

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Hassiba Benbouali de Chlef

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Nutrition et Sciences des Aliments



# THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

## DOCTORAT

Filière : *Sciences Alimentaires et Nutrition humaine*

Spécialité : *Sciences des aliments*

Par

**TOUALBIA Meryem**

Thème :

---

### **Effet de certaines bactéries lactiques sur quelques bactéries pathogènes responsable de diarrhées infantiles**

---

Soutenue le ...../...../..... , devant le jury composé de :

ALLAM Rachida	Professeur	Université Hassiba Ben Bouali Chlef	Présidente
DELMi BOURAS Abd El Kader	Professeur	Université Hassiba Ben Bouali Chlef	Rapporteur
KOICHE Malika	MCA	Université Hassiba Ben Bouali Chlef	Co-encadreur
BEKKADA Mohamed	Professeur	Université El-Wancharissi Tissemsilt	Examineur
DOUMANDJI Amel	Professeur	Université Saad Dahleb Blida	Examineur
MEZIANE Malika	MCA	Université Hassiba Ben Bouali Chlef	Examineur

**2018-2019**

## **Remerciement**

Avant tout, je remercie Dieu le Tous Puissant de m'avoir donné la force, le courage, la santé et la patience pour pouvoir accomplir ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements et ma gratitude la plus profonde à tous ceux qui m'ont aidé à l'accomplissement de cette modeste thèse. Je remercie chaleureusement mon promoteur Professeur DELMI BOURAS A.E.K., pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ses nombreux conseils qui ont contribué à la réalisation de ce travail, pour la confiance qu'il m'a accordé, et son soutien scientifique et moral tout au long du travail. J'exprime toute ma reconnaissance à mon Co-encadreur Dr. KOICHE Malika, pour sa disponibilité et pour sa rigueur scientifique. Qu'elle trouve le témoignage de ma haute considération et de mon profond respect.

Je remercie également tous les membres du jury pour l'honneur que vous m'avez fait afin d'examiner mon travail et pour le temps consacré à la lecture de ma thèse: la Présidente de jury Professeur ALLEM Rachida et les examinateurs: Professeur BEKKADA Mohamed, Professeur DOUMANDJI Amel et Dr. MEZIANE Malika.

Je voudrais dire un merci tout spécial à Professeur AYCHOUNI M. à qui je dois beaucoup pour ses nombreux avis, sa disponibilité en tout temps, son aide de toute sorte et ses encouragements très précieux. Toute ma gratitude va aussi à Monsieur KERKOUD Mohamed pour son aide et son savoir faire dans la partie moléculaire.

Mes remerciements vont aussi aux sœurs SADOUD Meriem, MEDJKANE Meriem, NEMAR Fouzia, LAISSAOUI Aicha et NAAS Hiba pour leur esprit d'équipe et leur coopération professionnelle.

J'adresse également mes remerciements aux membres de ma famille pour leur soutien et leur patience, dont ils m'ont fait preuve et leur confiance en moi, ce qui m'aidait moralement pour faire aboutir cette thèse. Au risque de me répéter, j'exprime mes vifs remerciements à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de cette thèse.

## ***Dédicace***

***Je commence par rendre grâce à dieu et à sa bonté, pour la patience, la compétence et le courage qu'il m'a donné pour arriver à ce stade.***

***Avec tout mon amour éternel et avec l'intensité de mes émotions,***

***Je dédie ce modeste travail à***

***Mon cher père et ma chère maman qui ont veillé à ce que je suis arrivée maintenant. Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.***

***Mon cher mari Dilmi qui a su m'apporter son réconfort et son aide pendant tout les moments difficiles et à qui je lui souhaite beaucoup de réussite et de santé.***

***Mes frères et sœurs : Amine, Youcef, Leila et Hadil qui ont toujours été présents pour moi et qui ont fourni tellement d'efforts pour m'aider tout au long de ma vie.***

***Ma belle mère et ma belle famille pour leur soutien et leur sympathie.***

***Mes petites princesses Insaf, Noursine et Rajae Alae, vous êtes mon bonheur, ma joie et ma fierté, que dieu vous protège.***

***Je clos mes remerciements en dédiant ce travail aux mes sœurs amies que j'ai eu la chance de les avoir toujours à mes côtés, qui m'ont soutenue tout au long de ces années (Meryouma, Fouzette, Mimi, Aicha, Hiba, Sakina et Soumia). Que dieu vous offre une vie pleine de joie, bonheur et de réussite.***

## ملخص

من أجل تثبيت الجراثيم المعوية ومنع أو علاج العدوى المعوية، فقد اقترح لعقود من الزمن استخدام ما يسمى بـ بكتيريا اللبنة "البروبيوتيك". إن استهلاك هذه البكتيريا، التي تعتبر مكونات طبيعية للجراثيم المعوية، سيكون له آثار مفيدة على الصحة. ومع ذلك، فقد تم دراسة دورهم الوقائي أو العلاجي المحتمل القليل.

في هذا العمل، تم عزل 120 سلالة من البكتيريا المسؤولة عن الإسهال الطفل في مختبر مستشفى مروان عابد في الشطية - الشلف. أوضحت دراسة الخصائص البيوكيميائية أن هذه العزلات تنتمي إلى 3 أنواع بكتيرية: *Proteus mirabilis* و *Salmonella enterica subsp. Diarizonae*, 7.33% و *Echerichia fergusonii* 92% و *DNAr 16S* (تم تأكيد هويتهم عن طريق تسلسل جيني).

و لقد تم عزل 100 سلالة من بكتيريا اللبنة من عينات مختلفة من حليب البقر و الماعز و حليب الإبل، التي تم جمعها من مناطق مختلفة في الجزائر. حيث أظهرت دراسة الخصائص المجهرية و المورفولوجية و البيوكيميائية أن 70 سلالة تنتمي إلى جنس *Lactobacillus*.

كما لقد تم دراسة اثر استهلاك حليب مخثر ب *Lactobacillus* على الاضطرابات المعوية و الغشاء المعوي في حالة العدوى ب EPEC و التداوي بالمضادات الحيوية تبين فعالية *Lactobacillus sp.* ضد EPEC و هذا حتى بوجود المضاد الحيوي الاموكسيسيلين بنسبة عالية تقارب 100%. إن دراسة الأنسجة المعوية للأرانب المعالجة ب *Lactobacillus sp.* تبين مدى نجاعة هذه البكتيريا في الحد من الآثار السلبية لل EPEC و الاموكسيسيلين على الأغشية المعوية كما لقد لوحظ اختفاء الالتهابات المعوية التي يعاني منها الأرانب التي لم يتم معالجتها بال *Lactobacillus sp.*

على ضوء هذه النتائج يمكننا أن ننصح باستعمال الحليب المخثر ببكتيرية ال *Lactobacillus sp.* في حالة الإسهال لتفادي هذا الأخير و آثاره السلبية (الالتهابات) على الأغشية المعوية و بصفة عامة على صحة الرضيع.

**الكلمات المفتاحية:** البروبيوتيك ، *Lactobacillus plantarum* ، الإسهال لدى الأطفال، معايير الاختيار، نشاط مضاد للجراثيم.

## Résumé

Afin de stabiliser le microbiote intestinal et prévenir ou traiter les infections entériques, il est suggéré depuis des décennies d'utiliser des bactéries lactiques dites « probiotiques ». La consommation de ces bactéries, qui sont des composants normaux du microbiote intestinal, aurait des effets bénéfiques sur la santé. Cependant, leur éventuel rôle prophylactique ou thérapeutique n'a été que très peu étudié.

Dans ce travail on a isolé 150 souches de bactéries responsables des diarrhées infantiles dans le laboratoire de l'hôpital Merouane Abed de Chettia-Chlef. L'étude des caractéristiques biochimiques a montré que ces isolats appartiennent à 3 espèces bactériennes : *Echerichia fergusonii* (92%), *Salmonella enterica subsp. Diarizonae* (7,33%) et *Proteus mirabilis* (0,66%). Leur identité a été confirmée par séquençage du gène ADNr 16S.

100 souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir de différents échantillons de lait cru de vache, de chèvre et de chamelle collectés de différentes régions en Algérie. L'étude des caractéristiques phénotypique, morphologique et biochimique a montré que 70 souches appartenant au genre *Lactobacillus*. L'identification par galerie API 20E a abouti à différentes espèces : *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. gasseri*, *Lb. reuteri* et *Lb. acidophilus*.

Suite à l'étude de la résistance aux conditions hostiles du tractus digestif, une souche à haut profil probiotique et à forte activité antibactérienne a été sélectionnée. Elle a été identifiée et déposée au GenBank suite au séquençage du gène ADNr 16S qui a montré qu'il s'agit de *Lactobacillus plantarum*.

L'étude *in vivo* sur les lapins holoxéniques montre que la croissance de *Lb. plantarum* n'est affectée ni par la présence d'EPEC ni par l'administration d'amoxicilline. A l'inverse, l'effet antagoniste de *Lb. plantarum* à l'égard d'EPEC a été observé avec des taux d'inhibition atteignant 100% que se soit en présence d'amoxicilline ou pas, avec des taux de survie de 100% contre un taux de 0% pour les lots ou les lapins n'ont pas ingéré de *Lb. plantarum*. Effectivement, les résultats des observations macroscopiques et microscopiques des coupes histologiques réalisées à partir du tube digestif (intestin grêle et colon) après dissection de l'ensemble des lapins montrent que les lapins qui ont reçu l'amoxicilline associé ou non à une contamination à EPEC souffraient d'une sévère atrophie intestinale avec une dégradation des tissus intestinaux (paroi et muqueuse). Néanmoins, un impact moins important est observé chez les lapins qui ont subi une antibiothérapie associée à une contamination avec EPEC et qui ont ingéré du lait fermenté à *Lb. plantarum*. Par contre, aucune anomalie pathologique n'est observée chez les lapins qui ont ingéré du lait fermenté à *Lb. plantarum* associé à une contamination à EPEC ou à une prise d'amoxicilline. Ces résultats montrent que le nombre et la durée de survie de *Lb. plantarum* au niveau du tube digestif du lapin pendant l'ingestion du lait fermenté à *Lb. plantarum* et après arrêt de celui-ci ont permis à ce dernier d'exercer des effets probiotiques très satisfaisants.

**Mots clés :** Probiotique, *Lactobacillus plantarum*, diarrhées infantiles, survie, activité antibactérienne.

## Abstrat

In order to stabilize the intestinal microbiota and prevent or treat enteric infections, it has been suggested for decades to use "probiotic" lactic acid bacteria. The consumption of these bacteria, which are normal components of the intestinal microbiota, would have beneficial effects on health. However, their possible prophylactic or therapeutic role has been little studied.

In this work, 150 strains of bacteria responsible for infantile diarrhea were isolated in the laboratory of Merouane Abed hospital in Chettia-Chlef. The study of biochemical characteristics showed that these isolates belong to 3 bacterial species: *Echerichia fergusonii* (92%), *Salmonella enterica subsp. Diarizonae* (7.33%) and *Proteus mirabilis* (0.66%). Their identity was confirmed by sequencing of the 16S rDNA gene.

100 strains of lactic acid bacteria were isolated from different samples of raw cow, goat and camel milk collected from different regions in Algeria. The study of phenotypic, morphological and biochemical characteristics showed that 70 strains belonging to the genus *Lactobacillus*. The identification by API 20E gallery has resulted in different species: *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. Gasseri*, *Lb. reuteri* and *Lb. acidophilus*.

Following the study of resistance to hostile conditions of the digestive tract, a high profile probiotic strain with strong antibacterial activity was selected. It was identified and deposited at GenBank following sequencing of the 16S rDNA gene that showed it to be *Lactobacillus platarum*.

The *in vivo* study on holoxenic rabbits shows that the growth of *Lb. plantarum* is not affected by the presence of EPEC or the administration of amoxicillin. Conversely, the antagonistic effect of *Lb. plantarum* against EPEC was observed with inhibition rates up to 100% whether in the presence of amoxicillin or not, with 100% survival rates versus 0% for batches or rabbits did not ingest *Lb. plantarum*. Indeed, the results of macroscopic and microscopic observations of histological sections made from the digestive tract (small intestine and colon) after dissection of all rabbits show that rabbits that received amoxicillin with or without EPEC contamination suffered from severe intestinal atrophy with a deterioration of the intestinal tissues (wall and mucosa). Nevertheless, less impact is observed in rabbits that have received antibiotic therapy associated with EPEC contamination and ingested fermented milk with *Lactobacillus plantarum*. On the other hand, no pathological anomaly is observed in the rabbits who ingested fermented milk associated with EPEC contamination or amoxicillin intake. These results show that the number and duration of survival of *Lb. plantarum* in the gastrointestinal tract of the rabbit during ingestion of fermented milk at *Lb. plantarum* and after stopping it have allowed the latter to exercise very satisfactory probiotic effects.

**Key words:** Probiotic, *Lactobacillus plantarum*, infantile diarrhea, survival, antibacterial activity.

## Liste d'abréviations

**%** : Pour cent

**°C** : Degré Celsius

**g** : Gramme

**h** : Heure

**min** : Minute

**mL** : Millilitre

**mm** : Millimètre

**ATP** : Adenosine triphosphate

**DA** : Diarrhée aigue

**DAEC** : Diffuse-Adhering *Escherichia coli*

**EAGGEC** : EnteroAggregative *Escherichia coli*

**EIEC** : Entéroinvasive *Escherichia coli*

***E. coli*** : *Escherichia coli*

**EPEC** : Enteropathgenic *Escherichia coli*

**ETEC** : Enterotoxinogenic *Escherichia coli*

**FAO** : Food and Agriculture Organization

**Lb** : *Lactobacillus*

**MH** : Muller Hinton

**MRS** : Man Rogosa Sharp

**OMS** : Organisation Mondiale de Santé

**ROV** : Réhydratation par voie orale

**SRO** : Soluté de réhydratation orale

**UFC** : Unité formant colonies

**BET** : Bromure d'Ethidium

**BL** : Bactéries Lactiques

**BLAST** : Basic Local Alignment Search Tool

**BSH** : Biles Salts Hydrolase

**GI** : Gastro-Intestinal

**GRAS** : Generally Recognized As Safe

**Lb.** : *Lactobacillus*

**MDR** : Multi Drug Resistance

**MPM** : Marqueur de Poids Moléculaire

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

## Liste des tableaux

**Tableau I :** Répartition des agents entéropathogènes selon leur mode d'action (Dupont et *al.*, 1999).

**Tableau II :** Souches de lactobacilles probiotiques utilisées dans les diarrhées chez l'enfant (WGO, 2008).

**Tableau III :** Réactifs utilisés pour la réaction PCR

**Tableau IV:** Distribution des nourrissons hospitalisés par diarrhées selon l'âge (2011-2012).

**Tableau V:** Caractères morphologiques des BL isolées sur MRS.

**Tableau VI:** L'activité antimicrobienne des souches lactiques par la méthode des disques.

## Liste des figures

**Figure 01 :** Schéma des principales voies métaboliques des lactobacilles (Perry *et al.*, 2004 ).

**Figure 02 :** Les étapes de la coproculture systématique.

**Figure 03:** Schéma général d'isolement et de purification des bactéries lactiques.

**Figure 04 :** Amplification de fragments d'ADN *in vitro* : la PCR.

**Figure 05 :** Répartitions des cas positifs et négatifs dans les échantillons de selles étudiés.

**Figure 06 :** Répartition des nourrissons diarrhéiques selon le type d'allaitement.

**Figure 07 :** Distribution des différents genres bactériens isolés à partir des coprocultures.

**Figure 08:** L'effet inhibiteur de surnagent de la souche LBB31 sur *Escherichia sp.* (A) et *salmonelle sp.* (B).

**Figure 09 :** Croissance de LBB39, LBB28, LBB50, LBB31, LBB37 à pH 6.5 en absence de sels biliaires en fonction du temps.

**Figure10:** Croissance de LBB39, LBB28, LBB50, LBB31, LBB37 à pH 6.5 en présence de sels biliaires en fonction du temps.

**Figure 11 :** Croissance de LBB39, LBB28, LBB50, LBB31, LBB37 à pH 4.5 en absence de sels biliaires en fonction du temps

**Figure 12 :** Croissance de LBB39, LBB28, LBB50, LBB31, LBB37à pH 4.5 en présence de sels biliaires en fonction du temps.

**Figure 13 :** Croissance de LBB39, LBB28, LBB50, LBB31, LBB37 à pH 2.5 en absence de sels biliaires en fonction du temps.

**Figure 14:** Croissance de LBB39, LBB28, LBB50, LBB31, LBB37 à pH 2.5 en présence de sels biliaires en fonction du temps.

**Figure 15 :** Migration sur gel d'agarose des ADN amplifiés des souches isolées.

**Figure 16 :** Une homologie (identité) de 99% de séquence de *Salmonella sp.* avec *Salmonella enterica subsp. Diarizonae*.

**Figure 17:** Une homologie (identité) de 98% de séquence d'*Escherichia sp.* avec *Escherichia fergusonii*.

**Figure 18:** Une homologie (identité) de 98% de séquence de *Proteus sp.* avec *Proteus mirabilis*.

**Figure 19:** Une homologie (identité) de 100% de séquence de *Lactobacillus sp.* avec *Lactobacillus planctarum*.

**Figure 20 :** Evolution du nombre d'EPEC dans les fèces des lapins.

**Figure 21 :** Evolution du nombre des Lactobacilles dans les fèces des lapins.

**Figure 22:** Observations microscopiques des coupes histologiques à partir des intestins des lapins du lot 1 (Antibiotiques uniquement) qui présentent une atrophie intestinale avec dégradation de la muqueuse intestinale.

**Figure 23:** Observations microscopiques des coupes histologiques à partir des intestins des lapins du lot 6 (EPEC uniquement) qui présentent une atrophie intestinale avec dégradation de la muqueuse intestinale.

**Figure 24:** Observations microscopiques des coupes histologiques à partir des intestins des lapins du lot 2 (EPEC+ antibiotique) qui présentent une atrophie intestinale avec dégradation de la muqueuse intestinale.

**Figure 25 :** Observations microscopiques des coupes histologiques à partir des intestins des lapins du lot 6 (Antibiotique + Lactobacilles + EPEC).

**Figure 26 :** Observations microscopiques des coupes histologiques à partir des intestins des lapins du lot 4 (Lactobacilles + EPEC).

**Figure 27 :** Observations microscopiques des coupes histologiques à partir des intestins des lapins du lot 3 (Antibiotique + Lactobacilles).

**Figure 28 :** Observations microscopiques des coupes histologiques à partir des intestins des lapins du lot 5 (Antibiotiques + traitement curatif par les lactobacilles).

