Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université de Jijel
Faculté des sciences
Département de Biochimie et de Microbiologie

MB06106

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme des études supérieures en Biologie

Option : *Microbiologie*

Activité probiotique de L.plantarum et P.acidilactici : Etude des intéractions et evaluation comparative de l'effet de L.plantarum et de l'Oxytétracycline sur la translocation post abattage des entérobactéries chez le lapin.

Membres de Jury

* Président : M^me^ *ROULA. S*
* Examinateur : M^elle^ *LAGGOUN.S*
* Encadreur : M^r^ *IDOUI . T*

Réalisé par

* M^elle^ *DAHMANI Mounia*
* M^elle^ *KHEBBACHE Messaouda*
* M^elle^ *NEKHOUL Messaad*

Promotion 2006

Abréviations

°C : Degré Celsius.

°D : Degré Dornic.

µl : Microlitre.

ADH : Arginine deshydrolase.

ADT : Agar Well diffusion test (teste de diffusion sur gélose par les puits).

Bact. /g : Bactéries par gramme.

C8 : Huit atomes de carbone.

cm : centimètre.

g : gramme.

h : heure.

J : Jour.

LDC : Lysine décarboxylase.

ml : millilitre.

mm : millimètre.

ODC : Ornithine décarboxylase.

ONPG : Orthonitrophénylgalactopyranoside.

pH : Potentiel redox hydrogène.

R : Racine.

RM : Réaction de rouge de méthyle.

UFC / ml : Unité formant colonie par millilitre.

Urée : Uréase.

V_{NaOH} : Volume du NaOH.

VP : Réaction de Vosges Proskauer.

Liste des figures

Fig. 01 : Structure chimique de la tétracycline et de ses dérivés naturels. **P09.**

Fig.02 : Appareil digestif du lapin **P13.**

Fig.03 : Lapin disséqué avec organes en place **P21.**

Fig.04 : Galerie biochimique des entérobactéries **P22.**

Fig.05 : Illustration de la méthode de diffusion sur disques **P28.**

Fig.06 : Méthode du prélèvement du suc gastrique du lapin **P30.**

Fig.07 : La répartition des lapins dans les cages **P31.**

Fig.08 : Méthodes et voie d'administration des trois suppléments **P32.**

Fig.09 : Prélèvements d'organes dans des conditions stériles **P33.**

Fig.10 : Répartition des souches isolées et identifiées **P35.**

Fig.11 : Résultats des interactions entre *Lactobacillus plantarum* ensemencée en masse et les souches codées 01, 02, 04, 14 et 17 en touche **P39.**

Fig.12 : Actions des surnageants de *L. plantarum* et *P. acidilactici* sur quelques entérobactéries (boite A et B) **P41.**

Fig.13 : Actions des surnageants de *L. plantarum* et *P. acidilactici* sur quelques entérobactéries (boite C) **P42.**

Fig.14 : Survie de la bactérie lactique dans l'estomac du lapin **P47.**

Fig.15 : Evolution du nombre des entérobactéries luminales coliques **P49.**

Fig.16 : Evolution du nombre des entérobactéries associées à la muqueuse du colon. **P50.**

Fig.17 : Evolution du nombre des entérobactéries luminales de l'iléon **P51.**

Fig.18 : Evolution du nombre des entérobactéries adhérentes à la muqueuse de l'iléon **P52.**

Fig.19 : Evaluation de la translocation des entérobactéries vers le sang **P53.**

Fig.20 : Evaluation de la translocation des Entérobactéries vers le foie **P54.**

Liste des tableaux

Tableau 01 : Profil biochimique de *Pediococcus acidilactici* **P06.**

Tableau 02 : Profil biochimique de *Lactobacillus plantarum* **P06.**

Tableau 03 : Résultats de la galerie biochimique des souches isolées **P36.**

Tableau 04 : Résultats de la galerie biochimique des souches isolées (suite) **P37.**

Tableau 05 : Résultats des interactions entre *L.plantarum* et les entérobactéries **P38.**

Tableau 06 : Résultats de l'effet des surnageants de *Lactobacillus plantarum* sur les entérobactéries **P43.**

Tableau 07 : Résultats de l'effet des surnageants de *Pediococcus acidilactici* sur les entérobactéries **P44.**

Tableau 08 : Evaluation du nombre des bactéries lactiques dans l'estomac du lapin **P47.**

Tableau 09 : Variation du nombre des bactéries luminales du colon **P49.**

Tableau 10 : Variation du nombre des bactéries de la muqueuse du colon **P50.**

Tableau 11 : Variation du nombre des bactéries luminales d'iléon **P51.**

Tableau 12 : Variation du nombre des bactéries de la muqueuse iléale **P52.**

Tableau 13 : Evaluation de la translocation des entérobactéries vers le sang **P53.**

Tableau 14 : Evaluation de la translocation des entérobactéries vers le foie **P54.**

Sommaire

Introduction **P01**

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Probiotiques et prébiotiques.

I.1- Les probiotiques **P02**
I.2- Les prébiotiques **P02**
I.3- Les critères pour qu'un microorganisme soit considéré comme probiotique **P03**
I.4- Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé **P03**
I.5- Les souches probiotiques utilisées en alimentation humaine et animale **P05**
I.6- Caractères biochimiques de *L.plantarum* et *P.acidilactici* **P06**
I.7- Probiotiques en élevage **P07**

Chapitre II : Antibiotiques.

II.1- Définition et données générales sur les antibiotiques **P08**
II.2- Classification des antibiotiques **P08**
II.3- Mécanismes d'action des antibiotiques sur les structures bactériennes **P09**
II.4- Antibiotiques sans danger pour les lapins **P11**

Chapitre III : Lapins et cuniculture.

III. 1- Le lapin **P12**

III.1.1- Données générales **P12**
III.1.2- Anatomie du tube digestif du lapin **P12**
III.1.3- Microbiologie du tube digestif du lapin **P14**
III.1.4- Physiologie du tube digestif du lapin **P14**
III.1.5- Phénomène particulier : Cæcotrophie **P15**

III.2- La cuniculture **P15**

III.2.1- Conditions d'ambiance **P15**
III.2.2- Alimentation du lapin **P16**
III.2.3- Principales maladies d'origine bactérienne du lapin **P16**

Partie II : Travail pratique

Matériel et Méthodes

II.1-Matériel **P18**

II.1.1- Les bactéries lactiques **P18**
II.1.2-Antibiotique **P18**
II.1.3-Les lapins **P19**
II.1.4-L'aliment **P19**
II.1.5-Le lait **P19**
II.1.6-Les milieux de culture, réactifs et autres produits **P19**
II.1.7-Autre matériel **P20**

II.2- Méthodes **P20**

II.2.1- Isolement et identification des entérobactéries **P20**
II.2.1.1- Sacrifice du lapin **P20**
II.2.1.2- Prélèvement **P21**
II.2.1.3- Préenrichissement et ensemencement **P21**
II.2.1.4- Isolement et purification **P21**
II.2.1.5- Tests d'identification des entérobactéries **P22**
II.2.1.5.1- Examen microscopique : Coloration de GRAM **P22**
II.2.1.5.2-Tests physiologiques et biochimiques **P23**
- Recherche de la catalase **P23**
- Utilisation du citrate de Simmons **P23**
- Métabolise des protéines et des acides aminés **P23**
  -Recherche de l'uréase et la production d'indole **P23**
  -Recherche de l'Arginine deshydrolase (ADH) **P24**
  -Recherche de l'ornithine décarboxylase (ODC) **P25**
  -Recherche de la lysine décarboxylase (LDC) **P25**

- Attaque du Mannitol: Mannitol –Mobilité **P25**
- Réaction au rouge de méthyle **P25**
- Réaction de Vosges Proskauer **P26**
- Recherche de l'ONPG **P26**
- Fermentation des sucres en milieu TSI **P26**
- Fermentation des sucres en milieu MEVAG **P27**

II.2.2- Etudes des interactions entre les bactéries lactiques et les entérobactéries **P27**

II.2.2.1- Méthode Touche - Masse **P27**
II.2.2.2- Méthode des puits **P28**
II.2.2.3- Méthode de diffusion sur disques **P28**

II.2.3- Etude de l'effet surnageant des probiotiques sur les entérobactéries **P29**

II.2. 4-Etude de la survie de *Lactobacillus plantarum* dans l'estomac du lapin **P29**
II.2.4.1- Préparation du lait fermenté **P29**
- Détermination de l'acidité et du pH **P29**
- Dénombrement des bactéries lactiques du lait fermenté **P30**

II.2.4.2-Administration du probiotique **P30**
II.2.4.3-Dénombrement de la flore lactique au niveau stomacal **P30**

II.2.5-Etude de l'effet de l'Oxytétracycline et de *L.plantarum* sur la translocation post-abattage des entérobactéries chez le lapin **P31**
II.2.5.1-Préparation des lapins et administration des suppléments **P31**
II.2.5.2-Abattage des lapins, prélèvement d'organes et technique de dénombrement des entérobactéries **P32**
II.2.6-Traitement statistique **P33**

III. Résultats et discussion

III.1- Isolement et identification des entérobactéries **P34**
III.1.1-Observation macroscopique et microscopique **P34**
III.1.2-Tests biochimiques **P34**
III.2- Etude des interactions entre le probiotique et les entérobactéries **P38**
III.3- Etude de l'effet surnageant des deux probiotiques sur les entérobactéries **P41**
III.4- Survie de *Lactobacillus plantarum* dans l'estomac du lapin **P46**
III.4.1- Détermination de l'acidité et du pH du lait fermenté **P46**
III.4.2- Dénombrement des bactéries lactique du lait fermenté **P46**
III.4.3- Evaluation de la survie de *Lactobacillus plantarum* dans l'estomac du lapin **P47**
III.4- Etude de l'effet de *L.plantarum* et de l'oxytétracycline sur la translocation post abattage des entérobactéries chez le lapin **P48**

Conclusion Générale **P56**

Références bibliographiques **P57**

Annexe 01 **P65**
Annexe 02 **P68**
Annexe 03 **P69**

Glossaire

Introduction

Introduction

Dans le Caucase, en Europe de l'Est, en Russie et au Moyen-Orient, où l'on consomme des produits laitiers fermentés depuis des centaines d'années, on a toujours considéré que ces aliments étaient source de santé et de longévité **[97]**.

Un sujet qui est à la fois aussi ancien que l'humanité et d'une brûlante actualité: **les aliments probiotiques**. Aujourd'hui, nous les connaissons notamment sous la forme de produits laitiers fermentés contenant des bactéries lactiques vivantes qui exercent un effet favorable sur la santé **[98]**.

Les probiotiques, sont des bactéries vivantes présentes naturellement ou ajoutées dans certains aliments. Mais pour être qualifié de probiotiques, il faut que le micro-organisme ait fait preuve de bénéfices santé, il doit être capable de séjourner dans le milieu très acide de l'estomac et de résister à l'action de la bile, et qu'il survive suffisamment longtemps dans l'intestin pour agir et puissent atteindre leur site d'action, car s'il ne s'installe pas de manière durable, le probiotique amène néanmoins des bénéfices de manière transitoire, ce qui explique qu'il faut consommer régulièrement ces produits contenant des probiotiques : dès que l'on s'arrête, l'effet disparaît bien souvent **[15]**.

Les probiotiques sont des bactéries qui exercent une influence bénéfique sur la flore intestinale, et le bien-être en général, et peuvent être autant efficaces dans la prévention et le traitement de plusieurs maladies **[98]**.

L'usage des probiotiques semble plus particulièrement couronné de succès dans les diarrhées post-traitement antibiotique, un des buts premiers de la mise au point des probiotiques était de diminuer l'utilisation d'antibiotiques**[98]**. Les antibiotiques ont été également utilisés pour la prévention de l'altération microbiologique des viandes lors de leur maturation, ainsi, ils sont administrés aux animaux avant abattage **[74]**.

Il est vrai que les antibiotiques sont parfois utilisés à tort et à travers, ce mauvais usage étant à l'origine de l'émergence de résistances bactériennes. En ce domaine, les probiotiques sont une alternative, mais du travail reste encore à accomplir en la matière **[98]**.

C'est dans le même ordre d'idées que nous allons investir nos connaissances, en traitant le sujet intitulé : Activité probiotique de *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus acidilactici* : Etude des interactions et évaluation comparative de l'effet de *L.plantarum* et de l'oxytétracycline sur la translocation post abattage des entérobactéries chez le lapin.

Cette étude a été accomplie en deux parties :
Une partie bibliographique qui a permis l'acquisition des principes de base pour initier le travail pratique.
Une partie pratique dans laquelle on a mis en évidence le rôle de quelques souches lactiques à effet probiotique sur la flore endogène du lapin.

Partie I

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1

Probiotiques et Prébiotiques

I.1- Les probiotiques

La notion de " probiotiques" a été développée grâce aux travaux de Metchnikoff **[58]**qui avait constaté que les paysans bulgares, grands consommateurs de laits fermentés, vivaient très vieux et en bonne santé. Ainsi, Metchnikoff avait proposé l'ingestion de bactéries vivantes, particulièrement des bactéries lactiques, pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie **[27]**.

Le terme probiotique dérive des deux mots grecs " pros" et " bios" qui signifient littéralement "pour la vie" contrairement au terme antibiotique signifiant "contre la vie". Ce terme a été introduit pour la première fois par Lilly et Stillwell **[46]** pour décrire des substances produites par un microorganisme et stimulant la croissance d'autres microorganismes. Depuis, plusieurs définitions ont été données aux probiotiques dépendamment de leurs effets sur la santé. Selon Parker **[66]**, « probiotiques » désigne les microorganismes et les substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la flore intestinale. Cette définition englobant les microorganismes et les métabolites microbiens produits (les antibiotiques), a été modifiée par Fuller **[23]** qui redéfinit les probiotiques comme étant : "des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire et qui ont une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale". Enfin, selon la définition adoptée par le groupe de travail mixte formé par l'Organisation des Nations Unies (ONU) pour l'agriculture et l'alimentation et L'OMS (Organisation Mondiale pour la Santé) (Report of FAO/WHO, 2002), les probiotiques sont : « des microorganismes vivants administrés en quantités adéquates et qui sont bénéfiques pour la santé de l'hôte ».

I.2- Les prébiotiques

Les prébiotiques ont été définis comme étant des ingrédients alimentaires non digestibles exerçant des effets bénéfiques sur l'hôte en stimulant sélectivement dans le colon la croissance et/ou l'activité d'une ou d'un nombre limité de bactéries capables d'améliorer la santé de l'hôte **[02].**

Le concept de prébiotique a été développé suite aux travaux de Gibson et *al.* **[25]** qui ont mis en évidence une stimulation sélective de la croissance de bifidobactéries dans le colon de sujets ayant ingérés de l'oligofructose et de l'inuline.

Les prébiotiques doivent être non digestibles pour servir de substrat aux bactéries spécifiques, principalement les bifidobactéries et les lactobacilles, qui sont actives et améliore la santé de l'hôte. Les fibres alimentaires comme les polysaccharides tels que l'amidon, l'inuline, la pectine, la gomme guar, et les oligosaccharides non digestibles sont ainsi fermentées par les bactéries intestinales en produisant des acides gras à courte chaîne notamment les acides acétique, propionique et butyrique...qui

sont alors utilisés par les différents tissus de l'hôte comme substrats énergétiques, ou comme facteurs de régulation cellulaire **[08]**.

Pour être considéré comme prébiotique, un ingrédient alimentaire doit **[25]** :

- Etre ni hydrolysé ni absorbé dans le tractus gastro-intestinal.
- Etre sélectif pour un nombre limité de bactéries endogènes.
- Modifier la microflore intestinale en améliorant sa composition.
- Induire des effets intestinaux ou systémiques bénéfiques pour la santé de l'hôte.

I.3- Les critères pour qu'un microorganisme soit considéré comme probiotique

Pour qu'un organisme soit considérés comme étant potentiellement probiotique il doit présenté les caractéristiques suivantes **[72, 78,84, 85]** :

- Etre un habitant naturel de l'intestin.
- Etre capable de coloniser le milieu intestinal, persister et se multiplier.
- Résister à l'acidité gastrique.
- Résister aux acides biliaires.
- Adhérer aux cellules intestinales, et exclue ou réduit l'adhérence des pathogènes.
- Avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes.
- Non invasif, non carcinogène, non pathogène.
- Etre capable de co-agréger pour former une flore normale équilibrée.
- Survivre aux différent procédés technologiques de production.
- Garder sa viabilité dans l'aliment durant le transi intestinal.

I.4- Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation des probiotiques. Les points suivants illustrent la diversité de ces effets documentés et rapportés dans la littérature.

I.4.1-Les probiotiques et les infections gastro-intestinales : Des études cliniques ont démontré que des infections gastrointestinales causées par *Helicobacter pylori*, la diarrhée du voyageur, diarrhée due aux rotavirus, diarrhée-associée aux antibiotiques comme celle causée par *Clostridium difficile*, peuvent être contrecarrées avec succès par l'utilisation de probiotiques **[54, 69, 87,88, 93]**. A titre d'exemple Wang et *al.* **[103]**ont rapporté que la consommation régulière de yaourt additionné de *Lactobacillus acidophilus* La 5 ou de *Bifidobacterium lactis* Bb12 induit une suppression effective de l'infection due à *H. pylori.* Tandis que Rosenfeldt et *al.* **[71]** ont mentionné que des souches de *L. rhamnosus* et *L. reuteri* ont permis de traiter des gastro-entérites à rotavirus chez des enfants hospitalisés.

I.4.2-Les probiotiques et l'intolérance au lactose : Il a été rapporté que la consommation de lait ou de yaourts enrichis en probiotiques améliore l'absorption de lactose chez les patients déficients en lactase et réduit les symptômes digestifs dus à l'intolérance au lactose. Jiang et *al.* **[34]** ont démontré que la consommation de lait contenant des souches de *Bifidobacterium longum* réduit les symptômes de la malabsorption de lactose chez des sujets humains suite à une élévation de la sécrétion de β-galactosidase.

I.4.3-Les probiotiques et le cholestérol : Des études préliminaires ont révélé que la consommation de yaourt ou de lait fermenté contenant des probiotiques entraînent une diminution du taux de cholestérol dans le sang, et par conséquent la réduction des risques d'hypercholestérolémie responsable des maladies coronariennes. Bukowska et *al.* **[13]** ont mis en évidence une diminution du taux de cholestérol sanguin chez des sujets soumis à un régime supplémenté avec *Lactobacillus plantarum* 299 v.

I.4.4-Les probiotiques et la prévention du cancer du colon : Selon certaines études, les bactéries probiotiques ont la propriété d'inhiber les processus conduisant à la formation du cancer du colon chez l'homme. En effet, Matsumoto et Benno **[53]** ont mentionné que la consommation de yaourt contenant *Bifidobacterium lactis* LKM512 réduit significativement la mutagénécité dans l'intestin de volontaires par comparaison à un placebo.

I.4.5-Les probiotiques et les maladies inflammatoires de l'intestin : Selon la littérature, les processus inflammatoires impliqués dans les pathologies de l'intestin de l'homme comme la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse et la pouchite sont contrôlés par les probiotiques. Une étude de Guandalini **[29]** a montré que l'ingestion de *Lactobacillus GG* entraîne une amélioration notable de l'état clinique chez des enfants souffrant de la maladie de Crohn. De même Gosselink et *al.* **[26]** ont observé des effets cliniques bénéfiques chez des patients affectés par une colite ulcéreuse après ingestion de produits fermentés contenant *Lactobacillus GG* ($1\text{-}2x10^{10}$ bactéries/jour).

I.4.6-Les probiotiques et la perméabilité intestinale : L'altération de la perméabilité intestinale (fonction-barrière) causée par une infection, toxines ou autre facteur favorise un transfert aberrant d'antigènes (y compris la microflore locale) à travers l'intestin en engendrant des réponses immunitaires inappropriées (réactions inflammatoires ou auto-immunes) **[05]**. Des études récentes ont montré que la consommation de probiotiques stabilise la fonction barrière de l'épithélium intestinal. Isolauri et *al.* **[02]** ont démontré que *Lactobacillus* GG normalise le processus de perméabilité intestinale chez le rat. En outre, une étude récente de Rosenfeldt et *al.* **[70]** a démontré qu'une administration de probiotiques *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus reuteri* permet de stabiliser la fonction-barrière de l'intestin et de diminuer les symptômes gastro-intestinaux chez des enfants souffrant d'une dermatite atopique. Cependant les mécanismes impliqués dans cette normalisation ne sont pas encore bien connus.

