

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur
et de la recherche scientifique

MB 08/06

Université de Jijel
Faculté des sciences
Département de Biochimie et Microbiologie



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme des études
supérieures en biologie
Option : Microbiologie

THEME

Evaluation de l'activité antagoniste de
Lactobacillus plantarum « BJ0021 » et
étude de l'effet du régime alimentaire sur
la survie dans le tube digestif du lapin

Membres de jury

Présidente : M^{me} Benhamada. W

Examineur : M^r Boudjerda. J

Encadreur : M^r Idoui. T

Présenté par :

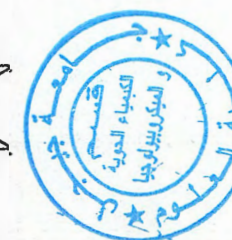
M^{elle} : Zaabat Yamina

M^{elle} : Khechmar Razika

M^{elle} : Kribet Nawel



Promotion : 2006



Remerciement

Nous remercions le bon dieu qui nous a donné le courage, la patience et la force pour continuer.

Nous tenons à exprimer nos remerciements à M^r. IDOUI.T enseignant à l'université de JIJEL, pour son encadrement précieux, sa patience et ses conseils.

Nos remerciement vont également à :

Nos enseignants ; à tous ceux qui ont aide de près ou de loin.

M^{elle} ZENNIR Sonia, responsable de laboratoire de Microbiologie de l'université de JIJEL pour les services qu'elle nous a offre le long de nos études.

Les membres de jury qu'ont bien accepte de juger notre travaille.

A vous tout, un grand merci

Liste des figures

Figure N°	page
Figure 1.: Répartition des lapins selon le régime alimentaire.....	22
Figure 2 : La voie d'administration du probiotique.....	23
Figure 3 : Profils d'identification d'E. coli.....	25
Figure 4 : Répartition des souches isolées.....	27
Figure 5 :Les caractéristiques antagonistes de <i>L. plantarum</i>	29
Figure 6 : Effet d'inhibition du surnageant natif sur <i>E. coli</i> (souches 12).....	31
Figure 7 : Evolution du nombre de <i>L. plantarum</i> « BJ0021 » dans l'estomac du lapin.....	34
Figure 8 : Evolution du nombre de <i>L. plantarum</i> « BJ0021 » dans l'intestin grêle.....	36
Figure 9 : Evolution du nombre de <i>L. plantarum</i> « BJ0021 » dans le Caecum.....	37
Figure 10 : Evolution du nombre de <i>L. Plantarum</i> « BJ0021 » dans la Matière fécale.....	39
Figure 11 : Evolution du nombre des Entérobactéries dans la matière fécale.....	40

Liste des abréviations

ADH : Arginine dihydrolase
BJ : Beurre jijelien
CAT : Catalase
CIT : Citrate
°C : Degré Celsius
°D : Degré Dornic
Glu : Glucose
g : gramme
g/l : gramme par litre
h : heure
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
IND : Indole
INO : Inositol
LAC : Lactose
Lb : Lactobacillus
LDC : Lysine décarboxylase
MAN : Mannitol
MF : Matière fécale
Mn : Minute
NS : Non Significatif
ODC : Ornithine décarboxylase
pH : Potentiel hydrogène
T : Température
URE : Urease
V : Volume

Liste des tableaux

Tableau N°	Page
Tableau 1 : Les différents genres de bactéries lactiques.....	3
Tableau 2 : Quelques propriétés biochimiques de <i>L. plantarum</i>	4
Tableau 3 : Quelques bactériocines produits par les bactéries lactique.....	6
Tableau 4 : Les souches les plus employées comme probiotique.....	8
Tableau 5 : La composition de l'aliment : granulé et broyé.....	14
Tableau 6 : Résultat des tests d'identification des souches.....	26
Tableau 7 : Résultat des interactions entre les entérobactéries et les bactéries lactiques..	28
Tableau 8 : Effet du filtrat de lyse sur les entérobactéries.....	30
Tableau 9 : Effet du filtrat de lyse pH7 sur les entérobactéries.....	32
Tableau 10 : Evolution du nombre de <i>L. plantarum</i> « BJ0021 » dans l'estomac du lapin.	34
Tableau 11 : Evolution du nombre de <i>L. plantarum</i> « BJ0021 » dans l'intestin grêle.....	35
Tableau 12 : Evolution du nombre de <i>L. plantarum</i> « BJ0021 » dans le Caecum.....	37
Tableau 13 : Evolution du nombre <i>L. plantarum</i> « BJ0021 » dans la matière fécale.....	38
Tableau 14 : Evolution du nombre des entérobactéries dans la matière fécale.....	40

Sommaire

Introduction.....	01
Partie I : Bibliographie	
Chapitre. I : Les bactéries lactiques	
I-1- Définition.....	02
I-2- Caractères généraux.....	02
I-3- Habitat.....	03
I-4- Classification des bactéries lactiques.....	03
I-4.1. Le genre <i>Lactobacillus plantarum</i>	04
I-5- Les caractères métaboliques des bactéries lactiques.....	05
I-5.1. Utilisation des sucres.....	05
I-5.2. Utilisation du Citrate.....	05
I-5.3. Dégradation des protéines.....	05
I-5.4. Dégradation des lipides et des esters.....	05
I-5.5. Le métabolisme de l'oxygène.....	05
I-6. L'effet antagoniste de bactéries lactiques.....	06
I-6.1. L'effet de l'acidification.....	06
I-6.2. l'effet du au pyroxyde d'hydrogene.....	06
I-6.3. L'effet de bactériocine.....	06
Chapitre II : Les probiotiques	
II.1. Définition.....	07
II.2. Les groupes des probiotiques.....	07
II.3. Les caractéristiques des probiotiques.....	08
II.4. Les bactéries lactiques à propriétés probiotiques.....	08
II.5. La capacité des probiotiques d'adhésion aux cellules intestinales.....	09
II.6. La survie des probiotiques dans le tube digestif.....	09
II.7. Rôle de probiotique.....	09
Chapitre III la physiologie digestive du lapin.	
III.1. la physiologie digestive du lapin	11

III.1.1.la bouche.....	11
III.1.2.l'oesophage.....	11
III.1.3.l'estomac.....	11
III.1.4.l'intestin grêle.....	11
III.1.5.le caecum.....	11
III.1.6.le colon.....	12
III.2.la flore caecale chez le lapin.....	12
III.3.les Entérobactéries.....	12
III.3.1.Définition et caractéristiques.....	12
III.3.2.Habitat et pouvoir pathogène.....	12
III.3.3.Caractères culturels.....	13
III.3.4. Caractères antigéniques.....	13

Partie II : MATERIEL ET METHODES

II.1.Matériel.....	14
II.1.1. La souche bactérienne.....	14
II.1.2.Lapin.....	14
II.1.3.L'aliment.....	14
II.1.4.Le lait.....	15
II.1.5.Les milieux de culture et réactif.....	15
II.1.6.Produits chimiques.....	15
II.1.7. Autre matériel.....	15
II.2.Méthodes.....	
II.2.1.Isolement et identification des entérobactéries à partir de caecum du Lapin.....	16
II.2.1.1.Abattage du lapin et prélèvement des échantillons.....	16
II.2.1.2. L'enrichissement et ensemencement.....	16
II.2.1.3.Purification et identification.....	16
II.2.2. Etude des interactions bactériennes.....	20
II.2.3.Etude de l'effet des surnageants sur les entérobactéries.....	21
II.2.4. Etude de l'effet du régime alimentaire sur la survie de <i>L. plantarum</i>	22

dans le tube digestif du lapin.....	
II.2.4.1. Préparation du lapin.....	22
II.2.4.2. Préparation des laits fermentés.....	22
II.2.4.3. Administration du probiotique.....	23
II.2.4.4. Evaluation de la survie du probiotique dans le tube digestif de lapin.....	24
II.2.5. Traitement statistique.....	24

PARTIE III : Résultats et discussion

III.1. Isolement et identification des entérobactéries à partir du Caecum du lapin.....	25
III.1.1. purification et identification	25
III.1.2. Test d'identification biochimique.....	25
III.2. Interaction bactériennes.....	27
III.3. Effet des surnageants de <i>L. plantarum</i> sur les intérobactéries.....	30
III.4. Influence du régime alimentaire sur la survie de <i>L. plantarum</i> dans le tube	33
digestif du lapin.....	
III.4.1. Survie dans l'estomac.....	33
III.4.2. Survie dans l'intestin grêle.....	34
III.4.3. Survie dans le caecum.....	36
III.4.4. Dénombrement de <i>L. plantarum</i> dans la matière fécale.....	38
III.5. Dénombrement des Entérobactéries dans la matière fécale.....	39
Conclusion générale.....	41

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Des études scientifiques suggèrent que les probiotiques peuvent jouer un rôle de premier plan sur la santé.

Chaque espèce de probiotiques offre des bénéfices santé particulières à leur souche, on peut retrouver parmi ces bénéfices santé :

Une amélioration du fonctionnement de système digestif et une augmentation des défenses naturelles du système immunitaire.

Certains probiotiques agissent en absorbant des protéines et d'autres produisent des vitamines.

Certains peuvent également produire des acides organiques qui luttent contre la propagation des mauvaises bactéries et jouent un rôle dans l'écosystème, mais afin de pouvoir survivre et de pouvoir réagir, les probiotiques doivent résister à plusieurs facteurs hostiles retrouvés dans le système digestif animale tels que l'acide gastrique, les sels biliaires et les sécrétions pancréatiques [50].

Il est important de s'assurer que les probiotiques consommés réussissent à passer toutes ces barrières et qu'ils arrivent en quantité suffisante pour exercer leurs rôles.

C'est dans cette optique que nous nous sommes proposés d'évaluer l'activité antagoniste de *Lactobacillus plantarum* « BJ0021 » par l'étude des interactions avec une collection de souches entérobactéries du tube digestif du lapin et étude de l'effet du régime alimentaire sur la survie de cette espèce chez le même animal.

Notre étude est divisée en deux parties :

- Une étude bibliographique qui a permis d'améliorer nos connaissances sur les bactéries lactiques, les probiotiques, les entérobactéries et le tube digestif du lapin.
- Une étude expérimentale dans laquelle nous établissons des profils d'identification de 14 souches d'entérobactéries, par la suite on passe à l'étude des interactions « in vitro » entre la souche lactique et les entérobactéries et enfin on va évaluer l'effet du régime alimentaire sur la survie de *Lactobacillus plantarum* « BJ0021 » dans les différents étages de tube digestif de lapin.

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitres

- Les bactéries lactiques.
- Les probiotiques
- La physiologie digestive du lapin

Chapitre I

Les bactéries lactiques

I.1. Définition.

Les bactéries lactiques ont été décrites pour la première fois par ORLA-JENSEN (1919) et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique [35, 40, 56], accompagné dans certains cas d'autres métabolites (éthanol, CO₂, autres acides organiques) [9]. Cette fermentation provoque un abaissement du pH et établissement des conditions favorables à diverses transformations [41].

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique [56].

I.2. Caractères généraux.

Il existe deux types morphologiques de ce groupe bactérien, les cocci et les bâcilles classés dans la famille des *Lactobacteriaceae*, et répondent aux caractéristiques suivantes [1, 9, 20, 38] :

- Ce sont des bactéries à Gram positif généralement immobiles, jamais sporulées.
- Ne possédant pas de catalase (certaines souches possèdent une pseudo-catalase).
- Donnant une réaction de l'oxydase négative. Nitrate réductase négative.
- Elles sont dépourvues de cytochromes, étant incapables d'effectuer la synthèse du noyau HEME de porphyrines, de ce fait elles sont incapables de respirer mais peuvent seulement effectuer un métabolisme fermentaire.
- Leur capacité de biosynthèse sont très faibles, elles possèdent de ce fait une exigence élevée en facteurs de croissance : acides aminés, bases nucléiques, acide gras et les vitamines du groupe B.
- En général aérotolérantes, mais certaines espèces vivantes dans le tube digestif des animaux sont anaérobies strictes.
- Elles ont la possibilité de se multiplier à température relativement basse (10 °C ou 15 °C) ou relativement haute (45 °C).

Selon le type de fermentation, les bactéries lactiques sont dites [9,39] :

- ❖ **Homofermentaires** : produisent de l'acide lactique, comme produit terminal.
- ❖ **Hétérofermentaires** : produisent en plus de l'acide lactique, l'éthanol, l'acétate et le CO₂.

La différence entre ces deux voies, est détectable par le dégagement de CO₂. Certaines bactéries homofermentaires sont aussi capables de fermentations hétérolactiques dans des conditions de croissance non optimales ou selon la nature de sucre utilisé.

I.3. Habitat.

Les bactéries lactiques sont généralement associées à des habitats riches en nutriments; c'est le cas pour une multitude de produits alimentaires (lait, viande, produits végétaux), on trouve aussi des bactéries lactiques dans la flore normale de l'intestin et du vagin des mammifères [52].

I.4. Classification des bactéries lactiques.

La nouvelle classification des bactéries lactiques tient compte des apports modernes de la taxonomie moléculaire [24] :

- Le phylum des *Clostridium* : le pourcentage de G+C inférieur à 50% :

- En forme de coque : *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Enterococcus*.

- En forme de bâtonnet : *Lactobacillus*, *Carnobacterium*.

- Le phylum des *Actinomycètes* : le pourcentage de G+C supérieur à 50% : *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* et *Propionibacterium* [15].

Seuls les *Lactobacillus*, les *Enterococcus*, les *Bifidobacterium*, les *Streptococcus* et éventuellement *Lactococcus* sont utilisés comme probiotique en alimentation animale et humaine [39].

Tableau 1 : Les différents genres de bactéries lactiques [39].

	Cellules		Fermentation	GC%
	Forme	Arrangement		
<i>Streptococcus</i>	Coque	chaînes	Homolactique	34-46
<i>Leuconostoc</i>	Coque	chaînes	Hétérolactique	36-43
<i>Pediococcus</i>	Coque	tétrades	Homolactique	34-42
<i>Lactobacillus</i>	Bacille	chaînes	Homolactique et Hétérolactique	32-53
<i>Bifidobacterium</i>	Variée	variée	Acétique et lactique	55-67

GC% : pourcentage molaire de L'ADN en bases G et C

I. 4. 1. Le genre *Lactobacillus* :

Il regroupe de nombreuses espèces dont l'hétérogénéité est illustrée par la variation du pourcentage G + C : 32 à 53 %. La croissance des lactobacilles est bonne dans un milieu à pH 4,5-6,4 mais s'arrête à pH 3.6-4.

La classification remaniée par KANDLER et WEISS, les subdivise en 3 groupes selon leur type fermentaire [9, 39] :

- **Groupe I** : Anciennement appelé *Thermobacterium*, ces bactéries ont un métabolisme strictement homo fermentaire. Elles se développent à 45 °C mais pas à 15°C.
- **Groupe II** : Anciennement appelé *Streptobacterium*, ce groupe comprend des espèces à métabolisme hétérofermentaire facultatif.
- **Groupe III** : Anciennement appelé *Betabacterium*. Ces espèces ont un métabolisme strictement hétérofermentaire.