## Table des matières

Page

Remerciement	
ملخص	
Résumé	
Abstrat	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	
<b>Chapitre I : les diarrhées infantiles</b>	
1. Généralités.....	03
2. Définition des diarrhées infantiles.....	03
3. Mécanismes de la diarrhée.....	03
4. Types de diarrhée infantile.....	04
4.1. Diarrhée aigue DA.....	04
4.2. Diarrhée chronique.....	05
5. Origine des diarrhées chez le nourrisson.....	05
5.1. Diarrhée infectieuse.....	05
5.1.1. D'origine virale.....	05
5.1.2. D'origine parasitaire.....	06
5.1.3. D'origine fongique.....	06
5.1.4. D'origine bactérienne.....	07
5.1.4.1. <i>Salmonella</i> .....	07
• <i>Pathogénie et symptômes associés aux salmonelles</i> .....	07
• <i>Le processus infectieux de Salmonella</i> .....	08
5.1.4.2. <i>Escherichia coli</i> .....	08
• <i>Le pouvoir pathogène chez l'homme</i> .....	08
5.1.4.3. <i>Shigella</i> .....	09
• <i>Pathogénicité de Shigella</i> .....	10
5.1.4.4. <i>Campylobacter</i> .....	10
5.1.4.5. <i>Yersinia</i> .....	10

5.1.4.6. <i>Vibrio cholerae</i> O1.....	11
5.1.4.7. <i>Staphylococcus</i> .....	11
5.1.4.8. Autre agents bactériens.....	11
5.2. Diarrhée non-infectieuse.....	11
5.2.1. Origine médicamenteuse.....	11
5.2.2. Diarrhée associée à une infection extra-digestive.....	12
5.2.3. Le colon irritable (colopathie fonctionnelle).....	12
5.2.4. Allergie alimentaire.....	12
6. Signes cliniques .....	12
7. Conséquences de la diarrhée.....	12
7.1.La déshydratation.....	13
7.2. La dénutrition .....	13
8. Traitement des diarrhées.....	13
8.1. Traitement nutritionnel.....	13
8.1.1. Réhydratation par voie orale.....	13
8.1.2. Réhydratation intraveineuse.....	14
8.1.3. Réalimentation précoce.....	14
8.2. Traitement médicamenteux.....	14
8.2.1. Inhibiteurs de la motricité intestinale et anti-sécrétoires.....	14
8.2.2. Agents pharmacologiques .....	15
8.2.3. Antibiothérapie.....	15
8.2.4. Antiseptiques intestinaux.....	15
8.3.Les probiotiques.....	15
8.4. Traitement préventif.....	16
<b>Chapitre II : L'effet probiotique des lactobacilles sur la diarrhée infantile</b>	
1. Généralités .....	17
2. Le genre <i>Lactobacillus</i> .....	17
2.1.Habitat .....	18
2.2.Caractéristiques générales .....	18
2.3. Besoins nutritionnels.....	19
2.3.1. Acides aminés.....	19
2.3.2. Vitamines .....	19
2.3.3. Bases azotées .....	20

2.3.4. Cations.....	20
2.4.Voies métaboliques.....	20
2.4.1. Voie d'Embden Meyerhof Parnas (Homofermentation ) .....	20
2.4.2. Voie de Dickens - Horecker et d'Entner Doudoroff (Hétérofermentation).....	20
3. Composés antimicrobiens produits par les lactobacilles.....	22
3.1.Acides organiques.....	22
3.2.Dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> ).....	22
3.3.Peroxyde d'hydrogène.....	23
3.4.Production de bactériocines .....	23
4. Rôle technologique et intérêt probiotiques des lactobacilles .....	24
4.1.Rôle de <i>Lactobacillus</i> dans l'industrie agroalimentaire.....	24
4.2.Lactobacilles et nutrition.....	24
4.2.1. Métabolisme de sucre.....	25
4.2.2. Dégradation de facteurs antinutritionnels.....	25
4.2.3. Absorption de minéraux.....	26
4.2.4. Synthèse de vitamines par les bactéries lactiques .....	26
4.3.Lactobacilles et prévention des maladies.....	26
4.3.1. Utilisation potentielle contre les maladies cardiovasculaires.....	26
4.3.2. Utilisation des bactéries lactiques pour dégrader l'oxalate.....	27
4.3.3. Lactobacilles et réduction de la perception de la douleur.....	27
4.3.4. Lactobacilles et maladies inflammatoires chroniques intestinales.....	27
4.3.4.1.Les diarrhées infectieuses infantiles.....	28
4.3.4.2.Diarrhées des voyageurs.....	29
4.3.4.3.Diarrhées à <i>Clostridium difficile</i> .....	30
4.3.5. Allergies.....	30
<b>Chapitre III : Matériel et méthodes</b>	
1. Matériel.....	31
1.1.Matériel biologique .....	31
1.1.1. Selles des enfants diarrhéiques .....	31
1.1.2. Lait .....	31
1.1.3. Souche de référence .....	31
1.2. Milieux de culture .....	32
2. Méthodes.....	32

1 <sup>ère</sup> partie : Isolement des bactéries pathogènes.....	32
1.1. Recueil et transport des échantillons.....	32
1.2. Examen macroscopique des selles.....	32
1.3. Diagnostic bactériologique des selles .....	33
1.3.1. Préparation de la suspension des selles.....	33
1.3.2. Coproculture systématique.....	33
1.3.2.1. Isolement direct.....	33
1.3.2.2. Enrichissement .....	33
1.3.2.3. Isolement à partir les deux enrichissements .....	34
1.3.2.4. Etude des caractères culturaux.....	36
1.3.2.5. Etude des caractères morphologiques.....	36
1.3.2.6. Identification biochimique.....	36
➤ Test des 3 sucres.....	36
➤ Test mannitol-mobilité.....	37
➤ Test de Simmons .....	37
➤ Production d'acétone .....	37
➤ Recherche de la production d'indole .....	37
➤ Recherche de la $\beta$ -galactosidase .....	37
➤ Recherche de l'uréase et du tryptophane désaminase .....	37
➤ Recherche de nitrate réductase .....	38
➤ Recherche de l'oxydase .....	38
➤ Recherche de L.D.O ; O.D.C et ADH.....	38
➤ Galerie API 20E .....	38
2 <sup>ème</sup> partie : Isolement des bactéries lactiques.....	39
2.1. Préparation des dilutions décimales.....	39
2.2. Isolement et purification .....	39
2.2.1. Isolement.....	39
2.2.2 Purification .....	39
2.3. Etude des caractères culturaux.....	41
2.4. Etude biochimique .....	41
2.4.1. Test de catalase.....	41
2.4.2. Dégradation des sucres (Glucose, saccharose, arabinose, maltose, xylose, lactose, galactose, raffinose, salicine).....	41

2.4.3. Etude du type fermentaire .....	41
2.4.3.1.A partir du glucose.....	41
2.4.3.2.A partir du gluconate.....	42
2.4.4. Identification par galerie API 20E(bio Mérieux).....	42
2.5. Conservation des isolats.....	42
2.5.1. La conservation à court terme .....	42
2.5.2. La conservation à long terme .....	42
2.6. Caractérisation du potentiel probiotique des souches lactiques .....	42
2.6.1. Caractérisation de l'activité antibactérienne .....	43
2.6.2. Survie des souches dans les conditions extrêmes du tube digestif .....	44
3 <sup>ème</sup> partie : Identification moléculaire des bactéries isolées par séquençage de l'ADNr16S.....	45
3.1.Extraction de l'ADN génomique .....	45
3.2.Amplification du gène de l'ADNr 16S par PCR.....	45
3.3.L'électrophorèse sur gel d'agaros.. .....	47
3.4.Le séquençage des gènes amplifiés ADNr 16S.....	48
3.5.Identification des souches par NCBI>BLAST.....	48
4 <sup>ème</sup> partie: Etude <i>in vivo</i> de l'effet antagoniste de la souche <i>Lactobacillus sp.</i> vis-à-vis <i>Escherichia coli</i> en présence et en absence d'antibiotique.....	49
4.1.Conditions d'élevage.....	49
4.2.Préparation du lait.....	50
4.2.1. Préparation du lait fermenté .....	50
4.3.Préparation des doses d'antibiotiques.....	50
4.4.Détermination de la flore intestinale des lapins.....	51
4.5.Administration des laits fermentés par les germes testés aux lapins.....	51
4.6.Recueil des selles.....	52
4.7.Analyse microbiologique .....	52
4.8.Analyse statistique.....	52
4.9.Etude histologique après dissection des lapins.....	53
4.9.1. Dissection des lapins .....	53
4.9.2. Préparation des coupes histologiques.....	53

<b>Chapitre IV : Résultats et discussion</b>	
I. Isolement et identification des bactéries pathogènes.....	54
1.1.Répartition des cas positifs et négatifs dans les échantillons étudiés.....	54
1.2.Examen bactériologique (Coproculture).....	55
• Isolement de différentes espèces bactériennes responsables de diarrhées.....	55
1.3.Répartition des infections intestinales d'origine bactérienne selon le mode d'allaitement .....	57
1.4.Distribution des différents genres bactériens isolés à partir des coprocultures...	58
1.5.Répartition des infections intestinales d'origine bactérienne selon l'âge.....	60
II. Isolement et identification des bactéries lactiques.....	61
2.1.Isolement et identification de bactéries lactiques.....	61
2.2.Identification des isolats obtenus.....	61
2.2.1. Etude des caractères morphologiques.....	61
A) <i>Examen macroscopique</i> .....	61
B) <i>Examen microscopique</i> .....	62
2.2.2. Etude de caractères biochimiques.....	63
A) <i>Recherche de la catalase</i> .....	63
B) <i>Type fermentaire</i> .....	63
C) <i>Fermentation des hydrates de carbonés</i> .....	63
2.3. Caractérisation probiotique des lactobacilles isolés.....	64
2.3.1. Activité antibactérienne des lactobacilles isolés .....	64
2.3.2. Etude de la survie des souches lactiques dans les conditions extrêmes du tube digestif.....	69
a) <i>Survie à pH 6.5 en absence et en présence de sels biliaires</i> .....	69
b) <i>Survie à pH 4.5 en absence et en présence de sels biliaires</i> .....	71
c) <i>Survie à pH 2.5 en absence et en présence de sels biliaires</i> .....	73
III. Identification moléculaire .....	76
✓ <i>Résultats de l'analyse In silico des séquences</i> .....	78
VI.Etude <i>in vivo</i> de l'activité antagoniste de <i>Lactobacillus plantarum</i> vis-à-vis <i>E. coli</i> entéropathogène (EPEC).....	81
4.1.Recherche d' <i>E. coli</i> dans le lait premier âge .....	82
4.2.Evolution du nombre de <i>Lb. plantarum</i> et d'EPEC dans les fèces des lapins.....	82
4.3.Etude histologique .....	87

Conclusion.....	100
Références bibliographiques.....	103
Annexes	

## INTRODUCTION

Les maladies diarrhéiques du nourrisson et de l'enfant constituent une des principales causes de mortalité et de morbidité dans les pays en développement, et une cause majeure de malnutrition et de retard de croissance. L'OMS estime le nombre d'épisodes qui frappent annuellement les enfants de moins de 5 ans à 1.3 milliards et à 3.5 millions le nombre de décès attribuables à ces maladies (UNICEF/OMS, 2009).

En Algérie, selon le rapport établi en 2005 par le « programme national de lutte contre les maladies diarrhéiques et les infections respiratoires aiguës des enfants de (0 à 04 ans) révolus » les diarrhées sont considérées comme la première cause de mortalité infantile et la deuxième cause de morbidité après les infections respiratoires aiguës. L'incidence annuelle est de 2.5 épisodes de diarrhée par enfant et par an soit 10 millions de cas. La répartition des cas est saisonnière avec un pic estival, la déshydratation est responsable de grand nombre des décès par diarrhée. Les causes sont étroitement liées à une mauvaise hygiène, à la malnutrition et le manque de structures sanitaires.

Les traitements antibiotiques usuels n'étant pas toujours efficaces à cause de l'apparition de la résistance aux antibiotiques ainsi qu'à leurs effets secondaires (Korwin, 2004). A une époque où nous avons besoin de nouvelles façons de contrôler et de traiter les infections microbiennes, des stratégies se développent pour élargir les applications des probiotiques en tant qu'aliments fonctionnels (Nagpol et *al.*, 2012). Dans ce contexte, une approche prometteuse est développée, les probiotiques, pourraient combiner profil d'innocuité favorable avec amélioration de la nutrition et de fonction du microbiote intestinal et par conséquent, peuvent constituer une bonne stratégie de lutte contre les diarrhées infectieuses infantiles dans les pays en développement (FAO/OMS, 2001 ; Preidis et *al.*, 2011).

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, en tant que starter dans des procédés de fermentation afin de répondre aux exigences croissantes des consommateurs en produits alimentaires sécurisés et exempts de conservateurs chimiques.

Leur intérêt réside dans l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques, sans altérer le goût ni l'odeur, mais en augmentant leur durée de conservation, ceci est attribué à la production de plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne tels que les acides organiques, le peroxyde

d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009 ; Moraes et *al.*, 2010 ; Ababsa, 2012).

Les probiotiques sont dotés de nombreux effets bénéfiques pour la santé, notamment leur rôle dans la prévention et le traitement des diarrhées infectieuses (WGO, 2008). Plusieurs études cliniques ont démontré l'efficacité des bactéries lactiques probiotiques, en particulier les souches de lactobacilles dans les diarrhées infantiles d'origine microbienne (Preidis et *al.*, 2011 ; Bahri, 2014).

En outre, un certain nombre d'études randomisées et de méta-analyses permettent actuellement de considérer qu'il existe un effet positif des probiotiques sur la réduction du risque de survenue de diarrhées infectieuses et sur la diminution de sa sévérité évaluée en terme de durée de l'épisode (Ruemmele et Goulet, 2007). Ainsi, il a été démontré qu'un lait fermenté avec les ferments du yaourt et autres espèces de *Lactobacillus* modifie la flore d'enfants bien portants (Dupont, 2000).

Notre étude s'est articulée en six parties :

- Isolement et identification des bactéries pathogènes responsables des diarrhées infantiles chez des nourrissons âgés de 0 – 24 mois ;
- Isolement et identification des bactéries lactiques à partir de différents échantillons de lait (vache, chèvre et chamelle) ;
- Etude de l'activité antimicrobienne *in vitro* des souches de bactéries lactiques vis-à-vis quelques bactéries diarrhéiques ;
- Etude de la survie des souches lactiques dans les conditions extrêmes du tube digestif ;
- Confirmation de l'identité des souches pathogènes et des bactéries lactiques isolées montrant de bon résultat par séquençage du gène ADNr 16S;
- Enfin, une étude *in vivo* sur des lapins holoxéniques avec analyse des coupes histologiques dans la prescriptif d'emploi de lactobacille comme alicament associé à une antibiothérapie et en cas de contamination avec EPEC chez les nourrissons.

Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Emirates Journal of Food and Agriculture*.

## **Chapitre I : les diarrhées infantiles**

### **1. Généralités**

La diarrhée est la deuxième cause de mortalité chez l'enfant de moins de cinq ans. Elle peut durer plusieurs jours, déshydratant l'organisme et le privant des sels minéraux nécessaires pour la survie. Dans la plupart des cas de décès, les sujets meurent en fait de déshydratation sévère par pertes hydriques. Ce sont les enfants en état de malnutrition ou d'immunodépression qui sont les plus exposés au risque de diarrhées (Dupont et *al.*, 1999).

### **2. Définition des diarrhées infantiles**

La diarrhée est définie selon Sizonenko et Griscelli, (1996) par l'apparition brutale et fréquente de selles liquides ; résultant d'un déséquilibre entre la sécrétion et l'absorption de l'eau et des électrolytes (une diminution de l'absorption et une augmentation de la sécrétion) au niveau du grêle et du colon. Sa gravité dépend de l'abondance des selles, de la cause, de l'âge, de l'état nutritionnel, du terrain et de l'importance des vomissements associés.

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), la diarrhée se traduit par l'augmentation du débit fécal ou l'élimination excessive de liquide par cette voie (OMS, 2013). En pratique, on utilise des critères de fréquence et de consistance des selles ; elle est ainsi définie par l'émission de plus de trois selles liquides par jour (Martinot et *al.*, 2006).

### **3. Mécanismes de la diarrhée**

D'après Fauchère, (1990), deux catégories de bactéries sont impliquées dans les diarrhées, les bactéries entérotoxigènes et les bactéries invasives.

- Les bactéries entérotoxigènes se multiplient dans les parties hautes de l'intestin et provoquent des diarrhées sans émission de sang ou de leucocytes. Il n'y a pas de passage de ces bactéries dans le sang.
- Les bactéries invasives se multiplient dans les parties basses du tube digestif et provoquent des dysenteries avec émission de sang, leucocytes et de débris de la muqueuse. Elles ne passent dans le sang que de façon exceptionnelle.

Selon Dupont et *al.* (1999), quatre principaux mécanismes diarrhéigènes sont mis en évidence et qui conduisent à l'apparition de différents tableaux cliniques (Tableau I):

- D’abord, les germes adhèrent au niveau de structures spécifiques, l’invasion commence par un processus d’endocytose au pôle apical de la cellule. La multiplication des germes dans les vésicules d’endocytose aboutit à la destruction cellulaire. Un syndrome inflammatoire s’installe suite à cette infection bactérienne.
- Le processus invasif est associé à la production de cytotoxines responsables de lésions des muqueuses et de destruction cellulaire.
- La toxine stimule l’adénylcyase, elle même à l’origine d’une augmentation du taux intracellulaire d’AMPc, à son tour augmente le flux d’eau et d’électrolytes vers l’extérieur.
- Enfin, la bactérie adhère étroitement à la surface de la muqueuse de l’intestin grêle et du colon ; en altérant l’activité enzymatique de la membrane apicale de l’entérocyte, désagrégeant le glycocalyx et détruisant le tapis microvillositaire.

**Tableau I :** Répartition des agents entéropathogènes selon leur mode d’action (Dupont et al., 1999).

Adhésion-colonisation	Invasion (Action directe)	Invasion (Cytotoxine)	Sécrétion d’une entérotoxine
EPEC	Shigelles	Shigelles	Shigelles
EHEC	Salmonelles	EPEC	EPEC
	<i>Yersinia</i>	EHEC	<i>Yersinia enterocolitica</i>
	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Vibrio cholera</i>

#### 4. Types de diarrhée infantile

##### 4.1. Diarrhée aigue DA

Elle est définie par la présence de plus de trois épisodes de selles liquides par jour depuis moins de sept jours (Martino et al., 2006).

## **4.2. Diarrhée chronique**

Les diarrhées chroniques persistent pendant une durée de plus de 14 jours. (Randremanana, 2012).

## **5. Origine des diarrhées chez le nourrisson**

Parmi les principaux facteurs responsables de la survenue d'un taux élevé de la mortalité par les diarrhées, on peut citer : le manque d'eau potable, un système sanitaire inadéquat, et /ou des conditions physiologiques comme la malnutrition. D'autres facteurs comme le sevrage, confèrent un risque supplémentaire se traduisant par une plus grande exposition aux agents pathogènes, et une diminution passive de l'immunité maternelle par l'allaitement artificiel (Mitsuok et Rotio, 1992 ; Tsague et *al.*, 2007).

Les causes immédiates sont souvent de nature infectieuse et inclut une variété de microorganismes pathogènes principalement les virus, les bactéries, les protozoaires et les helminthes (Giordano et *al.*, 2001 ; Delmee, 2001).

La détermination des agents étiologiques des diarrhées est importante pour le développement d'une thérapie rationnelle et pour des mesures de contrôle adéquates (Albert et *al.*, 1995).

### **5.1. Diarrhée infectieuse**

#### **5.1.1. D'origine virale**

Les virus sont la cause la plus fréquente de la diarrhée infectieuse, soit 80 à 90 % des diarrhées du nourrisson (Fodha et *al.*, 2007). Les virus prolifèrent au sein des entérocytes matures des villosités entraînant leur desquamation rapide et leur remplacement accéléré par des entérocytes immatures incapables de réaliser correctement leur fonction d'absorption : c'est une diarrhée mal absorptive. Parmi ces derniers, les *rotavirus* sont les agents les plus impliqués ; ils sont responsables de plus de 900000 décès par an chez les enfants, soit 20 à 25% des décès par diarrhée sévère (Konaté, 2006).

Après ingestion, les virus se fixent sur les entérocytes, s'y répliquent, lysent les bordures en brosses diminuent les activités enzymatiques, entraînent une fuite hydrique dans la lumière du tube digestif et sont éliminés en grand nombre dans les selles (Naganda, 1986). Il y a quatre types de virus associés aux diarrhées chez l'homme : *Rotavirus*, *Astrovirus*, *Calcivirus humain*, et *Adenovirus entériques*. Les *rotavirus* humains représentent la cause majeure des gastro-entérites infantiles (Segondy, 2007 ; OMS, 2008).

### **5.1.2. D'origine parasitaire**

Les infections d'origine parasitaire apparaissent dans les régions où l'eau potable est absente et/ou l'environnement sanitaire est détérioré. Les parasites intestinaux ont la capacité de résister longtemps dans un environnement humide (Feng et *al.*, 2011). Parmi les agents parasitaires, on trouve *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba noshkovskii*, *Giardia albicans* (Segondy, 2007).

Les parasites cause de diarrhée peuvent être groupés en fonction de la localisation de l'infection. Certains (par exemple, *Giardia lamblia*, *Strongyloides stercoralis*, *Capillaria philippinensis*) interviennent dans l'intestin grêle essentiellement. D'autres parasites se trouvent dans le gros intestin (par exemple, *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli* ou *Trichuris trichiura*). Plusieurs autres facteurs peuvent être impliqués dans la pathophysiologie des diarrhées d'origine parasitaire. Certaines de ces diarrhées chroniques (dysenterie amibienne, trichocephalose intense, par exemple) sont souvent compliquées par des infections intestinales bactériennes. Des troubles intestinaux fonctionnels peuvent accompagner des infections intestinales d'origine parasitaire. Ces facteurs additionnels compliquent encore la classification des diarrhées d'origine parasitaire et la compréhension des mécanismes pathogéniques (OMS, 2008).

Les parasites intestinaux comme les *Giardia* ont un cycle direct et sont immédiatement infectants une fois émis dans les fèces, les autres parasites comme les helminthiases s'adaptent et se développent facilement dans l'environnement (Hall et *al.*, 2008).

### **5.1.3. D'origine fongique**

Les infections fongiques sont dues aux levures du genre *Candida* de la famille des *Cryptococcaceae* (Randremanana, 2012).

*Candida albicans* est la principale espèce incriminée. Saprophyte exclusif des muqueuses digestives (Bourée.1989), elle se présente toujours comme une petite levure ronde ou ovalaire (Moulinier, 2003).

L'infection fongique est rare mais sévère. Elle est due au développement dans la lumière du tube digestif de colonies importantes de *Candida albicans* parfois de *Candida tropicalis* faisant généralement suite à une candidose buccale ou œsophagienne (Jacquemin et Jacquemin, 1987).

#### 5.1.4. D'origine bactérienne

Les diarrhées d'origine bactérienne ne représentent que 5 à 10% des diarrhées infectieuses de l'enfant (Giordano et al., 2001), leur indice est directement lié aux conditions d'hygiène. Les diarrhées infectieuses infantiles d'origine bactérienne peuvent être causées par différents pathogènes tel que : *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio cholerae* et autres vibriens et à moindre degré *Listeria*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* et *Bacillus cereus* (Coudeyras et Forstier, 2010).

##### 5.1.4.1. *Salmonella*

*Salmonella* est un membre de la famille des *Enterobactériaceae* de la classe de  $\gamma$ -*proteobacteria* (Korsak et al., 2004).

La classification actuelle des salmonelles en sérotypes repose sur la diversité des antigènes O (lipopolysaccharide) et H (protéine flagellaire) (Le Minor et Véron, 1989).

Actuellement le genre *Salmonella* comprend deux espèces, *S. enterica* et *S. bongori*. *S. enterica* est elle-même divisée en six sous-espèces : *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarisonae*, *houtenae* et *indica* (Bourgeois et al., 1996 ; Korsak et al., 2004). La sous-espèce *S. enterica subsp enterica* est elle-même divisée en plusieurs sérovars : *Dublin*, *enteritidis*, *infantis*, *paratyphi*, *typhi*, *typhimurium*, *virchow*... etc. (Aubry, 2013).

La majorité des infections humaines dues aux salmonelles sont causées par les sérovars de *S. enterica subsp. enterica*. A ce jour, plus de 2500 sérotypes sont reconnus, dont 1504 dans la sous-espèce *enterica* (Popoff et al., 2004).