I.4.7-Les probiotiques et la motilité de l'intestin : 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 (Takiguchi et *al.*)**[02]**.Une étude de Grimaud et *al.* **[02]** a montré que l'ingestion de lait fermenté avec *Bifidobacterium animalis* entraîne une réduction significative du temps du transit du contenu gastro-intestinal chez des volontaires. Tandis que Verdu et *al.* **[90]** ont rapporté que l'effet de *Lactobacillus paracasei* sur la motilité de l'intestin se traduit par une atténuation de l'hyper contractilité post-infection du muscle. Ils suggèrent que les probiotiques peuvent être utilisés dans le traitement du syndrome de l'intestin irritable.

I.4.8-Les probiotiques et le système immunitaire : Selon la littérature, les probiotiques, grâce à leurs composants intra ou extracellulaires actifs, sont capables d'influencer le système immunitaire par contact avec les cellules immunocompétentes, en transmettant des signaux qui modifient la réponse immunitaire de l'organisme hôte. De nombreuses études ont en effet rapporté que la prolifération des lymphocytes et la production de cytokines par les cellules du système immunitaire peuvent être sensiblement modifiées par l'ingestion de probiotiques. Selon la nature de leurs constituants cellulaires, les probiotiques influencent sélectivement la fonction immunitaire en induisant la réponse humorale, cellulaire ou non spécifique **[82]**.

I.4.9-Les probiotiques et les allergies : Une étude clinique de Mastrandrea et *al.***[52]** effectuée sur des sujets humains (6 à 48 ans) présentant des symptômes cliniques d'asthme et/ou conjonctivite, rhinite, urticaire, dermatite atopique, allergie alimentaire et le syndrome de l'intestin irrité, a montré les effets positifs des probiotiques dans le traitement des maladies allergiques. Selon cette étude, une administration quotidienne d'un mélange1 x 10^9 bactéries vivantes de *L.acidophilus*, *L.delbrueckii* et *S. thermophilus* permet de réduire significativement le taux de précurseurs circulants de lymphocytes CD_{34}^{+} impliqués dans l'inflammation allergique systémique. Wang et *al.* **[92]** ont rapporté que l'ingestion de lait fermenté contenant *L.paracasei* -33 (2 x 10^9 cfu/pot) pendant 30 jours, permet d'améliorer la qualité de vie chez des patients souffrant d'une rhinite allergique.

I.5-Les souches probiotiques utilisées en alimentation humaine et animale

Les souches ou espèces probiotiques sont des composants normaux de la flore intestinale **[20]**. En alimentation humaine, les genres microbiens les plus utilisés comme probiotiques sont *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* **[06]**. Par contre, en alimentation animale de nombreux genres bactériens et fongiques sont

utilisés, comme *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* et *Torulopsis* **[83]**.

En général, les souches probiotiques sont sélectionnées prioritairement pour leurs effets bénéfiques et leur sécurité d'utilisation (innocuité) **[86]**.

I.6- Caractères biochimiques de *L.plantarum* et *P.acidilactici*

Parmi les bactéries lactiques à effet probiotique on trouve les deux espèces : *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus acidilactici*, dont les principaux caractères sont mentionnés dans les tableaux 01 et 02.

Tableau 01 : Profil biochimique de *Pediococcus acidilactici* **[10,30]**.

				Croissance							
Isomère acide lactique	VP	ADH	NaCl 4 %	NaCl 6,5 %	NaCl 18 %	pH 4,2	pH 7	35 °C	40 °C	50 °C	
DL	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
Production d'acide à partir de :											
Amidon	Arabinos	Esculine	Galactose	Glycérol	Lactose	Maltose	Mannitol	Mélésitos	Raffinose	Ribose	Saccharo	Salicine	Sorbitol	Tréhalose	Xylose	Dextrine
-	±	+	+	-	±	-	-	-	±	+	-	+	-	±	+	-

Tableau 02 : Profil biochimique de *Lactobacillus plantarum* **[10, 30]**.

Isomère acide lactique	ADH	CO_2 sur glucose	Mobilité	Croissance	
				15°C	45°C
DL	-	-	-	+	±
Production d'acide à partir de :					

Amygdaline	Arabinose	Cellobiose	Esculine	Gluconate	Lactose	Mannitol	Mélésitose	Mélibiose	Raffinose	Rhammose	Ribose	Saccharose	Sorbitol	Tréhalose	Xylose
+	±	+	+	+	+	±	±	+	+	-	+	+	+	+	±

I.7- Probiotiques en élevage

Les germes probiotiques sont déjà utilisés depuis un certain temps pour l'élevage des animaux et beaucoup de nos connaissances actuelles sur les probiotiques sont issues de la recherche vétérinaire **[59]**. Ce sont des composés utilisés comme additif alimentaire antimicrobien qui influencent l'équilibre de la population microbienne intestinale et augmentent ainsi la croissance et la production du cheptel **[55]**.
Les probiotiques peuvent aidés à surmonter les effets négatifs de certaines maladies qui modifient de façon nuisible la flore intestinale. Ils sont donc utiles dans certains cas pour réduire au minimum les troubles digestifs ou aider à surmonter le stress provoqué par le sevrage ou le transport des animaux. Les fongi unicellulaires de type levures peuvent également avoir des effets efficaces sur la fermentation ruminale et améliorer la digestion et l'efficacité alimentaire **[55]**.

Aujourd'hui, on trouve sur le marché de plus en plus d'aliments contenant des probiotiques, ces derniers sont également fabriqués et distribués sous formes de médicaments**[59]**.

En se basant sur le fait de la production d'acide lactique on a cherché a réaliser sa production dans l'intestin dont on veut modifier la flore bactérienne, par acidification du milieu, dans les entérites, la constipation, en administrant des bacilles lactiques, sélectionnés, présentés sous forme de cultures liquides (les plus actifs), pâtes (également actives), et comprimés lactiques (de valeur douteuse), mais la forme lyophilisées est préférée a toute autre **[58]**.

Les préparations a base d'autolysat de *Lactobacillus* et de *Saccharomyces* servent de support pour administration buccale de *E. coli* non pathogène, antibiorésistant et à prolifération rapide pour le traitement des entérites des carnivores **[58]**.

Chapitre II

Antibiotiques

II.1- Définition et données générales sur les antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances chimiques organiques, produites par un petit nombre de microorganismes, et exerçant une action toxique envers d'autres microorganismes dont principalement des bactéries **[11].** Cette réaction peut être seulement inhibitrice de la croissance, elle est alors bactériostatique et réversible mais elle peut aussi être létale, et dans ce cas elle est bactéricide et irréversible. Souvent un même antibiotique peut exercer l'un ou l'autre de ces effets, en fonction de sa concentration **[11].**

L'efficacité des antibiotiques dépend considérablement de leur nature chimique qui conditionne également leur spectre d'activité. Beaucoup d'entre eux sont à **spectre étroit** : c'est à dire qu'ils n'exercent une efficacité significative que sur un nombre limité d'espèces bactériennes, et parfois même sur une seule espèce. D'autres sont, au contraire, à **large spectre** et agissent sur un nombre important d'agents pathogènes, leur application médicale est alors bien plus répandue. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est variable, les bactéries à Gram positif étant généralement plus sensible que les bactéries à Gram négatif **[11].**

II.2- Classification des antibiotiques

Il existe de très nombreux antibiotiques connus. Mais mois de 1 % d'entre eux trouvent une application médicale, principalement à cause de leur toxicité intrinsèque vis-à-vis des cellules de l'organisme hôte traité. En effet, seuls les antibiotiques ciblant une structure ou une fonction bactériennes spécifiques sont peu ou pas toxiques **[11]**.

Les antibiotiques sont classés en familles, selon leur structure chimique, leur origine ou leur mode d'action, et on distingue les groupes suivants **[11]**:

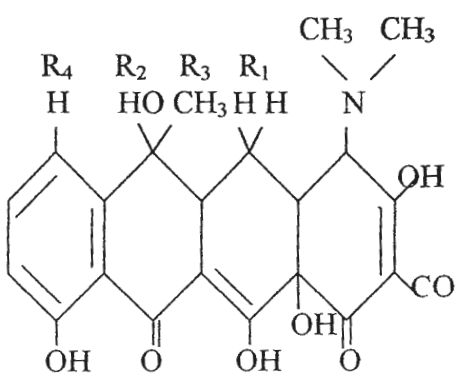
II.2.1- Les ß –lactamines : Elles comprennent les Pénicillines, les Céphalosporines et les Céphamycines. Les ß-lactamines sont les antibiotiques les moins toxiques pour l'homme.
La plupart des pénicillines sont produites naturellement par *Penicillium notatum* et *Penicillium chrysogenum*, sous forme de pénicilline G (benzyl-pénicilline).

II.2.2- Les Aminosides : sont des substances composées d'un petit nombre de sucres aminés. Ils ont une activité bactéricide, mais induisent une toxicité significative pour l'hôte.

II.2.3- Les Macrolides : C'est un groupe d'antibiotiques ayant un cycle lactone associé à un ou plusieurs glucides, leur substance type est l'Erythromycine qui est synthétisée par *Streptomyces erythraeus*. Ce groupe d'antibiotique possède un spectre d'action relativement large.

II.2.4- Tétracyclines : Les Tétracyclines regroupent 3 antibiotiques d'origine naturelle : la Tétracycline (voir figure 01), la Chlorotétracycline et l'Oxytétracycline. Elles sont composées de 4 cycles substitués par divers éléments.

Les Tétracyclines ont une grande importance médicale en raison de leur large spectre d'action. Il existe également des tétracyclines semi synthétiques, mieux tolérées et plus actives, dont le noyau naphtacène est substitué par différents autres éléments.



Tétracycline

Antibiotiques	R1	R2	R3	R4
7-chlortétracycline: (Autréomycine)	H	OH	CH_3	CL
Oxytétracycline : (Tétracycline)	OH	OH	CH_3	H

Fig. 01: Structure chimique de la tétracycline et de ses dérivés naturels.

II.2.5- Le Chloramphénicol : C'est un antibiotique à large spectre, mais il a une toxicité pour l'hôte relativement importante, qui limite son usage aux seuls cas où il ne peut être remplacé par un autre antibiotique. Sa toxicité s'exprime par des réactions d'allergie et des effets neurotoxiques et sanguins.

II.2.6- Sulfamides : Ce sont des composés entièrement obtenus par synthèse chimique et dérivent de la chimie des colorants. Ils agissent par l'inhibition compétitive de la synthèse de métabolites essentiels dont ils sont des analogues de structure.

II.3- Mécanismes d'action des antibiotiques sur les structures bactériennes

La première phase d'action des antibiotiques est leur mise au contact des bactéries ciblées dont ils doivent perturber une voie métabolique vitale qui constitue leur site d'action [11] :

II.3.1- Action sur la paroi : Contrairement aux cellules animales, les bactéries possèdent une paroi rigide qui les protège des perturbations osmotiques du milieu. Elle a la particularité d'être constituée d'un complexe moléculaire exclusif : le peptidoglycane, dont le métabolisme de synthèse constitue la cible sélective de nombreux antibiotiques : principalement les ß-lactamines.

II.3.2- Action sur la membrane cytoplasmique : La membrane cytoplasmique est le siège des transports membranaires de substrats et de métabolites entre la bactérie et son milieu. Les antibiotiques désorganisent les fonctions normales de la membrane cytoplasmique, en altérant sa structure par la formation de pores et par la dérégulation du transport des ions et d'autres substrats.

La membrane cytoplasmique, ainsi altérée, ne peut plus contrôler les transports et perd son rôle de barrière osmotique, provoquant la perte de la substance cytoplasmique.

II.3.3- Action sur la synthèse des protéines : De nombre antibiotiques ; Tétracyclines, Macrolides, Chloramphénicol, ont pour cible primaire les sous unités 30S ou 50S des ribosomes bactériens.

Comme ces antibiotiques sont spécifiques des ribosomes bactériens (70S), ils sont inactifs sur les ribosomes eucaryotes (80S). Leur action aboutit à l'altération à différents niveaux de la synthèse des protéines : fixation de l'aminoacyl-ARN_t, liaison peptidique des acides aminés, lecture de l'ARN_m. Les Tétracyclines se lient à la sous unité ribosomale 30S et empêchent la liaison des ARN_t au complexe ribosome-ARN_m avec pour conséquence l'inhibition du métabolisme de synthèse des protéines.

Les Tétracyclines ont, en outre, la propriété de s'accumuler dans les cellules bactériennes grâce à un système de transport actif, ce qui accroît d'autant leur effet antibactérien.

II.3.4- Action sur la synthèse des acides nucléiques : Certains antibiotiques, perturbent le métabolismes de synthèse des acides nucléiques, essentiellement en inhibant l'ADN-polymérase. Mais ils agissent aussi sur d'autres enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN et dans sa transcription.

II.3.5- Anti-métabolites : Les antimétabolites sont des substances de synthèse, ayant une structure chimique analogue à celle de métabolites primaires bactériens. Ils agissent comme anti-métabolites par inhibition compétitive : ils sont reconnus et fixés par une enzyme clé de la bactérie, à la place de leur substrat normal mais ils ne peuvent être métabolisés, ce qui a pour effet de bloquer la voie métabolique concernée.

II.4- Antibiotiques sans danger pour les lapins

Il existe de nombreux antibiotiques qui peuvent être utilisés dans le traitement des maladies du lapin, citons **[24] :**

- **Pénicilline et streptomycine :** suspension à injecter par voie intramusculaire ou sous-cutanée, indiquée pour les infections bactériennes à Gram positif.

- **Tétracyclines Terramycine :** poudre à prendre par la bouche pour le traitement des infections causées par des bactéries Gram positif ou négatif.

- **Chloramphénicol Framycétine :** pour le traitement des infections causées par les Gram positif ou négatif.

- **Aminoside :** utilisé contre les bactéries Gram positif et négatif.

- **Néomycine :** utilisé contre les bactéries Gram positif et négatif.

- **Tylosine :** utilisée contre les Gram positif.

Chapitre III

Lapin et Cuniculture

III.1- Le lapin

III.1.1- Données générales

Lapin, petit mammifère à fourrure, à queue courte et à longues oreilles, appartient à la famille des Léporidés, l'ordre des lagomorphes **[96].**

Les lapins, qui sont de mœurs plutôt nocturnes, sont herbivores. Ils se nourrissent de plantes herbacées, de graminées, d'écorce, etc. Ils sont des animaux prolifiques, la gestation dure environ un mois. Chez certaines espèces domestiques, le nombre de portées peut aller jusqu'à huit, chacune comptant douze lapereaux, ces derniers naissent aveugles, dépourvus de fourrure et incapables de se déplacer **[96]**.

Les lapins sont élevés comme animaux de compagnie, mais aussi pour les expériences en laboratoire dans le cadre de recherches en biologie, et enfin, pour leur chair et leur fourrure **[96]**.

III.1.2- Anatomie du tube digestif du lapin

Chez un lapin adulte (4-4,5 kg) ou subadulte (2,5 à 3 kg), le tube digestif a une longueur totale d'environ 4,5 à 5 mètres. Il est constitué de :

III.1.2.1- La bouche : La dentition du lapin est préformée dès la naissance de 16 dents de lait, vers l'age de 15 jours sont entierment remplacées par 28 dents définitives a croissance continue leur rôle masticateur est très modéré **[41, 24]**.
Les glandes salivaires (parotide, sous-mandibulaire, linguale et zygomatique) secrètent une salive séreuse qui lubrifier les aliments et débute la digestion **[09, 24]**.

III.1.2.2- L'œsophage : Est placé entre la trachée et la colonne vertébrale, il est d'une longueur de 8 à 12cm **[41, 24]**. Il ne permet les mouvements du bol alimentaire que dans la direction d'estomac **[41]**.

III.1.2.3- L'estomac : C'est une poche allongée au revêtement muqueuse, d'une acidité élevée (pH=2,2), dans lequel ont lieu les principales réactions d'attaque des aliments notamment des sucres et des protéines sous l'action de l'acidité chlorhydrique **[24]**.

III.1.2.4- L'intestin grêle : Il fait suite au pylore, mesure environ 3m de longueur pour un diamètre d'environ 0,8 à 1cm, il est légèrement alcalin (pH=7) et s'acidifié progressivement pour atteindre 6,2-6,5 à sa fin **[41]**. Il est d'une capacité limité, qui se confond contrairement à celui des autres animaux avec le duodénum, le jéjunum et l'iléon.

Dans le duodénum se répand la bile produite par le foie et emmagasinée par la vésicule biliaire.

Outre la bile, l'intestin grêle reçoit les sucs pancréatiques : trypsine, chymotrypsine, les lipases et autres enzymes **[24]**.

III.1.2.5- Le cæcum : Forme un second réservoir qui est très développé chez les lapins à tel point qu'il représente avec l'estomac presque 70% de l'appareil digestif pour ce qui concerne la capacité, le poids et le volume **[24]**, il mesure environ 40-45 cm de longueur pour un diamètre moyen de 3 à 4 cm. La paroi du cæcum s'invagine selon une spirale qui fait 22 à 25 tours ou spires, augmentant ainsi la surface de muqueuse au contacte du contenu cæcal **[41]**.

Dans le cæcum ont lieu toutes les réactions de fermentation concernant la digestion de la cellulose qui ne peut être digérée, et par conséquent décomposée que dans ce secteur **[24]**. Il renferme une flore et une faune indispensable à une bonne digestion. En cas de perturbation de l'équilibre écologique, il se crée souvent une diarrhée **[09]**.

A son extrémité, l'appendice cæcale (10 à 12 cm) a un diamètre nettement plus faible, sa paroi est constituée de tissus lymphoïde **[41]**.

III.1.2.6- Le côlon : D'environ 1,5 m, il est d'abord caractérisé par la présence d'haustra (petits renflements en forme de poche). Sur environ 50cm ; c'est le côlon proximal. Après une zone d'environ 1 à 1,5 cm portant les seuls muscles stries du tube digestif **[41]**.

La paroi devient lisse dans sa partie terminale. Cette partie est appelée côlon distal, sa dernière partie est appelée rectum et se termine à l'anus, qui est porteur des glandes anales. La figure ci-dessous montre les composant du tube digestif du lapin.

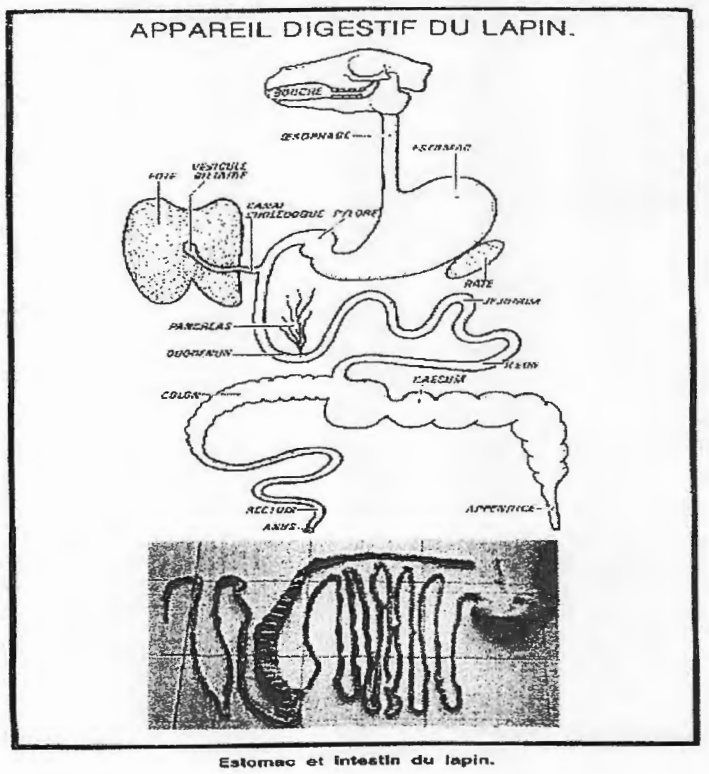


Fig. : Appareil digestif du lapin **[42]**

III.1.3- Microbiologie du tube digestif du lapin

Comme tous les nouveau-nés, le lapereau n'a pas de flore intestinale à la naissance. L'implantation de la flore est assez atypique, dans la mesure où pendant les deux premières semaines la flore stomacale et dans une certaine mesure celle de l'intestin grêle est très pauvre, voire absentes. Cette situation est due au rôle bactériolytique des acides gras en C8 et C10 largement présents dans le lait des lapines et libérés par la lipase gastrique des lapereaux **[41]**.