I.4. 1.1. Etude de l'espèce *Lactobacillus plantarum* :

Elle se présente sous la forme de cellules en forme de bâtonnets isolées ou réunies en chaînes courtes. Elle transforme les sucres et le mannitol formé au cours de la phase précédente et conduit à une acidité de 1.5 à 1.9% [10].

La souche de *Lactobacillus plantarum* peut synthétiser une catalase si le milieu contient un dérivé hématique (milieu au sang) [10].

Chez *Lactobacillus plantarum*, une pyruvate oxydase provoque la libération de peroxyde d'hydrogène à partir du glucose en aérobiose, ce peroxyde peut aussi s'accumuler lors de la croissance sur des milieux sans sucre contenant du glycérol sous l'action d'une glycérophosphate oxydase. *Lactobacillus plantarum* peut libérer de l' H_2O_2 à partir du lactate dans un milieu où le glucose est épuisé [10]. Le tableau ci-dessous illustre quelques propriétés biochimiques de cette espèce.

Tableau 2 : Quelques propriétés biochimiques de *L. plantarum* [10].

Caractéristique	Croissance à 45°C	Peptidoglucane	Ac. lactique	Nitrate réductase	Fermentation de :	Ribose	Arabinose	Mannitol	Raffinose	Melibiose	Saccharose	Maltose	Sorbitol	Lactose
<i>Lb. plantarum</i>	-	-	DL	±		+	±	+	+	+	+	+	+	+

+ : Test positif. - : Test négatif. ± : variables.

I. 5. Les caractères métaboliques des bactéries lactiques.

I. 5.1. Utilisation des sucres :

Le métabolisme des sucres conduit principalement à la formation de l'acide lactique et de l'éthanol. Ces deux composés ont un seuil de perception très élevé néanmoins du fait de leur fortes concentration, ils ont un impact sur la qualité sensorielle des produits [39].

I. 5. 2. Utilisation du citrate :

Le citrate seul ne peut être utilisé comme substrat de croissance par formation d'acétate (en majeure partie excrétée) de CO₂ et de diacétyle, qui est le composé aromatisant. D'autres produits sont excrétés, l'acétoïne et éventuellement le 2-3 butylène glycol et 2-3 butylène-dione [39].

I .5.3. Utilisation des protéines :

Pour satisfaire leur besoin en acide aminé, les bactéries lactiques doivent dégrader les protéines. Leur système protéolytique est complexe, mais il a été bien étudié [2].

Si les protéines ont un rôle dans la texture des aliments fermentés, il ne semble pas qu'elles interviennent directement dans les autres dimensions de la flaveur. Au contraire, leurs produits de dégradation directs ; les peptides ont des propriétés sapides. Ils sont de plus des précurseurs d'acides aminés et de composés d'arome importants [46].

I.5.4.Dégradation des lipides et des esters :

L'activité lipolytique de ces bactéries est très faible, il se pose, donc des problèmes méthodologiques, pour leur caractérisation. Dans de nombreux cas, on a mis en évidence des activités esterasiques sans montrer de façon certaine que ces enzymes pouvaient dégrader les lipides naturels [2].

I.5.5.Le métabolisme de l'oxygène :

L'absence d'une catalase hémique est une caractéristique importante des bactéries lactiques. Cependant on peut observer chez tous les germes une pseudo-catalase. En générale, les bactéries lactiques sont capables de transformer l'O₂ moléculaire en super oxyde, en peroxyde (H₂O₂) ou en eau. Ces réactions sont catalysées par des enzymes spécifiques en présence d'un substrat à oxyder [2].

I.6. L'effet antagoniste des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont connues et utilisées pour les influences antagonistes qu'elles développent [11]. Elles sont dues aux métabolites excrétés : acide lactique, autres acides organiques, diacétyl, peroxyde d'hydrogène et surtout antibiotiques et bactériocines [16, 51].

I.6.1. L'effet de l'acidification :

La tolérance des microorganismes vis-à-vis du pH est très variable ; la majorité des espèces bactériennes ne peut se développer aux pH inférieurs à 4. Les bactéries lactiques exercent leur pouvoir inhibiteur par la production de l'acide lactique qui provoquera une chute du pH du milieu [9].

I.6.2. L'effet du au peroxyde d'hydrogène :

Il a été montré que de nombreuses souches de bactérie lactiques peuvent libérer du peroxyde d'hydrogène à des concentrations suffisantes pour provoquer l'inhibition d'autres contaminants de leur environnement [9].

I.6.3. Les bactériocines :

Les bactériocines peuvent être simplement définies comme des protéines ou complexes protéiques biologiquement actifs, inhibiteurs des bactéries Gram positif exclusivement plus particulièrement de bactéries taxonomiquement proches de la souche productrice étant immunisée contre sa propre bactériocine [9]. Les bactériocines sont des bactéricides mais la nisine et la sporostatique ont un effet bactériostatique. Les bactéries lactiques productrices de ces substances ont l'habileté d'inhiber des Gram positif aussi bien que des Gram négatif [10]. Le tableau 3 illustre la gamme de bactériocines produits par les bactéries lactiques.

Tableau 3 : Quelques bactériocines produites par les bactéries lactiques [44].

Bactériocines	Organisme du producteur
Lactacine B	<i>L. acidophilus</i>
Gasserine A	<i>L. gasseri</i>
Lactocine 27	<i>L. helveticus</i>
Acidophilucine	<i>L. acidophilus</i>
Lacticine	<i>L. lactis</i>
Brévicine 37	<i>L. brevis</i>
Lacticine f	<i>L. acidophilus</i>
Plantacine B	<i>L. plantarum</i>
Lactocine S	<i>L. sake</i>
Bactériocine pA-1	<i>p. acidilactici</i>
Pédiocine A	<i>p. pentosaceus</i>
Nisine	<i>L. lactis subsp. lactis</i>

II.1. Définition des probiotiques.

Le terme probiotique proposé dans les années 1960 par PARKER dérivé de deux mots grecs « pro » et « bio » et signifie littéralement « pour la vie » par opposition au terme antibiotique signifiant contre la vie [41, 44].

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité adéquate, ont des effets bénéfiques sur l'organisme hôte en améliorant les propriétés de sa flore intestinale [41, 44].

Il s'agit le plus souvent de bactéries ou de levures présentes soit dans des aliments, notamment les produits laitiers fermentés, soit dans des compléments alimentaires sous forme lyophilisée. Les micro-organismes tués par la chaleur ne répondent pas à la définition des probiotiques même si certains effets thérapeutiques leur ont été attribués [50].

II.2. Les groupes des probiotiques.

Il existe 4 groupes des probiotiques [50] :

❖ Les ferments lactiques :

Ils sont capables de produire de l'acide lactique par la fermentation de certains sucres comme le lactose, ils sont regroupés en deux catégories en fonction de leur morphologie : les lactobacilles (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus casei*) et les coques (*Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*).

❖ Les bifidobactéries :

D'origine humaine ou animale, elles appartiennent à la flore intestinale normale et possèdent une bonne résistance aux sucs gastriques, la population de *Bifidobacterium* diminue avec l'âge et leurs espèces varient selon l'âge.

❖ Les levures :

Renferme les différentes levures de types *saccharomyces*, elles sont principalement utilisées par l'industrie agroalimentaire et comme probiotiques.

❖ Les autres bactéries sporulées, dont *Bacillus*, *Subtilis* et *Cereus*.

Les micro-organismes les plus utilisés comme probiotique sont *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecium* et *Saccharomyces boulardii*.

Chapitre II

Les probiotiques

II.3. Caractéristiques des probiotiques.

Pour pouvoir être utilisés comme germes probiotiques dans les denrées alimentaires ou bien en alimentation animale, les micro-organismes doivent répondre aux critères suivants [18, 20, 22, 49] :

- Absence de nocivité (aucune réaction immunitaire de l'hôte contre le germe probiotique ; aucune réaction pathogène, toxique, allergénique mutagène ou cancérigène).
- Exercer un "effet bénéfique" sur l'hôte.
- Contenir un nombre élevé de cellules viables et posséder une survie dans le tractus gastro-intestinale.
- Avoir éventuellement la capacité d'adhérer aux cellules intestinales pour coloniser le tractus intestinal sans perturber la flore intestinale et posséder une capacité de croissance.
- Rester viables pendant le stockage et l'utilisation.
- Produire des enzymes utiles ou d'autres substances utilisables par l'hôte.
- Exercer un effet métabolique pendant le transit intestinal.
- Résister à l'HCl de l'estomac et aux sels biliaires de l'intestin grêle.
- Ils doivent améliorer les performances zootechniques des animaux (augmentation de poids moyen quotidien ou GMQ, diminuer l'indice de consommation IC et ils doivent augmenter la digestibilité de la ration alimentaire).

II.4. Les bactéries lactiques à propriétés probiotiques.

Le tableau suivant présente le nombre de bactéries couramment utilisées comme probiotiques.

Tableau 4 : Les souches les plus employées comme probiotiques [13].

Genres	Espèces
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i> <i>crispatus</i> <i>johansonii</i> <i>paracasei</i> <i>plantarum</i> <i>rhamnosus</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>adolescentis</i> <i>bifidum</i> <i>breve</i> <i>infantis</i> <i>lactis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>

II. 5. La capacité des probiotiques d'adhésion aux cellules intestinales.

La possibilité d'une colonisation durable du tube digestif pour un probiotique était jusqu'à peu considérée comme impossible en raison d'un grand déséquilibre de force en faveur de l'écosystème endogène. La flore est quantitativement plus abondante et occupe les sites d'adhérences au niveau de tube digestif. Deux études récentes ont montré que des souches adhérentes de *L.plantarum* pouvaient coloniser de manière prolongée une partie du tube digestif [50].

II .6. La survie des probiotiques dans le tube digestif.

Dans la mesure où la nature exacte des principes actifs est souvent inconnue; c'est la capacité des micro-organismes à survivre aux différents étages du tube digestif qui est étudiée [50].

Les concentrations des probiotiques véhiculés vivants aux différents étages du tube digestif sont influencées par le pourcentage de survie qui varie beaucoup entre les genres et les souches, certains probiotiques sont détruits dès leur passage dans l'estomac; alors que d'autres ; tels des *Bifidobacterium*; *L.acidophilus* traversent l'intestin grêle et parfois même le colon à haute concentration : ainsi; les bifidobactéries et les lactobacilles acidophiles délivrés vivants dans l'estomac représentent respectivement 67% et 64% quantités ingérées [50].

La fraction des probiotiques survivant jusqu'à la fin de l'intestin grêle est significativement influencée par la présence et la quantité de bile. Celle-ci représente dans des conditions expérimentales simulant la physiologie 24% et 10% des quantités ingérées [50].

II .7. Rôle de probiotiques.

Les probiotiques utilisés chez le lapin sont des souches vivantes de bactéries *Lactobacillus*, *Streptococcus* qui par leur action sur la flore intestinale permettent de limiter les diarrhées chez les lapereaux et obtenir une meilleure croissance. La limitation des diarrhées chez le jeune est liée aux activités métaboliques des probiotiques (sécrétion d'enzymes; production d'acides aminés. de vitamines) [42].

L'usage des probiotiques vise à réduire les difficultés d'un dérèglement de la flore intestinale chez le jeune animale ; qui est à l'origine des entérites. Il semble; en effet exister une inadéquation à cet age; entre l'aliment proposé et la flore intestinale; on dit alors que le sevrage représente un stress alimentaire pour le jeune [42].

En cuniculture, une réduction de taux de mortalité; en utilisant une association de culture de levures et bactérie lactique a été observée. Leur présence permet une diminution du pH du tractus digestif et ils secrètent aussi différentes substances qui limitent ainsi la prolifération anarchique de colibacilles qui apprécié un milieu plus basique [28, 34].

Les probiotiques permettent d'améliorer la digestibilité de nombreux nutriments : leur rôle essentiel est de garantir une bonne hygiène digestive en favorisant la dégradation et l'absorption des aliments [22]. Les probiotiques peuvent jouer un rôle à la fois préventif et curatif [33, 54].



Chapitre III

La physiologie digestive du lapin

III.1. La physiologie de tube digestif du lapin.

Le tube digestif du lapin est très long. Il mesure en moyenne 4,5 à 5 mètre de long pour un adulte pèsent environ 5 Kg. Il se compose d'une bouche, d'un œsophage, d'un estomac, d'un intestin grêle, d'un caecum, d'un colon terminé par un rectum et un anus [21, 58].

III.1.1 La bouche :

Le lapin est un rongeur capable d'assimiler divers aliments riches en cellulose [6]. Il possède des dents à croissance continue et sont usées par frottement.

Les aliments sont saisis directement par les incisives sans l'intervention des lèvres [5], puis les glandes salivaires libèrent la salive qui lubrifie les aliments et débute la digestion [8].

III.1.2 L'œsophage :

L'œsophage est placé entre la trachée et la colonne vertébrale [37]. Il fait suite au pharynx. C'est un tube qui assure le transport des aliments et de l'eau jusqu'à l'estomac [8].

III.1.3 L'estomac :

C'est une poche assez allongée; son revêtement interne est en totalité muqueux [45].

Chez le très jeune lapereau, la paroi stomacale sécrète une pepsine, ainsi qu'une autre peptidase la rénine. Pendant la période d'allaitement; cette endopeptidase est responsable de la coagulation du lait dans l'estomac [37].

L'estomac joue un rôle mécanique secondaire d'un rôle chimique dans la digestion. [5, 8].

III.1.4 L'intestin grêle :

C'est la première partie des intestins qui est la plus longue [7]. Il est divisé en duodénum, jéjunum et iléon; la partie terminale. Le canal cholédoque qui apporte la bile en provenance du foie débouche au début du duodénum [37].

L'intestin grêle constitue le lieu où se déroule le démontage des aliments en leur éléments nutritifs de base [7].

III.1.5 Le caecum :

Le caecum forme un second réservoir, il contient 100 à 120g d'une pâte homogène, ayant une teneur en matière sèche (M S) moyenne de 22% et un pH proche de 6 [21].

Ce réservoir renferme de nombreux organismes microbiens qui transforment le reste des aliments en substances riches assimilables par le lapin [37].

III.1.6. Le colon :

Le colon est d'abord caractérisé par la présence de petits renflements en forme de poche. La paroi devient lisse dans sa partie terminale. Sa dernière partie est appelée rectum et se termine par l'anus [37]. Il produit des crottes molles le matin et des crottes dures le reste de la journée [21].

III. 2. La flore caecale chez le lapin.

La flore intestinale du lapin apparaît comme une exception dans l'échelle animale. Dès la naissance, la flore se stabilise très irrégulièrement, durant les trois premières semaines on trouve une flore réduite comme elle peut être absente [42, 34]. Cette situation est due au rôle bactériolytique des acides gras en C₈ et C₁₀, qui sont présents dans le lait et libérés par la lipase gastrique des lapereaux [36].