- ***Pathogénie et symptômes associés aux salmonelles***

Les infections causées par les serotypes de *salmonella* peuvent produire la fièvre entérique, la gastroentérite, ou des conditions de bactériémie ou septicémie. La fièvre entérique est causée par *Salmonella typhi* et *paratyphi*. L'infection peut s'étaler de 8 à 28 jours et les symptômes les plus communs sont la fièvre, la diarrhée, douleurs abdominales et maux de tête. Quand les infections sont dues à la consommation d'aliments contaminés avec des salmonelles non-typhique, la maladie est autolimitée chez les individus sains. Les symptômes apparaissent à partir de 8 à 72h après l'ingestion, et ils sont moins sévères que la fièvre entérique, la diarrhée et les douleurs abdominales disparaissent au bout de cinq jours (Kidgell et al., 2002).

- ***Le processus infectieux de Salmonella***

Suite à l'ingestion des salmonelles par voie orale, elles surviennent à l'acidité de l'estomac, et parviennent au niveau de l'intestin grêle ou elles s'adhèrent aux cellules de l'épithélium intestinal, préférentiellement aux cellules M des plaques de Peyer. Les bactéries sont ensuite internalisées dans les cellules épithéliales ou elles résident et se multiplient à l'intérieur des vacuoles. Une fois l'épithélium est franchi, il y'a deux possibilités :

1- Les sérotypes de *Salmonella* responsables de maladies systémiques (comme *S. typhi*) pénètrent dans les macrophages intestinaux et se disséminent vers d'autres organes du corps.

2- Par contre, les serotypes de *salmonella* non-typhique, responsables de gastroentérites (comme *S. typhimurium*), induisent une inflammation locale précoce, qui conduit à l'afflux massif de neutrophiles au niveau de la muqueuse intestinale, causant la destruction de l'épithélium intestinal et de la diarrhée (Haraga et al., 2008).

### **5.1.4.2. *Escherichia coli***

D'après Johnson et al., (2003) ; *Escherichia coli* est l'espèce type du genre *Escherichia* appelée communément colibacilles Gram négatif aérobies. Cette bactérie est retrouvée dans le microbiote intestinal réside de tous les animaux à sang chaud, incluant les humains.

- ***Le pouvoir pathogène chez l'homme***

Les souches pathogènes d'*E. coli* possèdent des propriétés particulières (pouvoir d'adhésion, production de toxines...) qui sont nécessaires au pouvoir infectieux et permettent de les repérer et de les identifier quand elles sont associées dans une flore complexe. Ces souches sont classées dans des « pathovars » (variété pathogène), chaque pathovars est associé à un syndrome infectieux caractéristique (Johnson et al., 2003).

Certaines souches d'*E. coli* sont capables de causer des dommages au niveau de la muqueuse digestive se traduisant par un syndrome infectieux. Elles sont dites « entérovirulentes ».

Les facteurs de pathogénicité des souches d'*E. coli* sont variés. Suivant les facteurs mis en jeu et le processus physiopathologique de l'infection, ces souches sont actuellement classées dans six « pathovars » (Leminor et Viron, 1989).

Les pathovars sont désignés par un sigle : Exemple ECEP= *E.coli* Entéropathogène ou EPEC « Enteropathgenic *E. coli* » (sigle anglicisé) (Le Minor et Viron, 1989).

- ***E. coli* Entéropathogène (EPEC) « Entéropathogène *E. coli* »**

Les EPEC (ECEP) sont actuellement responsables d'épidémies de diarrhées infantiles (enfant moins de 3 ans).

- ***E. coli* Entérotoxigènes (ETEC) « Enterotoxinogenic *E. coli* »**

ETEC (ECEP) sont responsables de la diarrhée du voyageur « turista ».

- ***E. coli* Entéro-invasif (EIEC) « Entéroinvasive *E. coli* »**

Les EIEC sont pathogènes quelque soit l'âge. L'infection se traduit par un syndrome dysentérique analogue à celui provoqué par les shigelles. Elle se caractérise par une fièvre et une diarrhée sanglante et purulente.

- ***E. coli* Entérohémorragique (EHEC) « Enterohémorragic *E. coli* »**

Elle provoque des colites hémorragiques sévissant sous forme sporadique ou épidémique.

- ***E. coli* EntéroAgrégatif (EAGGEC) « EnteroAggregative *E.coli* »**

Les EAGGEC sont responsables d'infection digestive analogue à celles dues aux EPEC mais plus persistantes. Les nourrissons et les jeunes enfants vivant dans les pays émergents sont fréquemment atteints.

- ***E. coli* à Adhésion Diffuse (DAEC) « Diffuse-Adhering *E. coli* »**

Ces *E. coli* ont été individualisées en raison de leur phénotype d'adhésion particulier.

### 5.1.4.3. *Shigella*

Selon Le Minor et Richared (1993), ces espèces sont surtout parasites de l'intestin et pathogène de l'homme et d'animaux. Elles peuvent être isolées des eaux contaminées par des excréments. Il existe quatre groupes de *shigella* :

- **Groupe A : *Shigella dysenterie*** : qui comporte 13 sérotypes, dont 2 et 3 sont les plus fréquents. Le sérotype1 (bacille de shiga) est le plus pathogène.

- **Groupe B** : *Shigella flexnerie* : qui comporte 6 sérotypes.
- **Groupe C** : *Shigella boydii* : qui comporte 8 sérotypes. Le 2 est le plus fréquent.
- **Groupe D** : *Shigella sonnei* : comporte un seul sérotype.

- **Pathogénicité de *Shigella***

La dose infectieuse requise provoquant la maladie est faible, soit quelque 200 bactéries à peine, une fois ingérées, les bactéries ne sont pas influencées par l'acidité stomacale (Tortora et *al.*, 2003). D'après Regnault, (2002) ; la pathogénicité des Shigelles est due à l'action :

-D'une toxine à pouvoir entérotoxique, qui au niveau des entérocytes bloque indirectement le transport des électrolytes à travers la membrane plasmique, ce qui entraînent l'accumulation de liquide dans l'intestin et par conséquent les diarrhées.

-De molécules d'adhésion, les invasives, qui permettent aux shigelles de se fixer à la surface des enterocytes ou s'introduire à l'intérieure des cellules.

#### **5.1.4.4. *Campylobacter***

Sont des Grams négatifs, aérobies, en forme de bacilles incurvés ou hélicoïdales, long de 0,2 à 0,5  $\mu\text{m}$ , très mobiles grâce à une ciliature polaire. (Cerf et Hagiage, 1992 ; Leclerc et *al.*, 1995).

Ils sont localisés au sein de la muqueuse intestinale, induisant une réaction inflammatoire intense (Dupont et *al.*, 1999).

*C.jejuni* et *C. coli* sont responsables de 6 à 8% de cas de diarrhée de l'enfant dans les pays industrialisés (Faure et besnard, 1998), et de 40% dans les pays en voie de développement (Guanalini et Fasano, 1993).

L'infection se manifeste habituellement par une diarrhée glaira-sanglante fébrile accompagnée de vomissement et de douleur abdominales intense. Les diarrhées à compylobacter entraînent rarement une déshydratation sévère, et les bactériémies sont exceptionnelles (Fohom Tayou, 2010).

#### **5.1.4.5. *Yersinia***

Sont d'une identification relativement récente et dont le rôle pathogène semble croissant. Ils comportent plusieurs espèces. Leur croissance se fait en milieu alcalin. Il s'agit de germe relativement résistant au froid (Cover et Aber, 1989).

**5.1.4.6. *Vibrio cholerae* O1**

*Vibrio cholerae* O1, l'agent responsable du cholera, a 2 biotypes (classique et El Tor) et 2 sérotypes (Ogawa et Inaba). *Vibrio cholerae* O1 est non invasif, la diarrhée étant due à une toxine cholérique qui provoque une abondante sécrétion d'eau et d'électrolytes dans l'intestin grêle. Elle peut être grave, aboutissant en quelques heures à une déshydratation, à un collapsus et à la mort si les liquides et les selles perdus ne sont pas remplacés (Fohom Tayou, 2010).

**5.1.4.7. *Staphylococcus***

La présence de staphylocoques pathogènes dans les selles d'un nourrisson diarrhéique ou normal est un fait banal et il est impossible d'affirmer la responsabilité du germe dans la diarrhée (El omari, 2007).

**5.1.4.8. Autre agents bactériens**

D'autres agents bactériens ont été isolés dans les selles d'enfants présentant une diarrhée aigue (*Klebsiella*, *Aeromonas*, *Clostridium difficile*, *Citrobacter*) sans que leur pouvoir pathogène soit véritablement prouvé et leur mode d'action éventuel déterminé (Fohom Tayou, 2010).

**5.2. Diarrhée non-infectieuse****5.2.1. Origine médicamenteuse**

Des diarrhées peuvent apparaître lors de l'utilisation de certains médicaments, notamment antibiotiques, sans qu'ils soient généralement nécessaires d'interrompre le traitement, mais parfois l'utilisation de certains antibiotiques comme amoxicilline et lincomycine engendre une diarrhée accompagnée de douleurs abdominales violentes et une altération majeure de l'état général (Sizonenko et Griscelli, 1996).

L'antibiothérapie perturbe le rôle capital assuré par la flore intestinale normale dans la protection d'une infection (Dupeyron, 1997 ; Moubareck et al., 2005). Leur effet bactéricide et/ou bactériostatique induit une diarrhée par l'émergence de souches indésirables, cette dernière est plus fréquente chez les enfants âgés de moins de deux ans (Gottrand, 2006).

Le traitement le plus conseillé est la prise en parallèle de probiotiques (Noir et al., 1991).

**5.2.2. Diarrhée associée à une infection extra-digestive**

Les infections extradiigestives ont fréquemment des manifestations digestives en particulier une diarrhée chez le nourrisson (Plantaz, 2005). Les diarrhées sont observées fréquemment dans les otites, pneumopathie et les infections urinaires (Bensenouci et Mazouni, 1995). Chez le nouveau-né la diarrhée est un signe non spécifique d'infection systémique (El Omari, 2007).

**5.2.3. Le colon irritable (colopathie fonctionnelle)**

Le colon irritable est la cause la plus fréquente des diarrhées chroniques du nourrisson et de l'enfant, il s'agit d'une diarrhée chronique caractérisée par une première selle matinale souvent normale suivie au cours de la journée par des selles plus liquides. Elle survient le plus souvent entre un et quatre ans (Dabadie, 1999 ; Michael et Zurich, 2008).

**5.2.4. Allergie alimentaire**

Les diarrhées peuvent apparaître chez les personnes souffrantes d'une intolérance aux allergènes (œuf, orange, céréales, poisson cèleri....) (Faure et Besnard, 1998).

Avec l'utilisation importante d'aliments de substitution, en particulier le lait infantile chez les nourrissons, des réactions aiguës allergiques aux protéines animales sont identifiables et connues de longues dates. Cette allergie est exprimée par une diarrhée (Navaro, 2002).

**6. Signes cliniques**

Selon El Omari (2007), la diarrhée est associée essentiellement aux vomissements (93,4 %), suivis de fièvre (61,4 %) et de douleur abdominale (60,2 %). D'autres symptômes signalés par les médecins comprennent des signes d'altération de l'état général, anorexie, amaigrissement, et apparition du sang dans les selles.

**7. Conséquences de la diarrhée**

La bonne prise en charge de la diarrhée aiguë doit permettre de prévenir ses principaux risques :

### **7.1. La déshydratation**

L'organisme, lors d'une diarrhée aiguë, subit une perte accrue d'eau et d'électrolytes, d'une part à travers les selles liquides, et d'autre part à travers les vomissements et la transpiration. Ceci conduit à une déshydratation apparaît lorsque ces pertes ne sont pas convenablement compensées (Bhan *et al.*, 2006).

### **7.2. La dénutrition**

La dénutrition au cours d'une diarrhée aiguë est le fait des conséquences digestives de l'agression infectieuse, et de l'insuffisance des apports alimentaires (Bhan *et al.*, 2006).

## **8. Traitement des diarrhées**

La déshydratation est la complication la plus susceptible de survenir lors d'une diarrhée chez un nourrisson (Gamba, 2001).

Le traitement des diarrhées repose essentiellement sur l'utilisation des solutions de réhydratation orale, et la réalimentation précoce. La place des traitements médicamenteux doit être limitée (Cézard *et al.*, 2002 ; Aubry, 2005).

### **8.1. Traitement nutritionnel**

L'OMS recommande une phase de 4 à 6 heures de réhydratation orale, suivie d'une réalimentation précoce comme seul traitement de la diarrhée aiguë infantile (Mouterde, 2007).

#### **8.1.1. Réhydratation par voie orale**

La réhydratation par voie orale (ROV), au moyen d'une solution de glucose et d'électrolytes simple, peu coûteuse est recommandée par l'organisation mondiale de la santé (OMS), depuis sa découverte, elle a sauvé la vie de millions d'enfants atteints de diarrhée aiguë (Société Canadienne de Pédiatrie, 2006). Elle peut être effectuée par une solution stimulant le co-transport actif du sodium ou glucose entraînant l'absorption de l'eau ce qui assure une réhydratation rapide et efficace (Urbain *et al.*, 2001 ; Steurer et Spalinger, 2008 ; Fontaine, 2008).

Selon la commission d'Evaluation des Produits Prestations (2006), les solutés de réhydratation orale (SRO) sont des produits constitués : d'eau, d'électrolytes (sodium, potassium et chlore), d'agent alcalinisant (citrate ou bicarbonates) et de glucides (sauf le lactose).

Ils visent à compenser les pertes hydro-électrolytiques au cours des diarrhées aiguës, à prévenir ou traiter toute acidose et à assurer un apport énergétique tout en permettant une acceptabilité gustatives de la solution.

### **8.1.2. Réhydratation intraveineuse**

La présence d'un signe de gravité telle que la perte de poids (8 – 10%) nécessite en urgence une hospitalisation et une réhydratation intraveineuse qui permet de restaurer le plus rapidement le volume perdu (Duggan, 1996 ; Benbernou *et al.*, 2000 ; Spandorfer *et al.*, 2005).

### **8.1.3. Réalimentation précoce**

La pratique de « mettre au repos le tube digestif » avec l'idée de stopper la diarrhée date des années 1960 jusqu'au début 1970 ; on recommandait une période de 24h à 48h de jeûne pendant la phase de réhydratation suivi d'une réintroduction très lente et progressive des aliments.

Actuellement, la nécessité d'une réalimentation précoce voire très précoce (4 heures après le début de la réhydratation) n'est plus à discuter (Délèze, 2009).

La réintroduction rapide de l'alimentation complète entraîne un rétablissement beaucoup plus rapide en assurant les éléments nécessaires à la stimulation de l'absorption, et au production d'énergie (Urbain *et al.*, 2001 ; Chaigneau, 2007). Elle permet d'éviter la dégradation de l'état nutritionnel en facilitant la « réparation » et la régénération des entérocytes et en maintenant l'activité des disacchridases (Duggan *et al.*, 1996; Sullivan, 1998; Bocquet *et al.*, 2002).

## **8.2. Traitement médicamenteux**

En dehors de la réhydratation orale, aucun médicament n'a fait la preuve de son efficacité sur le critère principal de jugement défini par l'OMS (réduction d'au moins 30% du débit des selles) (Cézard *et al.*, 2007).

### **8.2.1. Inhibiteurs de la motricité intestinale et anti-sécrétoires**

Le Loperamide est l'un des inhibiteurs de la motricité intestinale le plus utilisé et le mieux connu (Cézard *et al.*, 2007).

### **8.2.2. Agents pharmacologiques**

Les silicates (diosmectite Smecta) auraient un effet sur la diminution de la durée d'émission de selles liquides et sur le nombre de selles. Elle est prescrite à la dose de 01 à 03 sachets par jour en fonction de l'âge. Les silicates sont capables d'absorber de nombreux micronutriments et médicaments, leur administration doit donc être faite à 02 heures de distance des autres médicaments (Bensaleh, 2010). L'action des silicates est essentiellement symptomatique, et porte sur l'aspect des selles (Dupont, 2000) et non sur le processus sécrétoire, elles ne font donc qu'améliorer le confort de l'enfant (Duhmel et *al.*, 1999).

### **8.2.3. Antibiothérapie**

Les antibiotiques n'ont qu'une place très restreinte dans le traitement des diarrhées aiguës infantiles (Duhmel et *al.*, 1999 ; Cézard et *al.*, 2002 ; Cézard et *al.*, 2007).

Il existe cependant des indications reconnues de l'antibiothérapie au cours des diarrhées aiguës de l'enfant, ils sont selon Cézard et *al.*, (2007) ; de deux ordres liés :

- Soit à la virulence du germe,
- Soit à la fragilité du terrain ou à la sévérité du syndrome infectieux.

### **8.2.4. Antiseptiques intestinaux**

L'efficacité des antiseptiques intestinaux n'a jamais été démontrée. Ce groupe de médicament n'a donc aucune place dans le traitement des diarrhées aiguës de l'enfant (Duhamel et *al.*, 1999 ; Cézard et *al.*, 2002 ; Cézard et *al.*, 2007).

## **8.3. Les probiotiques**

Les nourrissons, dont la maturation intestinale est en cours, sont particulièrement exposés aux problèmes de diarrhées et d'allergies alimentaires. Afin d'apporter aux nourrissons une protection contre tels risques, l'administration des probiotiques a moduler la microflore intestinale, ainsi le système immunitaire (Cinquin, 2005 ; Hurre et *al.*, 2008).

Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de transmettre les principes actifs qu'ils contiennent (enzymes, composants de paroi, peptides immunomodulateurs, substances antimicrobiennes...) jusqu'à leur cible d'action dans le tube digestif. Ils peuvent avoir des effets directs ou indirects en agissant via des modifications du système immunitaire et de la flore intestinale (Villaluengaa et Rosario, 2007).

La plupart des probiotiques sont dérivés de l'alimentation et, plus pratiquement des produits laitiers. Il existe principalement deux types de probiotiques, les plus fréquemment utilisés font partie des bactéries productrices d'acide lactique, soient les espèces de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. En suite, le deuxième groupe est composé de bactéries qui ne produisent pas d'acide lactique, parmi lesquelles on trouve les Saccharomyces, un type de levure non pathogène (Alvarez et Oberhelman, 2001 ; Breaggar et Zurich, 2006). Pour effectuer leurs effets bénéfiques, les probiotiques doivent posséder la capacité de résister à la digestion par les enzymes digestives et pancréatiques en plus de prévenir l'adhérence, l'établissement et la réplication des pathogènes à l'intérieur du tractus gastro-intestinal (Dubé, 2004). Leur intérêt est non seulement fonctionnel pour améliorer la physiologie digestive et le système immunitaire, mais aussi thérapeutique pour le traitement de certaines pathologies digestives (Robin et Rouche, 2002).

#### **8.4. Traitement préventif**

Selon Cézard et *al.*, (2007) ; un bon traitement préventif doit être assuré par une hygiène hydrique et alimentaire (collectivité, séjour hospital ...) et lavage des mains.

## Chapitre II : L'effet probiotique des lactobacilles sur la diarrhée infantile

### 1. Généralités

Les bactéries lactiques, en particulier les lactobacilles, sont largement connues pour leur potentiel probiotique et nutritionnel. Les effets probiotiques démontrés sont la stimulation du système immunitaire, la prévention et la réduction de l'intensité/durée des épisodes diarrhéiques, et la réduction de l'intolérance au lactose (Wolvers *et al.*, 2010).

En plus de leur intérêt dans les filières agroalimentaires, une partie des bactéries lactiques peuvent être ingérées vivantes et peuvent offrir un certain nombre de caractéristiques probiotiques. Le terme probiotique dérive de deux mots grecs « pro » et « bios » et signifie littéralement « en faveur de la vie » (Roberfroid, 2003). La définition officielle des probiotiques est la suivante: « microorganisme vivant qui ingéré en quantité suffisante procure un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (FAO/WHO, 2001). Des centaines de produits commercialisés sous forme d'aliments fermentés ou de compléments alimentaires contiennent des bactéries probiotiques.

De part sa définition, pour qu'un microorganisme soit reconnu comme probiotique, il faut que son effet bénéfique chez l'Homme, et sa capacité à survivre au transit intestinal soient démontrés (FAO/WHO, 2001 ; Van de Guchte *et al.*, 2002 ; AFSSA, 2005). Ainsi, pour garantir leur survie pendant le passage du tractus digestif, les probiotiques sont premièrement criblés pour leur tolérance au pH acide et à la bile (Turpin, 2011).

Les principaux microorganismes probiotiques connus à ce jour sont soit des bactéries comme les lactobacilles et les bifidobactéries ou des levures comme *Saccharomyces boulardii* (Ouwehand *et al.*, 2002).

### 2. Le genre *Lactobacillus*

Selon De Vos *et al.*, (2009) ; les lactobacilles forment un ensemble très disparate. Ils appartiennent au groupe des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Lactobacillaceae*. Ce genre est le plus dominant au sein des bactéries lactiques. Il comprend actuellement, au moins 145 espèces reconnues qui présentent une diversité phylogénétique, phénotypique et écologique extrême (Corrieu et Luquet, 2008 ;

Barinov et *al.*, 2011). Cette diversité est due à la variation en contenu guanine/cytosine (G/C) qui varie entre 30 et 55 % selon les espèces (De Vos et *al.*, 2009).

### 2.1.Habitat

Les lactobacilles sont des microorganismes ubiquitaires et ils sont présents dans de nombreux biotopes comme l'eau, le sol, le lait et les produits laitiers, les végétaux, les produits carnés, les poissons, la bière, les fruits et les jus de fruits (Fredereghi, 2005), mais aussi, constituent une part importante du microbiote humain et animal. Chez l'Homme sain, ils se retrouvent tout au long du système digestif. Les espèces les plus rencontrées sont : *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. brevis*, le groupe *L. casei*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. vaginalis* et *L. ruminis* (Reuter, 2001 ; Eckburg et *al.*, 2005 ; Walter, 2008 ; Ozgun et Vural, 2011).