Selon Gouet et Fonty **[41]**, la vitesse de colonisation de l'estomac varie beaucoup d'un lapereau à l'autre. Le nombre total de bactéries du contenu stomacal est généralement faible jusqu'à 14 jours (entre $<10^2$ et 10^4 bact/g). Il augmente un peu ensuite et se situe aux environs de 10^4 à 10^6 bactéries par gramme à partir du 30^{eme} jour. Il augmente temporairement au moment où les lapereaux ingèrent leurs cæcotrophes **[41]**.
Dans l'intestin grêle, l'implantation des bactéries est plus rapide et plus abondante. L'amplitude des variations entre individus s'estompe à partir du sevrage (28-30 jours), et la flore se stabilise vers 10^6 à 10^8 bact /gramme de contenu. Le cæcum et le côlon hébergent dès la première semaine une flore abondante (10^7-10^9 bactéries par gramme) et par la suite le nombre de bactéries total reste constamment élevé (10^9 - 10^{10} bact /g) **[41]**.

Du point de vue des souches présentes, la flore digestive du lapin se caractérise par la dominance d'espèces anaérobies strictes et particulièrement des bacilles Gram négatifs (Bactéroïdes), que l'on retrouve à tous les niveaux du tube digestif.
Les bactéries sporulées sont de cent à mille fois moins nombreuses que le Bactéroïdes et appartiennent aux genres *Clostridium*, *Endosporus* et *Acuformis*. Les streptocoques (*S. faecium*, *S. faecalis*) sont presque toujours absents de l'estomac. Dans l'intestin grêle, le cæcum et le côlon, leur nombre atteint son maximum chez des lapereaux âgés de 7 à 14 jours, et diminue ensuite avec l'âge. En tout état de cause, il faut savoir que la flore normale d'un lapin est exempte de protozoaires **[41]**.

III.1.4- Physiologie du tube digestif du lapin

Le lapin mange peu à la fois mais souvent, il ingère la majeure partie de ses aliments la nuit. Dans l'estomac, les aliments sont mélangés à des sucs gastriques (essentiellement acide chlorhydrique et protéase) et y restent quelque heures. Ces aliments prédégradés seront ensuite, au cours de leur migration, dilués par les sécrétions biliaires, pancréatiques et intestinales **[09]**.

Une partie des nutriments passe alors la barrière intestinale (absorption par passage au travers des villosités), alors que les particules non dégradées, après un séjour total d'environ 1heure 30 dans l'intestin grêle, entrent dans le cæcum, elles vont obligatoirement y séjourner un certain temps (2 à 12h) où elles subissént une attaque par les enzymes des bactéries vivantes dans le cæcum. Les éléments dégradables par

cette nouvelle forme d'attaque sont libérés (acides gras volatils principalement), et a leur tour franchissent la paroi du tube digestif, puis sont repris par le sang, le contenu du cæcum est évacué vers le côlon. Il est constitué approximativement, pour moitié, par des particules alimentaires grosses et petites n'ayant pas été dégradées entièrement et, pour l'autre moitié, par le corps des bactéries qui sont développées dans le cæcum **[09]**.

En effet si le contenu cæcal s'engage dans le côlon au cours du début de la matinée, il y subit peu de transformations biochimiques. La paroi colique secrète un mucus qui enrobe progressivement les boules qui se réunies en grappes allongées formant ainsi les cæcotrophes (crottes molles) **[41].**

III.1.5- Phénomène particulier : la cæcotrophie

Les lapins rejettent pendant le jour des crottes sèches, et pendant la nuit des crottes molles sphériques (2 à 12 mm de diamètre) enduit de mucus que l'animal prend entre ses lèvres, à la sortie de l'anus, et avale sans les mâcher ; on nomme ces crottes **cæcotrophes.** Cette partie entre dans la physiologie normale de l'animal et qui est le résultat de stimulations nerveuses qui informent l'animal du passage et de la disponibilité des matières qui seront ré ingérées **[28]**. Ces cæcotrophes ont à peu prés la composition du contenu cæcal, ils sont cependant plus riches en matière azotées, à cause de probablement d'une sécrétion produite par la paroi du côlon **[24, 28]**.

III.2- La Cuniculture

Comment toutes les productions animales, l'élevage du lapin tend à se rationaliser et à s'organiser **[42].** L'application cohérente des principes d'hygiène, de reproduction, de nutrition et de contrôle des maladies, permet un élevage efficace des lapins. L'utilisation d'un équipement adéquat dans la lapinière est également de première importance **[55]** .

Ce qui suit représente les principes fondamentaux d'élevage de lapins **[55]** :

III.2.1- Conditions d'ambiance

III.2.1.1- Température : La température souhaitée doit être aussi constante que possible. Pour la maternité, l'optimum est situé à 18°C, mais les élevages peuvent fonctionner de 14°C à 25°C, sans grande difficulté. Les fortes chaleurs, surtout si elles sont brutales, indisposent les animaux. En effet, les mâles accusent une baisse dans l'ardeur sexuelle et dans la fertilité **[57]**.

III.2.1.2- Hygrométrie : L'hygrométrie est l'humidité de l'air ambiant qui a un rôle important : pour permettre un bon confort des animaux et une évacuation satisfaisante de la vapeur d'eau du local, elle est comprise entre 60% et 75%. Lorsqu'elle est

inférieure à 50% apparaissent en raison de l'atmosphère poussiéreuse, des troubles respiratoires [57].

III.2.1.3- Ventilation : Elle doit éliminer les gaz nocifs et l'excès d'humidité, assurer l'oxygénation du bâtiment et contribuer au maintien de la température [57].

III.2.1.4- Lumière : Elle a une influence sur la reproduction du lapin. Pour les reproducteurs mâles, une durée de 8 h / jour est suffisante à la spermatogenèse et à l'activité sexuelle. Pour les femelles, la durée est plus longue, soit 14 h à 16 h / jour [57].

III.2.1.5- Hygiène : Elle est importante dans l'élevage de tous les animaux, mais en particulier dans le cas des lapins. Une mauvaise hygiène étant cause de maladies et de morts, le nettoyage et la désinfection doivent être réguliers. Les boites-nids doivent être désinfectées entre les utilisations. Les cages, les mangeoires et les abreuvoirs doivent être périodiquement aseptisés[55].
Une solution antiseptique efficace et bon marché est représentée par l'hypochlorite de sodium (eau de javel) rajoutée à l'eau (30ml/1L) [55].

III.2.2- Alimentation du lapin :

Dans les conditions de l'élevage rationnel, les lapins sont alimentés avec des matières premières sèches et broyées permettant, par leur complémentarité, de constituer des aliments complets équilibrés. Malheureusement, le lapin supporte très mal les poussières inévitablement présentes dans les farines et il est donc généralement préférable de granuler les mélanges [64].

Pour les aliments courants, le diamètre idéal du granulé est situé entre 3 et 4 mm ; il ne devrait jamais dépasser 5 mm si l'on veut éviter le gaspillage. Pour que le granulé soit totalement adapté à la bouche du lapin, sa longueur soit également rester inférieure à 8–10 mm. On notera enfin que la granulation améliore de 5 à 7 % l'efficacité d'un régime.

Il est possible, avec certaines formules, d'alimenter des lapins avec aliment sous forme de farine. On évitera alors à tout prix de fabriquer une farine très fine qui perturberait le fonctionnement normal du nez du lapin. Enfin, les essais d'alimentation avec une pâtée (60 % farine + 40 % d'eau) montrant que celle-ci est utilisable à condition de veiller scrupuleusement à la propreté des distributions [63].

III.2.3- Principales maladies d'origine bactérienne du lapin :

C'est une partie importante de la pathologie du lapin, et nous ne parlerons que des maladies les plus fréquentes :

III.2.3.1-La pasteurellose : Due à une *Pasteurella.cuniculicida*, la maladie se traduit par des signes respiratoires de gravité variable. Dés l'apparition des premiers symptômes, le lapin est traitée avec une association antibiotique efficace, telle que la Cofamycine ou le A 11 Superbiotique. Le traitement doit être précoce et poursuivi de 3 à 5 jours consécutifs **[42].**

III.2.3.2-Les entérotoxémies : C'est des entérites très graves du lapin. Elles sont provoquées par la multiplication dans les intestins d'un germe anaérobie, le *Clostidium.perfingens* qui secrète une toxine extrêmement dangereuse. Les causes qui permettent la multiplication brutale de ce germe sont surtout alimentaire. Cette maladie se manifeste d'abord par un ballonnement de l'abdomen qui est dilaté et rempli de gaz.
L'animal est triste, cesse de s'alimenter et meurt en 1 à 3 jours dans la plupart des cas. Les lapines allaitantes sont plus prédisposées à cette affection. Le sérum anti-perfringens et des médicaments toniques (Cofacalcium, Cofalysor) permettront de sauver un sujet sur deux ou trois malades **[42].**

III.2.3.3-La colibacillose : Cette maladie se manifeste par une diarrhée liquide suivie d'une déshydratation et d'une forte mortalité, et qui atteint surtout les lapereaux. Elle est causée par *E.coli.* Devant une colibacillose, il semble judicieux de réaliser un antibiogramme afin d'utiliser l'antibiotique actif : Chloramphénicol, Néomycine, Tétracycline, Polymyxine et Colistine **[31].**

III.2.3.4-La salmonellose : Chez le lapin, la salmonellose est le plus souvent due à *Salmonella. typhimurium* et à *S. enteridis* et rarement à *S. pullorum* agent de la pullorose.
La diarrhée inconstante en raison de l'évolution parfois suraiguë de la maladie qui se traduit par des avortements chez les lapines et une septicémie rapidement mortelle chez les jeunes.
Le traitement se fait par voie orale ou parentérale :
- Tétracycline : 30 à 50 mg / kg de poids vif / jour pendant 4 jours de suite.
- Chloramphénicol : 50 à 150 mg / kg de poids vif / jour pendant 4 jours de suite par voie orale exclusivement.
- Furaltadone : 100 mg / kg de poids vif / jour dans l'eau de boisson pendant 4 jours de suite. **[31]**

III.2.3.5-La pseudo-tuberculose : Maladie infectieuse, contagieuse, due à la multiplication dans l'organisme de *Yersinia pseudo-tuberculosis* (bacille de Mallassez et vignal). L'infection se fait à la suite de l'ingestion d'aliments contaminés.
Le plus souvent, la maladie provoque un amaigrissement progressif, des troubles digestifs (constipation, diarrhée) aboutissant en plusieurs semaines à la mort du sujet.
Le traitement se fait par la Dihydrostreptomycine, utilisée précocement, 100 mg / kg de poids vif / jour pendant 4 jours de suite en sous cutané **[31].**

Materiel et méthodes

L'intégralité de ce travail pratique a été réalisée au sein du laboratoire de microbiologie de l'université de Jijel.

Il a pour objectif de recouvrir les points suivants :

- Isolement, purification et identification des souches endogènes du tube digestif du lapin.
- Etude «in-vitro» des interactions entre les souches d'entérobactéries déjà isolées et la bactérie lactique *L.plantarum* BJ0021.
- Etude «in-vitro» de l'effet des surnageants des deux souches lactiques (*L.plantarum* et *Pediococcus acidilactici*) sur les entérobactéries isolées.
- Etude de la survie de la bactérie lactique *Lactobacillus plantarum* dans l'estomac du lapin.
- Etude «in-vivo» de l'effet d'un antibiotique et d'un probiotique sur la translocation post-abattage des entérobactéries chez le lapin.

II.1- Matériel

Au cours de cette étude, nous avons utilisé le matériel suivant :

II.1.1- Les bactéries lactiques

Nous avons utilisé deux souches de bactéries lactiques à effet probiotiques :

Un biotype de *Lactobacillus plantarum BJ0021* isolé et identifié au niveau du laboratoire de biologie moléculaire et génétique, université d'Oran **[33].**
Une souche de *Pediococcus acidilactici* MA185 M, fournie par la firme française LALLEMAND (Bactocell).

II.1.2-L'antibiotique

Pour l'étude comparative entre probiotique et antibiotique, on a utilisé un Oxykel 80 wsp à base d'Oxytetracycline (800 mg/g) sous forme Chlorhydrate d'Oxytétracycline.

Partie II

Travail Pratique

Matériel et Méthodes

مكتبة الكلية

Il est utilisé pour le traitement des infections causées par les germes sensibles à l'Oxytétracycline, dont l'administration est effectuée par voie orale.

Cet antibiotique est fabriqué par KELA, Saint-Lenaartseweg 48-2320 Hoogstraten-Belgique.

II.1.3-Les lapins

Douze (12) lapins de population locale ont été utilisés pour l'étude «in-vivo». Quatre d'entre eux sont de sexe féminin, le reste est de sexe masculin, d'un poids compris entre 650g et 875g.

Neuf (9) lapins ont été utilisés pour l'étude de la translocation post-abattage des Entérobactéries, les trois (3) restant pour :

- L'isolement du souchier des entérobactéries.
- L'étude de la survie de la bactérie lactique dans l'estomac.
- L'étude de la translocation des entérobactéries avant l'administration de l'antibiotique et du probiotique (lapin témoin).

II.1.4-L'aliment

L'approvisionnement des lapins a été réalisé par un aliment granulé de forme cylindrique, de 0.4 cm de diamètre et 1 cm de hauteur, il est composé de :

- Tourteau de soja.
- Maïs
- Grignon d'olive
- Son de blé dur
- CNV.
- Sel.
- Carbonate de calcium.
- Mélasse.

II.1.5- Le lait

Pour la préparation de laits fermentés, nous avons utilisé un lait écrémé en poudre, fourni par la laiterie SKIPLAIT.

II.1.6- Les Milieux de culture, réactifs et autres produits

Durant notre étude expérimentale, l'utilisation de différents milieux de culture et réactifs était nécessaire pour le dénombrement et la recherche de certaines flores, ainsi que leur identification. Ces milieux et réactifs sont :

- Gélose HEKTOEN : pour l'isolement des entérobactéries. (Annexe 01)
- Gélose VRBG : pour le dénombrement des entérobactéries. (Annexe 01)
- Gélose et bouillon MRS (MAN ROGOSA SHARPE) : pour la culture des bactéries lactiques (Annexe 01)
- Bouillon Nutritif : pour le préenrichissement. (Annexe 01)
- Milieu TSI, Mannitol-Mobilité, Urée-Indole, Citrate de SIMMONS, MEVAG sans sucres, CLARK et LUBS, milieu MOELLER additionné de Lysine, Ornithine, Arginine.
- Sucres : Inositol, Glucose, Mannose.

Les autres Réactifs utilisés sont les suivants (Annexe 03) :

- Réactif de KOVACS.
- Rouge de Méthyle.
- VPI et VPII.
- Eau oxygénée.
- Disque ONPG.

Les Produits chimiques se résument en:

- Cristal violet, Lugol, Alcool, Fuschine : pour la coloration du GRAM (Annexe 02).
- Phénol phtaléine (1%) et Soude dornic (9N) : pour la détermination de l'acidité.
- HCl (1N) et NaOH (1N) : pour l'ajustement du pH.

Autres produits : Vaseline, huile à immersion, papier Whatman, papier filtre.

II.1.7- Autre matériel

En plus de ce qui a été mentionné au dessus, nous avons utilisé :
Les boites de Pétri, sonde gastrique, seringue, pH mètre, burette, balance, centrifugeuse et étuve.

II.2- Méthodes

II.2.1- Isolement et identification des entérobactéries

II.2.1.1- Sacrifice du lapin

Nous avons sacrifié un lapin par saignée directe en ayant soin de ne pas le faire stressé. L'élongation de la colonne vertébrale par étirement semble la solution la plus facile à réaliser. Puis il est débarrassé de sa robe et placé en décubitus dorsal avec

les pattes écartées. Les muscles abdominaux sont incisés sur la ligne blanche au milieu du corps. Nous observons alors les organes en place : estomac, foie, cæcum et intestins, ainsi que poumons et cœur **[09]**. Voir figure 03.

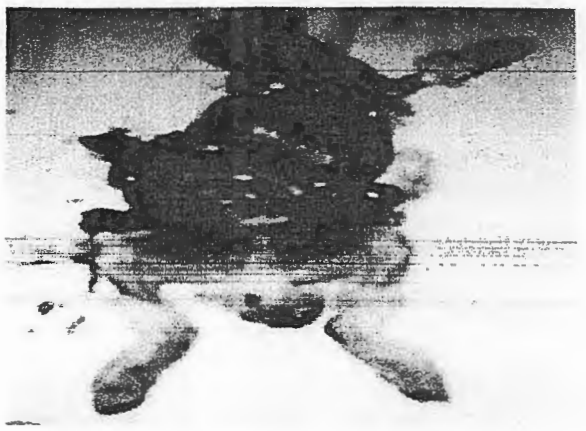


Fig.03 : Lapin disséqué avec organes en place.

II.2.1.2- Prélèvement

Nous avons effectué les prélèvements avec une pipette Pasteur à partir du contenu du cæcum (entrée et sortie). De même, des échantillons élémentaires de ce segment intestinal ont été prélevés.

II.2.1.3- Préenrichissement et ensemencement

Les trois échantillons sont préenrichis dans le bouillon nutritif pendant 15 minutes à température ambiante. Cette opération représente le premier bain pour la portion du cæcum qui va ensuite subir deux bains successifs avec un intervalle de temps d'1/4 h en utilisant le même milieu.

Pour chaque échantillon, nous avons réalisé des dilutions décimales jusqu'à 10^{-5}, et concernant l'ensemencement, il était fait à partir de la solution mère et certaines dilutions (10^{-5}) par la méthode d'étalement.

Un étaloir en verre stérile est utilisé pour étaler l'inoculum sur des boites contenant la gélose **HEKTOEN**. Les boites sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h **[61].**

II.2.1.4- Isolement et purification

Après incubation, chaque colonie bien isolée peut être prélevée, remise en suspension dans le bouillon nutritif avec une anse de platine à fil droit puis repiquée dans les mêmes conditions. Cette opération est répétée, jusqu'à la certitude de

la pureté de la souche.

La conservation se fait au froid (à 4°C) dans des tubes hermétiquement clos contenant la gélose **VRBG** inclinée **[11].**

II.2.1.5-Tests d'identification des entérobactéries

II.2.1.5.1-Examen microscopique : Coloration de GRAM

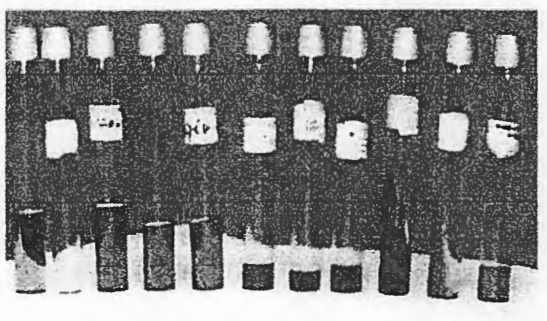
Cette coloration des cellules bactériennes nous permet à la fois de connaître la morphologie des bactéries et de les classer en deux groupes en fonction de leur capacité ou non à retenir la coloration violette du Cristal violet dans les conditions opératoires **[39].**

On distingue alors le groupe des Gram négatif et celui des Gram positif qui retient le Cristal violet même après un lavage avec l'alcool.

Le grammage a été effectué sur les 21 souches isolées par la technique suivante :

- Etalement et fixation par la chaleur de la suspension bactérienne sur une lame porte objet.
- Coloration pendant une minute au violet de Gentiane ou au cristal violet.
- Lavage à l'eau
- Coloration au Lugol pendant une minute.
- Lavage à l'eau.
- Rinçage avec de l'alcool .
- Contre coloration pendant 1 à 2 minutes par une solution de Fuschine diluée à 10% ou par une solution de Safranine.
- Lavage à l'eau.

Après séchage, la lame est soumise à une observation microscopique avec objectif à immersion. Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose **[11]**.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Fig. 04 : Galerie biochimique des entérobactéries.

1 : Milieu Urée indole.
2 : Milieu CLARK et LUBS.
3, 4 et **5 :** Milieu MEVAG additionné d'inositol, glucose et de mannose.
6, 7 et **8 :** Milieu MOELLER additionné de lysine, ornithine et d'arginine.
9 : Milieu TSI.
10 : Milieu Citrate de SIMMONS.
11 : Milieu Mannitol-Mobilité.

II.2.1.5.2 -Tests physiologiques et Biochimiques

La figure 04 illustre les différents tests biochimiques réalisés pour les 21 souches isolées des entérobactéries.