La flore intestinale normale du lapin est constituée à 90% de bactéries anaérobies strictes ou facultatives, homo ou hétérofermentaires telle que le bactéroïdes. La flore secondaire représentant les 10% restant est composée d'*E. coli*, des entérocoques et des clostridies [36].

Puisque les entérobactéries constituent la flore dominante de tube digestif du lapin, on a proposé d'étudier quelques caractéristiques de la famille d'*Entérobactériaceae*.

III.3. Les *Enterobacteriaceae*.

III.3.1 Définition et caractéristiques :

La famille des *Enterobactériaceae* est constituée de genres bactériens qui se rassemblent en raison de leurs caractères bactériologiques communs [2, 23] :

- Ce sont des bacilles à Gram négatif dont la dimension varie de 7 à 6 µm de long et 0.3 à 1 µm de large.
- Mobile par une ciliature péritriche ou immobiles.
- Asporulés.
- Ce sont aérobie anaérobie facultatif.
- Ne possédant pas d'oxydases (à la déference des *Vibrio* et *Pasteurella*)
- Réduisant les nitrates en nitrites (sauf quelques *Erwinia*).
- Catalase positive (sauf *Shigella dysenteriae* serovar 1).
- Se multiplient facilement sur milieu ordinaire à pH neutre, à température de 37 °C.
- Fermentent le glucose avec ou sans production du gaz.

III.3.2 Habitat et pouvoir pathogène :

De nombreuses espèces d'*Enterobacteriaceae* sont trouvées dans l'environnement, d'autres chez les végétaux ou les animaux. Il en est qui ont un

pouvoir phyto- pathogène. Parmi les espèces qui peuvent être isolées chez l'homme, certaines *Shigella* sont constamment pathogènes. D'autres espèces se comportent comme des bactéries pathogènes opportunistes responsables d'infection chez des malades de fragilisés [2].

III.3.3 Caractères culturaux :

Parmi les caractères, on cite [2] :

- Les Enterobacteriaceae se développent dans un bouillon ou une gélose ordinaire incubés 18 heures à 37 °C.
- Les formes S (Smooth) sont l'aspect habituel au sortir de l'organisme.
- Les colonies sont lisses, bombées, brillante et humides, elles ont 2 à 4 mm de diamètre.
- Le bouillon est trouble de façon homogène.
- Les formes R (Reugh) s'observent surtout avec des souches ayant subits plusieurs repiquages.
- Les colonies sont rugueuses, sèches, à contours irréguliers et de teinte malte. en bouillon, les formes R donnent un aspect grumeleux.
- Les colonies muqueuses sont habituelles avec les *Klebsella*, les diamètres peuvent dépasser 10 mm ; elles ont une tendance à la confluence. On peut les rencontrer aussi avec d'autres espèces, notamment *Salmonella Paratyphi B*
- Les colonies naines s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques.

III.3.4 Caractères antigéniques :

Les entérobactéries possèdent différents antigènes [2] :

- **Les antigènes O :** C'est des antigènes de paroi constitués de lipopolysaccharides (LPS) qui sont thermostables et résistent à l'alcool ou à l'acide.
- **Les antigènes H :** C'est des antigènes flagellaires qui ne sont donc présents que chez les souches mobiles. Constitués d'une protéine, la flagelline, ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool.
- **Les antigènes K :** Ces antigènes capsulaires sont généralement constitués d'une couche externe polysaccharidique. Parmi les antigènes K, se trouvent les antigènes L, A, B des *E. coli* et l'antigène Vi de certaines *Salmonella* ou *Citrobacter*.

Les antigènes d'adhérence ou adhésines de nature protéique, en relation avec la présence de pili sont classés parmi les antigènes K.

Partie II

Matériel et méthodes

Notre étude a été réalisée au laboratoire de microbiologie de l'université de Jijel. Cette étude comporte les points suivants :

- Isolement, purification et identification des souches des entérobactéries à partir du caecum du lapin.
- Etude « in vitro » des interactions entre la bactérie *L. plantarum* à propriétés probiotiques et les entérobactéries.
- Evaluation de l'effet du régime alimentaire sur la survie de la bactérie lactique dans les différents étages de tube digestif du lapin.

II. Matériel et méthodes.

II.1. Matériel.

II.1.1. La souche bactérienne :

La souche bactérienne utilisée comme probiotique est la bactérie lactique *Lactobacillus plantarum* «BJ0021» isolée du Beurre traditionnel de la région de Jijel et identifiée au laboratoire de biologie moléculaire et génétiques de l'université d'Oran [25].

II.1.2. Lapin :

L'étude in vivo a été réalisée sur 15 lapins de population locale de deux sexes, 9 mâles et 6 femelles, pesant entre 520 g et 1050 g au début de l'expérimentation.

II.1.3. L'aliment :

L'expérimentation a été réalisée avec trois régimes alimentaires : L'herbe, l'aliment broyé et celui granulé, les dimensions de ce dernier sont 4mm sur 10mm. La composition des deux derniers régimes est consignée au tableau 5.

Tableau 5 : La composition de l'aliment granulé et celui broyé.

Les composants de l'aliment	
Granulé	Broyé
- Tourteau de soja	- Mais
- Mais	- Tourteau de soja
- Grignon d'olive	- Phosphate bicalcique
- Son de blé dur	- C. M. V
- C.N.V	- Calcaire
- Mélasse	- Son gros
- Sel	

II.1.4. Le lait :

Pour la préparation de probiotique, on a utilisé un lait écrémé de provenance laiterie IGILAIT.

II.1.5. Les milieux de culture et réactif :

Pour pouvoir être cultivées, isolées puis identifiées ; les bactéries nécessitent des milieux de culture adéquats. Au cours de notre expérimentation on a utilisé les milieux suivants :

- Bouillon nutritif, pour l'enrichissement des entérobactéries.
- Gélose Hektoen, pour la culture des entérobactéries.
- Gélose VRBG (Gélose biliée au cristal violet et au rouge neutre) pour l'isolement et le dénombrement des entérobactéries.
- Gélose M17 et gélose MRS pour la culture des streptocoques et lactobacilles lactiques et pour leur dénombrement.
- Bouillon MRS, pour la culture de *Lactobacillus plantarum*.
- L'eau distillée, pour la préparation des dilutions.
- Milieu Moeller ODC, LDC et ADH.
- Les milieux : TSI, citrate de Simmons, Mannitol mobilité, urée indole, MEVAG sans sucres, Clark et Lubs et l'eau peptonée exempte d'indole.
- Les réactifs VP_I (Solution alcoolique de α -naphtol) et VP_{II} (solution aqueuse de soude 16%)
- Le réactif de KOVACS.
- Le rouge de méthyle.
- L'eau oxygénée.
- Disque ONPG

II.1.6. Produits chimiques :

Pour chaque test, on a utilisé les produits correspondants :

- Colorations de Gram :
 - Violet de Gentiane.
 - Lugol
 - Alcool acétone
 - Fuschine
- Détermination de l'acidité :
 - Phénol phtaléine 1%
 - La soude doronic 9N.
- Ajustement de pH :
 - NaOH 3M

II.1.7. Autre matériel :

Parmi le matériel utilisé au cours de cette étude, nous citons le suivant : Bain marie, centrifugeuse, pH mètre, burette, agitateur, balance, autoclave, étiuvé 37 °C.

II.2. Méthodes.

II.2.1. Isolement et identification des entérobactéries à partir de caecum de lapin.

II.2.1.1. Abattage du lapin et prélèvement des échantillons :

Un lapin est abattu par saignée directe, puis on a récupéré l'échantillon global représenté par le caecum du lapin. Les échantillons élémentaires ont été prélevés à partir de trois endroits différents de caecum.

II.2.1.2. Enrichissement et ensemencement :

Les trois prélèvements sont incubés sur bouillon nutritif durant 24 h à une température de 37 °C. Une série de dilution a été entreprise à partir des cultures d'enrichissement (10^{-7}). L'isolement a été pratiqué sur HEKTOEN par étalement de quelques gouttes des dilutions les plus faibles (10^{-5} à 10^{-7}). Les boîtes de Pétri sont incubées à 37 °C / 24 h [12].

II.2.1.3. Purification et indentification.

II.2.1.3.1. Purification :

A partir des boîtes déjà incubées, on cible des colonies bien distinctes et on repique sur le bouillon nutritif. Après une incubation à 37 °C, 14 boîtes de gélose HEKTOEN sont ensemencées par strie à partir des 14 cultures de bouillon nutritif. Si les colonies apparaissent homogènes (couleur, forme et taille) après les 24 h d'incubations on arrête la purification [23].

II.2.1.3.2. Tests d'indentification.

Chaque culture pure a été soumise aux tests d'identification [23] :

A. Coloration de GRAM :

Elle permet d'identifier les Gram+ et les Gram- en examinant le frottis au microscope. Les bactéries qui retiennent le violet de gentiane après le Lugol, l'alcool et la Fuschine sont dites Gram+.

Les souches ont été soumises à la coloration de Gram dont la technique est la suivante :

- On étale une Ose de culture sur une lame;
- On fixe par la chaleur par passage répété sur la flamme;
- On inonde le frottis par la solution de violet de gentiane et on laisse agir 1 minute ;
- On ajoute le mordant (Lugol) et on laisse agir pendant une minute ;

- Décoloration de l'étalement bactérien par l'alcool acétone jusqu'à ce que ce dernier soit incolore ;
- Lavage à l'eau courant ;
- La recoloration de la préparation par la Fuschine diluée pendant 1 minute ;
- Rinçage abondamment, séchage et observation à immersion à l'objectif 100.

B. Tests physiologiques et biochimiques.

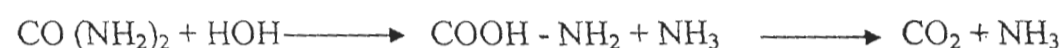
1. Recherche d'une catalase :

Sur une lame de verre, on a déposé une goutte d' H_2O_2 puis on a ajouté une ose de culture à étudier. Un dégagement de bulles d'oxygène indique la présence d'une catalase.

2. Métabolisme des protéines et des acides aminés.

a. Recherche de l'uréase et la mise en évidence de la production d'indole :

Certains germes élaborent une uréase extrêmement active, et peuvent utiliser l'urée comme seule source d'azote en produisant du CO_2 et NH_3 .

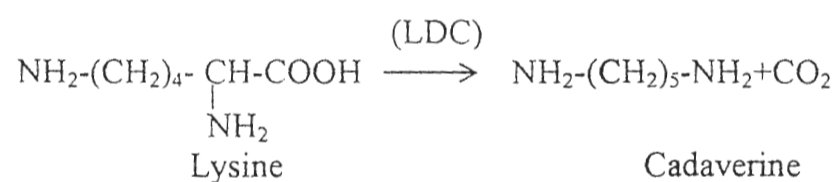


A partir de chaque milieu gélosé contenant la culture pure, on ensemence le milieu urée-indole par la culture bactérienne et on incube à $37^\circ C / 6 h$.

Le virage de l'indicateur de pH au rouge et l'alcalinisation du milieu témoignent de la présence d'une uréase. Par suite, on ajoute 3 gouttes du réactif de Kovacs le long des parois du tube, on homogénéise et on laisse reposer, la présence d'indole est indiquée par la formation d'un anneau rouge en surface.

b. Recherche de la lysine-décarboxylase (LDC) :

Certaines bactéries possèdent une décarboxylase qui agit sur un acide aminé particulier ; la Lysine, en produisant la Cadaverine qui réagit avec la Ninhydrine en donnant une coloration violette.



On ensemence le milieu Moeller enrichi à la lysine par une ose de culture et on incube à $37^\circ C / 24 h$. La présence d'une LDC se traduit par une coloration violette.

b. Fermentation des sucres sur milieu TSI :

Le milieu TSI est un milieu complexe, qui permet la mise en évidence de plusieurs enzymes qui sont responsables de la dégradation du glucose, du lactose et des acides aminés soufrés.

Le milieu est ensemencé par piqûre centrale dans le culot, suivi par des stries superficielles sur la pente du milieu, après incubation à 37 °C/24h, on fait la lecture :

- Glucose fermenté : culot 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 une poche gazeuse repoussant la totalité du milieu vers le haut.
- Lactose fermenté : la pente vire au jaune.
- Les peptones et les acides aminés sont dégradés : la pente vire au rouge.
- Production du sulfure d'hydrogène (H₂S) au dépens des acides aminés à radical soufre : la pente et le culot sont noirs.

5. Recherche d'une B-galactosidase (ONPG) :

Pour que le lactose soit attaqué par une bactérie, il faut qu'il pénètre dans la cellule microbienne. Cette pénétration va dépendre d'une enzyme lactose perméase et une autre enzyme intracellulaire B-galactosidase catalysant la scission du lactose et galactose au niveau de la liaison B-galactoside.

0.5 ml d'eau physiologique est ensemencé par la suspension dense d'une culture bactérienne. Après, on ajoute le disque ONPG et on incube à 37 °C / 24 h.

La solution devient jaune si la bactérie possède une B-galactosidase.

6. Recherche de dérivés de l'acide pyruvique sur milieu Clark et Lubs :

Le but de ce test est de détecter la production d'acétoïne à partir de la fermentation du glucose. Ce métabolisme glucidique est mis en évidence par deux réactions :

a. Réaction au rouge de méthyle (RM) :

La réaction au rouge de méthyle permet de caractériser la fermentation acide mixte. Que se soit en aérobiose ou en anaérobiose, on obtient à partir de l'acide pyruvique des acides organiques à courte chaîne. Lorsqu'ils sont produits, ces acides organiques maintiennent le pH de la culture à un degré suffisamment bas pour que le rouge de méthyle garde sa coloration rouge (pH inférieur à 5).

On ensemence 5 ml du milieu de Clark et Lubs. L'incubation se fait à 37 °C. Après deux jours d'incubation, on prélève 2 ml du milieu, puis on ajoute deux gouttes d'une solution de rouge de méthyle :

La réaction positive : coloration rouge, le milieu est acide avec un pH < 4,2
 La réaction négative : coloration jaune, le milieu alcalin et le pH > 7.

b. Réaction de Voges-Proskauer (VP) :

La réaction de Voges-Proskauer permet de révéler la présence d'acétyl-méthyl-carbinol ou l'acétoïne qui est un corps intermédiaire dans la formation du butylène glycol (2,3 – butène-diol).

On ajoute 0,5 ml du réactif VP_I (α -naphtol à 6% dans l'alcool absolu) et 0,5 ml du réactif VP_{II} (une solution de potasse à 15% d'eau distille) au 3 ml de la culture, sur milieu Clark et Lubs.

Les tubes sont agités énergiquement et laissés 15 mn au maximum à température ambiante. La présence de l'acétoïne se traduit par la formation d'un anneau en surface.

7. Profil fermentaire des sucres :

Le test permet d'apprécier la capacité des souches à fermenter quelques sucres (Inositol, Mannose, Glucose). Ce test est réalisé sur milieu MEVAG (milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides) dans les tubes à essai. Pour réaliser ce test, on a ajouté au milieu fondu et refroidi à 37°C quelques gouttes (5 gouttes) de sucres à tester, on homogénéise puis on ensemence nos souches bactériennes.