### 2.2.Caractéristiques générales

Les bactéries du genre *Lactobacillus* présentées sous des aspects variés allant du bacille long et fin au coccobacille en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux. Ils sont Gram positif , non sporulés , fréquemment associés en chaînettes et habituellement immobiles. Les lactobacilles sont généralement plus résistants au stress acide que les lactocoques (Siegumfeldt et *al.*, 2000). Le métabolisme des sucres chez ce genre est hétéro-ou homofermentaire (Laurent et *al.*, 1998).

Orla-Jensen, (1919) ; a proposé de diviser le genre *Lactobacillus* en trois sous genres : *Thermobacterium*, *Bêtabacterium*, *Streptobacterium*.

La classification remaniée par Kander et Weiss (1989) ; les subdivise en 3 groupes selon leur type fermentaire :

- **Groupe I :** anciennement appelé *Thermobacterium*, il regroupe les lactobacilles homofermentaires stricts et thermophiles, ils sont incapables de fermenter les pentoses et les gluconate. Ces bactéries fermentent les hexoses par la voie d'Embden-Meyerhof en produisant exclusivement de l'acide lactique, elles se développent à 45°C mais pas à 15°C (Bottazzi ,1988).
- **Groupe II :** Les Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs regroupent les espèces de l'ancien sous genre *Streptobacterium*, métabolisent les hexoses en acide lactique par la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof-Parnas et

dégradent les pentoses par voie hétérofermentaire. Ils ne produisent pas de CO<sub>2</sub> lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la fermentation du gluconate ( Stiles et Holzapfel, 1997).

- **Groupe III** : anciennement appelé *Betabacterium*, ces espèces ont un métabolisme strictement hétérofermentaire, la fermentation des hexoses produit de l'acide lactique, de l'acide acétique (ou de l'éthanol ) et du CO<sub>2</sub> , celle des pentoses, de l'acide lactique et de l'acide acétique. Les cellules sont courtes, droites et séparées (Bottazzi, 1988).

### 2.3. Besoins nutritionnels

Les bactéries lactiques ont une faible aptitude biosynthétique et sont en principe incapable d'assimiler directement les principaux précurseurs de leur environnement. Elles sont considérées comme le groupe bactérien le plus exigeant de points de vue nutritionnel (Lenoir et *al.*, 1992). En plus de la source de carbone et d'azote, les lactobacilles sont caractérisés par des exigences nutritionnelles nombreuses qui peuvent être classées comme suit :

#### 2.3.1. Acides aminés

Les espèces du genre de lactobacilles sont notamment incapables de synthétiser un certain nombre d'acides aminés pour les quels sont donc auxotrophes. Ces besoins en acides aminés sont cependant très variables d'une espèce à une autre et même d'une souche à une autre (Hervé et *al.*, 2000).

#### 2.3.2. Vitamines

Selon De Man et *al.*, (1960) et De Vos et *al.*, (2009) ; les lactobacilles sont incapables de synthétiser les vitamines qui jouent un rôle irremplaçable de coenzymes dans le métabolisme cellulaire (Desmazaud, 1983). Toutes les espèces ont un besoin absolu en vitamines telles que la pantothenate (B5), en niacine (B3) et en cobalamine (B12). Les déficiences en vitamine B12 peuvent induire une diminution de la synthèse de l'ADN et entraîner des changements morphologiques et les cellules deviennent filamenteuses. Une telle élongation cellulaire a été observée avec *L. helveticus sp. jugurti* lors de déficiences en cobalamine (B12) ou en acide folique.

### 2.3.3. Bases azotées

Les exigences en bases azotées sont très variables selon les espèces bactériennes (Desmazaud, 1983).

Les lactobacilles exigent la présence d'adénine, de cytosine, de désoxyguanosine, de guanine, de thymidine et d'uracile (Law et Kolstad, 1988 ; LeBlanc et *al.*, 2004).

### 2.3.4. Cations

Les ions  $Mg^{2+}$  et  $Mn^{2+}$  ou  $Fe^{2+}$  sont nécessaires pour la croissance des lactobacilles. Il a été démontré que le manganèse et le magnésium interviennent comme activateurs d'un grand nombre de réactions enzymatiques et comme stabilisateurs de la structure des acides nucléiques, de l'intégrité des ribosomes et de la membrane cellulaire des lactobacilles (De Man et *al.*, 1960 ; De Vos et *al.*, 2009).

## 2.4. Voies métaboliques

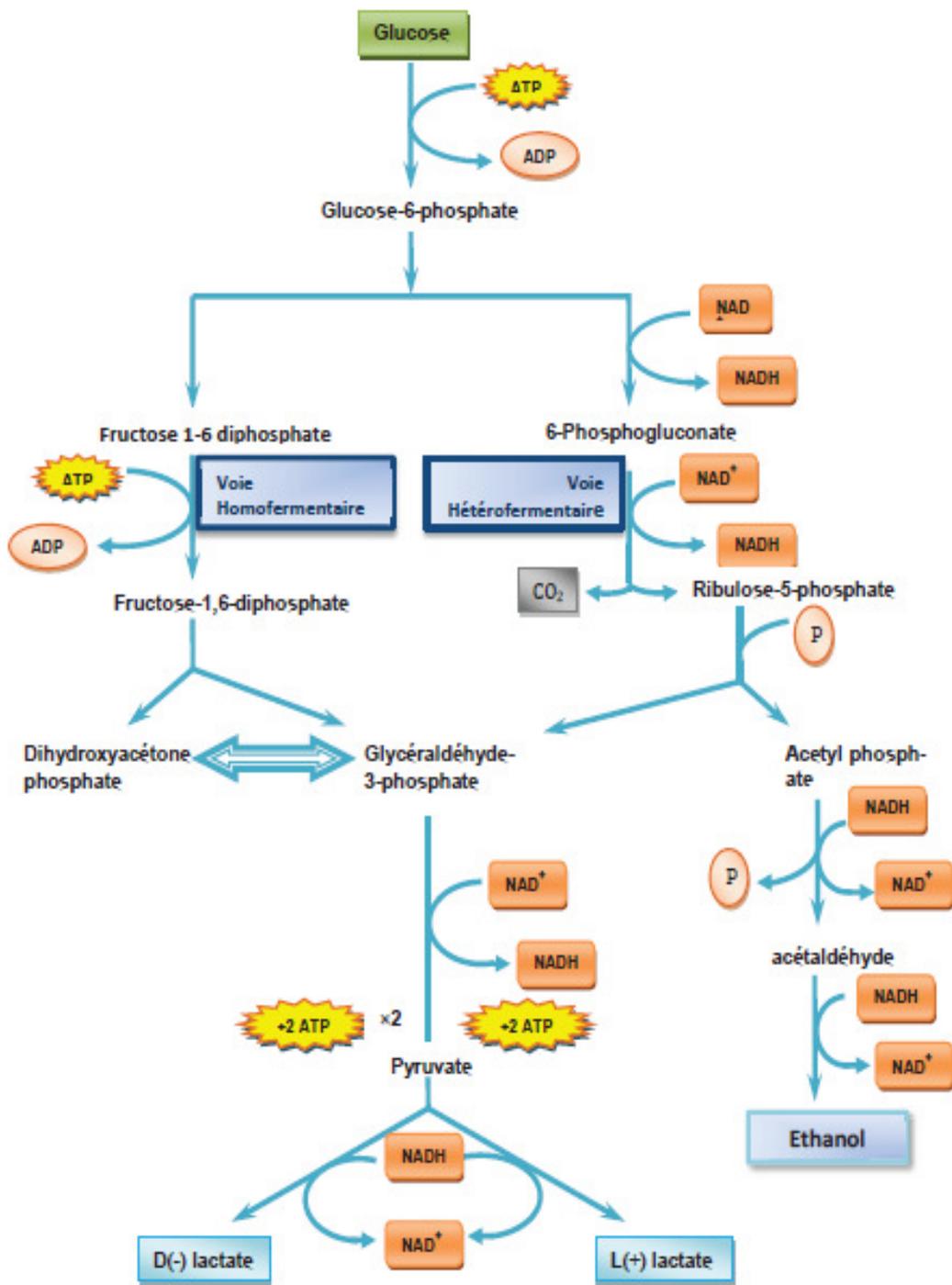
Les lactobacilles sont divisés en deux groupes (hétéro-ou homofermentaire) selon le produit final de la fermentation, les principales voies sont illustrées dans la figure 1.

### 2.4.1. Voie d'Emden Meyerhof Parnas (Homofermentation)

Dans laquelle l'acide lactique est le seul produit du métabolisme excrété à partir du substrat (Bourgeois et *al.*, 1980).

### 2.4.2. Voie de Dickens - Horecker et d'Entner Doudoroff (Hétérofermentation)

Dans laquelle les bactéries produisent de l'acide lactique en mélange avec d'autres produits d'excrétion comme le  $CO_2$ , acide acétique, éthanol...etc, selon les espèces (Bourgeois et *al.*, 1980 ; Novel, 1993).



**Figure 01:** Schéma des principales voies métaboliques des lactobacilles (Perry et *al.*, 2004).

### **3. Composés antimicrobiens produits par les lactobacilles**

Les lactobacilles peuvent produire des substances antimicrobiennes tels que les acides organiques, le diacétyl, le peroxyde d'hydrogène, le CO<sub>2</sub> et/ou les bactériocine pendant les fermentations lactiques (Talarico et Dobrogosz, 1989 ; Lindgren et Dobrogosz, 1990 ; Piard et Desmazeaud, 1991 ; Anderssen et *al.*, 1998 ; Sholeva et *al.*, 1998 ; Zhennai, 2000 ; Oyetayo et *al.*, 2003 ; Ouwehand et Vesterlund 2003 ; Servin, 2004 et Deegan et *al.*, 2006).

Les composés antimicrobiens produits par les lactobacilles capable d'empêcher la croissance des bactéries pathogènes, contaminants possibles, des produits fermentés (Smith et Palumbo, 1983 ; Andersson, 1986 ; Adams et Hall, 1988 ; Raccach et *al.*, 1989 ; Berry et *al.*, 1995 ; Cintas et *al.*, 2001 ; Gill et Halley, 2003 ; Guessas et *al.*, 2007 ; Parada et *al.*, 2007).

#### **3.1.Acides organiques**

Les acides organiques sont le métabolite principal des bactéries lactiques causant la réduction du pH qui inhibe largement le développement de microorganismes pathogènes (Magnusson, 2003). L'effet inhibiteur de ces acides organiques est principalement provoqué par les molécules non dissociées qui diffusent à travers les couches lipidiques des membranes des microorganisme, libérant les ions H<sup>+</sup> qui acidifient le cytoplasme provoquant ainsi un abaissement du pH dans le cytoplasme qui a pour conséquence la déstabilisation des cellules (Brillet et *al.*, 2005). En plus de l'effet du pH, l'acide non dissocié fait chuter le gradient électrochimique de proton, entraînant la bactériolyse et finalement la mort des bactéries sensibles (Eklund, 1989).

#### **3.2.Dioxyde de carbone ( CO<sub>2</sub>)**

Le CO<sub>2</sub> est principalement produit par les lactobacilles hétérofermentaires. Le mécanisme précis de son action antimicrobienne est toujours inconnu. Cependant, le CO<sub>2</sub> peut jouer un rôle antimicrobien en créant un environnement anaérobique, qui empêche les décarboxylations enzymatiques, et l'accumulation de CO<sub>2</sub> dans le milieu causant un dysfonctionnement de la perméabilité (Hotchkiss et *al.*, 1999).

Le degré d'inhibition par le CO<sub>2</sub> varie considérablement selon les espèces, un taux de CO<sub>2</sub> de 10% pourrait diminuer la population bactérienne de 50% (Wagner et Moberg,

1989), et une production d'un taux de 20 et 50% de CO<sub>2</sub> a une forte activité antifongique (Lindgren et Dobrogosz, 1990).

### **3.3. Peroxyde d'hydrogène**

Le peroxyde d'hydrogène est depuis longtemps reconnu comme un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques en particulier celle des lactobacilles. Il peut s'accumuler et créer un environnement toxique pour les cellules non équipées de système de protection capable de dégrader ce composé, son accumulation inhibe les différents micro-organismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (Zalan et *al.*, 2005).

### **3.4. Production de bactériocines**

Différentes définitions de bactériocine ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de Klaenhammer (1988) qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines représentent une large classe de substance antagoniste qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988).

Toutes les bactériocines de bactéries lactiques, dont le mode d'action a été étudié, paraissent agir de façon similaire en formant des pores dans la membrane plasmique des cellules cibles. La formation des pores dans la membrane cytoplasmique est responsable d'un efflux rapide de petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP... (Montville et *al.*, 1995 ; Dortu et Thonart, 2009) qui aura pour conséquence de perturber le potentiel transmembranaire et le gradient de pH, à la cessation rapide des activités cellulaires et par conséquent à la mort de la cellule (Rink et *al.*, 2005).

Les lactobacilles sont largement connus par leur capacité de production de bactériocines (Todorov, 2005) telles que : l'acidocine B (*L. acidophilus* M46), la lactacine F (*L. johnsonii*), la lactacine S1 et lactacine S2 (*L. salivarius* BGHO1), la gasséricine A (*L. gasseri* LA39), la brévicine 27 (*L. brevis* SB27), la plantaricine ASM1 (*L. plantarum* A1) (Dortu et Thonart, 2009) et la caseicine 80 (*L. casei* B80) (Rammelsberg et *al.*, 1990).

#### **4. Rôle technologique et intérêt probiotiques des lactobacilles**

##### **4.1. Rôle de *Lactobacillus* dans l'industrie agroalimentaire**

Les lactobacilles sont réponsus dans la nature, et beaucoup d'espèces ont des applications dans les industries agroalimentaires. Elles sont en générale plus tolérantes à l'acidité que les autres bactéries et peuvent, ainsi, être responsable de plusieurs fermentations lactiques spontanées comme l'ensilage et les fermentations végétales (Mayra-Makinen et Bigret, 2004).

Selon Tamime (2002) et Mayra-Makinen et Bigret (2004) ; parmi les fonctions physiologiques des lactobacilles qui sont très importantes dans l'industrie alimentaire, et qui influence sur les qualités organoleptiques de l'aliment, on peut citer :

- Fermentation des sucres, amener le pH à un niveau bas, ce qui est important pour terminer le phénomène de caillage, et la réduction ou la prévention de la croissance de la microflore d'adventice ;
- Hydrolyse des protéines, ce qui donne la texture et le goût de l'aliment ;
- La synthèse des composants aromatiques (acétoine, diacétyle) ;
- La synthèse des agents de texture (exopolysaccharides), ce qui peut influencer la consistance du produit ;
- La production des composants inhibiteurs de la flore indésirables ;
- La contribution à la fonction diététique de l'aliment.

##### **4.2. Lactobacilles et nutrition**

Bien que les mécanismes ne soient pas toujours connus, certains lactobacilles peuvent améliorer la biodisponibilité des macronutriments et micronutriments. Leur vaste diversité d'activités enzymatiques leur permet de dégrader de nombreux constituants nutritionnels qui ne peuvent être métabolisés par l'hôte comme les  $\alpha$ -galactooligosaccharides, l'inuline, et certains facteurs antinutritionnels comme les tannins ou les phytates responsable de la chélation de minéraux comme le fer, le zinc, le magnésium et le calcium.

Les lactobacilles peuvent également modifier la physiologie intestinale en augmentant la production de facteurs de croissance. Enfin, certaines souches sont capables de synthétiser des vitamines du groupe B comme la riboflavine, le folate et la cobalamine (Turpin, 2011).

#### **4.2.1. Métabolisme de sucre**

L'un des effets le plus connu et prouvé des bactéries probiotiques est leur capacité à dégrader le lactose, ce qui réduit les problèmes intestinaux associés comme l'intolérance au lactose ou sa mauvaise digestion (De Vrese et *al.*, 2001). La production insuffisante de  $\beta$ -galactosidase conduit à une fermentation colique du lactose avec une production excessive de gaz responsables des douleurs abdominales (Turpin, 2011).

De la même manière, les  $\alpha$ -galactosides : raffinose, stachyose et verbascose, provoquent aussi des fermentations dans le tractus digestif, ce qui provoque la production de 58 gaz et de douleurs abdominales (Cristfaro et *al.*, 1974). Plusieurs souches de bactéries lactiques appartenant aux espèces *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum* et *Lb. plantarum* possèdent ces activités  $\alpha$ -galactosidases (Donkor et *al.*, 2007b ; Songre-Ouattara et *al.*, 2008).

#### **4.2.2. Dégradation de facteurs antinutritionnels**

Certains lactobacilles sont capables de dégrader les tanins ce qui peut augmenter la biodisponibilité des minéraux dans l'aliment. Les tanins sont principalement retrouvés dans les produits végétaux comme le thé, le vin, les fruits et les céréales (Bravo, 1998). Ils sont considérés comme des facteurs antinutritionnels car ils sont capables de chélater les ions ce qui réduit la biodisponibilité des minéraux (Turpin, 2011).

Les espèces *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus* ou *Lb. paraplantarum* sont capables de dégrader les tanins grâce à leur activité tanin acylhydrolase. Cette capacité est fréquemment associée à la fermentation de produits végétaux et conférerait un avantage écologique (Osawa et *al.*, 2000).

En effet, les tanins exercent des effets antibactériens sur les bactéries lactiques notamment en provoquant un stress oxydant et la disruption de l'enveloppe bactérienne (Bossi et *al.*, 2007; Cecconi et *al.*, 2009; Curiel et *al.*, 2011). *Lb. plantarum* VP08 est une souche capable d'utiliser l'acide tannique comme seule source de carbone (Cecconi et *al.*, 2009).

Les phytates sont aussi reconnus comme facteurs antinutritionnels responsables de la chélation des minéraux (Mullaney et *al.*, 2000). De nombreuses lactobacilles sont capables de dégrader les phytates, et il a été montré que des bactéries possédant cette activité

pouvaient augmenter la solubilisation des minéraux pendant la fermentation de pâtes (Vats et Banerjee, 2004 ; Songre-Ouattara et *al.*, 2008 ; Anastasio et *al.*, 2010).

### 4.2.3. Absorption de minéraux

Bien que les déficiences en chlore soient rares, elles peuvent être induites par des diarrhées, ou des vomissements, et peuvent engendrer des baisses de tension sanguine ainsi que des sensations de faiblesse (Grossman et *al.*, 1980). Les souches *Lb. acidophilus* 4357 et *Lb. rhamnosus* 53103 ont montré qu'elles sont capables d'augmenter l'activité de l'échangeur d'anion  $Cl^- / OH^-$  dans les cellules Caco-2 ce qui permet d'augmenter l'absorption de chlore (Borthakur et *al.*, 2008).

*Lb. salivarius* UCC118 et *Lb. helveticus* sont également capables d'améliorer l'absorption de calcium sur ce modèle cellulaire ce qui peut aider à prévenir des maladies associées avec la déficience de ce minéral comme l'ostéoporose (Narva et *al.*, 2004 ; Gilman et Cashman, 2006).

### 4.2.4. Synthèse de vitamines par les bactéries lactiques

Les lactobacilles représentent une proportion importante des groupes bactériens capables de produire les vitamines du groupes B (Burgess et *al.*, 2009). Ces vitamines sont des micronutriments essentiels étant donné leur importance dans le métabolisme cellulaire humain. La consommation de bactéries probiotiques ou d'aliments fermentés par des bactéries pouvant produire ces vitamines pourrait être intéressante dans les cas de déficiences chez l'Homme (Turpin, 2011).

## 4.3. Lactobacilles et prévention des maladies

De nombreuses allégations santé ont été associées à l'utilisation des lactobacilles probiotiques en tant que médicaments ou alicaments chez l'Homme. Les principaux effets bénéfiques sont :

### 4.3.1. Utilisation potentielle contre les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont responsables d'environ un tiers des décès dans le monde. Les bactéries probiotiques peuvent prévenir l'hypertension grâce à leur capacité à inhiber l'angiotensin converting enzyme (ACE) et peuvent prévenir de l'hypercholestérolémie de par leur capacité à métaboliser les acides biliaires (Turpin, 2011).

#### **4.3.2. Utilisation des bactéries lactiques pour dégrader l'oxalate**

La lithiase uro-oxalique résulte généralement des capacités de l'oxalate à chélater de nombreux ions métalliques, ce qui forme des calculs urinaires. La diminution de la consommation de sels et des protéines animales est fréquemment recommandée pour diminuer les quantités de calcium urinaire et prévenir ainsi des symptômes associés à la lithiase oxalique (Grases et *al.*, 2006).

Des études chez l'Homme ont montré que la consommation de *Lb. casei* et de *Bifidobacterium breve* chez des patients atteints de calculs urinaires peut réduire les excréments urinaires d'oxalate (Ferraz et *al.*, 2009). Néanmoins cette capacité reste très souche dépendante puisque parmi 60 souches de bactéries lactiques, seulement 21 sont capables de dégrader 5 mmol/l d'oxalate *in vitro* à des taux compris entre 50 et 100% (Turroni et *al.*, 2007).

L'utilisation de bactéries lactiques pouvant métaboliser l'oxalate est donc une piste intéressante pour prévenir des pathologies associées (Abratt et Reid, 2010).

#### **4.3.3. Lactobacilles et réduction de la perception de la douleur**

Il a récemment été montré que les probiotiques permettent de moduler la perception de la douleur. Par exemple, le surnageant de culture de *Lb. paracasei* NCC2461 possède des propriétés anti nociceptives et permet de restaurer la perméabilité de l'intestin après un stress néonatal de privation maternelle chez le rat (Eutamene et *al.*, 2007). Les auteurs expliquent ce phénotype par l'activation de cellules submucosales immunitaires, ou/et par la régulation des jonctions serrées de l'intestin. D'autres études très récentes ont montré que l'ingestion de 109 UFC/j de *Lb. reuteri* permet d'agir au niveau des canaux à ions des nerfs sensitifs entériques ce qui conduit à une modification de la motilité et de la perception de la douleur intestinale chez le rat (Kunze et *al.*, 2009).