- **Recherche de la catalase [76]**

La catalase est une enzyme contenant du fer, qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui est toxique, en eau et en oxygène, et qui est synthétisée par la plupart des bactéries aérobies au cours de leur métabolisme.

Ce test consiste essentiellement à exposer les cellules bactériennes au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La présence de catalase se marque par la formation de bulles de gaz (oxygène) selon l'équation suivante :

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2\,H_2O + O_2$$

- **Utilisation du citrate de Simmons [30]**

Il s'agit d'un milieu gélosé incliné, contenant un indicateur coloré (Bleu de Bromothimol). Le citrate étant la seule source de carbone, toute multiplication cellulaire implique son utilisation. De plus, cette croissance s'accompagne fréquemment d'une alcalinisation qui se traduit par le virage au bleu de l'indicateur.

Nous avons ensemencé le milieu **Citrate de Simmons** en surface par stries longitudinales, les tubes sont incubés à 37°C pendant 24h. L'utilisation du citrate comme seule source de carbone, se traduit par le virage de la couleur du milieu au bleu.

- **Métabolisme des protéines et des acides aminés**

- Recherche de l'uréase et la production d'indole [30]

Les microorganismes possèdant une uréase très active transforment l'urée en ammoniac et carbonate d'ammonium :

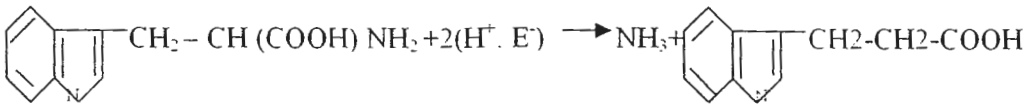
$$CO(NH_2)_2 + H_2O \longrightarrow 2NH_3 + CO_2$$

$$CO_2 + 2NH_3 + H_2 \longrightarrow CO_3(NH_4)_2$$

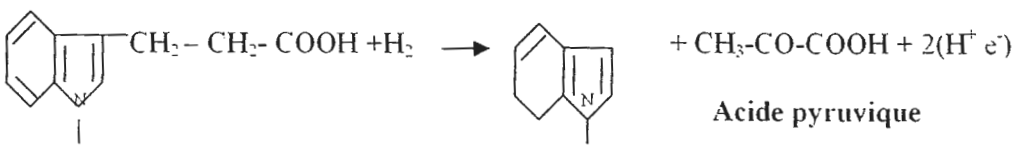
Cette réaction se traduit par une alcalinisation du milieu, décelable par un indicateur coloré.

La recherche de l'uréase peut s'effectuer par culture sur milieu liquide de **Fergusson (urée indole)**. L'ensemencement se fait par inoculation du milieu. Après incubation à 37°C pendant 24h, ce milieu prend une teinte rouge due à l'augmentation du pH si l'urée est dégradé.

L'indole est issu de l'hydrolyse de Tryptophane, il est caractérisé par le réactif de **KOVACS** ou d'**EHRLICH**. Après culture, quelques gouttes du réactif sont ajoutées au milieu : après agitation, la présence d'indole se manifeste par apparition d'un anneau rouge en surface (nitrosoindole).



Tryptophane



Acide pyruvique

Indole

- Recherche de l'Arginine deshydrolase (ADH) [30]

L'arginine est décarboxylée en agmatine puis hydrolysée en putrescine.

$$NH{=}C(NH_2){-}NH{-}(CH_2)_3{-}CH(COOH)NH_2 + 2H_2O \longrightarrow NH_2{-}(CH_2)_3{-}NH_2 + 2NH_3 + 2CO_2$$

Arginine **Putrescine**

Nous avons ensemencé le milieu **MOELLER** enrichis avec de l'arginine par une culture fraîche et on l'a incubé à 37°C pendant 24h.

L'activité enzymatique de l'ADH se traduit par le virage vers l'alcalinité de l'indicateur avec apparition d'une couleur violette.

- Recherche de l'ornithine décarboxylase (ODC) [30]

La décarboxylation de l'ornithine conduit au putrescine et libération du CO_2.

$$NH_2\text{-}(CH_2)_3\text{-}CH(COOH)NH2 \longrightarrow NH_2\text{-}(CH_2)_4\text{-}NH_2 + CO_2$$

Ornithine **Putrescine**

Nous avons ensemencé le milieu **MOELLER** enrichi de l'ornithine par une öse de culture pure, puis le milieu est incubé à 37°C pendant 24h, le virage au violet indique la présence de l'ODC (acidification du milieu par l'utilisation du glucose).

- Recherche de la lysine décarboxylase (LDC) [30]

Certaines bactéries possèdent une décarboxylase qui agit sur un acide aminé particulier : la lysine, en produisant la cadavrine qui réagit avec la ninhydrine en donnant une coloration violette qui est témoin de positivité.

$$NH_2\text{-}(CH_2)_4\text{-}CH\ (COOH)\ NH_2 \longrightarrow NH_2\text{-}(CH_2)_5\text{-}NH_2 + CO_2$$

Lysine **Cadavrine**

- **Attaque du Mannitol (Mannitol -Mobilité) [30]**

C'est un milieu faiblement gélosé qui contient du mannitol et un indicateur coloré, permettant ainsi de déceler l'attaque du mannitol avec formation d'acides à chaîne très courtes et virage de la couleur du rouge au jaune. Il permet aussi la mise en évidence de la mobilité d'une souche bactérienne.

Nous avons réalisé l'ensemencement par piqûre centrale au fil droit. Après 24h d'incubation à 37°C, la mobilité du germe est traduite par l'envahissement plus ou moins grand du milieu à partir de la piqûre de l'inoculation. L'utilisation du mannitol est observée lors du virage de la couleur vers le jaune.

- **Réaction au rouge de méthyle [30]**

Cette réaction permet de différencier la fermentation acide mixte de la fermentation butylène-glucolique chez les entérobactéries, mais son utilisation est plus générale.
Elle est souvent réalisée à partir d'une partie aliquote d'un milieu **Clark et Lubs**.

Nous avons inoculé se milieu avec une öse de culture à partir de la souche pure. Après 24h d'incubation, 2 ml du milieu sont placés dans un tube à essai au contacte de quelques gouttes du réactif rouge de Méthyle.

Le réactif reste rouge lorsque le pH est inférieur à 5, ce qui traduit une production d'acides (RM+). Dans le cas contraire il vire au jaune (RM-).

- **Réaction de Vosges Proskauer [30]**

Elle permet la mise en évidence de l'acétylméthylcarbinol ou de l'acétoïne.
Nous avons ensemencé le milieu **Clark et Lubs** avec une öse de culture à partir de la souche pure, après 24h d'incubation, 1ml de ce milieu est placé dans un tube à essai et additionné de 0,5 ml du réactif de l'α-naphtol à 6 % dans l'alcool absolu (VPI) et de 0.5 ml d'une solution de potasse à 15 % d'H_2O distillée (VPII). Après agitation et un délai de 10 minutes, une coloration rose traduit la formation d'acétylméthylcarbinol. Cette substance se transforme avec l'α-naphtol en donnant un complexe de couleur rouge.

- **Recherche de l'ONPG [30]**

Ce test permet de mettre en évidence l'aptitude à la dégradation d'un sucre lorsque l'absence de perméase ne permet pas la multiplication cellulaire. La recherche de la ß-galactosidase est la plus fréquente.

Lorsque une bactérie possédant cette enzyme est lisée, elle libère cette dernière qui peut alors hydrolyser un réactif analogue du lactose,
l'orthonitrophénylgalactopyranoside (ONPG).
Ce produit donne du galactose et de l'orthonitrophénol qui présente une coloration jaune.

Une öse de culture bactérienne est mise en suspension dans quelques gouttes d'eau physiologique dans un tube à essai, puis quelques gouttes du réactif ONPG (ou un disque d'ONPG) sont ajoutées, et le tube est incubé. Une coloration jaune traduit une positivité (hydrolyse).

- **Fermentation des sucres en milieu TSI [30]**

Le milieu **TSI** est un milieu complexe qui permet la mise en évidence de plusieurs enzymes qui sont responsables de la dégradation du glucose, lactose et des acides aminées.
L'utilisation des sucres acidifie de plus en plus le milieu.
Nous avons ensemencé ce milieu par piqûre centrale dans le culot, suivi par des stries longitudinales sur la pente du milieu, après incubation à 37°C pendant 24h on a fait la lecture :

- Glucose fermenté : le culot vire au jaune.
- Lactose et saccharose fermenté : la pente vire au jaune.
- Production de gaz se traduit par la formation de bulles de gaz dans la masse du milieu et contre les parois, ou par la formation d'une poche gazeuse repoussant la totalité du milieu vers le haut.
- Dégradation des peptones et des acides aminées : la pente vire au jaune.
- Production de sulfure d'hydrogène (H_2S) au dépends des acides aminées à radicale soufré : la couleur du milieu vire au noir.

- **Fermentation des sucres en milieu MEVAG [30]**

Elle est basée sur la modification du pH, et utilise un milieu semi-solide additionné d'un indicateur de pH sensible (milieu **MEVAG**). Le tube du milieu est régénéré par chauffage au bain-marie, additionné d'un sucre, puis solidifié. Il est ensuite ensemencé par une piqûre centrale au fil droit, et incubé à 37°C pendant 24 h.

Si la couleur du milieu vire au jaune, il y a eu acidification du milieu et fermentation du sucre.

II.2.2- Etude des interactions entre les bactéries lactiques et les entérobactéries

L'étude de l'activité antagoniste des bactéries lactiques sur les entérobactéries du tube digestif du lapin a été effectuée par les trois méthodes suivantes afin de choisir la plus adaptée à notre étude: la méthode dite Touche- Masse ou Test Spot ou encore méthode directe **[22],** la méthode des puits **[04]** et la technique de diffusion sur disques **[79] :**

II.2.2.1- Méthode Touche - Masse

Les étapes de cette technique sont les suivantes :

- La gélose **MRS** est coulée dans des boites de Pétri puis laissée prendre en masse.
- Un volume de la culture de la bactérie lactique à tester est ensemencé en touche à la surface de la gélose **MRS** (cette quantité égale à 5µl d'une concentration approximative de10^9 UFC/ml, obtenue à partir d'une culture jeune (18h) sur bouillon **MRS**). Les boites sont en suite incubées à 37°C pendant 24h.
- Les isolats à tester pour leur sensibilité sont mélangés avec le milieu **VRBG** semi-solide (V/ 7V), puis coulé dans les boites dans lesquelles est préalablement ensemencée les bactéries lactiques.
- On laisse prendre en masse
- L'activité antibactérienne est évaluée après 18h à 24h d'incubation à 37°C, par mesure (en millimètres) des zones d'inhibition.

Les bactéries qui ont révélé une inhibition par cette méthode directe sont aussi testées par la méthode des puits.

II.2.2.2- Méthode des puits

La technique se déroule comme suit :

- La gélose **MRS** est coulée dans des boites de Pétri et laissée prendre en masse.
- Une couche de 7 ml de la gélose **MRS** semi-solide, contenant 0,2 ml de la souche indicatrice (*L. plantarum*), est ajoutée puis laisser prendre en masse.
- 5 puits de 5 mm de diamètres sont creusés dans la gélose de chaque boite de Pétri en utilisant une cloche de Durham.
- 50 µl de chaque souche à tester (entérobactéries isolées) sont placés dans chaque puit.
- Les boites sont incubées à 37°C pendant 24h puis les diamètres des zones d'inhibition entourant les puits sont mesurés.

II.2.2.3-Méthode de diffusion sur disques

Cette technique comporte les étapes suivantes :

- La gélose **MRS** est coulée dans des boites de Pétri stériles et laissée prendre en masse.
- 50 µl du bouillon **MRS** contenant approximativement 10^9 UFC / ml (Do = 7.050 pour *L.plantarum* et Do=7.600 pour *P.acidilactici* à 660nm) de la bactérie lactique sont étalés et laissés sécher ;
- Chaque disque de papier Whatman stérile (de 05 mm de diamètre) est imbibé par 20 µl d'une souche entérobactéries, et déposé sur la gélose déjà ensemencée ;
- Les boites de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24h ;
- On mesure les diamètres des zones d'inhibition.

Pour le reste de tests des interactions, nous avons utilisé la méthode de diffusion sur disques, la figure 05 illustre cette méthode.

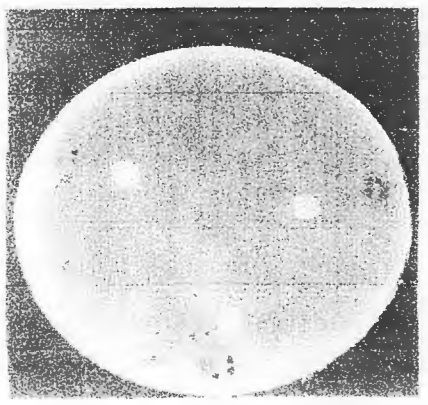


Fig. 05 : Illustration de la méthode de diffusion sur disques.

II.2.3- Etude de l'effet surnageant des probiotiques sur les entérobactéries

Pour la détermination de l'activité antibactérienne du surnageants de *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus acidilactici,* on a utilisé la méthode **ADT** (**A**gar Well **D**iffusion **T**est) selon Tagg et *al.* **[79].**

Avant le test, nous avons cultivé les deux souches séparément sur bouillon **MRS**, puis les cultures sont centrifugées à froid (12400 r / mn / 10 mn à + 4°C).
La moitié du surnageant de chaque souche est neutralisé par du NaOH 3M et on l'a filtré sur papier filtre stérile de 0.22 µm, c'est le surnageant pH7 **[17].**

Nous avons creusé des puits de 5 mm de diamètres dans la gélose **VRBG**, préalablement coulée, contenant la souche indicatrice (Souche des entérobactéries). Puis chaque puits reçoit 50 µl du surnageant natif, en parallèle d'autres puits reçoivent le même volume du surnageant pH7. Les boites sont incubées à 37°C pendant 24h.

42 boites de Pétri contenant la gélose **VRBG** ont été utilisées : 21 pour l'étude de l'effet du surnageant natif et le reste pour le surnageant à pH neutre.

Chaque boite contient 4 puits: deux pour le surnageant de *Lactobacillus plantarum* et deux pour le surnageant de *Pediococcus acidilactici.*

A noter que nous avons utilisé également la technique de diffusion sur disques.

II.2.4-Etude de la survie de *Lactobacillus plantarum* dans l'estomac du lapin

II.2.4.1-Préparation du lait fermenté

Nous avons préparé le lait fermenté à partir de 12g du lait écrémé en poudre et 100 ml d'eau distillée stérile auxquels nous avons ajouté 5g du Saccharose. Le tout a été stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 10 min, refroidi à température ambiante, inoculé par le lyophilisat de *Lactobacillus plantarum* et enfin incubé 4 h à 37°C **[33].**

- **Détermination de l'acidité et du pH**

Le pH est déterminé à l'aide du pH mètre : On plonge l'électrode du pH mètre dans un volume de lait fermenté et on lit la valeur enregistrée sur l'écran.

La détermination de l'acidité : Dans un bêcher, nous avons mesuré 10 ml du lait fermenté auquel on a ajouté quelques gouttes de Phénolphtaleine à 1 %, puis on l'a titré avec la soude dornic 9N jusqu'à l'obtention d'une couleur rose pâle **[36].**

➢ **Dénombrement des bactéries lactiques du lait fermenté**

Nous avons préparé des dilutions décimales à partir de la solution mère (lait fermenté) jusqu'à 10^{-9} ; 1ml de cette dernière est ensemencé par étalement sur gélose **MRS**. Après 24 h d'incubation à 37°C, on dénombre les colonies bactériennes.

II.2.4.2-Administration du probiotique

Nous avons administré 10 ml du probiotique au lapin « per-os » à 9h du matin. Le lapin est ensuite placé dans une haute stérile approvisionnée avec de l'eau distillée stérile et de l'aliment granulé.

Une heure après, nous avons introduit dans l'estomac du lapin une sonde gastrique stérile recouverte de Vaseline pour faciliter son passage, cette sonde est munie d'une seringue à gavage permettant d'aspirer le suc gastrique. Nous avons répété ce prélèvement après 2h, 3h et 4h d'administration du probiotique. La figure 06 montre la méthode du prélèvement du contenu stomacale.

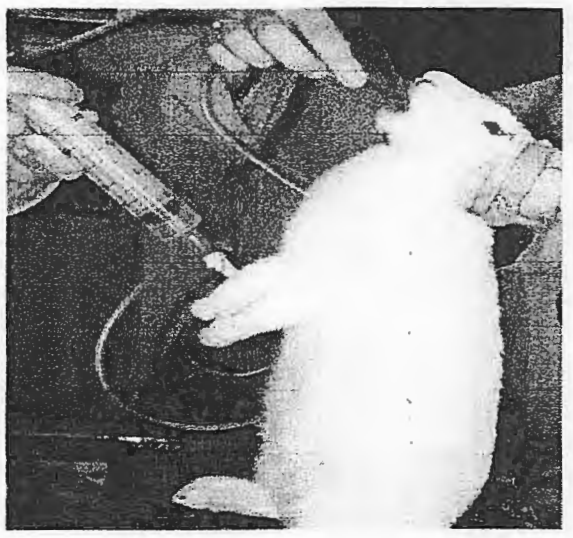


Fig. 06 : Méthode du prélèvement du suc gastrique.

II.2.4.3-Dénombrement de la flore lactique au niveau stomacal

Des échantillons du contenu stomacal ont été prélevés après 1h, 2h, 3h et 4h de l'administration de probiotique Nous avons réalisé des dilutions décimales jusqu'à 10^{-7} à partir des quatre (04) échantillons prélevés; 1ml de cette dilution (la dilution 10^{-7} de chaque échantillon) est ensemencé par étalement sur gélose **MRS.**
Le dénombrement de la flore lactique est réalisé après une incubation à 37°C pendant 24h.

II.2.5-Etude de l'effet de l'Oxytétracycline et de *L.plantarum* sur la translocation post-abattage des entérobactéries chez le lapin

II.2.5.1-Préparation des lapins et administration des suppléments

Nous avons placés les lapins en une partie d'animalerie dans des cages en bois a dimension d'un mètre de longueur, 0.85 m de largeur et 0.69 m de hauteur, dont le plancher est fabriqué d'une façon permettant l'évacuation de la matière fécale des lapins.

Chaque cage est munie de deux abreuvoirs de 18 cm de diamètre et de 550 ml de capacité, ainsi qu'un mangeoire de 98 cm de longueur et de 3.5 cm de hauteur (voir figure 07).

Tout le long de l'expérience, les lapins ont été maintenus à une température presque constante, un éclairage assuré par la lumière du jour, ainsi qu'une parfaite hygiène assurée par un nettoyage quotidien.

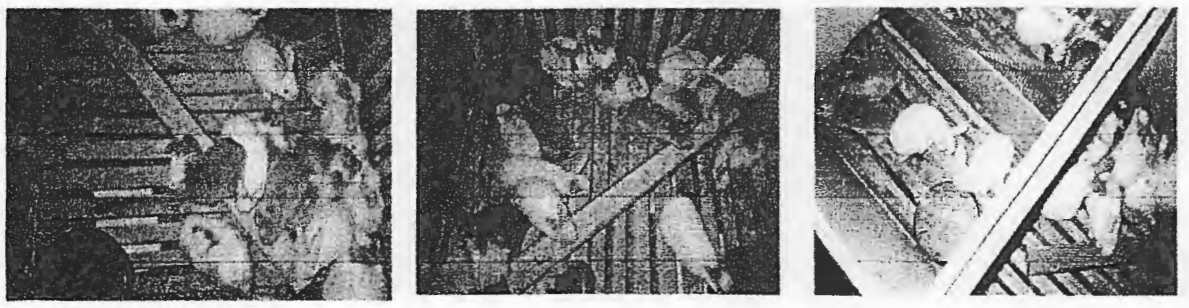


Fig. 07 : La répartition des lapins dans les cages.

Pour notre étude, nous avons réparti les lapins en trois lots, chacun à trois éléments :
Lot 1 : Nous lui avons administré 10 ml d'eau physiologique stérile / tête, 2 fois par jour (Témoin).
Lot 2: Les sujets reçoivent 10 ml d'Oxytétracycline d'une dose de 65 mg / 0.5 kg de poids vif du lapin, 2 fois par jour.
Lot 3: Nous lui avons administré 10 ml d'un probiotique à base de *Lactobacillus plantarum* BJ0021 à raison de 2 fois par jour.