Après incubation à 37 °C/24 h, tous les tubes dont la couleur vire vers le jaune sont considérés comme positif.

II.2.2. Etude des interactions bactériennes :

Afin d'étudier les interactions entre les bactéries lactiques et les entérobactéries isolées de caecum du lapin on a utilisé la méthode de Fleming et al. [19] dont les étapes sont les suivantes :

- La gélose MRS est coulée dans des boîtes de Pétri stériles et laissée prendre en masse.
- 50 µl du bouillon MRS contenant de la bactérie lactique est étalé à la surface de la gélose MRS et laissé 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 boîtes de Pétri sont incubées à 37 °C pendant 24h ;

- On mesure les diamètres des zones d'inhibition.

II.2.3. Etude de l'effet des surnageants sur les entérobactéries.

II.2.3.1. Technique de récupération du surnageant :

Avant le test, nous avons cultivé *L. plantarum* sur bouillon MRS, puis la culture est centrifugée à froid (12400 r / mn / 10 mn à + 4 °C). La moitié du surnageant est neutralisé par du NaOH 3 M et on l'a filtré sur papier filtre stérile de 0.22 µl [5].

II.2.3.2. Technique :

Afin de mettre en évidence l'effet de filtrat de culture sur les entérobactéries, on applique la technique des puits [3], qui se résume en :

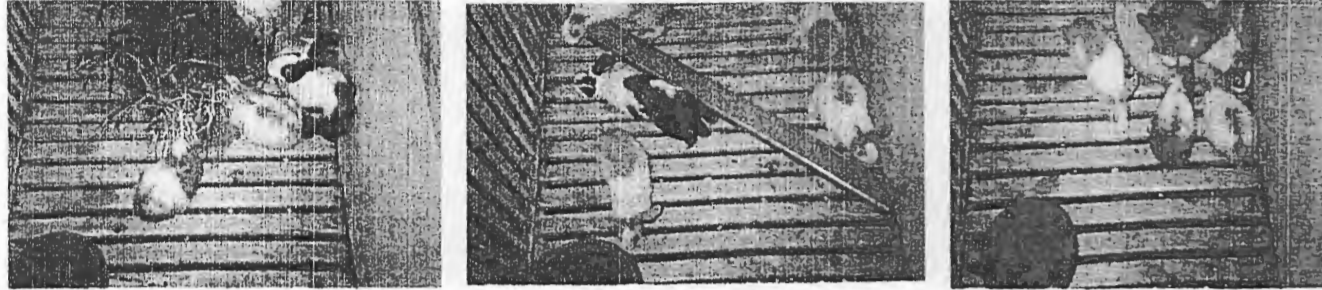
- Après avoir couler et solidifier la gélose VRBG, on ensemence chaque souche entérobactérie par inondation, le surplus de l'inoculum est récupéré. La gélose est séchée à l'étuve ;
- On dépose le surnageant dans des puits déjà confectionnés sur cette gélose ;
- Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24 h.
- La lecture se fait par mesure de zones d'inhibition autour des puits.

II. 2. 4. Etude de l'effet du régime alimentaire sur la survie de *L. plantarum* dans le tube digestif du lapin.

II. 2. 4. 1. Préparation du lapin :

Pour l'étude « in vivo », on a utilisé 15 lapereaux, males et femelles. Ces derniers ont été répartis en trois lots selon le régime alimentaire : l'herbe verte, l'aliment granulé et l'aliment broyé.

L'étude a été effectuée dans une animalerie bien nettoyée et bien éclairée.



Herbe verte

Aliment granulé

Aliment broyé

Figure 1 : Répartition des lapins selon le régime alimentaire.

II. 2. 4. 2. Préparation des laits fermentés :

Le probiotique a été administré aux lapins sous forme de lait fermenté. Pour la préparation de ce dernier, on a utilisé le protocole suivant :

Lait écrémé 24 g + 2 g de saccharose + 200 ml de l'eau distillée

↓
Stérilisation à 120 °C pendant 10 mn

↓
Refroidissement à la température de 37 °C

↓
Ensemencement de lait par le levain lactique
Lactobacillus plantarum « BJ0021 »

↓
Incubation à 37 °C jusqu'à la coagulation

Après incubation, on mesure le pH et l'acidité et on dénombre *L. plantarum* dans le produit fini

a- Mesure du pH :

Pour la mesure de pH du produit fini, nous avons utilisé un pH mètre, en plongeant l'électrode dans la prise d'essai, le résultat est enregistré directement sur l'écran [17].

b- Mesure de l'acidité :

L'acidité est déterminée par titration d'un échantillon de 10 ml de lait fermenté par la soude dornic (N/9) en présence de 5 gouttes d'indicateur de couleur, la phénophtaléine jusqu'à virage de la couleur au rose pâle [17].

$$\text{Acidité } ^\circ\text{D} = V_{\text{NaOH}} \times 10.$$

V_{NaOH} = Volume de la soude dornic utilisé.

c- Dénombrement de la flore lactique :

Il s'agit d'un dénombrement en surface du milieu MRS. On aensemencé la gélose MRS coulée et refroidie, par 1ml de la dilution 10^{-8} , l'inoculum est étalé par un râteau stérile. Le dénombrement est réalisé après 24 h d'incubation à 37 °C.

II. 2. 4. 3. Administration du probiotique :

L'administration de probiotique *Lactobacillus plantarum* « BJ0021 » est réalisée deux fois par jour à 9h et à 14 h par voie orale "per-os" (figure3) à raison de 20 ml /tête / jours pour l'ensemble des sujets. Chaque ml du lait fermenté contient $34,4 \times 10^9$ cellules de *L. plantarum*.

La supplantation est arrêtée au 6^{ème} jour pour les sujets de chaque lot.

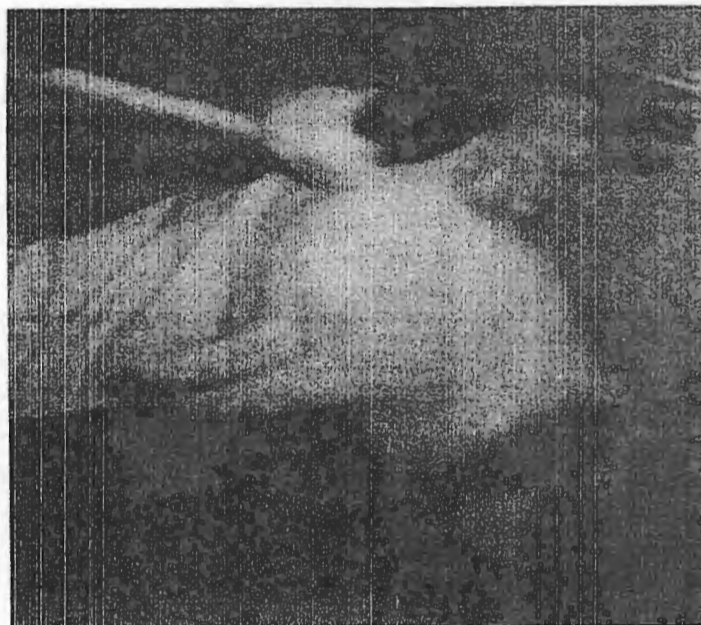


Figure 2 : La voie d'administration du probiotique.

Les effets du probiotique sur la composition de la flore endogène sont paradoxalement assez mal connus si l'on excepte la survie du probiotique lui-même.

II. 2. 4. 4. Evaluation de la survie du probiotique dans le tube digestif du lapin.

a. Dénombrement de *L. plantarum* :

Après sacrifice d'un lapin de chaque lot par saignée directe, on a fait des prélèvements à partir de l'estomac, du caecum, de l'intestin grêle et de la matière fécale.

De chaque échantillon, on pèse 4 g que l'on broie et homogénéise dans 40ml d'eau distillée stérile. A partir des solutions mères déjà préparées sur eau distillée stérile, on réalise des dilutions décimales jusqu'à 10^{-7} après une filtration sur papier filtre stérile.

Sur la gélose MRS coulée et solidifiée, on étale 1ml de la dilution 10^{-7} par râteau stérile. Le dénombrement de la flore lactique est réalisé après incubation à 37 °C pendant 24 h [14].

b. Dénombrement des entérobactéries de la matière fécale :

Un échantillon de 4g de la matière fécale est récupéré du dernier segment intestinal de tractus digestif du lapin. Après le broyage et l'homogénéisation dans 40ml d'eau distillée stérile, on réalise les dilutions décimales jusqu'à 10^{-7} .

On introduit au fond de chaque boîte de pétri 1ml de la dilution 10^{-7} , puis on coule la gélose VRBG fondue et refroidie à 47 °C, on mélange et on laisse prendre en masse. Après incubation 24 h à 37 °C, on dénombre les colonies typiques des entérobactéries.

II.2.5. Traitement statistique:

Les résultats obtenus avec la partie « in vivo » ont fait l'objet d'un traitement statistique par une analyse de variance dont le dispositif est le monofactoriel en randomisation total. Le facteur étudié est le régime alimentaire et le facteur contrôlé est la durée de l'administration du probiotique.

III. 1. Isolement et identification des entérobactéries à partir du caecum du lapin.

III. 1.1. Purification et identification :

La purification des souches isolées à partir du tube digestif du lapin, nous a permis d'obtenir une collection de 14 souches pures dont l'observation macroscopique révèle la présence des colonies de même taille, même forme et même couleur .

L'examen microscopique des préparations soumises à la coloration de GRAM nous a permis de distinguer des formes bâtonnets coccobacillaire de couleur rose.

III. 1.2. Tests d'identification biochimique :

Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 4. D'après les résultats répertoriés dans ce tableau, il apparaît que ce profil coïncident à ceux des entérobactéries.

Ainsi la coloration de Gram a montré que les souches sont à GRAM négatif, de forme coccobacille, ces dernières n'ont pas pour la majorité le pouvoir de dégrader le tryptophane avec production de l'Indole. Elles disposent d'un complexe enzymatique actif vis-à-vis de la dégradation (hydrolyse et décarboxylase) de l'Arginine, la Lysine et l'Ornithine.

Elles sont mobiles, et produisent du gaz à partir du lactose, cependant elles ont une défaillance enzymatique vis-à-vis de l'utilisation d'urée et l'utilisation de citrate. Il est à noter qu'il y a une variabilité entre les souches isolées, ainsi, seule la souche *Enterobacter* spp codée 1 a l'habilité d'utiliser l'inositol. Autres variabilités ont été notées à l'égard du mannose et du lactose.

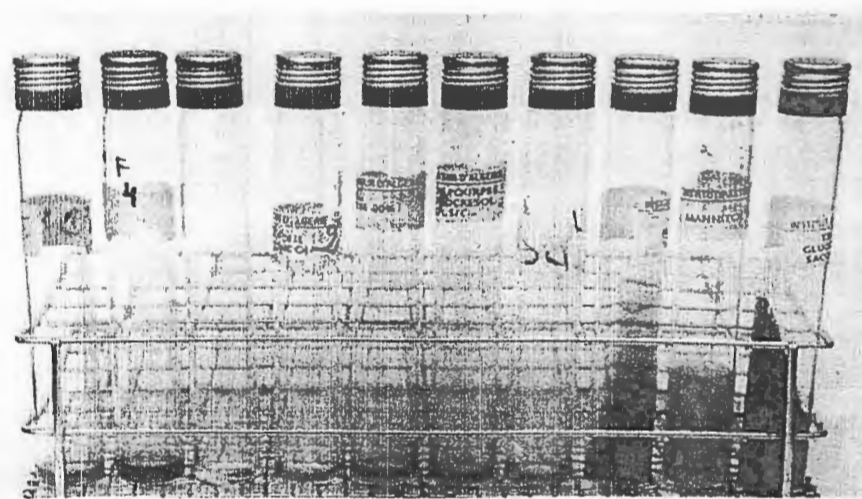


Figure 3 : Profil d'identification d'*E. coli* (Souche 12)

Tableau 6 : Résultats des tests d'identification des souches.

Souche	GRAM	Catalase	ONPG	LDC	ODC	ADH	CIT	H ₂ S	UREE	IND	VP	RM	GLU	LAC	MAN	INO	GAZ	Mobilité	Identifié à
1	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+/-	+	<i>Enterobacter</i> spp
2	-	+	+	+	+	-	+/-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Enterobacter</i> spp
3	-	+	+	-	-	+	+/-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	<i>Citrobacter</i> spp
4	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	<i>Citrobacter</i> spp
5	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>Enterobacter</i> spp
6	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>Erwinia</i> spp
7	-	+	+	+	+	+	+/-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	<i>Hafnia</i> spp
8	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	<i>Citrobacter</i> spp
9	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Citrobacter</i> spp
10	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	<i>Hafnia</i> spp
11	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	<i>Proteus</i> spp
12	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
13	-	+	+/-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
14	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	<i>Shigella</i> spp

+: Test positif

-: Test négatif

+/-: Test intermédiaire.

Partie III

Résultats et discussion

D'après les profils biochimiques on a identifié le suivant :

- 4 Souches du genre *Citrobacter*.
- 3 Souches du genre *Enterobacter*.
- 2 Souches du genre *Escherichia*.
- 2 Souches du genre *Hafnia*.
- 1 Souche du genre *Erwinia*.
- 1 Souche du genre *Proteus*.
- 1 Souche du genre *Shigella*.

En effet, la répartition des souches à identifier montre la dominance du genre *Citrobacter* à raison de 21 %, le reste est reparti entre les genres *Escherichia* et *Hafnia* de 14% et les genres *Erwinia*, *Proteus*, *Shigella* à raison de 7%.

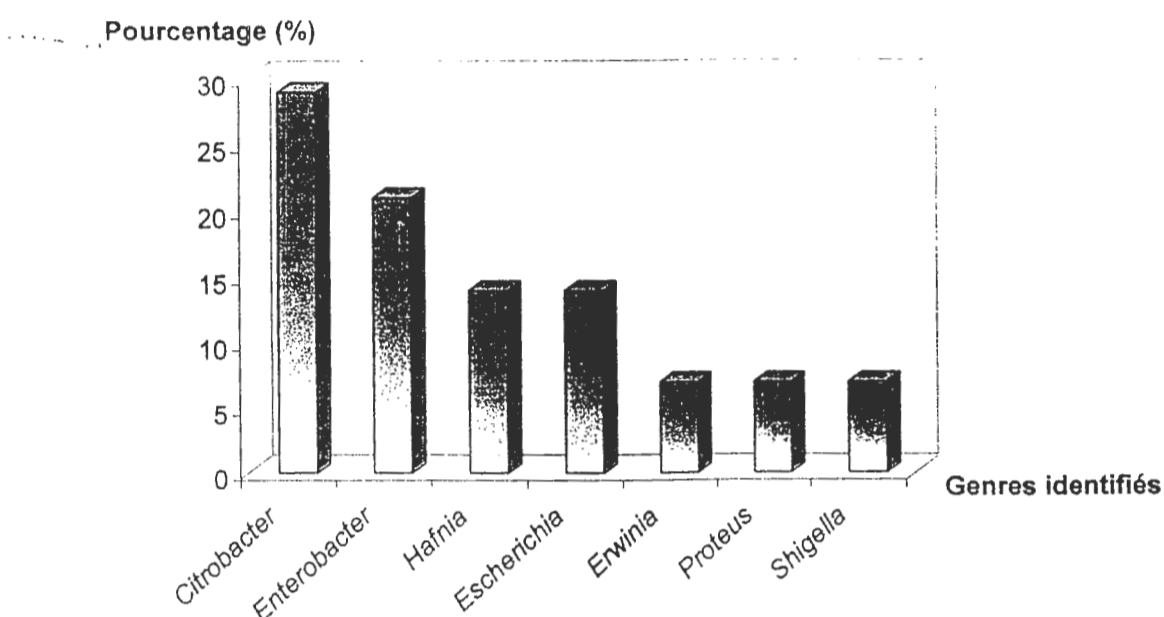


Figure 4 : Répartition des souches isolées.