#### **4.3.4. Lactobacilles et maladies inflammatoires chroniques intestinales**

L'inflammation est un procédé physiologique en réponse à différents stimuli comme les infections ou les lésions tissulaires. Dans certaines maladies, une activation continue et l'intolérance du système immunitaire peuvent entraîner une inflammation chronique avec des conséquences pathologiques comme les MICI (Duchmann et *al.*, 1995). Les MICI les plus connues sont la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Les patients souffrant de MICI

présentent des douleurs abdominales, des diarrhées, des obstructions intestinales, des crampes abdominales, et des excréments ensanglantés, ou des pertes de poids.

Les MICI touchent 3 à 15% de la population et l'origine de ces maladies est multifactorielle, incluant les sensibilités, les désordres immunitaires et des prédispositions génétiques (Cremonini et Talley, 2005). Malheureusement, il n'existe pas de traitement efficace connu pour soigner les MICI. Les thérapies utilisant les drogues anti-inflammatoires comme les stéroïdes ou les anti-facteurs de nécrose tumorale peuvent diminuer les signes et les symptômes associés avec les MICI, augmentant ainsi les temps de rémissions (Hanauer, 2002 ; Macdonald et Monteleone, 2005).

Les effets immunomodulateurs des probiotiques sont une piste thérapeutique pour le traitement des MICI mais les mécanismes impliqués ne sont pas encore bien connus (Quigley, 2008). Par exemple, la souche de *Lb. rhamnosus GG* améliore la qualité de la barrière intestinale d'enfants souffrant de la maladie de Crohn (Gupta et al., 2000) et son association avec une drogue anti-inflammatoire, la mésalazine permet de prolonger la rémission dans le cas de colite ulcéreuse (Zocco et al., 2006). Afin d'améliorer les conditions de vie des patients souffrant de MICI, des recherches menées sur les probiotiques sont orientées sur les propriétés anti-inflammatoires et leurs propriétés inhibitrices de la production de cytokines inflammatoires.

#### **4.3.4.1. Les diarrhées infectieuses infantiles**

Les diarrhées infectieuses infantiles, d'origine bactériennes peuvent être causées par différents pathogènes telque *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio cholerae* et autres vibriens et à moindre degré *Listeria*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* et *Bacillus cereus* (Lemberg et al., 2007). Différentes souches de lactobacilles, incluant *L. reuteri* ATCC 55730, *L. rhamnosus GG* et *L. casei* DN-114 001 ont prouvé leur efficacité dans la réduction de la sévérité et de la durée de la maladie diarrhéique aiguë chez l'enfant (Rosenfeldt et al., 2002 ; Szajewska et al., 2007 ; Lemberg et al., 2007).

L'utilisation de plusieurs espèces de probiotiques de lactobacilles a constitué une stratégie importante dans la prévention et le contrôle des diarrhées infectieuses infantiles dans les pays en voie de développement (FAO/OMS, 2001 ; Michail et al., 2006 ; Preidis et al., 2011). L'effet bénéfique de *Lactobacillus rhamnosus GG* a parfaitement été démontré

pour la prévention de la diarrhée aiguë causée principalement par des *rotavirus* chez les enfants. Outre les infections à *rotavirus*, de nombreuses espèces bactériennes causent la mort chez l'enfant (FAO/OMS, 2001 ; 2002). Des études ont prouvé que certaines souches de lactobacilles probiotiques peuvent inhiber *in vitro* la croissance et l'adhérence d'une gamme d'entéropathogènes (Gopal et al., 2001; Servin, 2004 ; Rishi et al., 2011; Campana et al., 2012). D'autres études sur des modèles animaux ont indiqué des effets bénéfiques de *L. casei* Shirota, *L. acidophilus* LB et *L. rhamnosus* GG contre des agents pathogènes comme *Salmonella* (Ogawa et al., 2001 ; WGO, 2008) (Tableau II).

**Tableau II** : Souches de lactobacilles probiotiques utilisées dans les traitements des diarrhées chez l'enfant (WGO, 2008).

Pathologie	Produit	Dosage recommandé
Traitement de la diarrhée infectieuse aiguë chez l'enfant	<i>L. rhamnosus</i> GG	10 <sup>10</sup> – 10 <sup>11</sup> UFC, 2 fois par jour
	<i>L. casei</i> DN-114 001	10 <sup>10</sup> UFC, 2 fois par jour
	<i>L. reuteri</i> ATTC 55730	10 <sup>10</sup> – 10 <sup>11</sup> UFC, 2 fois par jour
	<i>L. acidophilus</i> + <i>Bifidobacterium infantis</i>	10 <sup>10</sup> – 10 <sup>11</sup> UFC, 2 fois par jour
Prévention de la diarrhée associée aux antibiotiques chez l'enfant	<i>L. rhamnosus</i> GG	10 <sup>10</sup> UFC, 1 ou 2 fois par jour
Prévention de la diarrhée nosocomiale chez l'enfant	<i>L. rhamnosus</i> GG	10 <sup>10</sup> – 10 <sup>11</sup> UFC, 2 fois par jour
	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	10 <sup>9</sup> UFC, 2 fois par jour
Prévention de la diarrhée par <i>Clostridium difficile</i>	<i>L. casei</i> DN-114 001	10 <sup>10</sup> UFC, 2 fois par jour

#### 4.3.4.2. Diarrhées des voyageurs

Il est noté que la souche *Lactobacillus* GG est efficace en prévention des diarrhées survenant chez les touristes. L'administration du probiotique durant la période à risque a permis de réduire l'apparition des diarrhées de 39,5% chez les sujets traités (Fedorak et Madsen, 2004).

**4.3.4.3. Diarrhées à *Clostridium difficile***

Un traitement par antibiotique est souvent accompagné par l'apparition de la diarrhée, causée par *Clostridium difficile* qui se présente avec un nombre très faible dans un tractus intestinal sain, mais ce nombre est augmenté du fait de traitement par des antibiotiques et en produisant de toxines. L'administration de probiotiques est nécessaire pour ramener la microflore à un état d'équilibre qui reflète la flore normale avant la thérapie antibiotique. Certaines études ont montré, en effet, que cette approche peut atténuer les signes et les symptômes de l'infection par *C. difficile* (Tong et al., 2007). Dans la diarrhée associée aux antibiotiques, il y a une forte évidence d'efficacité pour *L. rhamnosus GG* chez l'adulte et l'enfant avec thérapie antibiotique (FAO/OMS, 2001). Une autre recherche concluante a indiqué l'efficacité de *L. casei* DN-114 001 chez l'adulte hospitalisé pour prévenir une diarrhée associée aux antibiotiques à *C. difficile* (Tuohy et al., 2003).

**4.3.5. Allergies**

Les allergies sont désormais l'une des maladies chroniques les plus répandues dans les pays développés (WHO, 1998). De nos jours, quelques études se concentrent sur les capacités des probiotiques à améliorer les symptômes des personnes souffrant d'allergies grâce à leur capacité à améliorer la maturation du tissu lymphoïde associé à l'intestin (Gut Associated Lymphoid Tissue, GALT). Il a été démontré que les probiotiques sont plus efficaces chez l'enfant que chez l'adulte. En fait, les bactéries aident à la maturation du système immunitaire et particulièrement dans le tissu lymphoïde intestinal (Falk et al., 1998 ; Calder et al., 2006). L'intérêt de consommer des bactéries probiotiques est l'une des stratégies pour aider à la maturation du GALT en réduisant le risque d'infection (Turpin, 2011).

### **Chapitre III : Matériel et méthodes**

Notre expérimentation a été réalisée au niveau du laboratoire de bioressources naturelles de faculté des Sciences de la nature et de la vie à l'université de Chlef durant la période de Mars 2012 à Avril 2015.

L'isolement des bactéries pathogènes a été réalisé au niveau du laboratoire central de l'Etablissement public hospitalier Merouane Abed de Chettia Wilaya de Chlef (Unité de Microbiologie), ce laboratoire médicale s'occupe des analyses bactériologiques, parasitologiques et biochimiques.

Le séquençage de l'ARN 16S des bactéries isolées a été réalisé au niveau de laboratoire de DiagGène en France.

#### **1. Matériel**

##### **1.1. Matériel biologique**

###### **1.1.1. Selles des enfants diarrhéiques**

Durant la période de notre stage, nous avons reçus 120 prélèvements de selles provenant de malades externes et hospitalisés dans le service de pédiatrie de l'hôpital de Chettia Chlef.

###### **1.1.2. Lait**

Les échantillons du lait ont été collectés de différentes régions de la wilaya de Chlef, et du sud de l'Algérie. Les échantillons sont prélevés à partir de trois laits de vache, de chèvre et de chamelle.

Les prélèvements ont été réalisé aseptiquement. Avant la traite, nous avons procédé à la désinfection des mains de fermier et des mamelons de l'animal par de l'eau chlorée, les échantillons de lait ont été recueillis dans des flacons stériles placés tout près des mamelons afin d'éviter toute contamination. Ces échantillons sont conservés dans des glacières pendant le transport au laboratoire, puis conservés à 4C° avant le début d'expérimentation.

###### **1.1.3. Souche de référence**

*Escherichia coli* ATCC 25922 : fournit par l'institut Pasteur Alger.

### 1.2. Milieux de culture

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale, il s'agit des milieux suivants :

- MRS bouillon et gélose (Man Rogosa Sharp) sont utilisés pour la culture des lactobacilles (voir l'annexe I).
- Mueller-Hinton utilisé pour évaluer les activités antimicrobiennes.
- SFB bouillon à double concentration (Institut Pasteur, Alger) a été utilisé pour l'enrichissement des entéropathogènes.
- Milieu Hektoen et SS (Institut Pasteur, Alger) a été utilisé pour l'isolement des Gram négatifs entéropathogènes (salmonelles et *E.coli*).
- Milieu EMB a été utilisé pour le dénombrement d' *E.coli*.

## 2. Méthodes

### 1<sup>ère</sup> partie : Isolement des bactéries pathogènes

#### 1.1. Recueil et transport des échantillons

Un écouvillonnage rectal est utilisé chez le nourrisson et le petit enfant dont l'âge varie de 0 à 24 mois. Les prélèvements doivent être immédiatement acheminés au laboratoire dans les plus brefs délais ou bien conserver au maximum une nuit à 4°C afin d'arrêter la prolifération des bactéries.

Chaque prélèvement est accompagné d'une fiche de renseignement mentionnée en annexe 1, elle comporte les points suivants :

- Nom, prénom, sexe et âge.
- Antécédents du patient.
- Si le patient est sous une antibiothérapie.

#### 1.2. Examen macroscopique des selles

Un examen macroscopique des différents échantillons des selles a été réalisé selon la méthode décrite par Vande et al.,(1994), il consiste à déterminer :

- La consistance des selles.
- La couleur des selles.
- L'odeur.

- La présence de sang, le mucus, la glaire ou de pus.

### 1.3. Diagnostic bactériologique des selles

L'objectif principal d'une coproculture consiste à tenter d'isoler au sein d'une flore complexe un nombre limité d'espèces bactériennes réputées pathogènes, responsables de diarrhées infectieuses (Avril, 1995 ; Joly et Reynaud, 2003).

#### 1.3.1. Préparation de la suspension des selles

1 mL de selles est prélevé dans un tube à essai contenant 1 mL d'eau physiologique à 0,9% de NaCl, le mélange est ensuite agité à l'aide d'un vortex pour avoir une suspension homogène.

#### 1.3.2. Coproculture systématique

En absence de toute indication spécifique du clinicien, on recherche systématiquement les genres bactériens : *Salmonella*, *Shigella* et les entéropathogènes, spécialement *Escherichia coli*.

##### 1.3.2.1. Isolement direct

Il consiste à ensemencer deux boîtes de pétri, l'une contenant la gélose Hektoen et l'autre la gélose SS par quelques gouttes de la suspension des selles préparée qui sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

##### 1.3.2.2. Enrichissement

Deux enrichissements successifs ont été réalisés selon la méthode décrite par Robin et Roche, (2002) :

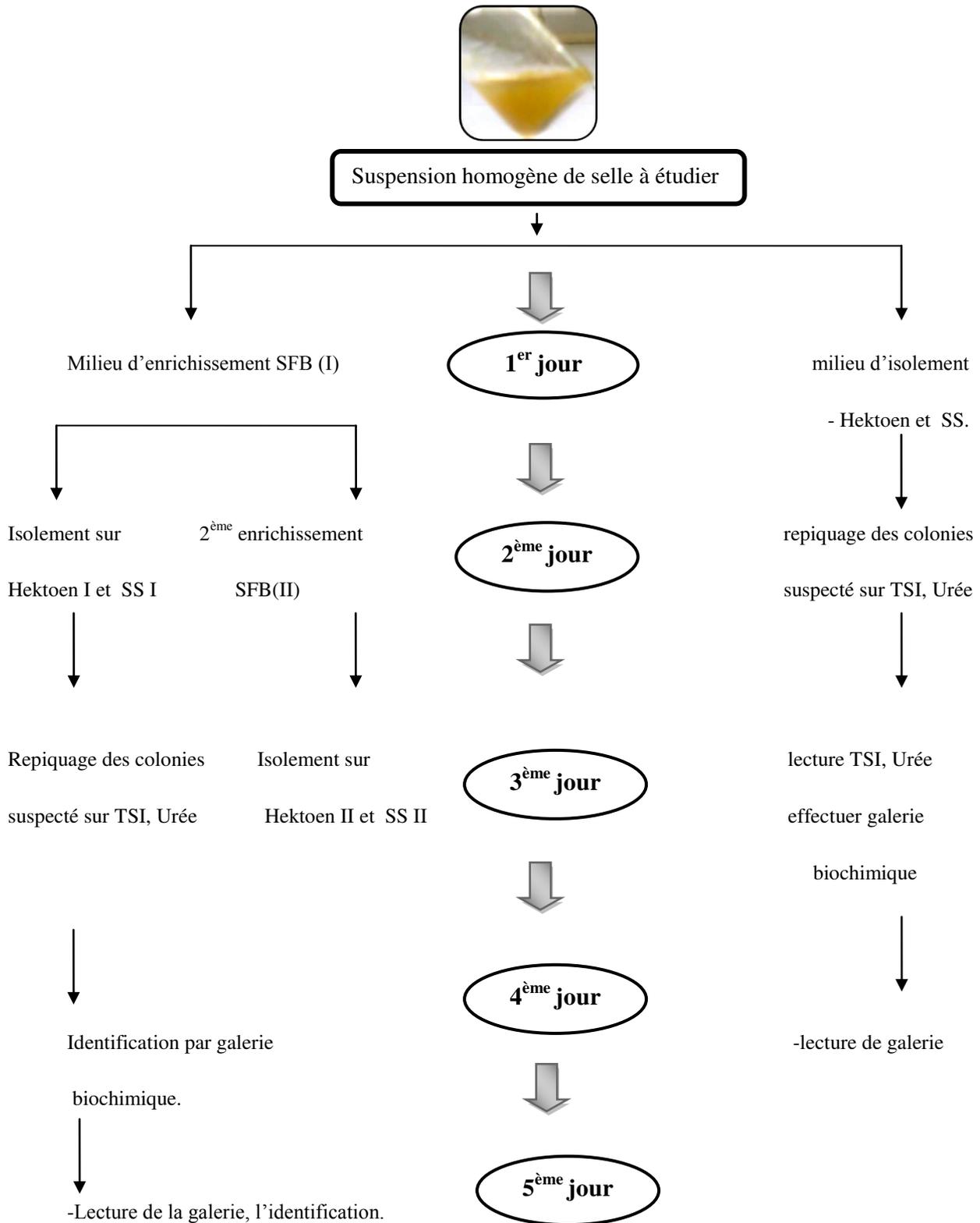
- Le premier enrichissement a été réalisé sur milieu SFB avec additif, pour cela 5 mL de la suspension des selles préparée préalablement est additionnée à 5 mL de milieu SFB double concentration dans un tube à essai qui est incubé à 37°C pendant 24 heures.
- Un deuxième enrichissement a été réalisé ensuite, 5 mL du tube précédent sont additionnés à 5 mL du milieu SFB dans un tube à essai qui sera incubé à 37°C pendant 24 heures.

### 1.3.2.3. Isolement à partir des deux enrichissements

L'isolement a été réalisé à partir des deux milieux d'enrichissement ensemencés précédemment. Après 24 heures d'incubation, quelques gouttes prélevées de chaque tube sont ensemencées sur gélose Hektoen et SS, les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures.

Après croissance des colonies en boîte, on prend de chaque boîte les colonies isolées sur lesquelles sera effectuée un repiquage successive, l'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention d'une culture pure dont la pureté est estimée par observation microscopique après coloration de Gram (Balows et *al.*, 1992 ; Curk et Mac Phail, 1996 et Heleni et *al.*, 2006) .

Les étapes de la coproculture systématique sont résumées dans la figure 2.



**Figure 02 :** Les étapes de la coproculture systématique.

### 1.3.2.4. Etude des caractères cultureux

Cette étude consiste à déterminer à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire les caractéristiques des colonies (couleur, aspect, odeur, texture...). La lecture des boîtes ensemencées est faite selon les recommandations de Grimont, (1997) et Robin et Roche, (2002).

Les colonies jaunes avec un centre saumon, sèches, rondes, sont suspectes d'être *Escherichia coli enteropathogène*, et les colonies fines, vertes au centre noir sont suspectes d'être *Salmonella*.

### 1.3.2.5. Etude des caractères morphologiques

La coloration de Gram est la deuxième étape de l'identification (Philippon et *al.*, 2007). Elle renseigne sur l'aspect morphologique de la bactérie pour orienter l'identification biochimique de la bactérie isolée (Singleton, 1994 ; El Ouardi et Chami, 2001), ces étapes sont mentionnées dans l'Annexe III.

### 1.3.2.6. Identification biochimique

L'aspect microscopique et l'aspect des colonies ne suffisent pas pour identifier de façon précise une bactérie (Le Minor et Richard, 1993; Tortora et *al.*, 2003). Pour pouvoir nous orienter sur le métabolisme suivi par les bactéries isolées et les enzymes qu'ils possèdent, en se référant aux tests préconisés par Marshall et Bourdon, (1982) :

#### ➤ Test des 3 sucres

Sur le milieu TSI (Trois Sucres à Identifier) est ensemencé avec la souche à étudier, il est incubé à 37°C pendant 24 heures. Ce test permet la mise en évidence de la fermentation du glucose, du lactose et du saccharose, la réaction est dite positive si le milieu devient jaune orange.

Il met aussi en évidence la production d'H<sub>2</sub>S qui fait virer le milieu au noir ce qui est dû à la formation du sulfure de fer (Sahl et *al.*, 1995).

### ➤ **Test mannitol-mobilité**

L'utilisation du mannitol se traduit par une acidification entraînant un jaunissement de l'indicateur du milieu mannitol ; la mobilité se traduit par une diffusion à partir de la piqûre centrale vers le fond du tube (Couture, 1990 ; Joffin et Leyal, 2001).

### ➤ **Test de Simmons**

Ce test permet la mise en évidence du citrate perméase : enzyme permettant à la souche l'utilisation du citrate comme seule source de carbone ; après incubation à 37°C pendant 24 heures, l'utilisation du citrate se traduit par la libération des ions « OH<sup>-</sup> », qui alcalinisent le milieu en se traduisant par une couleur bleue après le virage du vert de bromothymol (Gaillot, 2008).

### ➤ **Production d'acétone**

La souche à identifier est ensemencé dans un tube qui contient le milieu Clark et Lubs, après incubation à 37°C, pendant 24 heures une goutte de VP1 et une goutte de VP2 (VP: Vogs Proakauer), sont ajoutées ; si après 10 min la couleur rouge au préalable devient rose la réaction est dite alors positive (Richard et Proskauer, 1987 ; Marchal et *al.*, 1991).

### ➤ **Recherche de la production d'indole**

Le milieu d'urée indole (couleur orange) est ensemencé avec la souche à tester, après incubation à 37°C, pendant 24 heures, on ajoute quelques gouttes de réactif Kovacs, s'il ya formation d'un anneau rouge la réaction est dite indole positif (Guillaume, 2010).

### ➤ **Recherche de la $\beta$ -galactosidase**

La souche étudiée est ensemencée dans un tube de 2 ml d'eau physiologique auquel on ajoute un disque d'Ortho-Nitro-Phenyl-Galactopyranoside (ONPG). Après incubation à 37°C, pendant 24 heures la réaction positive se traduit par une coloration jaune due à la libération d'orthonitrophenol dans le milieu (Richard et Proskauer, 1978).

### ➤ **Recherche de l'uréase et du tryptophane désaminase**

Après 24 heures d'incubation à 37°C Sur milieu urée indole la souche à tester produit la réaction suivante :  $\text{NH}_2 + \text{COOH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3$ .

La combinaison des produits  $\text{CO}_2$  et  $\text{NH}_3$  entraîne la formation du carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu et entraîne un virage au rouge violacé, le tryptophane

désaminase est détectée par addition du perchlorure du fer qui entraîne une coloration brunâtre (Singleton, 2005).

### ➤ **Recherche de nitrate réductase**

Le bouillon nitrate est ensemencé avec la souche à tester, après incubation à 37°C 24 heures on ajoute une goutte de nitrate 1 et une goutte de nitrate 2, si la coloration vire vers le rouge le teste est dit positif (Joly et Alain, 2003).

### ➤ **Recherche de l'oxydase**

La bandelette d'oxydase est déposée sur une lame propre et imbibé avec une goutte d'eau distillée stérile. Une colonie est prélevée à partir du milieu gélose nutritive à l'aide d'une pipette pasteur puis déposer sur la bandelette. En présence de l'oxydase la coloration violet foncé apparaît immédiatement ou en quelques secondes, puis noircit (rose violette puis elle devient brun foncé) (Grath et *al.*, 1977 ; Gulian, 1994).