Nous avons administré les trois suppléments aux lapins, par voie orale, quotidiennement à 10h du matin et à 16h du soir durant 7 jours (voir figure 08).

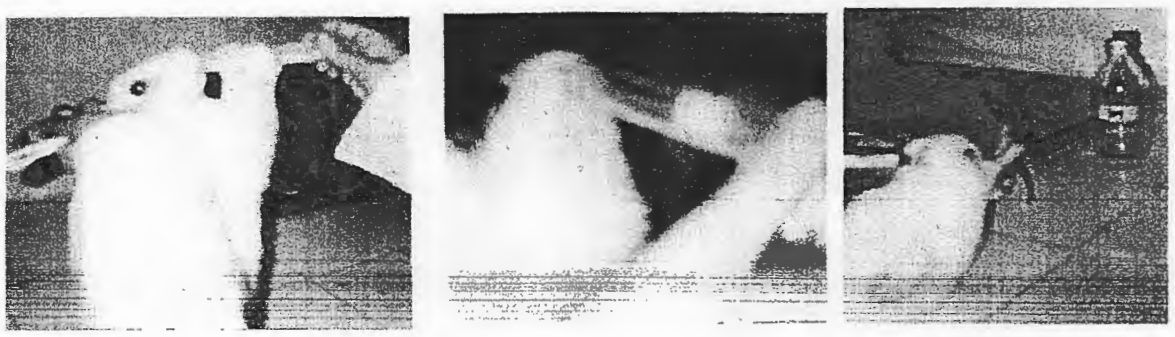


Fig. 08 : Méthode et voie d'administration des trois suppléments.

II.2.5.2-Abattage des lapins, prélèvement d'organes et technique de dénombrement des entérobactéries :

Abattage : A J_0 (avant l'administration des trois suppléments), nous avons sacrifié, par saignée directe, un lapin comme témoin en prélevant les organes.

A J_1 (après 24h d'administration des trois suppléments), nous avons sacrifié un lapin de chaque lots, la même opération est répétée à J_5 et J_7.

Prélèvement : Lors de la saignée, un volume du sang est prélevé (1ml). Après la saignée, on prélève les organes suivants dans les conditions d'asepsie : le foie, l'iléon et le colon.

Technique de dénombrement [21]

4g du foie ont été broyés dans 40 ml de bouillon nutritif. En suite, 2 cm d'iléon et la totalité du colon ont été prélevés et chaque segment d'intestin a été perfusé par 5 ml de bouillon nutritif dans lequel les bactéries libres luminales ont été dénombrées. Chaque échantillon a été lavé individuellement dans huit (08) bains successifs de bouillon nutritif. Chaque segment d'intestin a été pesé (0,55g) et perfusé dans 5ml de bouillon nutritif et les bactéries associées à la muqueuse ont été dénombrées (voir figure 09).

Pour le sang et le foie, nous avons réalisé des dilutions décimales jusqu'à 10^{-2} et 10^{-6} respectivement.

Pour l'iléon et le colon, nous avons effectué des dilutions décimales à partir du 1^{er} bain jusqu'à 10^{-6} et à partir du $8^{ème}$ bain jusqu'à 10^{-4}.

Nous avons ensemencé, en profondeur dans la gélose **VRBG,** 1ml de chaque dernière dilution. Le dénombrement a été effectué après incubation à 37°C pendant 24h.

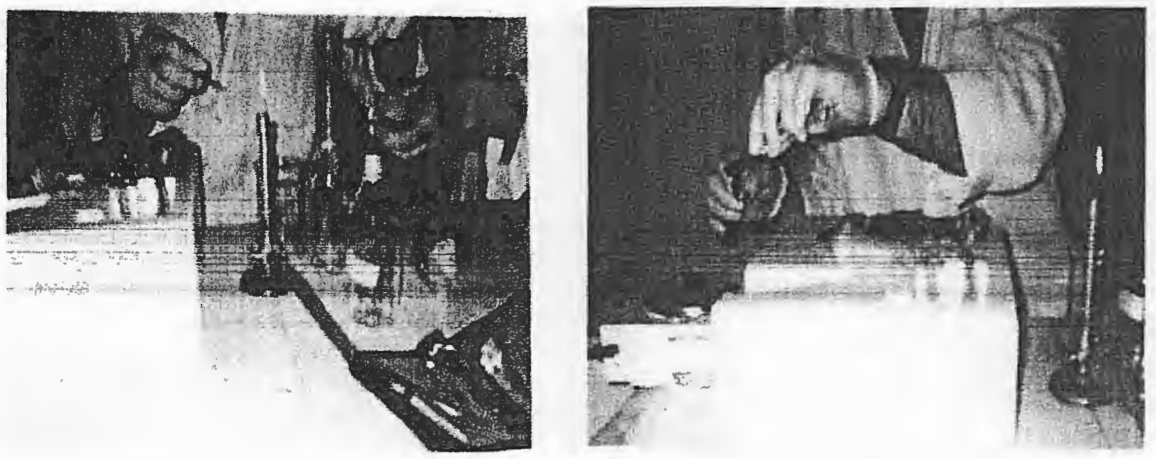


Fig. 09 : Prélèvements d'organes dans des conditions stériles.

II.2.6-Traitement statistique

Quelques résultats ont fait l'objet d'une analyse de variance au seuil de 5% et 1%, en utilisant un dispositif mono factoriel en randomisation totale (Newman Keuils).

Résultats et Discussion

III.1- Isolement et identification des entérobactéries

III.1.1-Observation macroscopique et microscopique

21 souches d'entérobactéries ont été isolées à partir du tube digestif du lapin (cæcum), la purification de chaque souche sur gélose **HEKTOEN** a donné des colonies de forme, taille et couleur identique.

La coloration de Gram a permis d'observer pour toutes les souches une forme coccobacillaire à Gram négatif (couleur rose).

III.1.2-Tests biochimiques

Toutes les souches obtenues sont catalase positives, capables de fermenter le lactose et le glucose sans production d'H_2S et de gaz sauf pour quelques unes (gaz positif).

La majorité est à fermentation mixte. Elles sont toutes dépourvues d'uréase, certaines dégradent le tryptophane jusqu'au stade indole. La majorité possède une activité décarboxylante vis-à-vis de la lysine et de l'ornithine. Ainsi qu'une deshydrolase pour l'arginine.

Ces souches sont pour la plus part mobile, et d'après les résultats cités ci-dessous, on conclut qu'elles appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae,* et les tableaux 03 et 04 résument l'intégralité des tests biochimiques des 21 souches.

Les résultats obtenus nous ont permis d'identifier :

- 09 souches d'*Enterobacter* spp.
- 06 souches d'*Escherichia coli*.
- 04 souches de *Citrobacter* spp.
- 02 souches de *Klebsiella* spp.

De ce fait, le souchier est composé de 42.85 % du genre *Enterobacter* qui est le plus dominant, 28.57 % du genre d'*Escherichia*, 19.04 % du genre *Citrobacter*, et 9.52 % du genre *Klebsiella* (voir fig.10).

Donc le souchier isolé du cæcum de ce lapin est essentiellement constitué de Coliformes avec un taux de 90.48 %.

Ce qui est utile à signaler est le manque de moyen matériel pour l'isolement de la flore anaérobie stricte à partir du tube digestif du lapin.

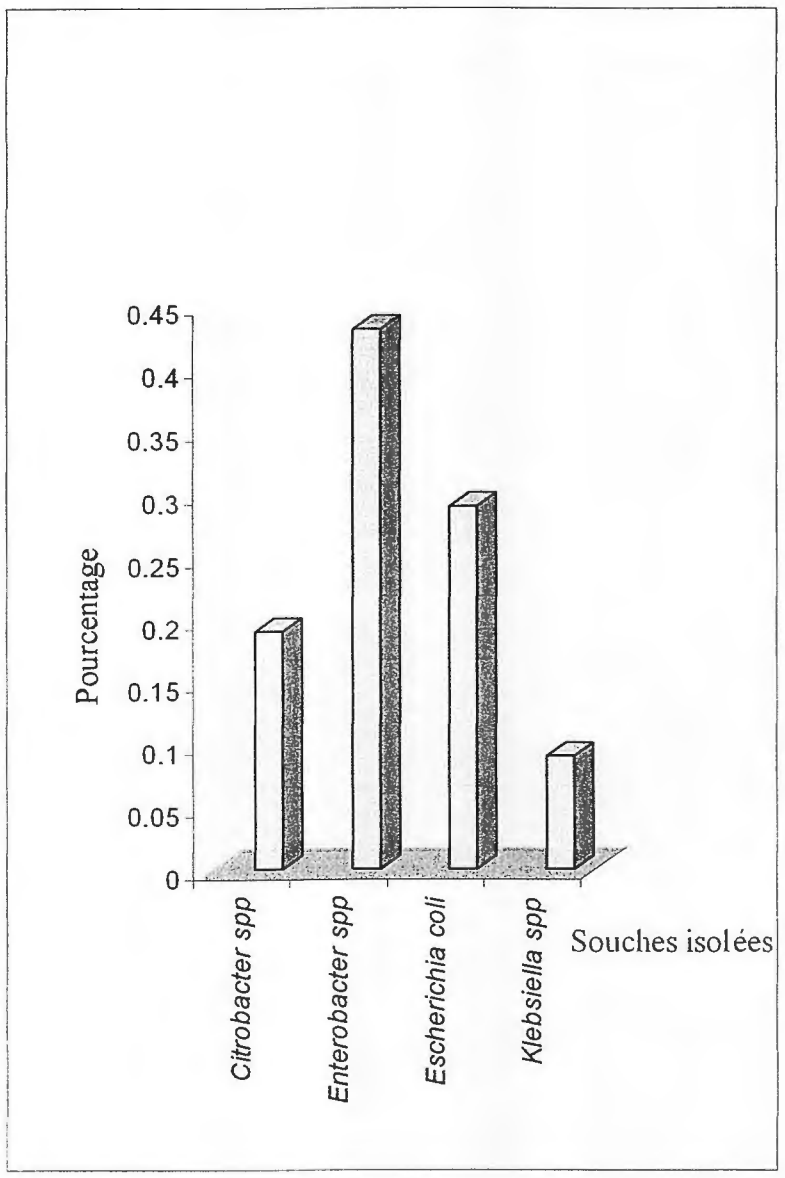


Fig.10 : Répartition des souches isolées et identifiées

Tableau 03 : Résultats de la galerie biochimique des souches isolées.

Souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Morphologie	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LDC	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
ODC	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
ADH	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+/-	+	+	-	++	-
H_2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urée	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
RM	+	+	+/-	+/-	+/-	+	-	+/-	-	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-
Lactose	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+/-	+/-
Mannose	+/-	-	-	-	-	+/-	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
Gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
Mobilité	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
ONPG										
Souches identifiées	***Citrobacter* spp**	***Citrobacter* spp**	***Citrobacter* spp**	***Enterobacter* spp**	***Citrobacter* spp**	***Enterobacter* spp**	***Enterobacter* spp**	***Klebsiella* spp**	***Enterobacter* spp**	***Klebsiella* spp**

Tableau 04 : Résultats de la galerie biochimique des souches isolées (suite).

Souches	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Morphologie	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	+	+/-	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
H_2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urée	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
Lactose	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gaz	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	+/-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Mobilité	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG						+	+	+	+	+	+
Souches identifiées	***Enterobacter* spp**	***Enterobacter* spp**	***Enterobacter* spp**	***Enterobacter* spp**	***Enterobacter* spp**	***Escherichia coli***	***Escherichia coli***	***Escherichia coli***	***Escherichia coli***	***Escherichia coli***	***Escherichia coli***

III.2- Etude des interactions entre le probiotique et les entérobactéries

Les résultats des interactions entre la bactérie lactique *L.plantarum* et les entérobactéries sont représentés dans le tableau 05.

Tableau 05 : Résultats des interactions entre *L.plantrum* et les entérobactéries.

Entérobactéries	Code	Interaction	Diamètre des zones d'inhibition En millimètre (mm)
***Citrobacter* spp**	01	+	7
***Citrobacter* spp**	02	+	8
***Citrobacter* spp**	03	-	0
***Enterobacter* spp**	04	+	8
***Citrobacter* spp**	05	+	7
***Enterobacter* spp**	06	+	7
***Enterobacter* spp**	07	+	7
***Klebsiella* spp**	08	-	0
***Enterobacter* spp**	09	-	0
***Klebsiella* spp**	10	+	8
***Enterobacter* spp**	11	+	8
***Enterobacter* spp**	12	+	12
***Enterobacter* spp**	13	+	7
***Enterobacter* spp**	14	+	9
***Enterobacter* spp**	15	-	0
Escherichia coli	16	-	0
Escherichia coli	17	+	7
Escherichia coli	18	+	8
Escherichia coli	19	+	10
Escherichia coli	20	+	6
Escherichia coli	21	+	11

+ : interaction positive.
- : interaction négative.

Résultats et discussion

Nous avons observé l'absence de zones d'inhibition pour les souches 03, 08,09,15 et 16 représentées par *Citrobacter* spp, *Klebsiella* spp, deux *Enterobacter* spp, et *Escherichia coli* respectivement. Le reste des souches ont présenté des zones d'inhibition inclues entre 06 mm et 12 mm, dont le plus grand diamètre est obtenu avec *Lactobacillus plantarum* ensemencée en masse et la souche 12 *Enterobacter* spp ensemencée en touche. Tandis que la plus faible zone d'inhibition est obtenue avec le couple *Lactobacillus plantarum* et la souche 20 *E. coli*.
La figure ci-dessous (11) illustre des effets d'antagonisme et de symbiose entre *L.plantarum* et quelques entérobactéries.

Ces résultats nous permettent de mettre en évidence deux types d'interactions :

- L'absence des zones d'inhibition se traduit par une symbiose entre *Lactobacillus plantarum* et les souches précédemment citées, ce qui prouve qu'il y a une stimulation de la croissance de ces souches mises en contact.

- La présence des zones d'inhibition est le résultat d'une inhibition de la croissance des souches ensemencées en touche par celle ensemencée en masse (bactérie lactique).

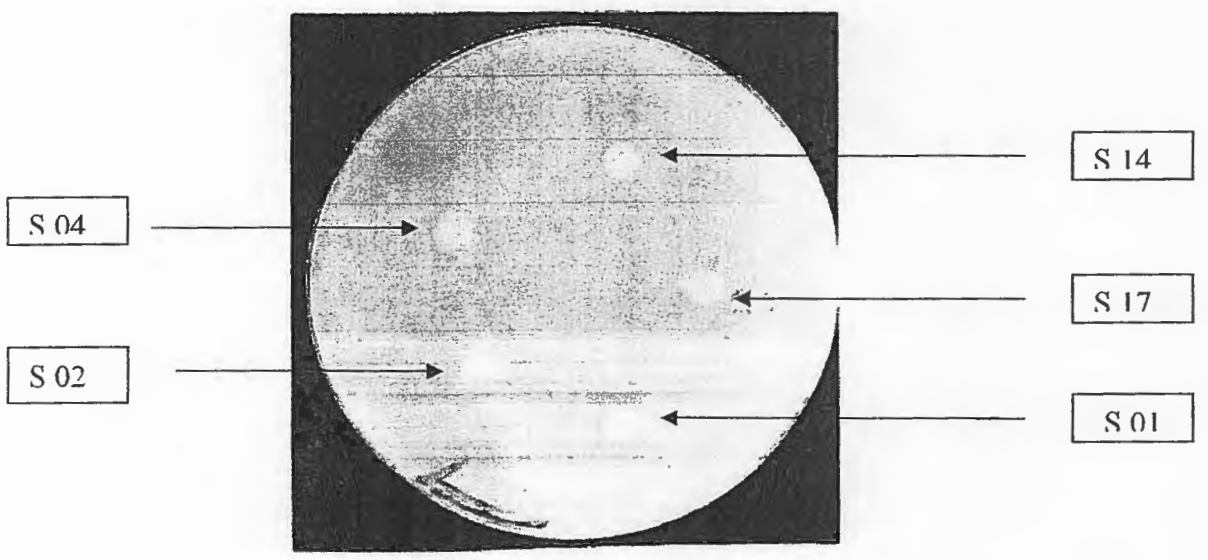


Fig.11 : Résultats des interactions entre *Lactobacillus plantarum* ensemencée en masse et les souches *Citrobacter* spp(01 et 02), *Enterobacter* spp(04 et 14) et *E.coli* (17) en touche.

Résultats et discussion

Il apparaît clairement que le probiotique *L.plantarum* exerce un hétéro antagonisme très marqué sur 76.19 % de la collection. Cependant, il y a une présence à la fois des deux phénomènes hétéro antagonisme et symbiose envers des souches de même espèce, ainsi, les souches d'*E.coli* codées 17, 18, 19 et 20 sont inhibées par le probiotique, en revanche, la souche de même espèce codée 16, manifeste une croissance en présence de la bactérie lactique. Ces observations témoignent la présence de biotypes, donc présence de gènes de résistance vis-à-vis des métabolites excrétés par la bactérie lactique.
La même observation relative à l'hétérogénéité du comportement vis-à-vis du probiotique a été notée à l'égard du reste des souches de même genre de la collection.

Ces résultats indiquent que notre bactérie lactique est capable de synthétiser des substances inhibitrices ayants des activités antibactériennes sur les bactéries à Gram négatif. Ainsi ces substances agissent différemment sur les souches sensibles, parmi ces substances il existe celles qui sont généralement de nature protéique **[35, 42, 89].**

Par ailleurs, les bactéries lactiques sont connues par la production de divers composés bactéricides ou bactériostatiques à savoir les acides organiques, les diacetyles, le peroxyde d'hydrogène, et les bactériocines ou les protéines bactéricides **[03, 47,64, 65,68, 75, 81,95]**.

Les mécanismes d'action de l'acide lactique dans la cellule ne sont pas totalement élucidés : l'acide non dissocié pénètre librement dans la cellule et comme le milieu intérieur est moins acide, il se dissocie en augmentant la concentration interne en proton. Cet afflux de proton réduit la force proton motrice ce qui perturbe certains échanges entre la cellule et son environnement : pénétration de nutriments, acides aminés en particulier **[10].**

Le peroxyde d'hydrogène ou les dérivés d'oxygène produits par les bactéries lactiques peuvent exercer un effet inhibiteur sur certaines flores. Cet effet s'exerce même contre des germes catalases positifs. Juffs et Babel en 1975 obtiennent une action inhibitrice vis-à-vis des bactéries Gram négatifs, en ensemençant du lait avec des ferments lactiques commerciaux. L'activité s'exerce contre *Enterobacter, Pseudomonas*... etc **[10]**.

Le diacetyle produit du métabolisme de citrate est capable d'inhiber les bactéries Gram négatif qui sont plus sensibles que les Gram positifs **[10]**.

Tous ces composés agissent probablement en synergie avec les facteurs du milieu **[40]**.

Nos constats sont en accord avec celles de Brink et *al.* **[12]**, qui ont confirmé que les lactobacilles exercent une forte activité antagoniste sur de nombreux microorganismes à partir de la production de métabolites primaires : l'acide lactique contribuant à la diminution du pH, est le facteur principal de la préservation des aliment fermentés. En plus, certaines souches contribuent à cette préservation en présence des autres substances inhibitrices, telles que les bactériocines**[12]**.

Des études ont rapporté que les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* exercent un pouvoir antagoniste très appréciable envers les bactéries à Gram négatif aussi bien qu'aux Gram positif **[62,77]**. Autres travaux ont montré que l'utilisation de *L.plantarum* isolé de différentes niches écologiques exerce une activité inhibitrice vis-à-vis d'*E.coli* **[14]**.

III.3- Etude de l'effet surnageant des deux probiotiques sur les entérobactéries

L'utilisation des surnageants des bactéries lactiques contre la collection des entérobactéries fait partie des tests d'appréciation des aptitudes probiotiques des souches bactériennes. Les tableaux 06 et 07 représentent les résultats trouvés et les figures 12 et 13 illustrent l'effet inhibiteur des surnageants.