D'après les résultats obtenus, on déduit que la flore dominante de cette collection est constituée de coliformes avec un pourcentage de 64,29 %. Cette dominance a une relation avec les conditions écologiques de cette flore caractéristique du tube digestif humain et animal.

III.2. Interactions bactériennes.

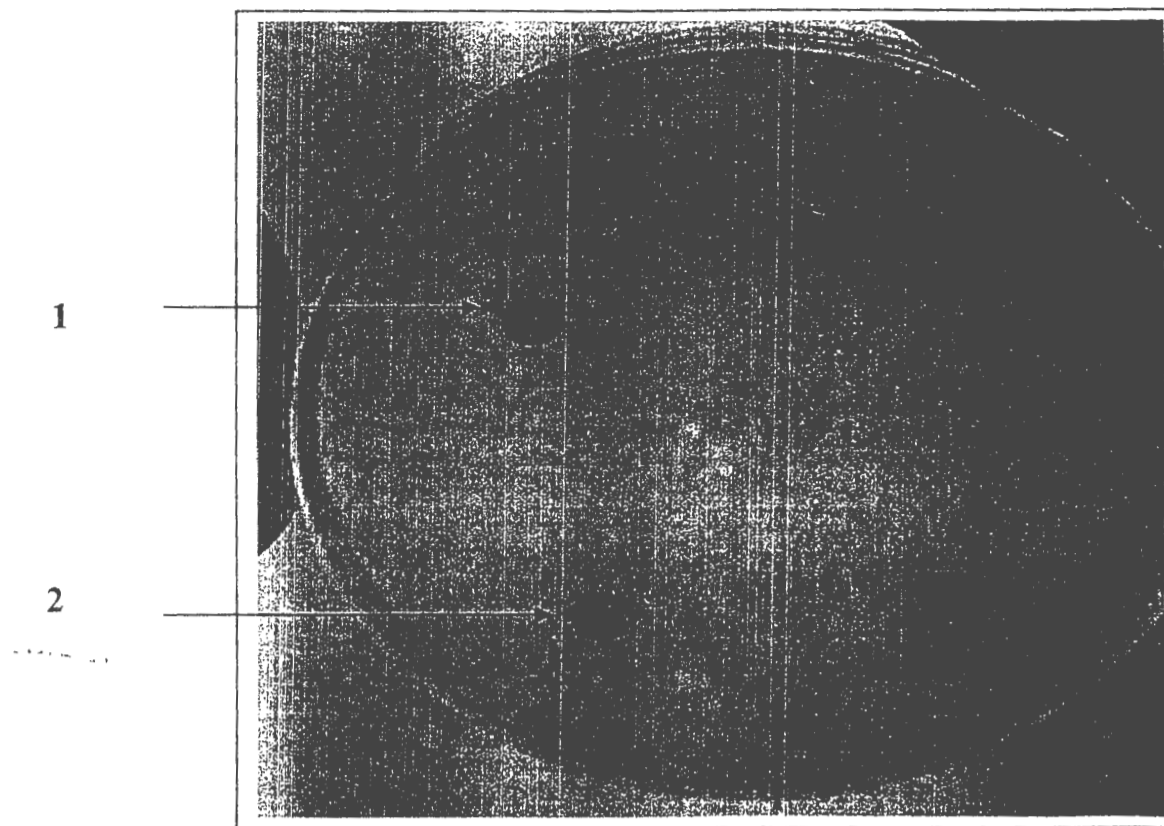
Le tableau 7 représente les résultats obtenus concernant les interactions entre le probiotique *L. plantarum* et les souches d'entérobactéries.

Tableau 7 : Résultats des interactions entre le probiotique et les entérobactéries.

Souches	Code	Test	Diamètre des zones d'inhibitions mm
<i>Enterobacter</i> spp	1	+	2
<i>Enterobacter</i> spp	2	+	3
<i>Citrobacter</i> spp	3	+	2
<i>Citrobacter</i> spp	4	+	4
<i>Enterobacter</i> spp	5	+	2
<i>Erwinia</i> spp	6	-	0
<i>Hafnia</i> spp	7	-	0
<i>Citrobacter</i> spp	8	+	1
<i>Citrobacter</i> spp	9	+	3
<i>Hafnia</i> spp	10	-	0
<i>Proteus</i> spp	11	+	3
<i>Escherichia coli</i>	12	+	4
<i>Escherichia coli</i>	13	+	2
<i>Shigella</i> spp	14	+	3

L'interaction entre la souche *Lactobacillus plantarum* « BJ0021 » et les entérobactéries sur milieu solide est représentée par deux phénomènes majeurs :

- Une symbiose qui se traduit par la stimulation de deux souches différentes cultivées ensemble, c'est la vie symbiotique qui unie entre la souche lactique *L. plantarum* « BJ0021 » ensemencé en masse et les souches appartenants aux genres *Hafnia* et *Erwinia*.
- Une inhibition des deux souches différentes lorsque l'une est mise en contact avec l'autre, ce phénomène est observé entre la souche lactique *L. plantarum* ensemencée en masse et les souches appartenants aux genres *Citrobacter*, *Escherichia*, *Proteus* et *Shigella* ensemencées en touche. Ces dernières sont inhibées par la souche lactique avec des diamètres allant de 1 à 4 mm, de ce fait notre probiotique exerce un pouvoir antagoniste très remarquable vis-à-vis de la majorité des souches isolées.



1 : Souche *Citrobacter* spp

2 : Souche *Escherichia coli*

Figure 5 : Les caractéristiques antagonistes de *L. plantarum*.

Les plus larges zones d'inhibitions sont obtenues avec les souches 4 et 12 qui correspondent à *Citrobacter* (0,4 cm) et à *E. coli* (0,4 cm), cela est intimement lié à l'antagonisme exercé par notre souche probiotique.

D'après les résultats obtenus, on déduit que *L. plantarum* exerce un effet sur les entérobactéries que se soit symbiotique ou inhibiteur.

Ces deux interactions s'expliquent par :

- La production des substances qui confèrent à nos souches des aptitudes antagonistes, il s'agit de bactériocines et d'antibiotiques probables [25].

L'effet de pH et les acides, notamment l'acide lactique qui confèrent aux bactéries lactiques un pouvoir antagoniste envers les bactéries Gram négatif aussi bien que Gram positif [43]. Par ailleurs, la principale modification des conditions physico-chimiques du milieu responsable de phénomènes d'inhibition est très certainement le gradient de protons du à la production d'acide lactique. Ainsi, une bonne acidification lactique, entraîne une inhibition de la croissance de *E. coli* et des *Salmonella*. Si le pH n'est pas maintenu constant, c'est l'ion H_3O^+ qui est inhibiteur [24].

- La compétition vis-à-vis du substrat : lorsque plusieurs souches sont mises en culture dans un même milieu, elle entrent nécessairement en compétition, si elles utilisent la même substrat [27].

Nos résultats sont en accord avec ce de Stiles [55], qui montre que de nombreuses souches de *Leuconostac* présentent des activités antagoniste, de même Hermier et al. [24], rapportent que les bactéries lactiques ont un rôle fondamental dans l'inhibition des flores non lactiques.

En outre Daesche [16], rapporte que les bactéries lactiques sont connues et utilisées pour les influences antagonistes qu'elles développent. Elles sont dues aux métabolites excrétés, acide lactique et autres acides organiques, diacétyle, peroxyde d'hydrogène et surtout antibiotiques et bactériocines.

III. 3. Effet des surnageants de *L. plantarum* sur les entérobactéries.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 8. Ces résultats illustrent la sensibilité totale des entérobactéries vis-à-vis des métabolites de la souche lactique.

Tableau 8 : Effet du surnageant natif sur les entérobactéries.

Souches	Code	Test	Diamètre des zones d'inhibitions mm
<i>Enterobacter</i> spp	1	+	1
<i>Enterobacter</i> spp	2	+	2
<i>Citrobacter</i> spp	3	+	4
<i>Citrobacter</i> spp	4	+	5
<i>Enterobacter</i> spp	5	+	5
<i>Erwinia</i> spp	6	+	9
<i>Hafnia</i> spp	7	+	3
<i>Citrobacter</i> spp	8	+	5
<i>Citrobacter</i> spp	9	+	5
<i>Hafnia</i> spp	10	+	5
<i>Proteus</i> spp	11	+	14
<i>Escherichia coli</i>	12	+	12
<i>Escherichia coli</i>	13	+	7
<i>Shigella</i> spp	14	+	3

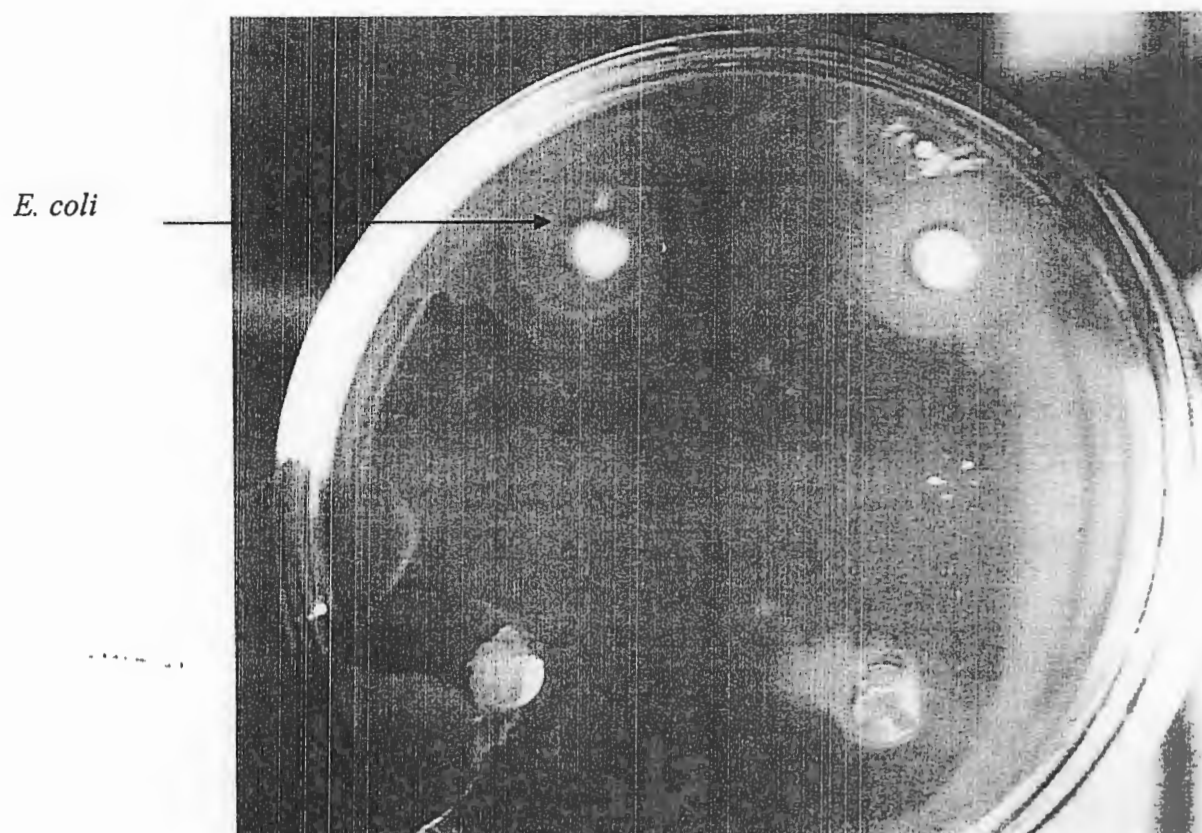


Figure 6 : Effet du surnageant natif sur *E. coli* (souche 12).

Les résultats montrent que le surnageant natif de *L. plantarum* inhibe les entérobactéries avec un pourcentage de 100 %. Le diamètre d'inhibition varie entre 1 mm et 14 mm, les plus larges zones d'inhibition sont obtenus avec les souches *Erwinia* 6 (9 mm), *E. coli* 12 (12 mm) et *Proteus* 11 (14 mm). La figure 7 montre l'effet du surnageant natif sur *E. coli* 12.

Ces résultats sont liés à l'action des métabolites de la bactérie lactique à savoir l'acide lactique, les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et probablement les bactériocines et ou antibiotiques, sur les souches testées.

Les résultats de notre étude sont en accord avec plusieurs données bibliographiques. Klaenhammert [32] et Schillinger [53], confirment que la production de substances antimicrobiennes, de type bactériocine est capable d'inhiber les germes fréquemment responsables d'infections en élevage, de même Vanderberg [57], rapporte que certains produits du métabolisme des bactéries lactiques, acide lactique et bactériocines, ont des propriétés antimicrobiennes et peuvent inhiber la croissance de certains pathogènes.

Reinheimeimer et al [48], montrent que la production d'acides organiques tels que l'acide lactique ou l'acide acétique limite la croissance de plusieurs germes, en abaissant le pH.

Par ailleurs, nos résultats vont et ceux de Kacem et *al* [30], qui ont trouvé que le surnageant natif de *L. plantarum* OL15 avait une activité inhibitrice envers des souches à Gram négatif.

Pour éliminer l'effet de l'acide lactique et d'autres acides organiques et afin de mettre en évidence la substance inhibitrice qui peut avoir une activité sur les entérobactéries, on a ajusté le pH du surnageant à pH=7.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Effet du surnageant pH 7 sur les entérobactéries.

Souches	Code	Test	Diamètre des zones d'inhibitions mm
<i>Enterobacter</i> spp	1	+	2
<i>Enterobacter</i> spp	2	+	4
<i>Citrobacter</i> spp	3	+	4
<i>Citrobacter</i> spp	4	+	1
<i>Enterobacter</i> spp	5	+	5
<i>Erwinia</i> spp	6	+	2
<i>Hafnia</i> spp	7	+	1
<i>Citrobacter</i> spp	8	+	2
<i>Citrobacter</i> spp	9	+	2
<i>Hafnia</i> spp	10	+	1
<i>Proteus</i> spp	11	+	3
<i>Escherichia coli</i>	12	+	3
<i>Escherichia coli</i>	13	+	1
<i>Shigella</i> spp	14	+	2

L'étude de l'effet du surnageant après l'ajustement du pH sur les entérobactéries, montre que l'inhibition persiste ce qui indique que l'acide lactique n'était pas le seul facteur à agir sur les souches de la collection mais d'autres substances inhibitrices interviennent aussi. Parmi ces substances probables, les bactériocines et l' H_2O_2 (Figure 6).