### ➤ **Recherche de L.D.O ; O.D.C et ADH**

Les milieux liquides Lysine décarboxylase, Ornithine décarboxylase, Arginine décarboxylase de couleur violette pour la recherche des décarboxylase et dihydrolase bactériennes sont réparties dans trois tubes différents, ensuite on ensemence la souche à étudier, on incube à 37°C, pendant 24 heures, si la couleur reste violacée, la réaction est dite positive et si elle devient jaune la réaction est dite Négative (Djelouat, 2008).

### ➤ **Galerie API 20E**

La galerie API 20E est un système d'identification biochimique des *Enterbacteriaceae* et autres bacilles Gram négatifs, comprenant 21 tests biochimiques, elle contient 20 microtubules contenant des substrats déshydratés. Les microtubules sont inoculés avec une suspension bactérienne jeune.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent, par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de la galerie doit se faire en référant au tableau de la lecture (Annexe III).

On code l'ensemble des réactions en un profil numérique de 7 chiffres qui nous permet d'identifier avec le catalogue analytique le nom de l'espèce à laquelle est identifiée la bactérie.

### 2<sup>ème</sup> partie : Isolement des bactéries lactiques

#### 2.1. Préparation des dilutions décimales

Selon Francois et *al.*, (1986) ; pour réaliser une analyse bactériologique, il est nécessaire de passer à des dilutions décimales, ces dilutions sont préparées de la manière suivante:

On a agité pendant 10 secondes le flacon contenant le lait à diluer par des mouvements tournants et à l'aide d'une pipette graduée stérile, 1 mL de lait est introduit aseptiquement dans un tube à essai contenant 9 mL d'eau physiologique, on obtient ainsi une dilution  $10^{-1}$ ; 1 mL de cette dilution est introduit dans un tube contenant 9 mL d'eau physiologique, ainsi pour obtenir la dilution  $10^{-2}$ ; l'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'une série de dilutions décimales.

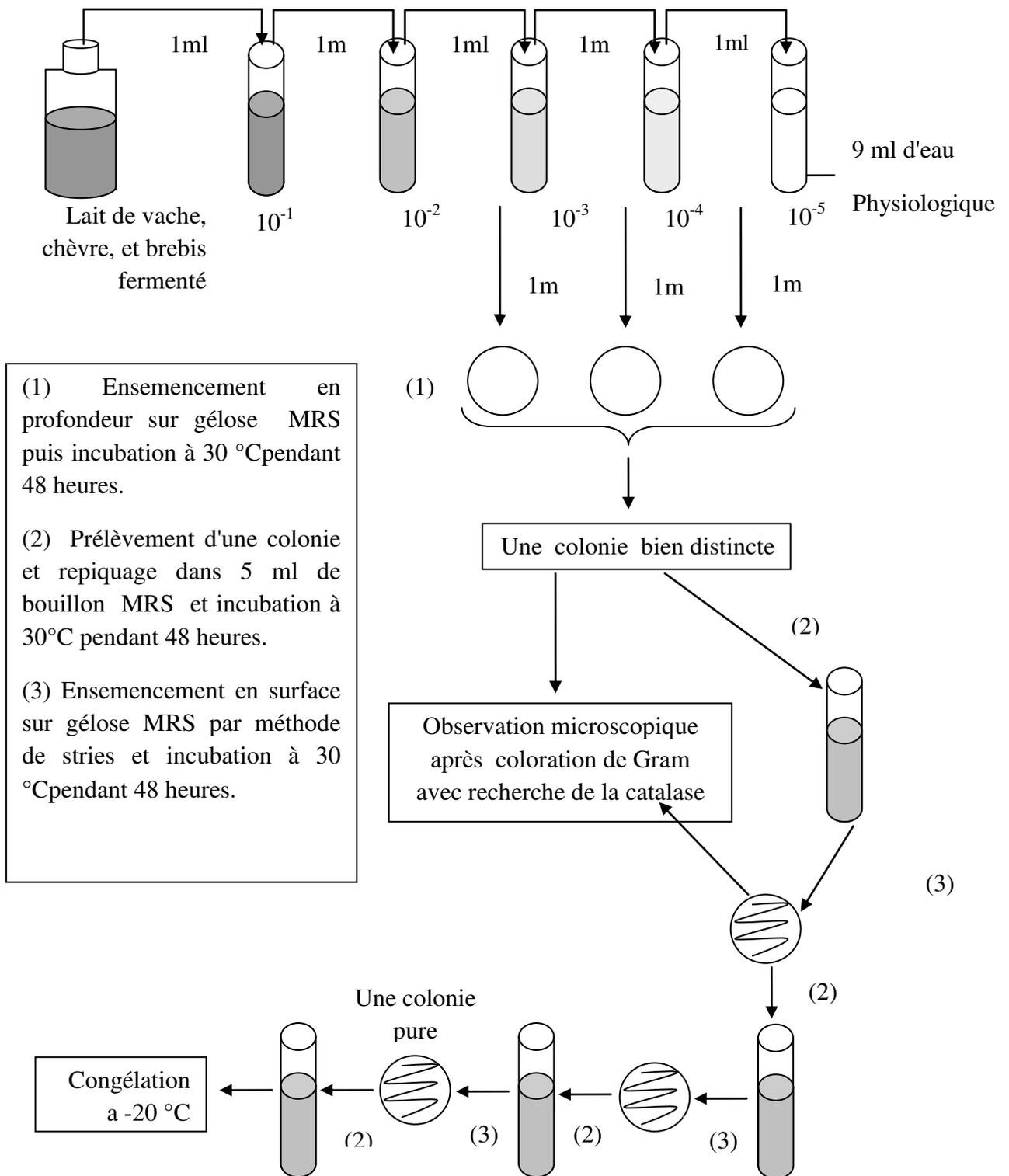
#### 2.2. Isolement et purification

##### 2.2.1. Isolement

L'isolement est réalisé par ensemencement en masse d'un mL des 3 dernières dilution sur gélose MRS, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures.

##### 2.2.2 Purification

La purification des isolats se fait par repiquages successifs des colonies isolées et bien distinctes sur bouillon et gélose MRS. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'une culture pure dont la pureté est estimée par observation microscopique après coloration de Gram (Balows et *al.*, 1992 ; Curk et *al.*, 1996 et Heleni et *al.*, 2006) . La figure ci-dessous résume la méthode d'isolement et de purification :



**Figure 03:** Schéma général d'isolement et de purification des bactéries lactiques.

### 2.3. Etude des caractères culturels

Elle consiste à l'étude macroscopique dont le but est de déterminer les caractères culturels (formes de colonies, couleur, types de contour, pigmentation...etc.) et l'étude microscopique par l'intermédiaire de la coloration de Gram, qui nous a permis d'examiner la forme, le mode d'association et le Gram de ces bactéries (Larpent et *al.*, 1997).

### 2.4. Etude biochimique

#### 2.4.1. Test de catalase

L'enzyme catalase sert à neutraliser les effets bactéricides de peroxyde d'hydrogène (Wheeler, 2008), par la décomposition de ce dernier en eau et en oxygène selon la réaction suivante :  $(2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{catalase} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2)$ .

Une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes est placée sur une lame stérile et une colonie jeune développée sur gélose y est répartie à l'aide d'une pipette pasteur. Le résultat est immédiat et se caractérise par un dégagement gazeux ( $\text{O}_2$ ) si la bactérie est (catalase<sup>+</sup>) (Larpent et *al.*, 1997 ; Marchal et *al.*, 1991 ; Mac Faddin, 2000 ; Sembene, 2002).

#### 2.4.2. Dégradation des sucres (Glucose, saccharose, arabinose, maltose, xylose, lactose, galactose, raffinose, salicine)

4 gouttes de sucre à tester sont ajoutées à une eau peptonnée contenant le rouge de phénol, qui seraensemencé par la culture bactérienne et incubée à 37°C pendant 24 heures.

Le virage de la couleur rouge vers le jaune ou l'orange est dû à l'acidification du milieu (Guiraud, 1998).

#### 2.4.3. Etude du type fermentaire

##### 2.4.3.1. A partir du glucose

On repique une culture pure et jeune de chaque isolat dans un tube contenant le bouillon MRS (avec le glucose au lieu de lactose) et la cloche de Durham pour mettre en évidence la production de gaz et de déterminer le type fermentaire de la bactérie (Axelsson, 2004).

### 2.4.3.2. A partir du gluconate

On applique le même protocole avec le précédent, sauf qu'on remplace le glucose par le gluconate de sodium, ça nous permet de déterminer si la fermentation est homofermentaire obligatoire (pas de production de gaz) ou facultative (production de gaz) (Axelsson, 2004).

### 2.4.4. Identification par galerie API 20E(bio Mérieux)

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture, cette galerie est recommandée pour l'identification des entérobactéries, mais nous avons utilisé les résultats de certains tests biochimiques pour compléter l'identification des souches lactiques isolées.

## 2.5. Conservation des isolats

### 2.5.1. La conservation à court terme

Les souches pures sontensemencées sur gélose MRS inclinée, après incubation à 30°C pendant 18 heures, les tubes sont conservés à 4°C, le renouvellement des cultures se fait chaque les trois à quatre semaines (Badis et *al.*, 2004).

### 2.5.2. La conservation à long terme

Les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 t / min pendant 10 min à partir des jeunes cultures (18-48 h) sur bouillon MRS sont ajoutées à un milieu de conservation en culot, le milieu contenant du lait écrémé, 0.2% d'extrait de levure et 30 % de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes Eppendorfs à -20°C. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le lait écrémé à 0.5 % d'extraits de levure avant utilisation (Badis et *al.*, 2004).

## 2.6. Caractérisation du potentiel probiotique des souches lactiques

Deux paramètres ont été testés pour l'évaluation du potentiel probiotique des isolats obtenus.

- L'activité antimicrobienne des bactéries isolées a été testée vis-à-vis des bactéries pathogènes isolées à partir des diarrhées infantiles.

- La survie des bactéries dans un milieu simulant le jus gastrique ( pH = 2,5 ; 4,5 ; 6,5) avec et sans sels biliaires a été estimée selon la méthode décrite par Dilmi Bouras et Sadoune (2002b) ; Gibson et *al.*,(2005).

### 2.6.1. Caractérisation de l'activité antibactérienne

Les abondantes méthodes décrites pour l'exploration de souches lactiques constructrices de bactériocines sont fondées sur le principe que ces substances protéiques peuvent disperser dans un milieu de culture solide ou semi solide qu'on inocule préalablement avec une souche cible. La production de bactériocine est remarquée par la possibilité inhibitrice du filtrat du micro-organisme testé sur le développement du germe cible (Benkerroum et *al.*, 2007).

On a utilisé la méthode des puits décrite par Barefoot et Klaenhammer, (1993). Les souches sont cultivées dans le milieu MRS liquide et incubées pendant 18 heures. Après incubation, le milieu est centrifugé (10 000 tr / mn) pendant 10 min et le surnageant est conservé.

Les surnageant ont été stérilisés par filtration à travers une membrane à 0,22 µm de pores. Une solution stérile de catalase a été ajoutée à chaque surnageant filtré (à raison de 1ml de catalase pour 10 ml de surnageant) afin d'éliminer les effets possibles d'inhibition par le peroxyde d'hydrogène. Les surnageant ont été ensuite neutralisés à pH 6,5 avec du NaOH 5N.

Des puits de 5mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce (cloche de Durham) sur la gélose Moeller-Hinton inoculé par la souche indicatrice (pathogène) et seront remplies avec 100 µL du surnageant de culture. Les boîtes de Pétri sont mises à une température de +4°C/ 4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (Doumandji et *al.*, 2010). Les boîtes sont incubées à 37°C et l'apparition de zones d'inhibition formées autour des puits est examinée après 24h d'incubation (Hwanhlem et *al.*, 2011). Les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des puits sont mesurés (moyenne de deux diamètres perpendiculaires).

L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1mm (Schillinger et Luke, 1989).

### 2.6.2. Survie des souches dans les conditions extrêmes du tube digestif

Le but de cette étude est de sélectionner des souches lactiques qui peuvent résister aux barrières physiologiques du tube digestif. La méthode utilisée est celle décrite par Dilmi Bouras et Sadoun, (2002) qui consiste à préparer deux fractions.

#### ➤ Préparation de l'inoculum

Dans un tube à essai contenant 9 mL de bouillon MRS, on a ajouté 1 mL de la culture pure des souches lactiques fraîchement repiquées, qui seront incubées à 30°C pendant 6h, on obtient l'inoculum des souches à testées.

L'étude de la survie est réalisée selon la méthode suivante :

Les bouillons de croissance (milieu MRS) sont fraîchement préparés et divisés directement en deux fractions :

➤ **La fraction 1** : sans sels biliaires, répartie en flacons et autoclavée à 120°C pendant 15 mn, puis additionnée d'acide chlorhydrique concentré jusqu'à obtention du pH désiré :

pH 2.5 : représente le pH de l'estomac à jeune.

pH 4.5 : représente le pH de l'estomac au moment ou juste après le repas

pH 6.5 : représente le pH au niveau des intestins.

➤ **La fraction 2** : est additionnée de 0,3 % de sels biliaires, après son autoclavage à 120°C pendant 15 mn. le pH est ajusté comme précédemment décrit.

Ces fractions sont ensuite réparties dans des tubes stériles à raison de 10 ml par tube et additionnées de 3 % d'inoculum d'une culture jeune de la souche lactique pure. Ces fractions sont ensuite incubées à 30 °C ou la croissance des ferments est contrôlée par dénombrements sur boîtes de Pétri pendant les intervalles de temps suivant de 0, 3, 6, 24, 48, et 72 heures.

### **3<sup>ème</sup> partie : Identification moléculaire des bactéries isolées par séquençage de l'ADNr16S**

Les bactéries pathogènes incriminées dans les diarrhées infantiles ainsi que les bactéries lactiques ont été soumises à l'identification moléculaire pour confirmer l'identité des espèces.

#### **3.1.Extraction de l'ADN génomique**

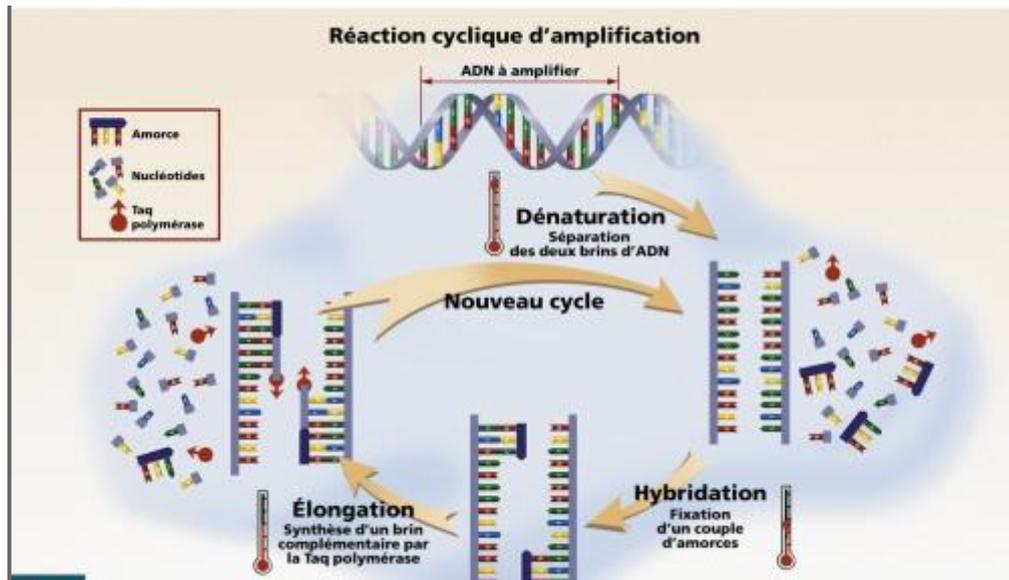
L'extraction de l'ADN des souches a été faite selon la méthode dite le choc thermique (boiling). Cette méthode est basée sur la lyse bactérienne par l'éclatement des membranes cellulaires sous l'effet d'un choc thermique (Quero et *al.*, 2007).

A partir d'une culture jeune, quelques colonies pures sont resuspendues dans 500µL d'eau distillée stérile et chauffées à 95°C pendant 10 min, puis placées immédiatement sur glace pendant 15 min, l'opération a été répétée 2 à 3 fois afin d'assurer la lyse des bactéries. Après une centrifugation de 13000 tr/min pendant 10 min, le surnageant contenant l'ADN est conservé à – 20°C (Roberta et *al.*, 2005).

#### **3.2.Amplification du gène de l'ADNr 16S par PCR**

Selon Saiki et *al.*, (1988), l'amplification en chaîne par polymérase ou réaction en chaîne par polymérase PCR est une méthode d'amplification génique, *in vitro*, qui permet de dupliquer en grand nombre, une séquence d'ADN ou d'ARN connue, à partir d'une faible quantité d'acide nucléique, séquence spécifique d'ADN et des amorces spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse de 20 à 25 nucléotides. Cette technique comprend d'après Bahri (2014), les cycles répétitifs suivants :

- Dénaturation de l'ADN par fusion à haute température pour convertir l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire ;
- Hybridation à l'ADN cible des deux oligonucléotides utilisés comme amorces ;
- Elongation de la chaîne d'ADN par addition de nucléotides à partir des amorces en utilisant l'ADN polymérase comme catalyseur en présence d'ions Mg<sup>2+</sup> (Bahri, 2014).



**Figure 04 :** Amplification de fragments d'ADN *in vitro* : la PCR.

Dans notre expérimentation, l'amplification du gène ADNr 16S a été réalisée en utilisant les réactifs suivants :

- **Des amorces universelles spécifiques (primers)** : 27F et 1492R qui serviront de matrice pour l'amplification de gène de l'ADN 16S, la pertinence de ces amorces est approuvée, testée tant *in silico* par simulation sur ordinateur, tant en laboratoire *in vitro* (Arzu et al., 2011).
  - 27 Forward (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')
  - 1492 reverse (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')
- De l'ADN extrait des souches de bactéries isolées ;
- Des désoxynucléotides triphosphates (dNTP, bases GCTA) ;
- De l'enzyme Taq polymérase (DNA polymérase) : elle se fixe sur les amorces servant de point de départ et ajoute les dNTP afin de synthétiser le brin d'ADN complémentaire ;
- Tampon de chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ), qui sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase.

Ces réactifs ont été mélangés dans un Eppendorf stérile selon les concentrations et les volumes mentionnés dans le tableau III .

**Tableau III.** Réactifs utilisés pour la réaction PCR

Réactifs	Concentrations de la solution mère	Concentrations utilisées	Volumes utilisés
Tampon	5 X	1 X	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM	1.5 µL
dNTPs	25 mM	0.2 mM	0.2 µL
Amorce 27F	10 µM	0.5 µM	1.25 µL
Amorce 1492R	10 µM	0.5 µM	1.25 µL
Taq polymérase (promega)	5 U	1U	0.2 µL
ADN génomique			4 µL
Volume final			25 µL

Le programme d'amplification a été réalisé sur thermocycleur Perkin Elmer (PE corporation, USA), selon les étapes suivantes :

- L'ADN subit une dénaturation primaire pendant 6 minutes à 95°C ;
- L'ADN dénaturé est amplifié durant 35 cycles comprenant : 30 secondes à 95°C (phase de dénaturation), 45 secondes à 55°C (phase d'hybridation) et 45 secondes à 72°C (phase d'élongation) ;
- La réaction est complétée par une élongation finale qui a lieu à 72°C pendant 10 minutes.
- Une fois le programme est terminé, les échantillons sont conservés à 4°C pour l'étape suivante.

### 3.3.L'électrophorèse sur gel d'agarose

La vérification de la qualité des produits PCR de l'amplification a été réalisée en faisant migrer par électrophorèse les produits PCR sur un gel d'agarose pour la visualisation des bandes d'ADN sous ultraviolets (UV).

Pour préparer le gel d'électrophorèse à 1,5%, 1,5g d'agarose sont pesés et placés dans un Erlenmeyer au quel sont ajoutés 100 mL du tampon TAE à 0,5X (Tris, Acétate, EDTA). Le mélange est chauffé, jusqu'à ébullition et la disparition du trouble et puis refroidi à une température de 55°C. Le mélange est coulé dans les moules de la cuve

intégrant les peignes nécessaires pour la création des puits ou sont déposés les produits PCR pour la migration dans la cuve d'électrophorèse remplie de tampon TAE 0,5X.

La révélation des produits d'amplification après migration se fait en plaçant le gel pendant 15 minutes dans un bain de BET (Bromure d'Ethidium ; marqueur fluorescent) à une concentration de 0,5 ug / mL.

Le bromure d'Ethidium est un intercalant de l'ADN très toxique et carcinogène. La manipulation du BET nécessite un équipement spécifique (gant imperméable, lunette).

Quand le colorant de charge (colorant bleu) atteint l'extrémité du gel, la migration est arrêtée par coupure du courant électrique.

La lecture des résultats a été faite sous UV et par comparaison avec le marqueur de poids à 1500 bp ; poids moléculaire de l'ADNr 16S. Une PCR positive montre la présence de bande sur le gel.

### **3.4.Le séquençage des gènes amplifiés ADNr 16S**

Le séquençage était fait par la méthode de Sanger, la réaction repose sur l'incorporation aléatoire par l'ADN polymérase de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) présents dans le milieu réactionnel. Ces ddNTP diffèrent des dNTP par leur extrémité 3'. L'extrémité 3'OH des dNTP est remplacée par une extrémité 3'H. Cette modification empêche la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant. L'allongement de la chaîne est alors interrompu. L'identification du ddNTP présent à l'extrémité 3' de chaque fragment déterminera la séquence nucléotidique du brin matrice initial (Sanger et *al.*,1977).