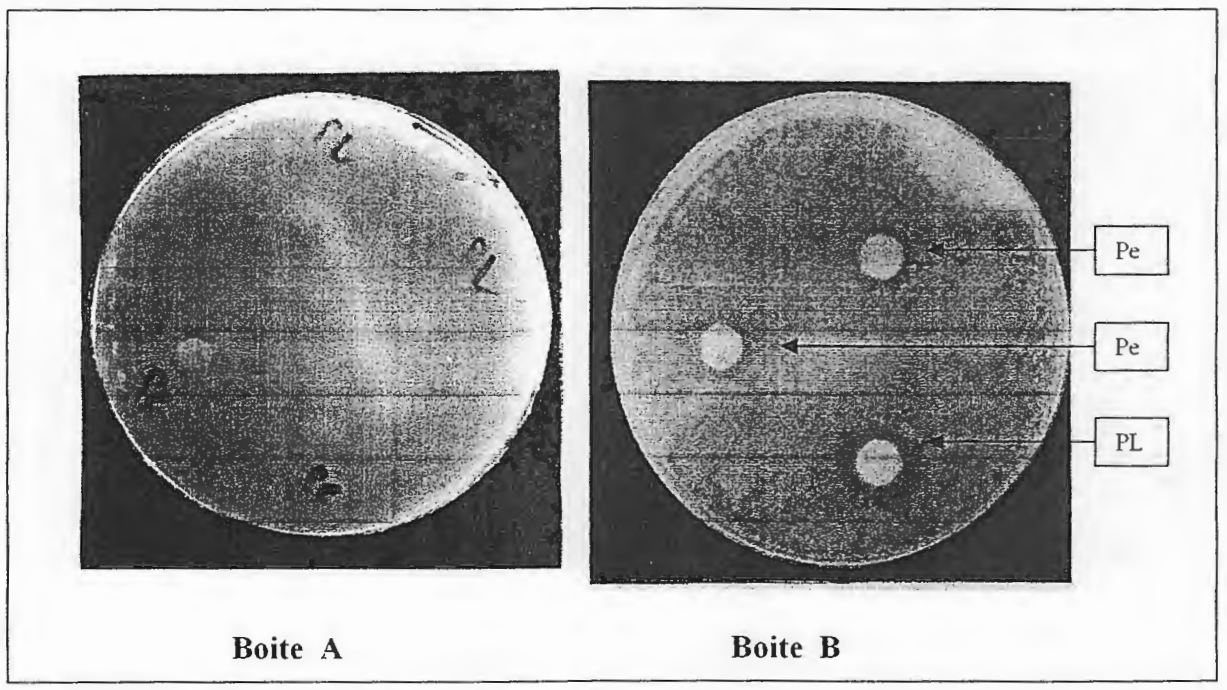
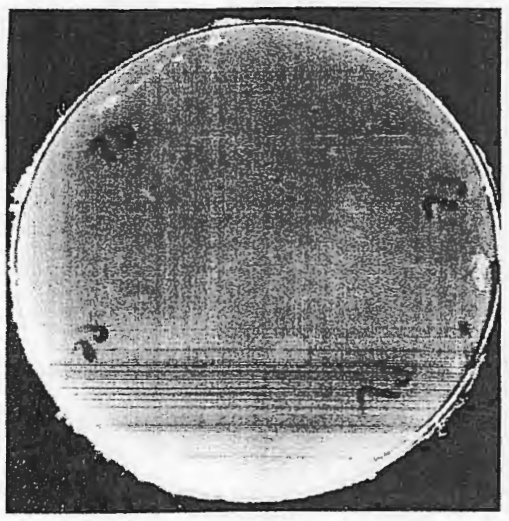


Fig.12 : Actions des surnageants de *L. plantarum* et *P. acidilactici* sur quelques entérobactéries
Boite A : Effet des deux surnageants pH 7 sur la souche *Enterobacter* spp 12.
Boite B : Effet des deux surnageants pH 7 sur la souche *Enterobacter* spp 06.



Boite C

Fig.13 : Actions des surnageants de *L. plantarum* et *P. acidilactici* sur quelques entérobactéries.

Boite C : Effet des deux surnageants natifs sur la souche *Escherichia coli* 18.

Tableau 06 : Résultats de l'effet des surnageants de *L. plantarum* sur les entérobactéries.

Souches	Surnageants de *L. plantarum*			
	Natif		pH 7	
	interaction	Diamètre de zones d'inhibition mm	interaction	Diamètre de zones d'inhibition mm
Citrobacter spp	+	9	+	10
Citrobacter spp	+	9	+	9
Citrobacter spp	+	12	+	9
Enterobacter spp	+	8	-	0
Citrobacter spp	+	8	+	18
Enterobacter spp	+	9	+	15
Enterobacter spp	+	9	+	8
Klebsiella spp	+	10	-	0
Enterobacter spp	+	12	+	10
Klebsiella spp	+	10	+	11
Enterobacter spp	+	10	+	9
Enterobacter spp	+	9	+	9
Enterobacter spp	+	10	+	7
Enterobacter spp	+	9	+	7
Enterobacter spp	+	9	+	8
Escherichia coli	+	8	-	0
Escherichia coli	+	9	+	9
Escherichia coli	+	9	+	9
Escherichia coli	+	10	+	7
Escherichia coli	+	9	+	11
Escherichia coli	+	9	+	8

+ : Inhibition.
- : Symbiose.

Tableau 07 : Résultats de l'effet des surnageants de *P. acidilactici* sur les entérobactéries.

Souches	Surnageants de *P. acidilactici*			
	Natif		pH 7	
	interaction	Diamètre de zones d'inhibition mm	interaction	Diamètre de zones d'inhibition mm
Citrobacter spp	+	7	+	10
Citrobacter spp	+	10	+	10
Citrobacter spp	+	10	+	10
Enterobacter spp	+	7	+	11
Citrobacter spp	+	8	+	18
Enterobacter spp	+	8	+	10
Enterobacter spp	-	0	-	0
Klebsiella spp	-	0	+	10
Enterobacter spp	+	9	+	9
Klebsiella spp	+	10	+	10
Enterobacter spp	+	10	+	10
Enterobacter spp	+	11	+	9
Enterobacter spp	-	0	-	0
Enterobacter spp	-	0	-	0
Enterobacter spp	+	11	-	0
Escherichia coli	+	11	+	7
Escherichia coli	+	8	-	0
Escherichia coli	+	9	+	7
Escherichia coli	+	10	+	7
Escherichia coli	+	12	+	8
Escherichia coli	+	9	-	0

+ :Inhibition.
- : Symbiose.

Résultats et discussion

D'après ces résultats, on note que le surnageant natif de *Lactobacillus plantarum BJ0021* a un spectre d'activité très large sur la totalité des entérobactéries (activité inhibitrice de 100%) avec une zone d'inhibition remarquable de 12 mm pour les souches 03 et 09 : *Citrobacter* spp et *Enterobacter* spp respectivement.

Après la neutralisation des acides organiques et particulièrement l'acide lactique, il y a une diminution de cette activité qui atteint 85.71% ; les souches 04, 08 et 16 ont présenté une résistance aux composants de ce surnageant, alors que la souche 05 (*Citrobacter* spp) a présenté une zone d'inhibition de 18 mm.

De même le surnageant natif de *Pediococcus acidilactici*, qui a présenté une inhibition de 80.95% de la collection, dont les souches présentant une résistance sont *Enterobacter* spp 07, 13, 14 et la souche *Klebsiella* spp 08. Contrairement aux autres souches de genre *Enterobacter*, la souche *Enterobacter* spp 15 s'est révélée très sensible avec un diamètre d'inhibition de 11mm. Par ailleurs, le surnageant à pH neutre a inhibé les 71.42% des souches avec une résistance des *Enterobacter* spp 07,13,14 et 15 et des *E.coli* 17 et 21, tandis que la souche *Citrobacter* spp 05 a présenté une sensibilité extrême avec une zone d'inhibition de 18 mm de diamètre.

Nous constatons qu'il y a une variabilité inter espèce dont on assiste à un comportement variable entre souche de même espèce vis-à-vis du surnageant natif et celui à pH 7, ainsi que l'origine des surnageants, c'est le cas des souches *E.coli*

La présence des zones d'inhibition est liée à la présence des métabolites ayant une action antibactérienne sur les souches des entérobactéries, mais la neutralisation des deux surnageants par une base forte (NaOH) a éliminé l'acide lactique et les autres acides organiques qui avaient un effet inhibiteur par abaissement du pH, et de ce fait nous avons observé une diminution de l'activité inhibitrice des surnageants des souches probiotiques.

La persistance de cette activité antagoniste, même après l'élimination de l'acide lactique, confirme l'existence des autres substances antibactériennes tels que H_2O_2, diacetyles et bactériocines cela a été rapportés dans les travaux de **[45]**.

Nos résultats sont en accord avec plusieurs auteurs qui confirment que quelques souches de *Lactobacillus plantarum,* isolées des olives fermentées et après neutralisation de leur surnageant, produisent des substances inhibitrices telles que les bactériocines **[18,35,48].**

La faible activité inhibitrice de *Pediococcus acidilactici* par rapport à celle de *Lactobacillus plantarum* est due probablement à la résistance de quelques bactéries Gram négatif, attribuée a la nature particulière de leur enveloppe cellulaire

et le mécanisme d'action de la bactériocine amené par le phénomène d'adsorption accordé à Bhunia et *al.* **[07].**

Les variations de la sensibilité sont dues aux caractères des souches indicatrices (présence ou absence des sites de réception ou immunoprotéines) et au niveau d'action causée par ces facteurs inhibiteurs **[16,60, 73,80].**

Nous signalons que le surnageant natif de *Lactobacillus plantarum* possède le plus grand spectre d'activité par rapport à celui de la souche *Pediococcus acidilactici*, grâce à sa production massive d'acide lactique **[67]**. L'effet inhibiteur de l'acide lactique sur les bactéries à Gram négatif a été rapporté par plusieurs auteurs **[19]**.

III.4- Survie de *Lactobacillus plantarum* dans l'estomac du lapin

III.4.1- Détermination de l'acidité et du pH du lait fermenté :

Après incubation, il y a eu coagulation complète du lait par la bactérie lactique suite à la transformation du lactose en acide lactique.

La détermination de l'acidité du lait fermenté, nous permet d'apprécier la quantité d'acide lactique produit par la bactérie lactique qui est égale au volume du NaOH N/9 nécessaire pour neutraliser la quantité d'acide lactique contenu dans 10 ml du produit.

Donc notre bactérie lactique *Lactobacillus plantarum* a produit 10g d'acide lactique après 4h d'incubation à 37°C, c'est une souche dite rapide ou Fast Acid Producer (FAP). En parallèle, la production de cette quantité d'acide lactique a fait baisser le pH à une valeur de 5,13.

III.4.2- Dénombrement des bactéries lactique du lait fermenté :

Le dénombrement de la totalité des colonies apparues sur gélose **MRS**, nous a permis d'apprécier le nombre initial des bactéries lactiques présentes dans 1ml du lait fermenté qui est égal à 178×10^9 colonies.

III.4.3- Evaluation de la survie de *Lactobacillus plantarum* dans l'estomac du lapin

Tableau 08 : Evaluation du nombre des bactéries lactiques dans l'estomac du lapin.

	Temps	1h	2h	3h	4h
Nombre de bactéries lactiques $n \times 10^9$/ml du contenu stomacal	1ère boite	12.4	17.6	8.4	4.8
	2ème boite	13.2	17.2	10	/
Nombre moyen $n \times 10^9$/ml		12.8	17.4	09.2	4.8

Après une heure d'administration du probiotique, nous avons observé une chute du nombre de bactéries lactiques dans l'estomac du lapin par rapport au nombre initial présent dans le lait fermenté par la bactérie probiotique.

Deux heures après, nous avons remarqué une légère augmentation, mais après trois heures d'administration, le nombre de bactéries lactiques a été réduit à la moitié, et cette réduction continue même après 4h.

La figure 13 montre une perte en nombre de la bactérie lactique en fonction du temps dans le contenu de l'estomac du lapin.

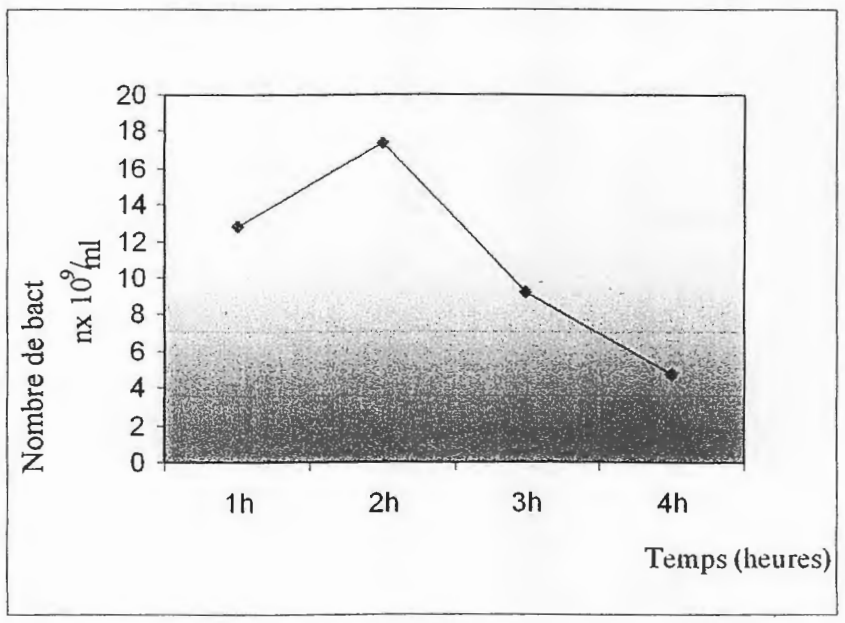


Fig.14 : Survie de la bactérie lactique dans l'estomac du lapin.

La chute observée après 1h peut être expliquée par les valeurs basses du pH stomacal et le rôle de l'acidité gastrique qui a un effet de barrière contre les microorganismes ingérés.
De ce fait, les bactéries lactiques ont subi un état de stress vis-à-vis du pH et de l'acidité provoquant cette diminution.

Ce nombre est faible par rapport à celui obtenu après 2h, cela a été probablement causé par une bonne motricité gastrique donc une bonne homogénéisation du contenu gastrique. D'autre part, il se peut qu'il y ait eu un effet tampon des protéines du lait.

Même après 3h et 4h d'administration du probiotique, on a remarqué que le nombre des bactéries lactiques reste toujours supérieur à 10^9 / ml du suc gastrique, ce qui confirme que *Lactobacillus plantarum* a la capacité de survivre dans l'estomac et de supporter ses condition hostiles, et donc elle révèle une des caractéristiques des bactéries probiotiques. Ce que nous avançons concernant cette aptitude probiotique de notre bactérie est rapportée par des données bibliographiques, ainsi "avant d'atteindre le tractus intestinal, les bactéries probiotiques doivent d'abord survivre au passage à travers l'estomac; là-bas la secrétions d'acide gastrique constitue la 1ère défense mécanique contre la plus part des microorganismes ingérés " **[32].** En effet l'administration des acides inhibe la pompe des protons (H^+), permettant la colonisation microbienne de l'estomac **[50].**

Pour augmenter leur taux de survie, les probiotiques doivent être ingérés pendant le repas, ou bien protégés dans des capsules ou par microencapsulation **[37]** .

En plus les concentrations des probiotiques vihéculés vivants aux différents étages du tube digestif sont influencées par leur pourcentage de survie et la quantité ingérée. Cependant, la capacité de survie varie entre les genres et les souches : certains probiotiques sont réduits dès leur passage dans l'estomac, alors que d'autres traversent l'intestin grêle et parfois même le colon à haute concentrations tel que *Bifidobactérium*, *L. plantarum* ou *L. acidophilus***[51].**

Stanton et *al* **[78]** ont confirmé que « pour obtenir certains effets positifs sur la santé, une souche probiotique doit atteindre le gros intestin à une concentration d'environ $1x10^7$ cellules viables/gramme. »

III.4- Etude de l'effet de *L.plantarum* et de l'oxytétracycline sur la translocation post abattage des entérobactéries chez le lapin

Au cours de ces expériences, le taux des bactéries libres luminales et des bactéries associées à la muqueuse iléale et colique a été déterminé à J_1, J_5, et J_7 dans les trois lots expérimentaux. Les résultats sont illustrés par les tableaux 09, 10, 11, 12 et leurs figures correspondantes.

Tableau 09 : Variation du nombre des bactéries luminales du colon.

Lots	Nombre de bactéries de la lumière du colon. nx10^7/ml.			
Temps en jours	J0	J1	J5	J7
Témoin	17.2	14.4	12	11.6
Antibiotique	17.2	29.2	14.8	06
L.plantarum	17.2	9.6	16	0.8

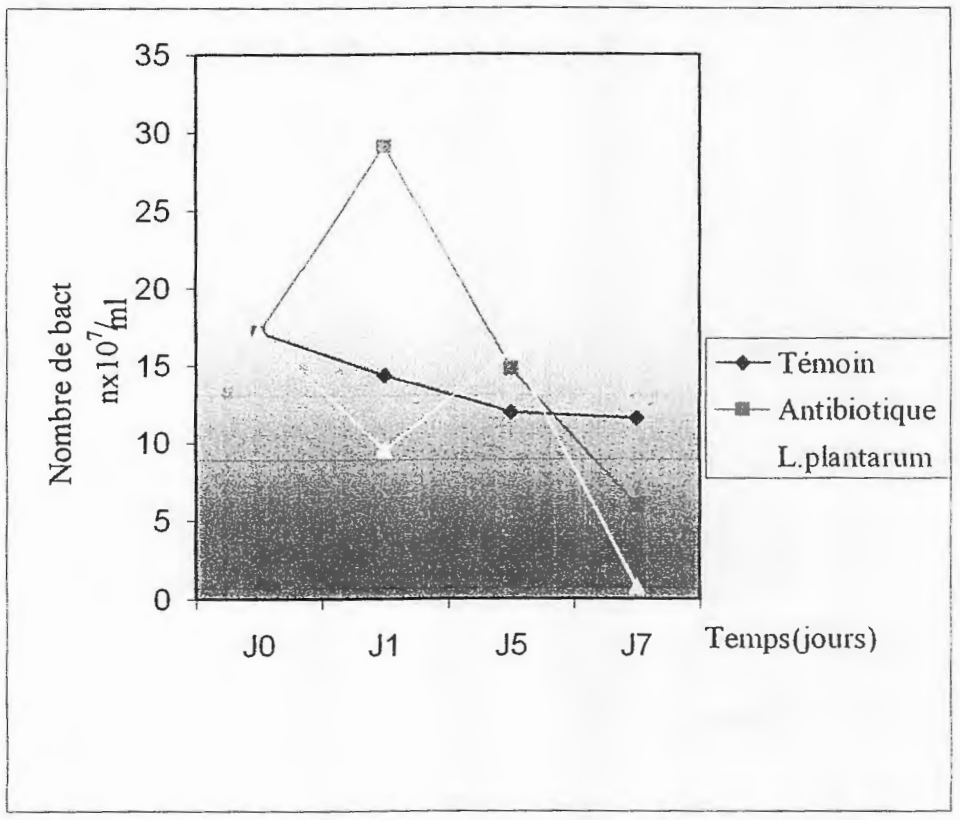


Fig.15 : Evolution du nombre des entérobactéries luminales coliques.

Tableau 10 : Variation du nombre des bactéries de la muqueuse du colon.

Lots	Nombre de bactéries de la muqueuse du colon nx10^5/ml.			
Temps en jours	J0	J1	J5	J7
Témoin	9.6	8.8	9.2	10.4
Antibiotique	9.6	23.2	16.4	11.2
L.plantarum	9.6	37.2	32	11.2

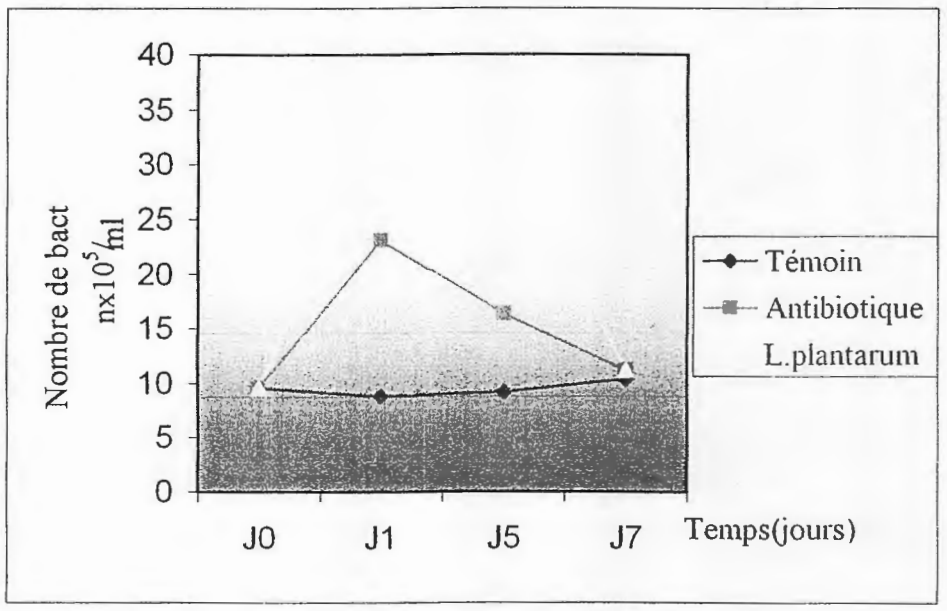


Fig.16 : Evolution du nombre des entérobactéries associées à la muqueuse du colon

Les résultats du tableau 09 montrent que l'apport de l'antibiotique et du probiotique avait un effet hautement significatif ($P< 0.01$) sur le nombre des bactéries de la lumière du colon après une semaine. Ainsi, on assiste à une diminution très notable de ces bactéries chez les sujets recevant le probiotique suivie de celle des sujets à l'oxytétracycline, le nombre respective était de 0.8 10^7 et de 6. 10^7 bactéries /ml. Par ailleurs, l'effet persiste ($P<0.05$) sur les bactéries adhérente à la muqueuse du colon avec contrairement à la flore libre, une augmentation considérable du nombre de bactéries fixées à cette partie de l'intestin.