D'après les résultats obtenus, on constate que le surnageant pH 7 inhibe la totalité des entérobactéries, avec des diamètres d'inhibition compris entre 1 et 5 mm. Comparativement aux résultats de l'effet surnageant natif, il apparaît que ces zones d'inhibition sont moins importantes et qu'il y a une perte de l'activité du surnageant.

Schaak et Marth [51], Leveau et *al* [38], rapportent que les bactéries lactiques sont connues et utilisées par les influences antagonistes qu'elles développent. Elles sont dues aux métabolites excrétés, l'acide lactique n'est pas seules à agir mais les antibiotiques et les bactériocines dotées d'un spectre d'action le sont aussi.

Pucci et *al* [47], rapportent que l'action de bactériocine se traduit par une diminution brutale de la viabilité de la population bactérienne après un contact de quelques minutes entre la bactériocine et la souche sensible.

III.4. Influence du régime alimentaire sur la survie de *L. plantarum* dans le tube digestif du lapin.

III.4.1. Survie dans l'estomac :

Après l'adaptation des lapins aux régimes alimentaires pendant 7 jours, on a commencé à administrer la souche probiotique. À J1, J3, J5 et J7 un sujet de chaque lot a été abattu par saignée directe. Après l'arrêt de l'administration du probiotique, on dénombre à J7 et J9. Les résultats de la numération de *L. plantarum* « BJ0021 » dans l'estomac sont représentés dans le tableau 9 et illustrés par la figure 8.

Ces résultats montrent une variation hautement significative ($P < 0.01$) de nombre de la souche lactique *L. plantarum* « BJ0021 » en fonction du temps et en fonction de régime alimentaire.

Le nombre de *L. plantarum* après 24h de l'administration est 184×10^7 , 96.10^7 et 204.10^7 cellule/ml de contenu de l'estomac correspond respectivement aux lot 1 (Herbe), lot 2 (aliment granule) et lot3 (aliment broyé).

Ce nombre a augmenté significativement ($P < 0.05$) de plus de 728.10^7 cellule/ml, plus de 172.10^7 cellule/g et de plus de 168.10^7 cellule/g au profit de des animaux du lot1, lot2 et lot3 respectivement après 96 h. cela est probablement, liée à un facteur hiérarchisé, non contrôlable qui agit en faveur de la protection de ces bactéries vis-à-vis de l'agression par les acides gastrique, c'est le pouvoir tampon des aliments composants le régime alimentaire du lapin.

Il apparaît clairement que la meilleure survie du probiotique est notée chez les animaux alimentés par l'herbe verte et l'aliment broyé, cela dit il est fort probable que le nombre trouvé de lactobacille dans l'estomac des lapins consommant de l'herbe verte soit la somme de *L. plantarum* et autre *Lactobacillus.ssp* apporté par cet aliment.

De même, on pense que l'aliment broyé fourni une sorte de protection de la bactérie lactique lorsqu'il y a homogénéisation par les mouvements relatif à la motricité gastrique. En revanche, avec l'aliment granulé, la bactérie lactique reste exposée à l'agressivité de l'acide chlorhydrique stomacal et aux autres facteurs hostiles.

Après l'arrêt de l'administration de probiotique, le nombre de cellules de *L. plantarum* « BJ0021 » diminue à des valeurs très basses pour atteindre respectivement $1.6.10^7$, $0,6.10^7$ et $0,2.10^7$ cellule/ml de jus gastrique en fin de l'expérimentation.

Ces résultats montrent qu'il faut un apport permanent de la souche lactique.

Jin et al [26] montrent que généralement les souches de lactobacilles ont une faible résistance à pH 1,0 et 2,0 et une résistance modérée à pH 3,1.

Tableau 10 : Evolution du nombre de *L. plantarum* dans l'estomac.

	<i>L. plantarum</i> : n. 10 ⁷ cellule/ g		
	L'herbe	Aliment granulé	Aliment broyé
J1	184	96	204
J3	816	117	224
J5	912	268	372
SS		* *	
J7	16	16	8
J9	1,6	0,6	0,2

SS : Signification statistique. * * : Hautement significatif

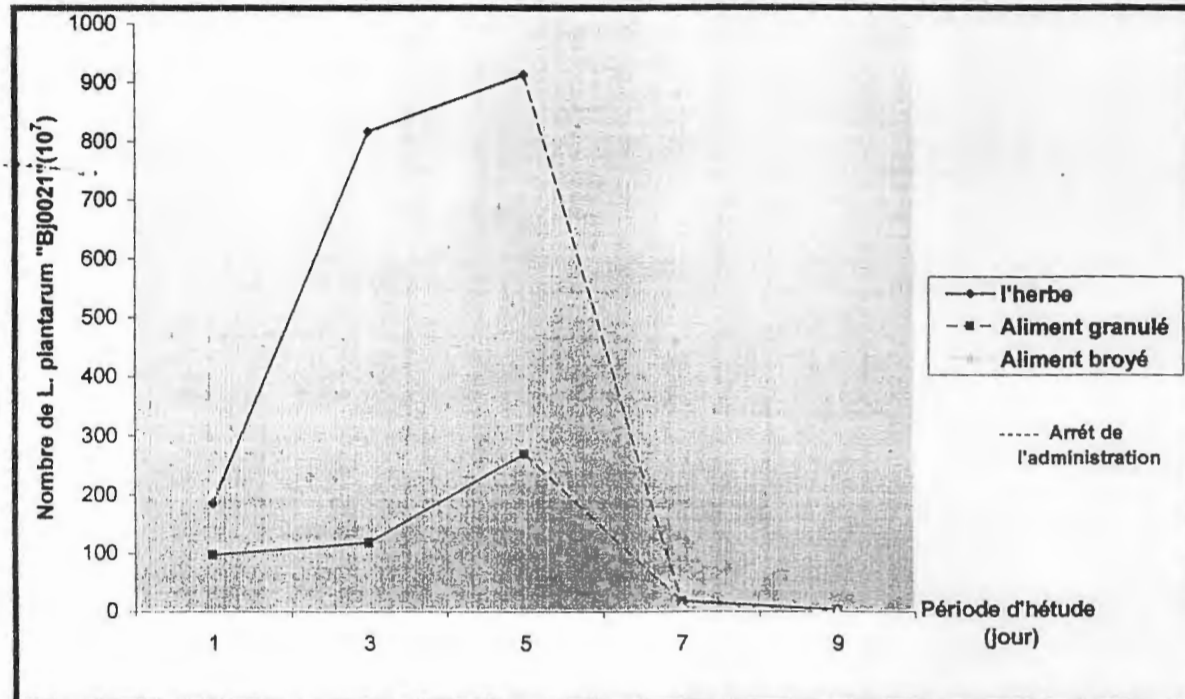


Figure 7 : Evolution du nombre de *L. plantarum* dans l'estomac du lapin.

III.4.2. Survie dans l'intestin grêle :

L'intestin grêle est une autre barrière physiologique de tube digestif du lapin au passage de bactéries lactique. Les résultats de la numération de *L. plantarum* « BJ0021 » dans l'intestin grêle sont représentés dans le tableau 10 et illustrés par la figure 9.

Après 48 h, le nombre de cellule de *L. plantarum* « BJ0021 » augmente significativement ($P < 0.05$) en fonction du temps et reste important dans contenu de l'intestin grêle avec les trois régimes alimentaires.

Au cinquième jour de l'administration du lait fermenté aux lapins, le nombre de *L. plantarum* « BJ0021 » a été trouvé à des concentrations très élevées $1,68.10^9$, $1,77.10^9$ et 220.10^9 cellule/g du contenu de l'intestin grêle des animaux alimentés respectivement par l'herbe verte, l'aliment granulé et l'aliment broyé.

Cependant, il est évident d'après les résultats obtenus que la meilleure survie est obtenue avec l'utilisation du régime alimentaire composé d'aliments broyés dont la différence de survie était hautement significative ($P < 0.01$) comparativement aux reste des régimes alimentaires.

Une persistance importante de *L. plantarum* « BJ0021 » au niveaux de l'intestin grêle est enregistrée. malgré la présence d'une quantité de la bile, cela est explique par l'effet tampon du lait fermenté.

Après l'arrêt de l'administration de lait fermenté, le nombre de cellule de *L. plantarum* « BJ0021 » diminue mais reste supérieur à 10^8 cellules / g de contenu de l'intestin grêle.

On note qu'il y a une survie des bactéries lactiques dans l'intestin grêle, ce qui confirme que *L. plantarum* « BJ0021 » a la capacité de résister aux conditions hostiles de ce segment intestinal, donc la souche peut traverser l'intestin grêle.

Tableau 11 : Evolution du nombre de *L. plantarum* dans l'intestin grêle.

	<i>L. plantarum</i> 10^7 cellule / g		
	Herbe verte	Aliment granulé	Aliment broyé
J1	126	288	312
J3	345	110	320
J5	168	177	220
SS	* *		
J7	54	90	121
J9	5,2	8,4	20,4

J : Jours

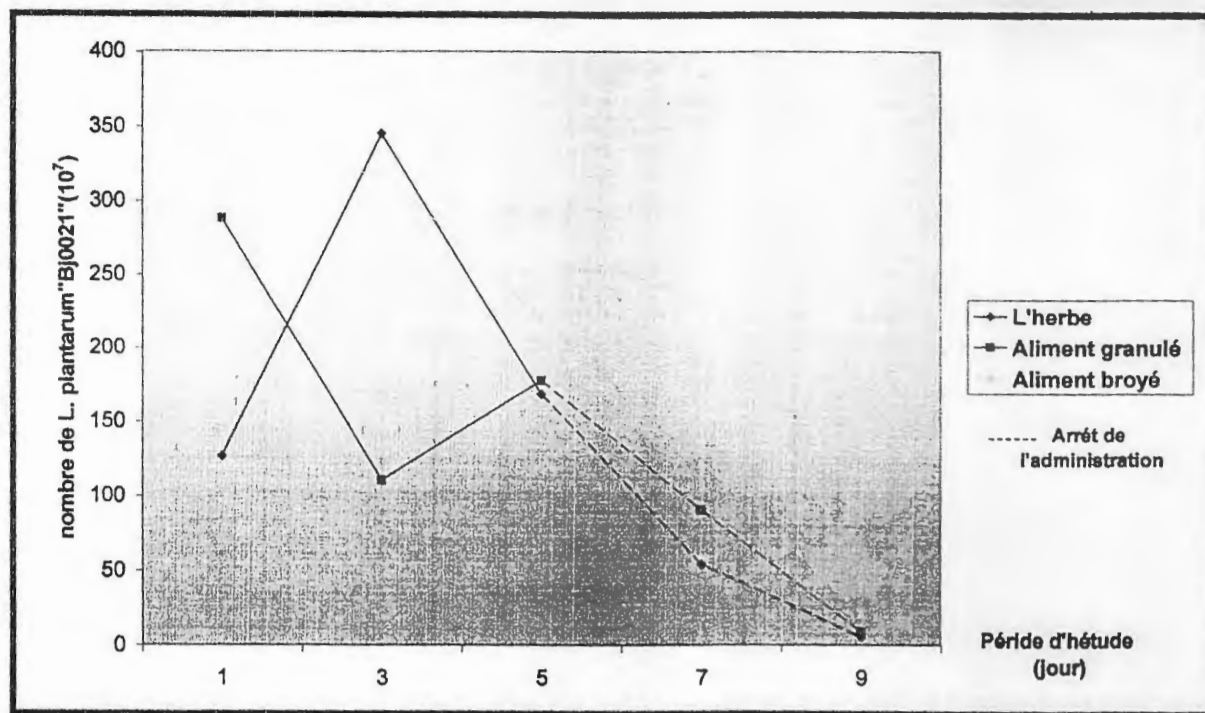


Figure 8 : Evolution du nombre de *L. plantarum* dans l'intestin grêle.

III.4.3. Survie dans le Caecum :

Les résultats de la numération de nombre de cellules de *L. plantarum* « BJ0021 » sont représentés dans le tableau 11 et illustrés par la figure 10.

Après 24 h de l'administration de lait fermenté, le nombre de cellule de la souche lactique étant de $3,20 \cdot 10^9$, $2 \cdot 10^9$ et $3,78 \cdot 10^9$ cellule/g du contenu de caecum des animaux recevant les régimes respectifs : herbe verte, aliment granulé et aliment broyé.

Après 96 h, ce nombre a augmenté significativement ($P < 0.01$) de plus de $2 \cdot 10^9$, $2,16 \cdot 10^9$ et $0,50 \cdot 10^9$ cellule/g de contenu de caecum des lapins à régimes herbe verte, aliment granulé et aliment broyé respectivement.

Malgré la présence de diverses bactéries résidentes dans le caecum, donc adaptées à des conditions écologiques spécifiques, la souche lactique a la capacité de survivre et d'interagir avec cette flore dont les résultats de la numération en témoignent.

Il est à noter qu'au cinquième jour, les sujets du lot recevant de l'herbe verte se détachent et forme un groupe distinct ($P < 0.01$), de ce fait ce régime alimentaire est le plus adapté à maintenir une survie maximale au sein du caecum de l'animal.

Ces résultats sont en accord avec ce qu'on a trouvé in vitro et qui détermine l'effet inhibiteur de *L. plantarum* vis-à-vis d'une des flores du caecum, les entérobactéries.

Après l'arrêt d'administration de lait fermenté, on note un chute de nombre de cellule de *L. plantarum* à des valeurs $0,275 \cdot 10^8$, $0,125 \cdot 10^8$ et $0,75 \cdot 10^7$ cellule /g

du contenu caecal des lapins du lot1, lot2 et lot3 respectivement. Par comparaison des résultats, on trouve qu'il y a une perte de deux Log 10 en nombre de cellule après l'arrêt de l'administration du probiotique. Cette chute est due à l'absence d'un apport exogène de la souche lactique.

D'après les résultats trouvés, notre souche présente des propriétés probiotiques chez *Oryctolagus cuniculus*. Khuntia et Chaudhary [31], ont trouvé que *L. plantarum* MTD1 peut survivre le long du tractus digestif du lapin, de même des essais similaires ont prouvé l'aptitude de cette souche à survivre aux conditions du rumen avec des apports d'effets bénéfiques sur le déroulement de la fermentation au sein du rumen.

Tableau 12 : Evolution du nombre de *L. plantarum* dans le Caecum.