Dans ce présent travail, les amplifias d'ADN sont purifiés à partir du gel d'agarose par l'utilisation d'un kit (QIA quick® gel extraction), séquencés par la firme (DIAG GENE, Anger-France) par l'application de la technologie de séquençage (BigDyeterminator, AppliedBiosystems, UK).

### **3.5.Identification des souches par NCBI>BLAST**

Les séquences traitées ont été comparées à des bases de données pour permettre l'identification des souches de bactéries par le logiciel NCBI/BLAST (National Center for Biotechnology Information/Basic Local Alignment Search Tool) via le site internet : [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Le logiciel Blast permet de comparer une séquence, nucléique ou

protéique, dite requête, à une banque de séquences, nucléiques ou protéiques. Blast compare, par alignement, les séquences nucléiques sur les 2 brins, c'est-à-dire la séquence étudiée (brin +) et son complémentaire inversé (brin -). Pour comparer une séquence nucléique à une séquence protéique, Blast traduit la séquence nucléique en générant toutes les séquences protéiques possibles. L'alignement des séquences permet, donc, de trouver des similarités entre les séquences analysées. Ces similarités sont dues à une origine évolutive commune (homologie) ou à des fonctions semblables (Hassaine, 2013).

### **4<sup>ème</sup> partie: Etude *in vivo* de l'effet antagoniste de la souche *Lactobacillus sp.* vis-à-vis *Escherichia coli* en présence et en absence d'antibiotique**

L'étude *in vivo* est réalisée dans le but d'étudier l'effet du lait fermenté avec la souche *Lactobacillus sp.* sur la diarrhée dans le cas d'antibiothérapie et une contamination avec *E. coli* ATCC 25922.

*Escherichia coli* est connu depuis longtemps comme une bactérie commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire. Au cours des dernières décennies, le rôle de certaines catégories d'*E. Coli* dans les syndromes diarrhéiques a été précisé et les mécanismes de ce pouvoir pathogène ont été analysés. L'existence de diarrhées à *E. coli* est connue depuis 1940. Dans ce travail, nous avons étudié la capacité des lactobacilles à inhiber *E. coli*. L'inhibition des souches d'*E. coli* par certaines souches de lactobacilles a été déjà décrite par plusieurs travaux (Todorov et *al.*, 2004 ; Karthikeyan et Santosh, 2009).

L'expérimentation est réalisée sur des lapins mâles et femelles de la même espèce (*Oryctolagus cuniculus*) et de même âge (30 jours), pesant entre 450 et 500 g au début de l'expérimentation : les lapins sont répartis aléatoirement en 08 groupes de 05 lapins chacun. Chaque lapin est identifié et chaque groupe est soumis à un régime différent pendant 02 semaines.

#### **4.1. Conditions d'élevage**

Les lapins sont hébergés dans une pièce convenablement aérée, à température de (22°C±1), humidité relative (50±20 %). Ils sont logés dans des cages en acier inoxydable, dont les dimensions et la structure répondent aux recommandations de la Commission Nationale de l'Expérimentation Animales, et soumis à un cycle de 12 heures de lumière suivies de 12 heures d'obscurité. L'eau est fournie par biberon et la nourriture est

disponible sous formes de granules. Les cages sont nettoyées tous les jours, avec renouvellement de la nourriture et de l'eau.

### 4.2. Préparation du lait

Le lait adapté 1<sup>er</sup> âge (Gigoz) est utilisé vecteur de la souche pour le suivi de l'antagonisme *in vivo*. Ce lait infantile est préparé stérilement en diluant 60g de poudre de lait dans 400 ml d'eau distillée stérile.

#### 4.2.1. Préparation du lait fermenté

Le lait fermenté à *Lactobacillus sp.* et l'inoculum d'EPEC sont élaborés tous les jours durant la période d'expérimentation.

- **Inoculum d'EPEC** : la souche d'*E. coli entéropathogène* 25922 est repiquée sur gélose EMB puis incubée à 44°C pendant 24 heures en aérobiose, ensuite 02 colonies sont inoculées dans 9 mL de lait de lait adopté 1<sup>er</sup> âge incubées pendant 18 heures à 44°C (soit  $10^7 E. coli$  /mL).
- **Préferment de *Lactobacillus sp.*** : 02 colonies jeunes sont inoculées dans 9 mL de lait adapté 1<sup>er</sup> âge et incubées pendant 18 heures à 30°C (soit  $7.10^8$  de *Lactobacillus sp.* / mL).

Les charges microbiennes sont standardisées à  $10^8$  UFC/mL pour *Lb. plantarum* et  $10^7$  UFC/mL pour EPEC. Ce taux de *Lb. plantarum* est indispensable pour que le ferment soit utilisé à des fins probiotiques, car l'action probiotique n'est obtenue que si cette souche est présente dans le tube digestif à un nombre important égal ou supérieur à  $10^7$  germes/g de fèces (Dilmi Bouras et Sadoun, 2002b).

### 4.3. Préparation des doses d'antibiotiques

L'antibiotique utilisé (125mg) sera donné aux lapins en tenant compte de la posologie quotidienne usuelle pour nourrisson d'une cuillère -mesure de sirop à 125 mg (le flacon est de 30 g de poudre, correspondant à 60 mL après addition d'eau distillée stérile).

Deux prises par jour, correspondant à 0.5 mL de sirop soit 2.5 mg de poudre d'antibiotique, 02 fois par jour pour un lapin (dose ramenée au poids du lapin) (Hamma, 2009).

### 4.4. Détermination de la flore intestinale des lapins

Avant de procéder à l'étude, une recherche d'EPEC et de lactobacilles dans la flore fécale des lapins et un dénombrement des entérobactéries a été effectué, et ce après une semaine d'installation dans le milieu qui leur est destiné au cours de la période d'expérimentation.

### 4.5. Administration des laits fermentés par les germes testés aux lapins

Dans cette étude, le nombre de  $10^8$  de *Lactobacillus plantarum* et  $10^7$  d'*E. coli* ne sont pas pris arbitrairement, mais représentent des nombres habituellement retrouvés chez les nourrissons sains pour les lactobacilles et chez les nourrissons diarrhéiques ( $10^7$  cellules d'EPEC) (Hamma, 2009).

Les 40 lapins sont répartis en huit lots de cinq lapins, chaque lot obéit à un traitement spécifique (type de germe inoculé, durée de traitement).

**Lot témoin :** Les lapins reçoivent un régime alimentaire de base et sans aucun traitement.

**Lot 1:** Les lapins de ce groupe reçoivent une dose thérapeutique d'amoxicilline de (2,5mg/ kg, deux fois par jour) pendant une semaine.

**Lot 2:** Les lapins reçoivent une dose thérapeutique d'amoxicilline (2,5 mg, 2 fois / jour) pendant une semaine associé à 1mL de lait inoculé par  $10^7$  UFC/ mL de la souche ECEP.

**Lot 3:** Les lapins reçoivent une dose thérapeutique d'amoxicilline (2,5 mg/kg, deux fois par jour) pendant une semaine avec successivement 1mL de lait fermenté à *Lactobacillus sp.* ( $10^8$  UFC/ mL) et 1 mL ( $10^7$  UFC/ mL) d'inoculum d'*E. coli*.

**Lot 4:** On administre aux lapins 1 mL de lait fermenté par la souche *Lactobacillus sp.* pendant une semaine puis 1 mL de lait durant la 2<sup>ème</sup> semaine (traitement préventif).

**Lot 5:** Les lapins reçoivent une dose thérapeutique d'amoxicicilline (2,5mg/ kg, deux fois par jour) pendant une semaine avec 1 mL de lait fermenté à *Lactobacillus sp.*

**Lot 6:** Les lapins reçoivent 1 mL de lait inoculé par  $10^7$  UFC/mL de la souche ECEP pendant une semaine.

**Lot 7:** Les lapins reçoivent 1 mL de lait inoculé par  $10^7$  UFC/ mL de la souche ECEP pendant 48h, puis 1mL de lait fermenté avec  $10^8$ / mL de *Lactobacillus sp.* durant une semaine (traitement thérapeutique).

#### 4.6. Recueil des selles

Une analyse microbiologique des selles a été réalisée quotidiennement après 4heures d'ingestion du lait fermenté et pendant une semaine après l'arrêt du traitement, 1g de selles est transféré stérilement et très rapidement à un tube contenant 9 mL d'eau physiologique stérile puis dilué et homogénéisé à l'aide d'un Vortex.

#### 4.7. Analyse microbiologique

Le dénombrement des *Lactobacillus sp.* et d'*E. coli* dans les selles a été réalisé sur milieu MRS et EMB (Eosine and Methylene Bleu) respectivement. Après avoir effectué une série de dilutions décimales à partir des échantillons de selles dans l'eau physiologique. Cent microlitres de chaque dilution sontensemencés en masse de la gélose, les boîtesensemencées sont ensuite incubées à 30 °C et 44°C pendant 48 heures pour les *Lactobacillus sp.* et *E. coli* respectivement.

Après avoir réalisé une moyenne arithmétique pour chaque milieu de culture, les résultats sont rapportés au nombre d'unité formant colonies par gramme des fécès (UFC/g).

Les dénombrements ont été réalisés quotidiennement à partir des selles des lapins, avant pendant, et après les différents traitements pour deux semaines. Le but de ces analyses était de déterminer le nombre de survie de lactobacilles et *E. coli*, et leur durée de vie dans les intestins.

#### 4.8. Analyse statistique

Trois répétitions ont été réalisées pour chaque test, les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  Ecart type, une analyse de variance à un facteur (ANOVA) a été réalisée. Les différences sont considérées statistiquement significatives à  $P < 0,05$ .

### **4.9. Etude histologique après dissection des lapins**

#### **4.9.1. Dissection des lapins**

Au terme des traitements réalisés après chaque décès, les lapins des différents lots sont disséqués. Le lapin chloroformé est installé dans une zone stérile, une incision est réalisée au niveau du ventre (de la cage thoracique à la poche urinaire) par une lame de dissection stérile.

Les organes sont récupérés et conservés dans un liquide fixateur (formol à 10%). Cette fixation a pour but la conservation des structures et la durcissement des tissus. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement de l'intestin grêle et le colon.

#### **4.9.2. Préparation des coupes histologiques**

La préparation des coupes histologiques des organes prélevés a été réalisée selon les étapes décrites par Hould, (1998).

L'inclusion a pour but la réalisation de coupes histologiques. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine, comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation (par immersion dans des bains d'alcool), puis immergé dans les bains de toluène (un solvant de la paraffine), puis infiltré par la paraffine fondue par chauffage avant être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue. Après refroidissement, on obtient un bloc de paraffine dur à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse.

Les coupes du bloc de paraffine sont réalisées avec un microtome permettant d'obtenir des tranches de section (coupes histologiques) de 2 à 5 microns d'épaisseur.

Les coupes sont recueillies sur des lames en verre. Les colorations des tissus sont réalisées sur lames, ce qui accentue les contrastes pour pouvoir reconnaître les différents éléments du tissu. Les colorants utilisés sont mentionnés dans l'annexe II.

Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre. Enfin, l'observation des tissus est réalisée à l'aide d'un microscope Zeiss Axiovert 200M- objectif 20 et camera couleur Zeiss.

## Chapitre IV : Résultats et discussion

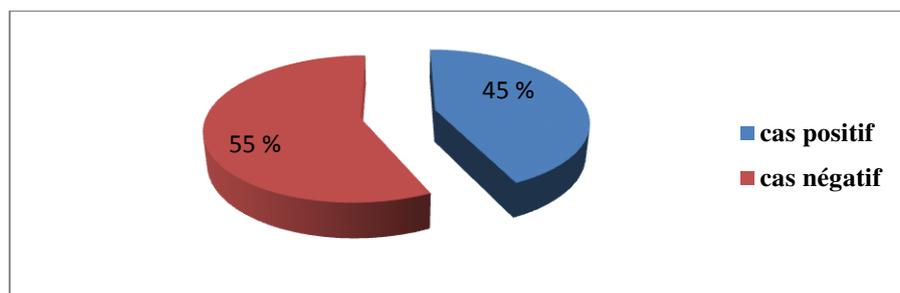
### I. Isolement et identification des bactéries pathogènes

Les troubles de la flore intestinale, chez les nourrissons sont dus aux différents facteurs externes (mode d'allaitement, âge du nourrisson, traitements médicamenteux ...) et se traduisent généralement par des diarrhées. En effet, plus de 20% des enfants souffrant de désordres intestinaux développent des diarrhées persistantes qui sont associées à une augmentation du risque de mortalité (Boclé, 2005 ; Hamma, 2009). La diarrhée représente en Algérie et de part le Monde l'une des causes principales de mortalité chez l'enfant de moins de cinq ans (Tannock, 1999 ; OMS, 2011).

120 prélèvements de selles ont fait l'objet de notre étude, provenant des malades du service de pédiatrie de l'hôpital de Chettia-Chlef et des malades externes âgés de moins de 02ans de différents sexes. Les différents résultats obtenus sont présentés comme suit :

#### 1.1.Répartition des cas positifs et négatifs dans les échantillons étudiés

Les résultats de la répartition des cas positifs et négatifs obtenus sont illustrés dans la figure 5. Il a été démontré que parmi les 120 prélèvements effectués, les cas négatifs sont représentés par un taux de 55%, tandis que les cas positifs représentent un taux de 45% du total des échantillons.



**Figure 05:** Répartition des cas positifs et négatifs dans les échantillons de selles étudiés.

Le taux élevé des cas négatifs peut être expliqué par :

- Une mauvaise orientation du diagnostic médical ;
- Une diarrhée induite par une erreur diététique ;
- Une diarrhée secondaire suite à une antibiothérapie ;
- Une diarrhée due à une allergie alimentaire ;
- Une diarrhée due aux *rotavirus*.

La présence des germes pathogènes dans les selles de ces nourrissons diarrhéiques peut être expliquée par l'état de santé du nourrisson (diarrhée), affaiblissement du système immunitaire, la nature de la diarrhée (diarrhée aigue) ainsi que les conditions externes (hygiène, la prise en charge,...).

La fragilité et la sensibilité du jeune enfant font de lui, une cible pour les agressions microbiennes. Dès la première colonisation, des germes pathogènes nuisibles peuvent peupler les différentes muqueuses et engendrer diverses pathologies telles que les infections respiratoires, méningites, les infections gastro-intestinales.... Les infections gastro-intestinales sont dues à l'implantation de germes entéropathogènes dans le tube digestif, cette implantation induit le dysfonctionnement de l'intestin qui se traduit généralement par des diarrhées (Delmee, 2003).

### **1.2.Examen bactériologique (Coproculture)**

L'examen bactériologique consiste à rechercher les espèces bactériennes dans les selles, de déterminer leurs caractéristiques phénotypiques puis les identifier par des tests biochimiques classiques et avec galeries API 20E afin de déterminer les espèces isolées à partir de nos échantillons. Et enfin les comparer à des espèces déjà identifiées et ainsi estimer le degré de similitude.

- **Isolement de différentes espèces bactériennes responsables de diarrhées**

Il est nécessaire de faire systématiquement une lecture des milieux de cultures ensemencés. Seule la présence des colonies isolées sur milieu de culture permet en pratique, de mener à bien le diagnostic bactériologique. L'isolement et la pré-identification des isolats issus des échantillons positifs, ont permis de déterminer les genres bactériens impliqués dans ces infections, après culture sur différents milieux.

Dans cette étude nous avons pu isoler 150 isolats bactériens à partir de 54 échantillons positifs de selles prélevés. Les résultats de l'examen macroscopique des espèces bactériennes isolées sur géloses sélectives ont été étudiés, cet examen consiste à déterminer les caractéristiques des colonies obtenues (aspect, couleur, taille, contour ...).

Les observations macroscopiques des isolats bactériens a montré 3 catégories de colonies différentes, 138 isolats (isolat  $\alpha$ ) apparaissent sous forme de colonies rondes, saumons, lisses et laiteuses sur la gélose Hektoen, 11 isolats (isolat  $\beta$ ) sont des colonies fines,

vertes au centre noire et 1 seul isolat (isolat  $\gamma$ ) sous forme de colonie circulaire, lisse et opaque.

L'examen microscopique a montré que tous les isolats obtenus sont des Gram négatifs. Les isolats  $\alpha$  apparaissent sous forme de bacilles fins, les isolats  $\beta$  ont une forme de petits bacilles, tandis que les cellules de l'isolat  $\gamma$  sont de petits bacilles droits.

Les résultats d'examens biochimiques confirment l'appartenance de ces isolats à la famille des Entérobactéries, ces tests ont démontré que les isolats  $\alpha$  fermentent l'indole, le mannitol et les sucres du milieu TSI (glucose, lactose et saccharose) avec production de gaz. Ils ont la capacité de synthétiser la Lysine décarboxylase (LDC), l'Ornithine décarboxylase (ODC) et la  $\beta$ -galactosidase, par contre ils ne possèdent pas d'oxydase, d'uréase, de Tryptophane désaminase (TDA) ni d'Arginine dihydrolase (ADH), ils sont mobiles et n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone.

En comparant ces résultats à ceux obtenus par Pilet et *al.*, (1981) ; Leclerc et *al.*, (1995) ; Podschum et *al.*, (2001) ; les isolats  $\alpha$  appartiennent à l'espèce d'*Escherichia sp.*

Les isolats  $\beta$  présentent les mêmes caractères biochimiques que ceux du genre *Escherichia* sauf qu'ils ne fermentent pas l'indole ni le lactose, ils produisent le H<sub>2</sub>S lors de la fermentation du TSI. Ils n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone, ils ne possèdent pas de l'Arginine dihydrolase (ADH).

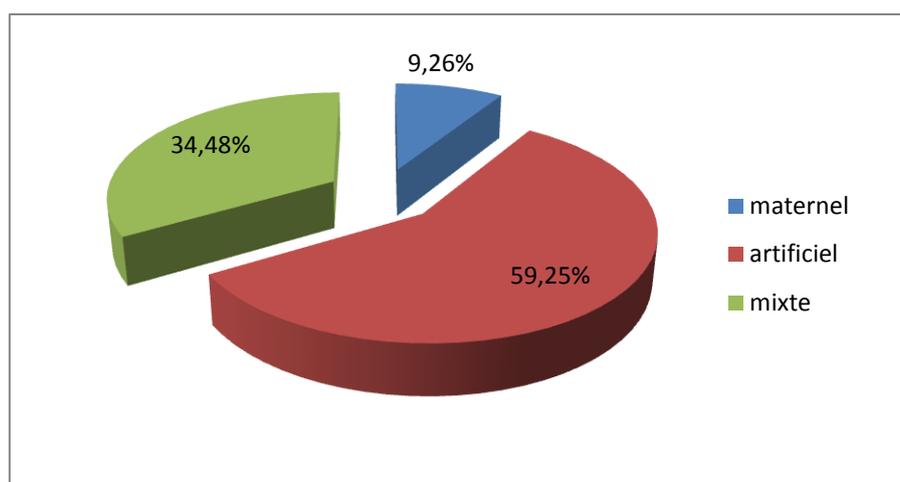
D'après ces résultats et par comparaison aux travaux de Tortora et *al.*, (2003) ; Gaillot, (2008) ; Djelouat, (2008) ; ces isolats appartiennent à l'espèce *Salmonella sp.*

En ce qui concerne l'isolat  $\gamma$ , les résultats d'examen biochimique ont montré qu'il n'a pas la capacité de fermenter l'indole et le lactose, il fermente le glucose du milieu TSI avec production de gaz, il a la capacité de synthétiser l'uréase et la Tryptophane désaminase (TDA). Cet isolat est oxydase,  $\beta$ -galactosidase et la Lysine décarboxylase (LDC) négatif.

La comparaison de ces résultats avec ceux de Maryse et Danielle, (2008) et Delarras, (2007), cet isolat appartient à l'espèce *Proteus sp.*

### 1.3.Répartition des infections intestinales d'origine bactérienne selon le mode d'allaitement

Dans cette étude nous avons remarqué que le nombre des enfants diarrhéiques allaités au lait artificiel était très important (59,25 % soit 32 enfants) par rapport à seulement (9,26 % soit 5 enfants) enregistré chez les enfants diarrhéiques nourris avec le lait maternel. Le nombre des enfants diarrhéiques allaités à la fois par le lait maternel et le lait artificiel (mixte) était de l'ordre de 34,48 % soit 17 enfants.



**Figure 06:** Répartition des nourrissons diarrhéiques selon le type d'allaitement.

D'après Lonnerdal et Lien (2003) et Cinquin et *al.*, (2005), les enfants allaités au sein souffrent moins souvent de ces troubles comparés aux enfants nourris avec des formules infantiles. Ceci s'explique par la nature même du lait maternel qui possède des propriétés particulières offrant ainsi une protection renforcée aux bébés allaités. Le lait maternel est le seul aliment réellement adapté aux besoins du nouveau-né et du jeune enfant. C'est un milieu complexe constitué de nombreux composés favorables à la fois au développement des fonctions immunitaires ainsi que le développement d'un microbiote intestinal dominé par les Bifidobactéries, bactéries ayant des vertus bénéfiques pour la santé de l'enfant (Izard, 1983 ; Hamma, 2009).