Résultats et discussion

Des résultats similaires ont été trouvés par Zareie et *al* **[94],** qui rapportent que l'administration de *L.rhamnosus* R0011 et *L.halveticus* R0052 au rat, réduit significativement le nombre de bactéries de la lumière du colon et peuvent augmenter comme réduire le nombres des bactéries de la muqueuse de ce fragment intestinal.

Tableau 11 : Variation du nombre des bactéries luminales d'iléon.

Lots	Nombre de bactéries de la lumière iléale. nx10^8/ml			
Temps en jours	J0	J1	J5	J7
Témoin	15	14	12.08	10.88
Antibiotique	15	8.48	0.52	0.04
L.plantarum	15	1.8	0.88	1.36

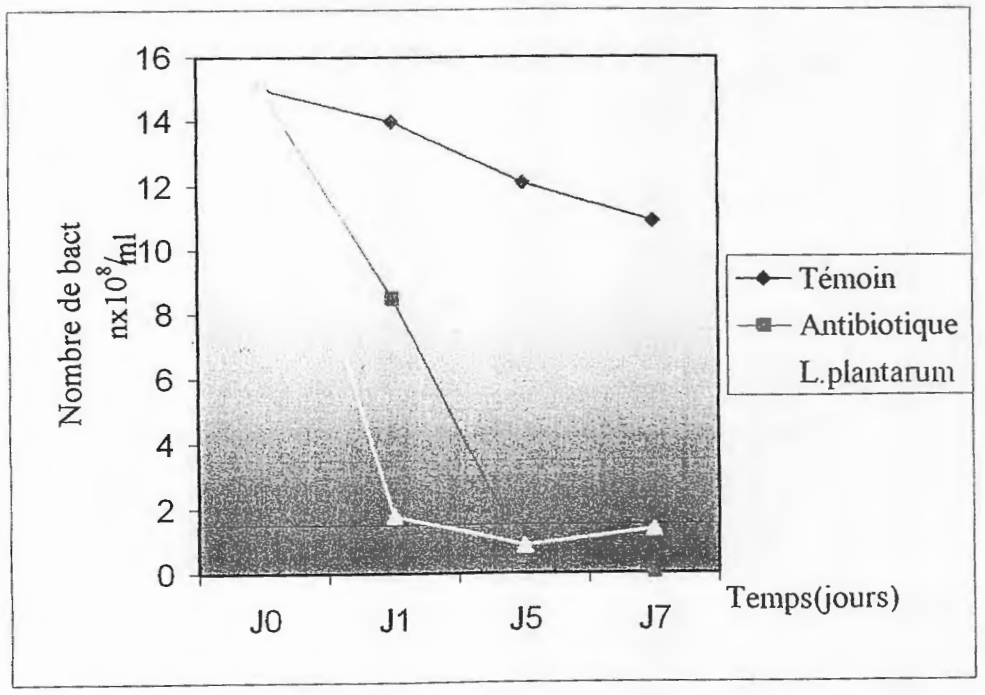


Fig.17 : Evolution du nombre des entérobactéries luminales de l'iléon

Tableau 12 : Variation du nombre des bactéries de la muqueuse iléale.

Lots	Nombre de bactéries de la muqueuse iléale nx10^5/ml			
Temps en jours	J0	J1	J5	J7
Témoin	18.8	17.2	16.4	14.4
Antibiotique	18.8	25.2	14.8	5.6
L.plantarum	18.8	40	31.2	14

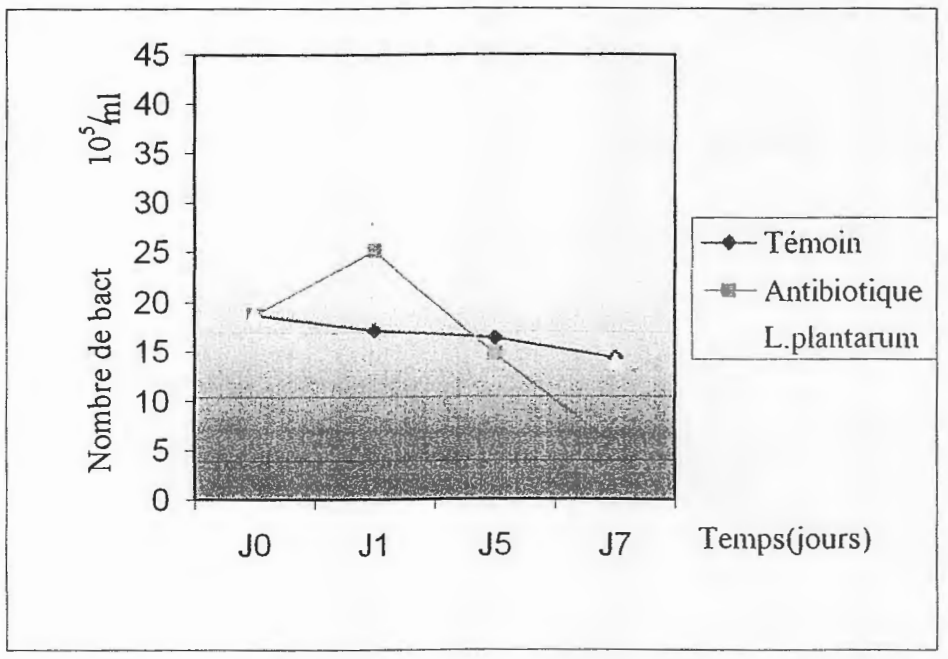


Fig.18 : Evolution du nombre des entérobactéries adhérentes à la muqueuse de l'iléon

Nous avons observé d'importantes différences entre le lot témoin et les autres lots expérimentaux, où les bactéries libres luminales iléales ont subi une réduction très importante, elle été très remarquable pour l'iléon prélevé des lapins du lot à antibiotique, et pour l'iléon récupéré des lapins du lot à probiotique.

En ce qui concerne les bactéries associées à la muqueuse iléale, leur nombre a été très réduit dans le lot à l'oxytétracycline et moins dans le lot à *L.plantarum* en les comparant toujours à celui du témoin et cela particulièrement en périodes J5 et J7. Les résultats observés prouvent que les bactéries libres sont plus sensibles à l'apport de l'antibiotique aussi bien que du probiotique, en revanche, celles adhérées au tube digestif résistent plus au stresse causé par les deux additifs.

Résultats et discussion

Des résultats similaires ont été trouvés par Zareie et *al.* **[94],** et Lee et *al.* **[43].** De même, Lee et *al.* **[44]** rapportent que l'utilisation des bactéries probiotiques avaient des effets positifs sur les entérobactéries, particulièrement *E.coli* au niveau du cæcum et du gros intestin du lapin.

Par ailleurs, Abdel-Samee **[01]** trouve que la substitution totale des antibiotiques par les probiotiques avait des effets sur l'équilibre de la flore cæcale qui s'est répercutée positivement sur la santé du lapin.

Les résultats de la translocation des entérobactéries vers le foie et le sang sont mentionnés dans les deux tableaux 13, 14 et illustrés par les figures 19 et 20.

Tableau 13 : Evaluation de la translocation des entérobactéries vers le sang.

Lots	Nombre de bactéries de sang. nx10^3/ml			
Temps en jours	J0	J1	J5	J7
Témoin	76	72	49.6	20
Antibiotique	76	68	60	5.6
L.plantarum	76	67.2	24	13.6

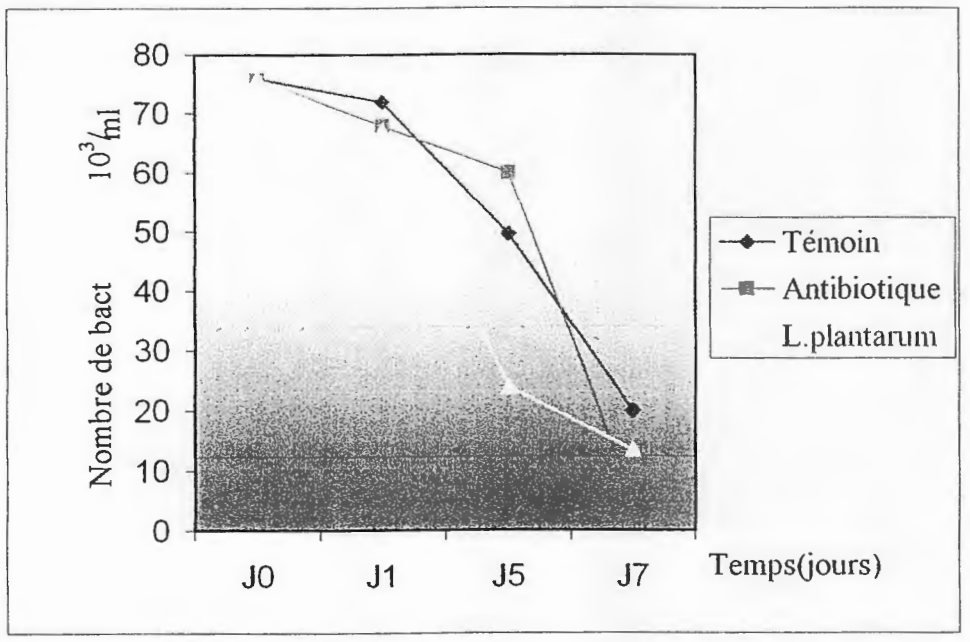


Fig.19 : Evaluation de la translocation des entérobactéries vers le sang.

Tableau 14 : Evaluation de la translocation des entérobactéries vers le foie.

Lots	Nombre de bactéries de foie. nx10^8/g			
Temps en jours	J0	J1	J5	J7
Témoin	11.2	6.4	4.8	2.4
Antibiotique	11.2	4.8	0.4	0.24
L.plantarum	11.2	9.6	0.32	0.24

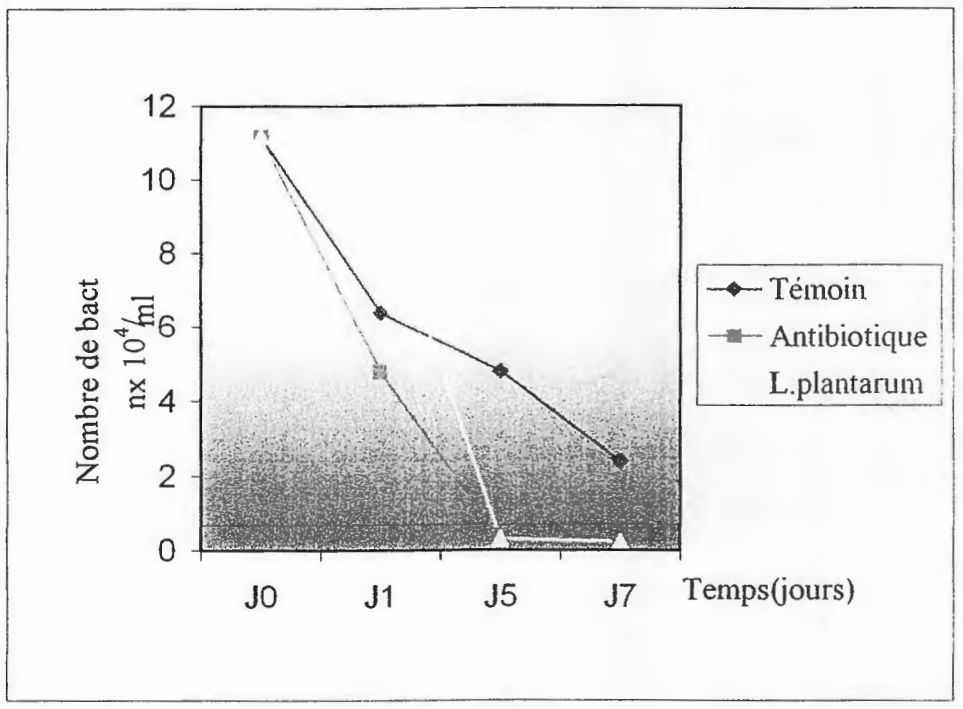


Fig.20 : Evaluation de la translocation des entérobactéries vers le foie.

Avant l'administration des trois suppléments, le nombre des entérobactéries dans le foie et le sang a été hautement significatif, de l'ordre de $11,2.10^8$/g et $7,6.10^8$ / ml respectivement.

Dès le premier jour J_1, ce nombre a diminué mais d'une façon plus remarquable dans le lot à l'oxytétracycline et à probiotique que dans le lot témoin. Cette diminution s'est poursuivie jusqu'à J_5 et J_7.

Nous avons utilisé ce model expérimental pour apprécier l'activité de l'Oxytétracycline et du lait fermenté à base de *Lactobacillus plantarum* vivant sur la modification et la translocation des entérobactéries du tube digestif de lapin. Cette étude démontre que l'Oxythétracycline s'oppose efficacement à la prolifération de ces bactéries en provoquant d'importantes modifications de leur nombre. Cet effet semble lié à l'action bactériostatique de l'antibiotique qui inhibe la synthèse des protéines en se liant au ribosome, inhibant aussi la fixation des aminoacyl-ARN_t au site A **[76].**

De même le probiotique a prouvé ces aptitudes à réduire le nombre des entérobactéries, surtout celles qui colonisent la muqueuse colique et iléale, en inhibant leur translocation vers le sang et le foie.

En effet, dès J_1, le nombre de bactéries associées à la muqueuse est significativement diminué dans les lots supplémentés, cet effet se prolonge jusqu'au J_7.

Le probiotique s'oppose donc à la translocation des entérobactéries aussi efficacement que l'Oxythétracycline mais par un mécanisme différent.

L'effet des préparations à base de *Lactobacillus* a été attribué selon les auteurs à la présence des produits bactériens bactéricides **[04,91].**

La diminution de concentration des bactéries coliformes dans le tube digestif serait due au pH très bas, obtenu grâce à l'apport du lait acidifié par l'acide lactique **[51].**

Il s'est avéré que certains probiotiques ont une capacité d'adhérence au tube digestif. Deux études récentes ont montré que des souches adhérentes de *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus* pouvaient coloniser de manière prolongée une partie du tube digestif.

Ces probiotiques pourraient agir en limitant l'implantation des germes, par compétition au niveau des sites de fixation, pour la colonisation : si les probiotiques utilisent la surface du tube digestif, les germes n'ont plus de place pour s'implanter. En plus certains *Lactobacillus* adhèrent aux villosités intestinales et inhibent la fixation de *E.coli* entéro pathogènes **[49].**

Nos résultats corroborent avec ceux rapportés par plusieurs travaux. Lee et *al.* **[44]** rapportent que l'administration des bactéries probiotiques minimise la fréquence de translocation intestinale de *E.coli* O157 : H7 chez les jeunes lapins. Zaeie et *al.* **[94]** trouvent que la consommation de probiotique a des effets thérapeutiques sur l'intestin, un pré traitement par *Lactobacillus* servira à la prévention de l'adhésion des bactéries pathogènes aux villosités du tube digestif et jouera ainsi le rôle de barrière contre la translocation de ces germes.

Conclusion

Générale

Conclusion générale

Les résultats tant espérés de nos expériences personnelles après plusieurs tentatives « in-vitro » qu'à « in-vivo », se résument dans les synthèses suivantes :

- L'isolement ainsi que l'identification des entérobactéries à partir du tube digestif du lapin, a permis de constituer une collection de 21souches appartenants aux trois genres :*Escherichia, Enterobacter*, et *Citrobacter*.

- L'étude des interactions « in-vitro » entre *Lactobacillus plantarum* et les souches isolées montrent que notre probiotique a un effet antagoniste très remarquable, il a une action inhibitrice sur 76 % des entérobactéries.

- L'étude de l'activité du surnageant natif et celui à pH7 de *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus acidilactici* sur les souches isolées, a révélé leur capacité d'inhiber ces bactéries, mais avec une différence entre leur spectre d'action. Toutefois, les surnageants de *L.plantarum* étaient les plus efficaces contre les entérobactéries.

- L'étude « in-vivo » de la survie de *Lactobacillus plantarum* dans l'estomac du lapin, a permis de prouver sa capacité de supporter les conditions hostiles stomacales et de révéler un des critères des bactéries probiotiques.

- L'étude comparative de l'effet de l'Oxytétracycline et du probiotique *L.plantarum* sur la modification du nombre de la flore endogène du lapin ainsi que dans la translocation vers le sang et le foie a prouvé la capacité de *Lactobacillus plantarum*, qui est une bactérie probiotique, à agir sur l'équilibre de la flore endogène du tube digestif du lapin de même à minimiser la translocation des entérobactéries vers le sang et le foie. Un effet similaire est trouvé avec l'utilisation de l'antibiotique.

Cependant, on peut refaire un travail similaire en étudiant l'effet des probiotiques et antibiotiques sur la translocation des germes pathogènes.

Reste a noté que les probiotiques ne sont pas largement utilisés chez l'être humain pour des raisons thérapeutiques, ils sont cependant abondamment utilisés pour leur effets nutritionnels.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

01- Abdel-Samee A-M, 1995. Using some antibiotics and probiotics for alleviating heat stress on growing and doe rabbits in Egypt. *World Rabbit Sci.* **3 (2):** 107-111.

02- Amrouche T, 2005. Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des Bifidobactéries : analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires impliqués. Chapitre 02.*Université du Québec.Montréal.*

03- Andersen, E. L., Diep D.B., Nes I. F., Eijsink V. G. H et Nissen-Meyer J, 1998. Antagonistic of *Lactobacillus plantarum* C 1: two new tow-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricins A. *Appl. And Environ. Microbiol.*, **64**: 2269 – 2272.

04- Barefoot, S.F et Klaenhammer T.R, 1983. Detctetion and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*.
Appl. Environ. Microbiol., **45**: 1808-1815.

05- Baumgart D. C et Dignass A. U., 2002. Intestinal barrier function. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, **5**, 685-94.

06- Berg R. D, 1998. Probiotics, Prebiotics or ''conbiotics''.
Trends in Microbiology, **6**, 89-92.

07- Bhunia, Johnson M. C., Ray B et Kalchayanand N, 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains.
J. *Appl. Bacteriol.*, **70**: 25 – 30.

08- Blaut M., 2002. Relationship of prebiotics and food to intestinal micro flora.
European Journal of Nutrition, **41**, 11- 16.

09- Boucher. S et Nouaille L, 1996. Maladies des lapins.
C E P Communication., 13 – 17 – 23 – 37.

10- Bourgeois C. M.,. et Larpent J. P , 1996. Microbiologie alimentaire Tome 2, aliment fermenté et fermentation alimentaires 2^{éme} édition.
Tec et Doc. Paris, 17 -18 – 24 – 25 – 434 – 436.

11- Bousseboua. H. 2002. Eléments de microbiologie générale. *Edition de l'université Mentouri Constantine.*, 148 - 171.

12- Brink ten B. Minekns M, Vander Vossen. JMBM, Leer RJ, et Huis in't Veld JHJ, 1994. Antimicrobial activity of Lactobacilli. J. *Appl. Bacteriol.* **77**: 140 – 148.

13- Bukowska H., Pieczul-Mroz J., Jastrze¸bska M., Chełstowski K., et Naruszewicz M., 1998. Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. Atherosclerosis, 137, 437–438.