	<i>L. plantarum</i> n. 10 ⁷ cellule / g		
	Herbe verte	Aliment granulé	Aliment broyé
J1	320	200	378
J3	345	322	400
J5	520	416	422
SS	* *		
J7	37	10	7
J9	2,75	1,25	0,75

J : Jours

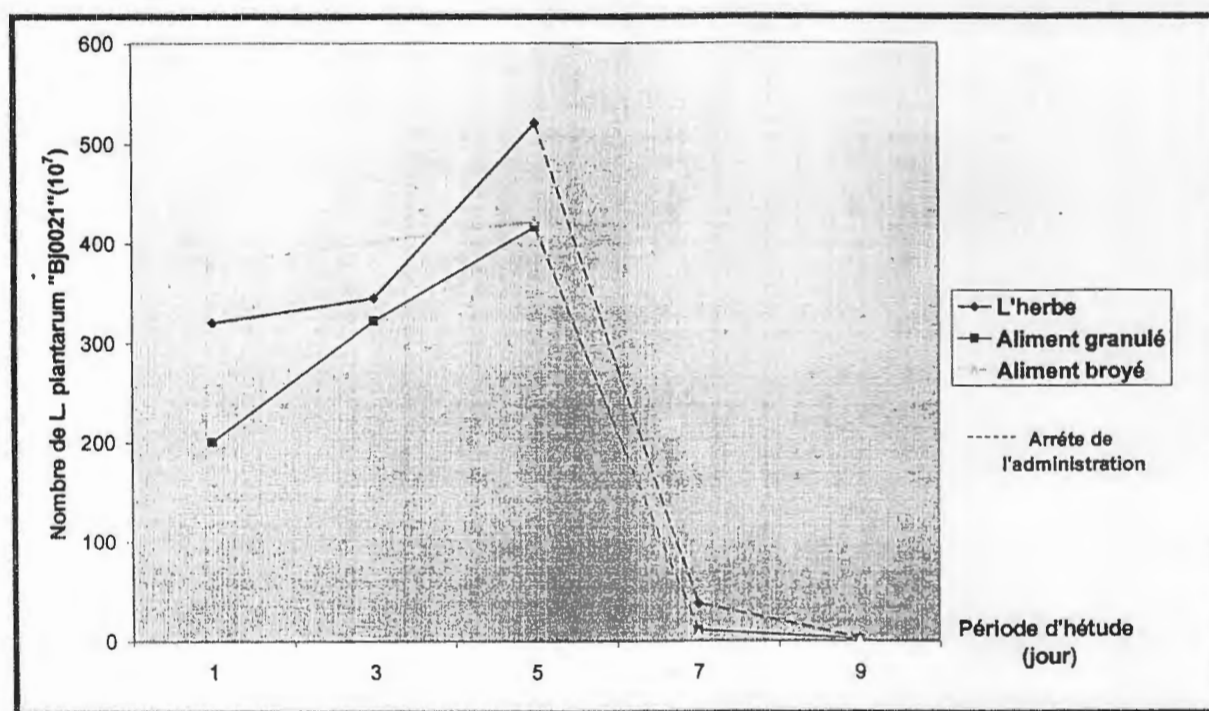


Figure 9 : Evolution du nombre de *L. plantarum* dans le caecum.

III.4.4. Dénombrement de *L. plantarum* dans la Matière fécale :

La numération de la bactérie lactique au niveau de la matière fécale est représentée dans le tableau 12 et illustrée par la figure 11.

Après 24 h de l'administration de probiotique, le nombre de cellule de *L. plantarum* « BJ0021 » était $4.27.10^9$, $1.74.10^9$ et $2.80.10^9$ cellule/g de la matière fécale des sujets à régimes herbe verte, aliment granulé et aliment broyé respectivement. Les résultats montrent une augmentation très significative ($P < 0.01$) du nombre de cellule chassé vers l'extérieur.

Chez les sujets recevant une diète à base d'un aliment broyé, le nombre de cellules chassé vers l'extérieur a chuté de $-1,2 \cdot 10^9$ cellule /g au 3^{ème} jour comparativement au premier jour.

Après l'arrêt d'administration de probiotique, une chute rapide du nombre de *L. plantarum* dans les échantillons était enregistrée, mais leur nombre reste non négligeable.

D'après ces résultats, on déduit que *L. plantarum* « BJ0021 » a la faculté de passer vivant à travers les cavités du tubes digestifs et qu'il pourra être réingérer avec les crottes molles et cela assure un apport permanent de cette bactérie probiotique.

Tableau 13 : Evolution du nombre de *L. plantarum* dans la matière fécale.

	<i>L. plantarum</i> n.10 ⁷ cellule/ g		
	Herbe verte	Aliment granulé	Aliment broyé
J1	472	174	280
J3	502	588	160
J5	600	750	480
SS	* *		
J7	23	14	8
J9	0,9	0,6	0,3

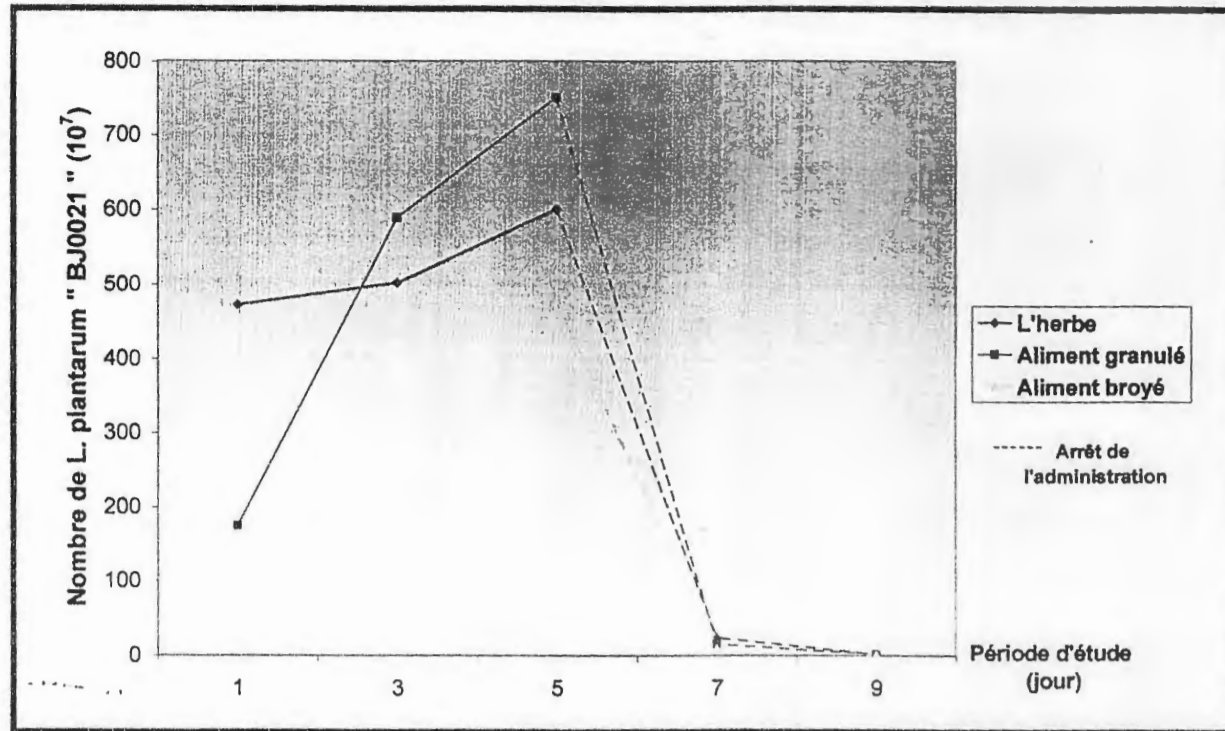


Figure 10 : Evolution du nombre de *L. plantarum* dans la matière fécale.

III.5. Dénombrement des entérobactéries.

Les résultats de dénombrement des entérobactéries sont représentés dans le tableau 14.

Après 24 h de l'administration de probiotique, le nombre des entérobactéries était $0,220 \cdot 10^{10}$, $0,302 \cdot 10^{10}$ et $0,410 \cdot 10^{10}$ cellule/g de la matière fécale des lapins consommant de l'herbe verte, de l'aliment granulé et celui broyé respectivement. Cependant, le dénombrement des entérobactéries de la matière fécale prélevée au cours du J3 et J5 montre une réduction très significative ($P < 0.001$) de la charge des échantillons en cette flore dont le nombre à J5 était respectivement de $3,8 \cdot 10^8$, $6,3 \cdot 10^8$ et $4,3 \cdot 10^8$ cellule/g de la matière fécale.

Cette réduction s'explique probablement par l'activité régulatrice de *L. plantarum* vis-à-vis de la flore excrétée avec la matière fécale, c'est à dire que les probiotique ont rétabli l'équilibre de la flore endogène ou encore il y a eu une symbiose entre le probiotique et les entérobactéries.

Après l'arrêt de l'administration du probiotique, on assiste à une réaugmentation du nombre des entérobactéries dans la matière fécale des sujets des différents lot. Cette augmentation peut s'expliquer par la réduction de nombre de *L. plantarum* « BJ0021 » qui exerce un effet inhibiteur et régulateur sur la flore endogène du lapin.

L'effet des bactéries lactiques sur les entérobactéries est justifié par Marionnet et Lebas [42] qui rapportent que les micro-organismes introduits par le probiotique entrent en compétition avec les autres germes présents à la surface des

muqueuses intestinales. Ils occupent le terrain et limitent ainsi le développement des souches non désirables.

Karma et al [30] ont trouvé que l'addition de probiotique dans le régime alimentaire du lapin agit favorablement sur l'équilibre de la flore du caecum

Tableau 14 : Evolution du nombre des entérobactéries dans la matière fécale.

	Entérobactéries n .10 ⁷ /g		
	Herbe verte	Aliment granule	Aliment broyé
J1	220	302	410
J3	112	205	103
J5	38	63	43
SS	* *		
J7	288	113	373
J9	438	327	542

J : Jours

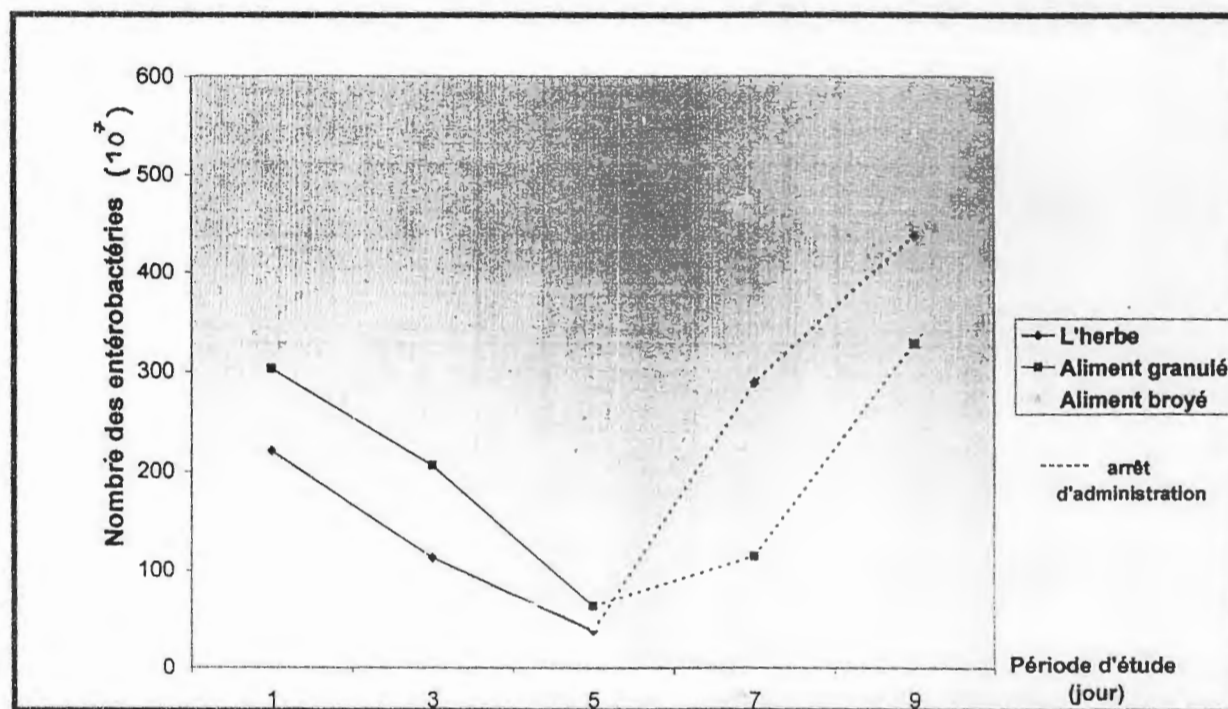


Figure11 : Evolution du nombre des entérobactéries dans la matière fécale.

Conclusion

Cette étude était articulée autour de plusieurs points nécessitant chacun des parties expérimentales distinctes, ainsi :

Nous avons pu mettre en place une collection de 14 souches entérobactéries isolées du caecum du lapin, appartenant aux genres *Hafnia*, *Erwinia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Proteus* et *Shigella*. Les coliformes représentent 64,29 % de cette collection.

L'étude des interactions bactérienne « in-vitro » a montré que *L. plantarum* « BJ0021 » exerce un effet antagoniste potentiel sur la majorité des entérobactéries avec des effets très marqués sur les souches du genre *Escherichia* et *Proteus*.

Les résultats du test de l'effet des surnageants de la culture de *L. plantarum* sur les entérobactéries ont montré une bonne activité des métabolites de cette bactérie sur la totalité des souches indicatrices avec des diamètres de zones d'inhibition variable, de même il s'est avéré que le surnageant maintient son aptitude inhibitrice après l'élimination de l'acide lactique.

L'étude « in vivo » a montré que *L. plantarum* « BJ0021 » a la capacité de traverser les différents étages de tube digestif du lapin et manifeste une résistance aux conditions hostiles du tractus digestif. Toutefois, cette étude a montré que le régime alimentaire agit significativement sur l'aptitude de cette bactérie à prendre le chemin du bol alimentaire tout en maintenant sa survie. Le régime alimentaire le plus adapté est celui à base d'herbe verte et celui à base d'aliment broyé.

D'après le reste de nos résultats ; l'utilisation de probiotique en alimentation du lapin a un effet bénéfique sur la régulation de la flore aéro-anaérobie facultative.

En vue de confirmer quel est le meilleur régime alimentaire pour la survie de *L. plantarum* « BJ0021 », nous proposons d'autoclaver l'aliment avant d'être consommé par l'animal.

