it is this ratio which will be used in the remaining of the experimentation for the inoculation of milk 50/50 in order to produce (make) an infant yoghurt.

The *in vitro* study of the opposing effect of the yoghurt's ferments with regard to EPEC has been achieved by of the wells test method and in mixed culture. The wells tests results of yoghurt bacteria show clear inhibition zones around the wells, which prove the presence of antibacterial substances with regard to EPEC, produced by yoghurt bacteria. These reports are reproduced in EPEC mixt culture with increasing (growing) inoculations in yoghurt's ferments (3.10^7 /ml, 3.10^8 /ml . 10^9 /ml) the dose of 3.10^8 /ml in yoghurt's ferments has been retained the *in vivo* study. The *in vivo* study realized on two groups of holoxenic rabbits made diarrheic, followed by histological cuts of the small intestines and of colons of different rabbits, have highlighted the probiotic effect of yoghurt's ferment used in the diarrhoea treatment. This effect is conjugated by the decrease of the number of *E. coli* in treated rabbits stools with a restructuration of the intestinal villus more reduced with a characteristic aspect of the infection to EPEC for the rabbits non treated with the yoghurt's ferments.

Key Words: Diarrhea / EPEC / Whey / Villus / *Lb. bulgaricus* / *Sc. thermophilus* / Yogurt.

ملخص

لقد قمنا بعزل و تنقية البكتريات الموجودة في خميرة اصطناعية الخاصة لصنع الياغورت. كما قمنا بالتأكد من انتماءها إلى الصنفي *Lactobacillus bulgaricus ; Streptococcus thermophilus* وهذا بالقيام بعدة اختبارات مخبرية . النسبة Lb/Sc والتي تساوي 2/1 قد اختيرت كأحسن نسبة بين هاتين البكتيريتين والتي تسمح بحدوث التعايش فيما

بينهما وهذا لغرض تخثير الحليب المنزوع الدسم الممزوج بمصل الحليب lactosérum بمقدار حجمي 50\50. النتائج المحصل عليها في المخبر تبين أن $3.10^8/ml$ من *Lb . bulgaricus+Sc. thermophilus* كان كافيا لتثبيط EPEC/المسؤولة عن حالات الاسهال لدى الرضع. التجارب التي أقيمت علي الأرناب أكدت أن الخليط المحضر و المخثر بالبكتيريتين السابقتين قادر على شفاء الأرناب المعالجة بهذا المحضر مقارنة بالأرناب التي عولجت بالخليط المعقم.

بعد التشريح. أكدت الصور الماخودة للمقاطع النسيجية أن الرغبات المعوية لدى الأرناب المعالجة بالمحضر المخثر قد تجد د ت مقارنة بالشاهد اي المعالجة بالخليط المعقم .

الكلمات المفتاحية : الاسهال / EPEC / مصّل الحليب/ الرغبات / *Lb. bulgaricus* / *Sc. thermophilus* / الياغورت