14- Caridi A, 2003. Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from ovine cheese Pecorino del Poro. *Int. J.Dairy Technol.* **56**: 1-6.

15- Corthier G, Josas J et Alamovitch C, 2005. Effets des probiotiques et des prébiotiques sur la flore et l'immunité, *Agence française de sécurité sanitaire des aliments*, février 2005.

16- Daeschel, M. A, et. Klaenhamner T. R., 1985. Association of a 13, 6 mega Dalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin acidity.
Appl. Environ. Microbiol., **50**: 1538 – 1541.

17- Dajani A.S., Tom M. C., et Law D.J., Viridins, 1976. Bacteriocins of alpha-haemolytic Streptococci: isolation, characterization and partial purification, antimicrob. *Agent's chamother*, 9 : 81-88.

18- Delgado A, Brito D, Fevereiro P, et Marques J F., 2001. Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum*, isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives. *Lait*, **81**: 203 -215.

19- Dhawale A, 2005. Better eggs hell quality with a gut acidifier.
Poult. Int. **44** : 18 -21.

20- Dunne C., O'Mahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., O'Halloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O 'Sullivan G. C., Shanahan F., et Collins J. K, 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *American Journal of Clinical Nutrition*, **73**: 386-392.

21- Fauchère, J.L Véron M, Lellouch-Tubiana A P et fister A, 1985. Experimental infection of gnotobiotic mice with Campylobacter jejuni: Colonisation of intestine and spread to lymphoid and reticuloendothelial organs. *J. med. Microbial.*, **20** : 215-224.

22- Fleming, H. P., Etchells J. L et Costilow R. N. 1975. Microbial inhibition of isolates of Pediococcus from cucumber brine. *Appl. Environ. Microbiol.* **30** : 1040 – 1042.

23- Fuller R., 1989. Probiotics in man and animals.
Journal of Applied Bacteriology, **66**: 365-378.

24- Gianinetti R, 1988. L'élevage rentable des lapins.
Edition de Vecchi S. A. Paris., 08 – 09 – 10 – 11 – 182 – 183.

25- Gibson G. R et Roberfroid M. B, 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.
Journal of Nutrition. **125**: 1401-1412.

26- Gosselink M. P, Schouten W. R., Van Lieshout L. M., Hop W. C., Laman J. D et Ruseler-van Embden J. G., 2004. Delay of the first onset of pouchitis by oral intake of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG.
Disease of Colon and Rectum, **47**: 876-884.

27- Gournier-château N, Larpent J. P, Castillanos M. I et Larpent J. L, 1994. Les probiotiques en alimentation animale et humaine.
Edition Technologie et documentation Lavoisier, Paris, France. 1-192.

28- Grassé P-P,1977. Précis de Zoologie vertébrés. Tom III. 2ème édition,
Masson paris., 235 - 236.

29- Guandalini S., 2002. Use of *Lactobacillus-GG* in paediatric Crohn's disease.
Digestive and Liver Disease, **3**: 63-65.

30- Guiraud J-P., 1998. Microbiologie alimentaire, *1ere édition. Dunod Paris.*, 231 – 288.

31- Haddad O, 1984. Elevage et pathologie du lapin. *Université de Constantine. Institut des sciences vétérinaire.*, 29 – 30 – 33 – 35 – 36.

32- Henriksson A, Khaled AKD et Conway PL, 1999. Lactobacillus colonization of the gastrointestinal tract of mice after removal of the nonsecreting stomach region.
Microb Ecol health Dis; **11**: 9-96.

33- Idoui. T, 1999. Les bactéries lactiques indigènes : Intérêts technologiques et nutritionnels. *Thèse de magister, université de Mostaganem.* 1- 195.

34- Jiang T, Mustapha A et Savaiano D. A, 1996. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum.*
Journal of Dairy Sciences, **79** : 750-757.

35- Jimenez-Diaz R, Rios-Sanchez R M, Desmazeaud M, Ruiz-Barba J L et Piard J.C, 1993. Pleanataricin S and T, tow new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. *APP. Environ. Microbiol.*, **59 :** 1416 – 1424.

36- Joffin Ch, et Joffin J. P,1999. Microbiologie alimentaire, 5ème édition.
Crdp Aquitaine., 174.

37- Kailasapathy K, 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology,* **3:** 39-48.

38- Klaenhammer, T. R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 39 -86.

39- Larpent J-P., Gourgaud M-L., 1997. Mémento technique de microbiologie. *3eme édition. Lavoisier Tec et Doc.*, 68.

40- Laureut S, Federighi M et Joove J.L, 1998. Manuel de bactériologie alimentaire. *Tec et Doc.*235-259.

41- Lebas F. Directeur de Recherches honoraire de l'INRA. La Biologie du Lapin. *revus cuniculture,* **25** : 1-10.

42- Lecerf Y, Boita R et Verger M, 1983. Guide pratique de l'éleveur des oiseaux de basse-cour et des lapins. *Solar.* 94 – 83 – 84 - 86.

43- Lee D-J, Drongowski R-A, Coran A-G et Harmon C,2000. Evaluation of probiotic treatment in a neonatal animal model. *Pediatric surgery intern.* **16 (4)**: 237-242.

44- Lee Y-K, Lim C-Y, Teng W-L, Ouwahand A-C, Tuomola E-M et Salminen S, 2000. Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. *Applied and Environmental Microbiologie.* 3692-3697.

45- Ligocka A et Paluszak Z, 2005. Capability of lactic acid bactaria to inhibit pathogens in sewage sludge subjected to biotechnological processes. *Bull Vet et Inst Pulawy,* **49** :23-27.

46- Lilly D. M., et Stillwell R. H., 1965. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science.* 147 – 747 - 748.

47- Lindgren, S. W et Dobrogosz W. J, 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. *FEMS microbial.* Rev., **87**: 149 – 164.

48- Maldonado A, Ruiz-barba JL et Jimenz-Diaz R, 2003, Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of Gram positive bacteria. *Archives of Microbiology.* **181**: 8 – 16.

49- Marteau P et Rambaid J-C, 1998. Probiotiques en gastroentérologie. *Hépato-gastro* n°**4**, vol 5.

50- Marteau P, Pochart P, Bouhnik Y et Ramadant J-C, 1994. The fate and effects of transiting, nonpathogenic microorganisms in the human intestine.

51- Marteau Ph, Pochart PH, Bouhnik Y et Rambaud J-C.1994. Ecologie microbienne, survie et effet de Lactobacilles acidophiles et Bifidobactéries de produits laitiers fermentés dans le tube digestif de l'homme *Cah. Nutr. Diet*, XXIX, 6.

52- Mastrandrea F, Coradduzza G, Serio G, Minardi A, Manelli M, Ardito S et Muratore L, 2004. Probiotics reduce the CD_{34}^{+} hemopoietic precursor cell increased traffic in allergic subjects. *Allergy and Immunology (Paris),* **36** : 118-122.

53- Matsumoto M., et Benno Y., 2004. Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM512 yogurt reduces gut mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. *Mutation Research.* **568**: 147-153.

54- Mercenier A, Pavan S et Pot B, 2002. Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design.* **8** : 99-110.

55- Merck, 1996. Manuel vétérinaire Merk, 1^{ére} édition française, Paris, Traduction de l'édition originale américaine du *Merck Veterinary manuel 7ème édition.*, 923

56- Metchnikoff E., 1907. The prolongation of life. In Optimistic *Studies* (Heinemann W., Ed.) . G. P. *Putnam and Sons, London, UK.* 1-100.

57- Ministère de l'agriculture., 1990. Le lapin, guide d'élevage. *Institut technique des petits élevages 2ème édition.*, 08 -10- 11 - 18.

58- Mollereau H, Porcher Ch et Nicolas E, 1973. Vade Mecum du vétérinaire.4ème édition. *Edition VIGOT frères.* 250-251.

59- Monatsschr Kinderheilkd, 2002. Traduction Française: probiotiques et gastroentérite. *Revue allemande.* **150** : 824 - 828.

60- Muriana, P. M et Klaenhamer T. R, 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced bay *Lactobacillus acidophilus* 11088, *Appl Environ. Microbiol.* **57**: 114 – 121.

61- Nicklin J, Graeme-Cook K, Paget T et Killington R, 2000. Essentiel en Microbiologie. *Berti éditions.*, 110.

62- Ogunbanwo A, kot B et Bukowski K, 2000. The antagonistic activity of lactic acid bacteria against selected bacteria. *Med Weter.* **56:** 53-57.

63- Ouvrage collectif rédigé par des chercheurs et ingénieurs du département de l'Elevage des Monogastrique. L'alimentation des animaux monogastriques. *2ème édition.*, 82 – 83 – 84.

64- Ouwehand A. C, 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen, S and Von. Wright A. (Ed.), lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects, 2nd edition (edited by) *Marcel Dekker Inc, New York.* 139 – 159.

65- Oyetayo V. O, Adetuyi F. C et Akinyosoye F. A, 2003. Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent in vivo. *Afr. J. Biotech.* **2**: 448 – 452.

66- Parker R. B, 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*, **29**: 4-8.

67- Piard J-C et Desmazeaud M, 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait.* **72**: 113- 142.

68- Piard J. C et Desmazeaud M, 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 1. Oxygen metabolites and catabolism en products. *Lait*, **71**: 525 – 541

69- Plummer S, Weaver M. A, Harris J. C, Dee P et Hunter J, 2004. *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C.* difficile diarrhoea. *International Microbiology*. 7: 59-62.

70- Rosenfeldt V, Benfeldt E, Valerius N. H, Paerregaard A et Michaelsen K. F, 2004. Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *Journal of Pediatry*. **145**: 612-616.

71- Rosenfeldt V, Michaelsen K. F, Jakobsen M, Larsen C.N, Moller P. L, Pedersen P, Tvede M, Weyrehter H, Valerius N. H et Paerregaard A, 2002. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in young children hospitalized with acute diarrhea. *Pediatry and Infectious Diseases Journal*. **21**: 411-416.

72- Salminen S, Isolauri E et Salminen E, 1996. Clinical uses of probiotics for stablising gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek.*
70: 347-358.

73- Sanni A. L, Onilude A. A, Ogunbanwo S. T et Smith S. I, 1999. Antagonistic activity of bacteriocin produced bay *Lactobacillus* species from Ogi, an indigenous fermented food.*J. Basic, Microbiol.* **39**: 189 -195.

74- Selselet AG, 1997. Technologie des viands et poissons, 1- 85.

75-Sholeva Z, Stefanova S et Chipeva V, 1998. Screening of antimicrobial activities among Bulgarian lactobacilli strains. *J Culture collection.* **2**: 15 – 20.

76-Singleton. P, 1999. Bactériologie. 4ème édition. *Dunod.*335.

77- Soomro A H, Masud T et Kiran A, 2002. Role of lactic acid bacteria in food preservation and human health. *Pakistan Journal of Nutrition* **1 (1):** 20 – 24.

78- Stanton C, Gardiner G, Meehan H, Collins K, Fitzgerald G, Lynch P. B et Ross R . P, 2001. Market potential for robiotics. *American Journal of Clinical Nutrition.* **73:** 476- 483.

79-Tagg J. R et McGiven A. R, 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* **21**: 943 – 945.

80- Tagg J. R, Dajani A. S et Wannamaker L. W, 1976. Bacteriocins of Gram positive bacteria, *Bacteriol. Rev.* **40:** 722 – 756.

81- Talarico T. L et Dobrogosz W. J, 1989. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri. Antimicrob. Agent Chemother.* **33:** 674 -679.

82- Tanaka K et Ishikawa H, 2004. Role of intestinal bacterial flora in oral tolerance induction. *Histology and Histopathology.* **19**: 907-914.

83- Tannock G. W, 1997. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends in Biotechnology.* **15**: 270-274.

84- Tannock G. W, 1999a. The normal microflora: an introduction. In Medical importance of normal microflora. Tannock, G. W., E, *Kluwer Academic Publishers, London, UK.*1 –23.

85- Tannock G. W, 1999b. Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **76**: 265-278.

86- Tournier –Châhteau N, Larpent J-P et Castellanos M-I, 1994. Les probiotiques en alimentation animale et humaine. *Lavoisier Tec&Doc, Paris.*

87- Turchet P, Laurenzano M, Auboiron S et Antoine J. M, 2003. Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot study. *Journal of Nutrition and Health Aging,* **7**: 75-77.

88- Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti G. M et Modeo M. E, 2004. Effect of *Lactobacillucasei* supplementation on the effectiveness and tolerability of a new second-line10-day quadruple therapy after failure of a first attempt to cure Helicobacter pylori *infection. Medical Science Monitor.* **10**: 662-666.

89- Vandenberg P. A, 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbio.* Rev., **12**: 221 -238.

90- Verdu E. F, Bercik P, Bergonzelli G. E, Huang X. X, Blennerhasset P, Rochat F, Fiaux M, Mansourian R, Corthesy-Theulaz I et Collins S. M, 2004. *Lactobacillus paracasei* normalizes muscle hypercontractility in a murine model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology,* **127***:* 826-837.

91- Vincent J.G, Veomett R.C et Riley R.F, 1959. Antibacterial activity associated with *Lactobacillus. Acidophilus. J. Bact.* **78**: 477-484.

92- Wang J. L, Kang L et Jia H. L, 2004. Generation and characterization of monoclonal antibodies against *Botulinum neurotoxin* type A (BoNT/A). *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* **20**: 83-85.

93- Wang M. F, Lin H. C, Wang Y. Y et Hsu C. H, 2004. Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria.
Pediatric Allergy and Immunology. **15**: 152-158.

94- Zareie M, Johnson –Henry K, Jury J, Yang P-C, Ngan B-Y, McKay D-M, Soderholm J-D, Perdue MH et Sherman P-M, 2006. Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress.
Gut, 175-191.

95- Zhennai Y, 2000. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties. *Academic Dissertation. Department of food Technology, University of Helsinki*, 61.

CD ROM :

96- "lapin." *Microsoft® Encarta®* 2006 [CD]. Microsoft Corporation, 2005.

Web bibliographique :

97- www. Passeportsanté.net . par Haddad P. chercheur national du fonds de la recherche en santé du Québec, département de pharmacologie. *Université de Montréal*, 2006.

98- www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/medecine
Réf :**00040621**

Composition des Bouillons et géloses

Bouillon MRS : pH 6,5

- Peptone 10g
- Extrait de viande 10g
- Extrait de levure 5g
- Glucose 20g
- Tween 80 1ml
- Phosphate dipotassique 2g
- Acétate de sodium 5g
- Citrate triammonique 2g
- Sulfate de magnésium 200 mg
- Sulfate de manganèse 50 mg

Bouillon nutritif : (pH 7,2)

- Peptone 10g
- Extrait de viande 5g
- Chlorure de sodium 5g

Gélose Hecktoen : (pH 7,6)

- Protéose-peptone 12g
- Extrait de levure 3g
- Chlorure de sodium 5g
- Thiosulfate de sodium 5g
- Sels biliaires 9g
- Citrate de fer ammoniacal 1,5g
- Salicine 2g
- Lactose 12g
- Saccharose 12g
- Fuschine acide 0,1g (40 mg pour certain milieux)
- Bleu de bromothymol 65 mg

Annexe 01

Gélose MRS :

Il s'agit du bouillon **MRS** gélosé à 1,5.

Gélose VRBG : (gélose biliée au cristal violet et au rouge neutre) pH 7,4.

- Peptone 7g
- Extrait de levure 5g
- Sels biliaires 1,5g
- Glucose 10g
- Chlorure de sodium 5g
- Rouge neutre 30 mg
- Cristal violet 2 mg
- Gélose 12g

Milieu citrate de Simmons : pH 7

- Citrate de sodium 2g
- Chlorure de sodium 2g
- Sulfate de magnésium 0,2g
- Phosphate d'ammonium 0,2g
- Phosphate d'ammonium monosodique 0,8g
- Bleu de bromothymol 0,08g

Milieu Mannitol-Mobilité : pH 8,2

- Peptone 20g
- Nitrate de potassium 2g
- Mannitol 2g
- Rouge de phénol à 1% 4g
- Agar 4g

Milieu MEVAG : pH 7,7

- Extrait de viande 3g
- Chlorure de potassium 5g
- Rouge de phénol 20 mg
- Gélose 3g

Annexe 01

Milieu Moeller : pH 6

- Peptone 5g
- Extrait de viande 5g
- Pourpre de bromocrésol 0,1g
- Rouge de crésol 5 mg
- Pyridoxal 5 mg
- Glucose 0,5g

Milieu TSI : pH 7,4

- Extrait de viande 3g
- Extrait de levure 3g
- Peptone 20g
- Chlorure de sodium 5g
- Citrate ferrique 0,3g
- Thiosulfate de sodium 0,3g
- Lactose 10g
- Glucose 10g
- Rouge de phénol 0,05g
- Agar 12g

Milieu Urée-Indole : pH 7

- L- tryptophane 3g
- Phosphate monopotassique 1g
- Phosphate bipotassique 1g
- Chlorure de sodium 5g
- Urée 20g
- Alcool à 95°C 10 ml
- Rouge de phénol à 1% 25 mg
- Eau distillée stérile 1000 ml

Milieu Clark et Lubs : pH 7,5

- Peptone 5g
- Phosphate bipotassique 5g
- Glucose 5g

Colorants

Cristal violet :

Solution A :

- Cristal violet 2g
- Alcool à 90° C

Solution B :

- Oxalate de NH_4 0,8g
- Eau distillée 20 ml

Mélanger les solutions A et B.

Lugol :

- Iode 1g
- Iodure de potassium 2g
- Eau distillée 300 ml

Violet de gentiane :

- Violet de gentiane 1g
- Ethanol à 90°C 10 ml
- Phénol 2g
- Eau distillée 100 ml

Réactifs

Catalase :

- Eau oxygénée 10 volumes.

Kovacs :

- Alcool amylique ou isoamylique 150 ml
- P-dimthylaminobenzaldéhyde 10g
- Acide chlorhydrique concentré 50 ml.

Le premier objectif de cette étude a été atteint, on a isolé et identifié 21 souches des entérobactéries appartenant aux genres *Enterobacter, Eschirichia* et *Citrobacter*.
L'étude des interactions a montré que *L. plantarum* possède un large pouvoir antagoniste envers la totalité des souches de la collection. De même, l'effet persiste avec les surnageants de cultures.
Les résultats de l'étude « in-vivo » ont prouvé la capacité de *L. plantarum* à survivre aux conditions hostiles de l'estomac du lapin.
Enfin, l'Oxytétracycline a montré le pouvoir important à réduire le nombre des entérobactéries luminales, tandisque *L. plantarum* a diminué significativement le nombre des bactéries adhérantes ainsi que la translocation des germes vers le sang et le foie.

Mots clés : Probiotique, antibiotique, lapin, interaction, translocation, survie.

This stady's main objective has been frelfilled. We did manage to isolate and identify 21 stubs of enterobacterium be longing to the *Enterobacter, Escherichia* and *Citrobacter* types.
The interactions study has revealed that not only *L.plantarum* has got a powerful impact on the whole stub collection, but that the effect persists on the surnaten cultures.
The results of the in-vivo study phowed that L.plantarum is capable of with standing the rabbit's stomach' hostile conditions.
Finally the Oxytetracycline highlighted the great ability to reduce the number of luminal enterobacterium while the L.plantarum has greathy decreased the number of linked bacterias as well as the germs translocation to blood and liver.

Key words: probiotic, antibiotic, rabbit, interaction, translocation, survival.

لقد توصلنا إلى الهدف الأول من هده الدراسة، و المتمثل في عزل و تعريف 21 نوع من البكتيريا المنتمية إلى عائلة entérobactéries من الأجناس *Citrobacter, Escherichia, Enterobacter*.
دراسة التداخلات أظهرت أن *L.plantarum* تملك قدرة كبيرة على تثبيط أغلبية البكتيريا المعزولة، و كدلك بالنسبة للطافي الخلوي .
نتائج الدراسات الحيوية بينت قدرة *L.plantarum* على العيش و البقاء في الظروف الصعبة لمعدة الأرنب.
و أخيرا أظهر Oxytetracycline فعالية عالية في خفض عدد entérobactéries المتواجدة في لمعة الامعاء، بينما قام *L.plantarum* بخفض معتبر لعدد البكتيريا الملتصقة بالبطانة المعوية و كدلك انتقالها نحو الدم و الكبد.

كلمات المفتاح. من أجل الحياة، مضاد حيوي، أرنب، تداخل، انتقال، بقاء.