Références bibliographiques

- [1]- Alais, C. 1960. Science du lait. *Principe des techniques laitières*
- [2]- Avril, J.L., Henry, D., Bernat, F et Henry, M, 1992. Bactériologie clinique. *Marketing*, 3-4.
- [3]- Barefoot, S.F., et Klaenhammer T.R, 1983. Detection and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**: 1808-1815.
- [4]- Bautisteta, E.S., Dahyars, T et Speack, M.L, 1975. Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Milk journal. Dairy. Des*, **33**.299.
- [5]- Bensegueni, A et Loucif, Z, 1985. Mémoire rédigé en vue de l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire : *proportion pratique pour l'élevage cunicole en Algérie*, 3.
- [6]- Boita, R., Verger, M et Lecef, Y. 1983. Guide pratique de l'éleveur (des oiseaux de base ... et des lapins Européenne en Algérie). *Solar*. 78-91.
- [7]- Bouaziz, R., Hichour, L et Chabbah, S, 2003. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme d'étude universitaire appliquée (DEUA). Etude générale sur l'élevage de lapin, 9.
- [8]- Boucher, S., Nouailie, L, 1996. Maladies des lapins. *France Agricole*, 13.
- [9]- Bourgois, C.M et Larpent, J.P, 1996. Microbiologie aliments fermentes et fermentation alimentaire. *Lavoisier*. Tome 2,4 -31, 432-447.
- [10]- Bourgois, C.M et Larpent, J.P, 1998. Microbiologie alimentaire. *Lavoisier*. Tome 2, 7-18.
- [11]- Bourgois, C.M et Leveau, J.Y., 1991. Technique d'analyse et des control dans les industries agro-alimentaires. 2^{ème} édition. *collection Sciences et technique Agro alimentaires*. Vol 3, 152-182.
- [12]- Boussboua H., 2002. Element de microbiologie générale. *l'universite Mentouri*, 225-234.
- [13]- Carole, V, 2002. Science et technologie du lait. Transformation du lait. Canada, 93-113.
- [14]- Cheng, I.C, Shang, H.F, Lin, T.F, Wang, T.H, Lin, H.S et Lin, S.H, 2005. Effect of fermented soy milk on the intestinal bacterial ecosystem. *World Journal of Gastroenterology*, **11** (8), 1225-1227.
- [15]- Dacosta, Y. 2002. La bioprotection des aliments. *Yves dacosta*, 1-18.

- [16]- Daeschel, M.A., 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food technology*, 164-166.
- [17]- Desmazeaud, M, 1992. Les bactéries lactiques. *I.N. R.A.*, 50-53
- [18]- Dubach, A. 1999. Laitier analytique. Microbiologie. *Emmi schweiz*. AG, 6032. 3
- [19]- Fleming, H.P., Echles, J.L et Costilow, R.N. 1975. Mutual inhibition of isolates of *Pediococcus* from cucumbers brine. *Appl. Environ microbial*, **30**, 1040-1042.
- [20]- Florent JM., 1997. L'action bénéfique des probiotiques en poulet de chair *Filière aviculture*, 182-183.
- [21]- Gamm, V, 2004. Conseil d'élevage des lapins N°23.
- [22]- Gournier, N., Chateau., Larpent, J.P, Castellanos. M et Larpent, J.L, 1994. Probiotiques en alimentation animale et humaine, 40-41.
- [23]- Guiraud, J.P, 1998. Microbiologie alimentaire. 1^{ère} édition. Dunod, 190-192.
- [24]- Hermier, J, Lenoir, J et Webere. 1992. Les groupes microbiens d'intérêt laitier. *CEEPIL*, 559.
- [25]- Idoui, T. 1999. Les bactéries lactiques indigènes : Intérêts technologiques et nutritionnels. 71-72.
- [26]- Jin, L.Z., Hoyw., Abdullah, N et Jallaludin, S, 1998. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Lett. Appl. Microbial*. **30**, 183-185
- [27]- Juillard, V., Spinnler H.E., Desmazeaud, M.J et Boquien C.Y, 1987. Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industries laitière. *Revue le lait*, 67,6-7.
- [28]- Junod, G, 1993. La revue de l'alimentation animale mensuel N°468.
- [29]- Kacem, M., Zadi- Karam, H et Karam, N.E. 2004. Isolation of lactic acid bacteria for its possible use in the fermentation of green algerian olives. *International. Journal of Fats and Oils*, **4**, 385-393.
- [30]- Kamra, D.N., Chaudhary, L.C., Singh, R., Pathak, N.N, 1996. Influence of feeding probiotics on growth performance and nutrient digestibility in rabbits. *World Rabbit Sci.*, **4**, 2. 85-88.
- [31]- Khuntia, A et Chaudhary, L.C, (2002). Performance of male crossbred calves as influenced by substitution of grain by wheat bran and the addition of lactic acid bacteria to diet. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, **15**.

- 188-194
- [32]- **Klaenhammet, R.**, 1988 Bacteriocins of lactic bacteria. *Biochimie*. **70**, 337-349.
- [33]- **Kosaza**. 1986. Les probiotiques pour demain, *Revue de l'alimentation animale* N° 397.
- [34]- **Lacza-szabos., Geppert, T., Hollar I et Virag, G**, 1990 Utilisation de *Streptococcus faecium* M 74 dans l'alimentation du lapin de chair. *Revue cuniculture* **96**, 176-263.
- [35]- **Larpent J.P et Gavgaud M L** .1997. Mémento technique de microbiologie. 549- 556.
- [36]- **Lebas F.**, 1975. Le lapin de chair, ses besoins Nutritionnels et son alimentation pratique. *DOC.T. Yavi*.
- [37]- **Lebas, F**, 2004. Biologie du lapin Appareil digestif et digestion, *Revue cuniculture*, 1-10.
- [38]- **Leveau JY., Boulx M et Deroissart M.**, 1991. La flore lactique. Technique d'analyse de contrôle dans les IAAO. 2^{ème} édition. *Lavoisier*, 2-40.
- [39]- **Leveau, J.Y, Bouix, M**, 1993 Microbiologie Industrielle les microorganismes d'intérêt industriel. *Tec et Doc-Lavoisier*. 171- 310. 513. 557.
- [40]- **Linden, G et Desn,R.**, 1985. Les enzymes non coagulantes dans la filière lait : Propriétés, utilisation industrielle et développement.
- [41]- **Manninger, R et Mocasy.**, les maladies infectieuses. Tome 1. *Vigot freres éditeur*, 531-532.
- [42]- **Marrionnet, D et Lebas. F** .1990. Séminaire approfondit (dossier probiotique et lapin) *cuniculture* N° 1040.
- [43]- **Piard J.C et Desmazeaud.** 1991. Inhibiting factors produced by Lactic acid bacteria.:1.Oxygen metabolites and end-products from catabolism. *Le lait*, vol. **71**, 525-540.
- [44]- **Piard, J.C et Desmazeaud, M.J**, 1992. Inhibiting factors by lactic acid bacteria.2.Bacteriocins and other antibacterial substances. *Le lait*. Vol **72** 142.
- [45]- **Pierre, P et Grasse**, 1995. Traité de zoologie. Anatomie systématique biologie : mammifères. Tome XXII. *Masson et ses éditeurs*, 1298.
- [46]- **Prescott, I. M., Harley, Y.P et Klein, D. A.**, 2003. Microbiologie 2^{ème} édition. de *hæck*, 550 -703.
- [47]- **Pucci M.J., Vedanutha B., Kunka S et Vandenberg, P.A**, 1988. Inhibition

- of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocine PA-Z production by *Pediococcus acidolactici* PAC. 1.0. *Applied Environmental Microbiology*. 54,2349-2353.
- [48]- Reinheimer, J.A., Demkou, M.R et Candotim, C. 1990. Inhibition of loliiform bacteria by lactic cultur. *The Austration journal of dairy technology*. 5-9.
- [49]- Richard, D., Anselme, B., Buehn, J.C et Chaffard, J, 1998. Physiologie des animaux. Constriction des organisme homéostasie et fonction des relation. Tome 2. Nathan, 237.
- [50]- Robin, J-M et Rouchy, M, 2001. Les probiotiques. *Nutrithérapie INFO*, 1-4.
- [51]- Sachack, M. M et Marth, E H., 1988. Interaction between lactic acid bacteria and some food borne pathogens. *Culture dairy products journal*, 23N°4, 14-20.
- [52]- Salminen, S et Wricht, A.V, 1993. Lactic acid bacteria *Marcel Dekker*, 1-15.
- [53]- Schilliger, V, 1990. Bacteriocin of Lactic acid bacteria. *Biotechnology and food safety*, 55-74.
- [54]- Serot, T., Dousset, X., Zucca, J et Torcatis, N, 1990. Mise en évidence et purification partielle de substance antibactérienne produites par *Leuconostocmesentevoides* et *Latobacillus plantarum* isolés de grains de kéfir, 177- 184.
- [55]- Stiles M.E, 1994. Bacteriocins produced by *Leuconstoc* species. *J.Dairy Sci* Vol 77, 2718-2724.
- [56]- Sutra, L., Federighi, M et Joove, J.L, 1998. Manuel de bactériologie alimentaire. *Polytechnica*, 235-259.
- [57]- Vanderberg, P.A, 1993. Lactic Acid bacteria, their metabolic product and interference with microbial growth. *F.E.M.S. microbial*. 12, 38-49.
- [58]- Vent, G, 1999. Bien élever et soigner le lapin . 1-3. 29-53.

Annexes

Annexe 7

Réactifs

1. Violet de gentiane.

- Violet de gentiane 1g
- Ethanol a 90% 10g
- Phénol 2g
- Eau distillée 100g

2. Fushine de Ziel.

- Fushine basique 1g
- Alcool éthylique a 90 % 10 ml
- Phénol 5g
- Eau distillée 100 ml

2. Lugol.

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

3. Kovacs.

- Alcool amylique ou isoamylique 150ml
- P. étimethylaminobenzaldéhyde 10g
- Acide chlorhydrique concentré 50ml
- Avec l'ajout de l'acide en dernier et lentement conserver à +4 °C

4. Réactifs de Voges Proskauer pour la recherche de l'acétoïne.

VP₁

- Hydroxyde de potassium 40g
- Eau déminéralisée 100ml

VP_{II}

➤ Alpha naphthol

6g

➤ Ethanol

100g

Annexe 2

Les milieux de culture

Gélose HEKTOEN.

➤ Protéose – peptone	12g
➤ Extrait de levure	3g
➤ Chlorure de sodium	5g
➤ Sels biliaires	9g
➤ Citrate de fer ammoniacal	1.5g
➤ Salicine	2g
➤ Lactose	12g
➤ Saccharose	12g
➤ Fushine acide	0,1g
➤ Bleu de bromothymol	65g
➤ Gélose	13mg

Mannitol mobilité.

➤ Peptone	20g
➤ Nitrate de potassium	1g
➤ Mannitol	2g
➤ Rouge de phénol	40g
➤ Gélose	4g

TSI.

➤ Peptone	20g
➤ Extrait de viande	3g
➤ Extrait de levure	3g
➤ Chlorure de sodium	5g
➤ Glucose	1g
➤ Lactose	10g
➤ Saccharose	0.5g

➤ Thiosulfate de sodium	0.5g
➤ Rouge de phénol	25g
➤ Gélose	12g

Citrate de SIMMONS.

➤ Formule en grammes par litre d'eau distillée.	
➤ Sulfate de magnésium	0.2g
➤ Citrate de sodium	2g
➤ Chlorure	5ml
➤ Phosphate d'ammonium	0.2ml
➤ Phosphate d'ammonium monosodique	0.8
➤ Bleu de bromothymol	0.08g
➤ Agar	15g

MEVAG.

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

Clark et Lubs.

➤ Peptone	20g
➤ Chlorure de sodium	5g
➤ Phosphaté disque	9g
➤ Phosphate monopotassique	1.5g

pH = 7.2 Autoclave 30 mn à 115 °C

Milieu Moeller ODC.

➤ Ornithine	5g
➤ Extrait de levure	3g
➤ Chlorure de sodium	5g
➤ Glucose	1g

Milieu Moeller ADH.

➤ L'arginine	5g
➤ Extrait de levure	3g
➤ Chlorure de sodium	5g
➤ Glucose	1g
➤ Pourpre de bromocrésol	16 mg

Milieu Moeller LDC.

➤ Lysine	5g
➤ Extrait de levure	3g
➤ Chlorure de sodium	5g
➤ Glucose	1g
➤ Pourpre de bromocrésol	16g

Bouillon nutritif.

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

(Facultatif selon la formule)

PH = 7.2. Autoclaver 20 mn à 120°C

VRBG (Gélose Biliée au Cristal Violet et au Rouge neutre).

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

Annexe 3

Milieu MRS.

➤ Peptone	10g
➤ Extrait de viande	8g
➤ Extrait de levure	4g
➤ Acétate de sodium	5g
➤ Phosphate bipotassique	2g
➤ Citrate d'ammonium, 7H ₂ O	0,2g
➤ Sulfate de manganèse, 4H ₂ O	0,05g
➤ Glucose	20g
➤ Tween 80	1ml
➤ Eau distillée qsp	100 ml
➤ pH= 6,2	

Stérilisation 15 mn à 120°C

Milieu M 17. Milieu de base

➤ Peptone trypsine de caséine	2,5g
➤ Peptones peptiques de viande	2,5 g
➤ Peptone papainique de soja	5g
➤ Extrait de viande	5g
➤ Extrait de levure déshydrate	2,5g
➤ Glycérophosphate de sodium	19g
➤ Sulfate de magnésium, 7h ₂ O	0,25g
➤ Acide axarrique	0,5g
➤ Agar	8 à 18g
➤ Eau	950 ml

Dissoudre les ingrédients dans l'eau à ébullition. Laisser refroidir à 50 °C.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,1 à 7,2.

Stérilisation 20 mn à 120°C.

Résumé

Notre étude a été menée sur la flore endogène du lapin dont 14 souches ont été isolées à partir du cæcum de ce dernier.

L'étude in vitro des interactions bactériennes et l'effet de filtrat de lyse a déterminé une bonne pouvoir antagoniste de notre souche lactique vis-à-vis des 14 souches d'entérobactéries.

L'étude in vivo a révélé l'effet de régime alimentaire sur la survie de *L. plantarum* « BJ0021 » dans les étages de tube digestif du lapin.

Mots clés :

Probiotique, lapin, survie, interaction, régime alimentaire.

Summary

Our study was done on the endogenous flora of rabbit, which 14 strains were isolate from the caecum of the rabbit.

The in vitro study of the bacterial interactions and the effect of filtrate of lysis determined a good antagonistic aptitude of our lactic acid bacteria regards the 14 strains of Enterobacteria.

Study in vivo has shown the effect of dietary ration on the survival of *L. plantarum* "BJ0021" in the stages of digestive tract of rabbit.

Key words:

Probiotic, rabbit, survival, interaction, dietary ration.

المخلص

لقد تمت دراستنا على الفلورة الداخلية للارنب، بحيث تم عزل 14 نوع من اعور هذا الأخير.
إن التداخلات البكتيرية "صناعيا" ورشاحتها بينت قدرة تضاد عالية للبكتيرية المخمرة للحليب اتجاه 14 نوع من "Enterobacteries".
الدراسة الحيوية بينت تأثير النمط الغذائي على مدة بقاء *L. plantarum* داخل الجهاز الهضمي للارنب.

كلمات المفتاح:

من أجل الحياة (بروبيوتيك)، أرنب، البقاء، تداخلات، نمط الغذاء