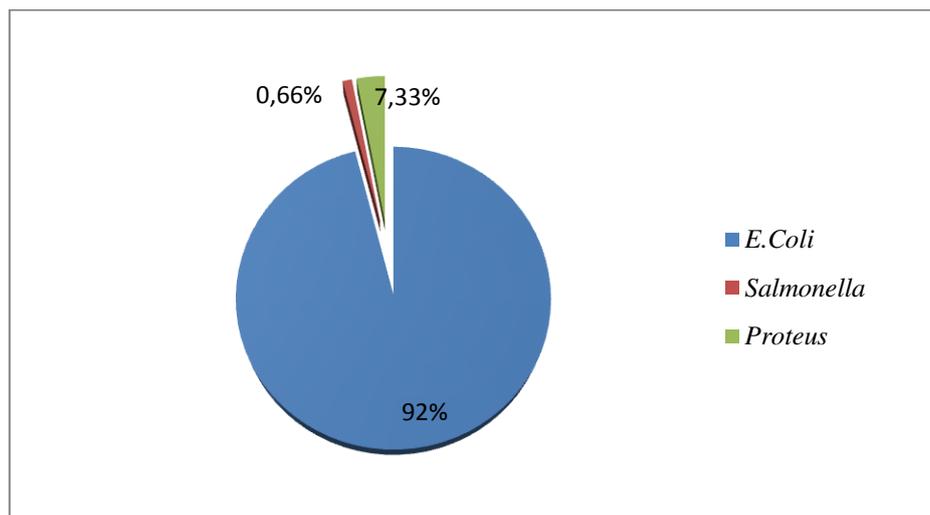
L'étude réalisée en Algérie par Belkhenchir (1985) révèle que 58,82% des enfants diarrhéiques sont allaités artificiellement et 22,11% des diarrhées sont dues à *Escherichia colientéropathogènes*. En effet, l'allaitement maternel « immunise » le bébé contre un grand nombre d'infections, il agit comme un vaccin naturel charriant un nombre considérable de facteurs cellulaires et biologiques, et grâce à certains de ces facteurs dits bifidigènes, ces

derniers favorisent l'installation des Bifidobactéries dans le tractus intestinal du nouveau-né nourri au lait maternel.

Une relation étroite existe entre le rétablissement de la flore intestinale et la digestion et l'absorption de certains aliments. Les caractéristiques de cette colonisation et de l'équilibre qui va en résulter dépendent, chez le sujet sain, des conditions de naissance et de modalités de l'alimentation. En effet l'influence du lait maternel sur l'établissement de la flore intestinale et son rôle bénéfique en matière de prévention des infections digestives sont bien connues, de même que l'effet bénéfique du lait fermenté et des yaourts (Chouraqui, 2002 ; Boclé, 2005 ; Hamma, 2009).

#### 1.4. Distribution des différents genres bactériens isolés à partir des coprocultures

Afin de déterminer les germes les plus incriminés dans les diarrhées infantiles, nous avons calculé le pourcentage de chaque germe isolé à partir des échantillons des selles des enfants diarrhéiques, les résultats obtenus sont représentés dans la figure 07.



**Figure 07 :** Distribution des différents genres bactériens isolés à partir des coprocultures.

On constate que la majorité des infections intestinales d'origine bactérienne sont dues au genre *Escherichia* avec un taux de 92% (soit 138 isolats / 150) suivie par *Salmonella sp.* avec un taux de 7,33% (soit 11 isolats / 150) et un taux minime de *Proteus mirabilis* et qui est représenté par un taux de 0,66% (soit 1 isolats / 150).

Le genre *Escherichia* avec un taux de 92% des cas de diarrhées infantiles demeure une cause majeure de diarrhées dans les pays en voie de développement, ce microorganisme est responsable d'épidémies de gastro-entérites en milieu hospitalier (OMS et Unicef, 1990).

Ainsi d'après Crivelli et *al.*, (2001) et Meillies et *al.*, (2006), les souches d'*Escherichia* identifiées pour la majorité des cas comme étant EPEC constituent l'une des principales causes de diarrhées infantiles. Une de ces souches d'EPEC sera donc retenue pour le reste de l'étude.

Dans les pays en voie de développement chez les enfants de moins de 5ans, près de 1,5 milliards de cas de diarrhées par an sont notés, une part significative de ces diarrhées infectieuses est imputable à des *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) (qui provoque des hémorragies intestinales comme *E.coli* CM57) et les listérioses qui sont des maladies d'origine alimentaire apparues au cours des dernières décennies, elles sont une des conséquences sérieuses et parfois mortelles, notamment chez les nourrissons (Merad et Merad, 2001).

Les principaux modes de transmission des infections à EHEC à l'homme sont la consommation d'aliments contaminés, la transmission de personne à personne, l'ingestion d'eau contaminée et le contact avec les animaux (notamment les bovins). En France, de 1995 à 2001, la moitié des cas SHU (Syndrome Hémolytique et Urémiques), pour lesquels une sérologie à été réalisée, était associée à une sérologie positive à *Escherichia coli* entérohémorragique (55%), avec une forte proportion du séro groupe 0157 (86%), ce qui est du même ordre de grandeur que dans les autres pays européens (Meilles et *al.*, 2003).

Les Salmonelles représentent un taux moins important des cas de nourrissons diarrhéiques (1%). Les diarrhées à Salmonelles sont fréquentes dans les pays sous-développés, elles seraient liées aux mauvaises condition d'hygiène (Diouf et *al.*, 1990).

La diarrhée du nourrisson peut être due à une malnutrition ou à une alimentation non équilibrée et non adaptée, à des traitements non adéquats (antibiothérapie), manque d'hygiène ou à un allaitement artificiel non adéquat, qui favorise l'implantation de germes pathogènes responsables de diarrhées infectieuses chez le nourrisson. Effectivement, les diarrhées aiguës sont plus graves dans les pays en voie de développement car elles surviennent le plus souvent sur un terrain fragilisé par la malnutrition, plus d'un tiers des lits de services de pédiatries de ces pays sont occupés par des enfants diarrhéiques. La malnutrition est la cause la plus fréquemment associée à la diarrhée. Quand la malnutrition augmente, les risques de diarrhée s'aggravent (Diouf et *al.*, 1990 ).

**1.5.Répartition des infections intestinales d’origine bactérienne selon l’âge**

D’autres facteurs liés au nourrisson peuvent être en relation directe avec le nombre de cas diarrhéiques et en conséquent le taux d’hospitalisation à cause de diarrhées. Parmi ces facteurs l’âge du nourrisson.

Le tableau suivant illustre la répartition du nombre des nourrissons hospitalisés par des diarrhées réparties selon leurs âges.

**Tableau IV : Distribution des nourrissons hospitalisés par diarrhées selon l’âge (2011-2012)**

<b>Tranche d’âge</b>	<b>0-4 mois</b>	<b>5-11 mois</b>	<b>12-17 mois</b>	<b>18-24 mois</b>
<b>Nombre de nourrissons diarrhéiques</b>	17	58	15	30

Dans cette étude nous avons enregistré 58 cas de diarrhées chez des enfants âgés de 5 et 11 mois, 30 cas chez des enfants âgés de 18 à 24 mois, 17 cas chez les enfants âgés moins de 4 mois et seulement 15 cas chez des enfants âgés de 12 à 17 mois.

Ces résultats montrent que l’enfant avant l’âge de 2 ans (notamment entre 5 et 11 mois) est particulièrement exposé à une diarrhée, ceci peut être expliqué par :

- C’est à cette période que se développe progressivement l’immunité propre à l’enfant. Pendant qu’il se produit une baisse des anticorps d’origine maternelle à cause de l’allaitement artificiel. Le nourrisson est alors plus vulnérable aux infections pendant cette période (5-11 mois).

- C’est également à ce moment que commence la diversification alimentaire de l’enfant. Lorsque celle-ci est mal conduite, la malnutrition puis la diarrhée peuvent survenir.

D’après Hamma (2009), toutes les tranches sont touchées par la diarrhée avec un plus grand nombre de cas d’hospitalisations pour les tranches d’âge allant de 0 à 11 mois. Cela est probablement dû au changement de type d’alimentation (sevrage) à cet âge précisément, car il y a une modification de la flore fécale du nourrisson suite à la première prise de nourriture solide, ce qui entraîne la diminution de la flore bifide et l’augmentation de la flore

putréfiantes (Bactéroides, Entérobactéries et *Clostridium*). Les modifications sont d'autant plus importantes, lorsque le régime de à l'enfant est moins adapté.

Hamma (2009) a constaté qu'après 11 mois, il y a une diminution des cas diarrhéiques de plus en plus et cela peut s'expliquer par l'adaptation de ces nourrissons à leur nouveau mode d'alimentation et surtout à la maturation de leur système immunitaire qui se développe au fur et à mesure que leur âge avance, donc plus de force pour affronter les différentes agressions microbiennes.

En effet, selon Hamma (2009), la composition et les fonctions de la microflore du tractus gastro-intestinal sont influencées par différents facteurs liés aux changements des conditions physiologiques de l'hôte (l'âge, état de santé), de la composition du régime alimentaire et des circonstances environnementales tels que l'hygiène et le traitement médicamenteux.

## **II. Isolement et identification des bactéries lactiques**

### **2.1. Isolement et identification de bactéries lactiques**

L'isolement des bactéries lactiques sur milieu MRS a conduit à une collection de 100 isolats obtenus à partir des différents échantillons de lait cru de vache, de chèvre et de chamelle. Afin de les différencier, chaque isolat a été désigné par une lettre et un chiffre en indiquant l'origine du lait.

### **2.2. Identification des isolats obtenus**

L'appartenance ou non des 100 isolats aux différents genres de *Lactobacillus* a été étudiée selon les caractéristiques culturelles, morphologiques et biochimiques. Les résultats obtenus sont démontrés dans le tableau V.

#### **2.2.1. Etude des caractères morphologiques**

##### **A) Examen macroscopique**

L'observation macroscopique des colonies des 100 isolats, obtenus sur gélose MRS, a révélé plusieurs types de colonies avec des différentes formes et couleurs, les colonies étaient circulaires ou lenticulaires, de couleur blanchâtre ou jaunâtre, rugueuses ou lisses (Annexe III, Figure 6.A).

**B) Examen microscopique**

L'examen microscopique des isolats a révélé qu'elles étaient positives à la coloration de Gram avec deux formes dominantes : bacillaire et coccique. Les cellules bactériennes étaient isolées ou disposées en paires, en chainettes ou en tétrade.

**TableauV:** Caractères morphologiques des BL isolées surMRS.

Genre	Macromorphologie	Micromorphologie	Coloration de Gram	Nombre de souches
<i>Lactobacillus</i>	- Arrondies ou lenticulaires ; - Blanchâtre ou jaunâtre ; - Tailles variables - Rugueuses ou lisses	bacilles ; coccobacilles ; isolées ou en chainettes.	+	82
Autres genres	- Arrondies ; - Transparentes ; - Très petites :	Coques ou ovales ; Disposées en chaînettes Coques ;	+	18
	- Arrondies ; - Grisâtres ou blanchâtres ; - Lisses.	Disposées en tétrade.	+	

+ : Positives à la coloration de Gram

Cent souches de bactéries lactiques ont été isolées du lait cru de vache, de chèvre et de chamelle. Elles ont été cultivées sur milieu MRS. Ce dernier est sélectif pour *Lactobacillus* mais quelques espèces de bactéries lactiques appartenant aux genres *Leuconostoc* et *Pediococcus* peuvent s'y développer. Par ailleurs, il ne permet pas la culture des autres bactéries lactiques comme *Carnobacterium*, à cause de la présence de l'acétate, et les Bifidobactéries qui nécessitent l'addition de la cysteine au milieu de culture (Sutra et al., 1998) .

En outre, l'examen microscopique des isolats, nous a permis d'éliminer les souches aux formes cocciques correspondant aux genres *Leuconostoc* et *Pediococcus*.

Par conséquent, sur les 100 bactéries lactiques testées, 82 souches positives à la coloration de Gram, de forme bacillaire ont été retenues. Elles appartenaient, via ces critères, au genres *Lactobacillus* (Klein et al., 1998 ; Axelsson, 2004 ; Hammes et Hertel, 2006 ; Tabasco et al., 2007 ; De Vos et al., 2009).

### **2.2.2. Etude de caractères biochimiques**

#### **A) Recherche de la catalase**

Parmi les 82 isolats retenus, le test de la catalase a révélé que seulement 70 isolats étaient catalase négative (dépourvus de catalase). Selon De Vos et al., (2009) ; les Lactobacilles sont catalase négatives, et de ce fait elles sont retenues.

#### **B) Type fermentaire**

Suivant la classification de De Vos et al., (2009), les lactobacilles retrouvées dans notre étude se subdivisent selon leur type fermentaire en trois groupes :

- Groupe des homofermentaires obligatoires représenté par *L. gasseri*, *L. ruminis* et *L. acidophilus*.
- Groupe des homofermentaires et hétérofermentaires facultatifs représenté par *L. platarum* et *L. casei* sp.
- Groupe des hétérofermentaires obligatoires représenté par *L. brevis*, *L. reuteri* et *L. fermentum*.

Nos résultats ont montré que quelques isolats sont homofermentaires et d'autres sont hétérofermentaires. Le métabolisme énergétique des lactobacilles est exclusivement fermentaire (certaines espèces sont homofermentaires (homolactiques) ne produisant que l'acide lactique, d'autres hétérofermentaires (hétérolactiques) produisant de l'acide acétique, de l'acétaldéhyde, de l'éthanol et du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) à côté de l'acide lactique (De Vos et al., 2009 ; Nanatani et Abe, 2011).

#### **C) Fermentation des hydrates de carbones**

La fermentation des sucres par les isolats obtenus sont présentés dans l'annexe V.

L'identification des isolats obtenus est basée sur les profils de souches de référence selon les travaux de Devoyod et Poullain, (1988); Leveau et al., (1991) ; Teuber et Geis, (2006).

Les Lactobacilles, sont généralement capable, de fermenter la plupart des sucres, sauf quelques exceptions par les quelles, on a fait une distinction entre les espèces.

Les isolats LBC35, LB37, LBC38, LBC41, LBG20, LBG26, LBG27, LBG28 et LBG33 fermentent la majorité des sucres mais elles ne fermentent ni le Xylose ni l'Arabinose, elles ont été identifiées comme étant *Lactobacillus fermentum*.

Les isolats LBV3, LBV4, LBV5 ont le même profil fermentaire toute fois l'isolat LBV4 fermente le Galactose. LBV3 ne fermente pas le Raffinose alors que LBV4 et LBV5 sont incapables de fermenter le Xylose.

Nous avons remarqué que nos isolats sont représentés majoritairement par *L. platarum* suivie par *L. fermentum* et minoritairement par *L. caseisp.*, *L. gasseri*, *L. ruminis*, *L. brevis* et *L. reuteri*.

### **2.3. Caractérisation probiotique des lactobacilles isolés**

#### **2.3.1. Activité antibactérienne des lactobacilles isolés**

L'activité antibactérienne d'un probiotique est primordiale pour la colonisation réussie des muqueuses intestinales. Elle lui assure un effet de barrière et de défense contre les pathogènes (Frey et Hubert, (1993) ; Erlend et *al.*, (1998) ; Vaughan et *al.*, 1999). Les lactobacilles, peuvent produire des substances antimicrobiennes, actives *in vitro* et *in vivo* sur les pathogènes comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (De Martinis et *al.*, (2001); Ayad et *al.*, (2004); Labioui et *al.*, (2005). Dans une autre étude, Dilmi Bouras et Sadoun, (2002a) assurent que l'implantation permanente des probiotiques dans le tube digestif n'est pas nécessaire. Une survie pendant un temps déterminé est largement suffisante pour que le probiotique assure son activité antibactérienne. Ce qui me semble très logique et favorable au maintien du microbiote intestinal.

L'activité antibactérienne des lactobacilles isolés de différents échantillons de lait cru, a été étudiée par la technique des puits contre un groupe de germes pathogènes intestinaux sensibles aux antimicrobiens : *Escherichia sp.*, *Salmonella sp.*, *Proteus sp.* isolées en pédiatrie (cas de diarrhée). L'effet inhibiteur des *Lactobacillus* a été déterminé par la mesure des zones d'inhibition. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau VI.

D'après le tableau VI, il apparait que les surnageant des souches de lactobacilles isolées, neutralisés à pH= 6,5 et traités par de la catalase (SNC), ont inhibé la croissance de la majorité des souches pathogènes testées avec des diamètres d'inhibition variables. Le surnageant des bactéries LBC39, LBG28, LBC50, LBG31, LBC37 avaient des activités antibactériennes très intéressantes, elles ont montré des spectres d'activité actifs sur toutes les

souches testés, avec des zones d'inhibition supérieures à 11 mm, ce qui traduit un bon ou fort potentiel antagoniste de ces bactéries. Les autres souches ont montré une activité antagoniste plus faible.

Tableau VI : Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques par la méthode de Barefoot et Kaenhammer (1983) vis-à-vis les bactéries pathogènes isolées (diamètre mesuré en mm).

Souche	LBB1	LBB2	LBB3	LBB4	LBB5	LBB6	LBB7	LBB8	LBB9	LBB10	LBB11	LBB12	LBB13	LBB14
<i>E. coli</i>	10 ± 0,4	01 ± 0,3	00 ± 0,0	03 ± 0,2	00 ± 0,0	07 ± 0,2	00 ± 0,0	13 ± 0,7	00 ± 0,0	00 ± 0,0	00 ± 0,0	06 ± 0,1	00 ± 0,0	07 ± 0,4
<i>Salmonella sp.</i>	04 ± 0,5	13 ± 0,6	12 ± 0,4	13 ± 0,7	00 ± 0,0	06 ± 0,1	06 ± 0,7	00 ± 0,0	07 ± 0,5	00 ± 0,0	06 ± 0,1	07 ± 0,4	00 ± 0,0	00 ± 0,0
<i>Proteusmirabilis</i>	11 ± 0,7	00 ± 0,0	13 ± 0,7	01 ± 0,2	06 ± 0,1	05 ± 0,3	00 ± 0,0	00 ± 0,0	00 ± 0,0	00 ± 0,0	00 ± 0,0	09 ± 0,1	00 ± 0,0	08 ± 0,6

Souche	LBB15	LBB16	LBB17	LBB18	LBB19	LBB20	LBB21	LBB22	LBB23	LBB24	LBB25	LBB26	LBB27	LBB28
<i>E. coli</i>	06 ± 0,3	04 ± 0,2	06 ± 0,1	08 ± 0,3	09 ± 0,1	06 ± 0,3	05 ± 0,2	08 ± 0,3	04 ± 0,2	07 ± 0,2	04 ± 0,1	11 ± 0,2	14 ± 0,2	<b>13 ± 1,2</b>
<i>Salmonella sp.</i>	04 ± 0,2	05 ± 0,1	03 ± 0,1	06 ± 0,2	06 ± 0,1	03 ± 0,2	07 ± 0,2	04 ± 0,1	11 ± 0,3	04 ± 0,2	14 ± 0,4	07 ± 0,1	12 ± 0,2	<b>05 ± 0,5</b>
<i>Proteusmirabilis</i>	14 ± 0,4	09 ± 0,2	06 ± 0,3	09 ± 0,1	02 ± 0,1	07 ± 0,1	14 ± 0,2	05 ± 0,1	03 ± 0,1	05 ± 0,1	06 ± 0,2	03 ± 0,1	15 ± 0,4	<b>02 ± 0,3</b>

Souche	LBB29	LBB30	LBB31	LBB32	LBB33	LBB34	LBB35	LBB36	LBB37	LBB38	LBB39	LBB40	LBB41	LBB42
<i>E. coli</i>	07 ± 0,1	11 ± 0,4	<b>15 ± 0,6</b>	07 ± 0,1	16 ± 0,2	04 ± 0,1	12 ± 0,4	13 ± 0,2	<b>18 ± 0,6</b>	07 ± 0,2	<b>12 ± 0,4</b>	12 ± 0,1	06 ± 0,1	03 ± 0,1
<i>Salmonella sp.</i>	05 ± 0,3	04 ± 0,1	<b>12 ± 0,9</b>	11 ± 0,3	12 ± 0,4	05 ± 0,3	10 ± 0,3	10 ± 0,4	<b>12 ± 0,5</b>	07 ± 0,7	<b>08 ± 1,1</b>	02 ± 0,1	04 ± 0,1	09 ± 0,3
<i>Proteusmirabilis</i>	05 ± 0,1	08 ± 0,1	<b>16 ± 0,3</b>	05 ± 0,1	07 ± 0,1	06 ± 0,1	07 ± 0,8	00 ± 0,0	<b>12 ± 0,2</b>	09 ± 0,3	<b>13 ± 0,8</b>	06 ± 0,1	02 ± 0,1	11 ± 0,4

Souche	LBB43	LBB44	LBB45	LBB46	LBB47	LBB48	LBB49	LBB50	LBB51	LBB52	LBB53	LBB54	LBB55	LBB56
<i>E. coli</i>	09 ± 0,5	08 ± 0,6	08 ± 0,4	09 ± 0,7	16 ± 0,3	14 ± 0,7	02 ± 0,4	<b>22 ± 1,6</b>	12 ± 0,6	00 ± 0,0	08 ± 0,7	13 ± 0,3	06 ± 0,2	06 ± 0,4
<i>Salmonella sp.</i>	07 ± 0,3	14 ± 0,4	05 ± 0,4	06 ± 0,3	08 ± 0,4	00 ± 0,0	03 ± 0,1	<b>17 ± 1,7</b>	09 ± 0,8	06 ± 0,7	04 ± 0,1	07 ± 0,6	15 ± 0,8	07 ± 0,3
<i>Proteusmirabilis</i>	11 ± 0,3	11 ± 0,6	07 ± 0,2	18 ± 0,8	09 ± 0,7	05 ± 0,1	05 ± 0,4	<b>14 ± 0,9</b>	08 ± 0,4	09 ± 0,1	18 ± 0,7	07 ± 0,3	00 ± 0,0	13 ± 0,7

Souche	LBB57	LBB58	LBB59	LBB60	LBB61	LBB62	LBB63	LBB64	LBB65	LBB66	LBB67	LBB68	LBB69	LBB70
<i>E. coli</i>	03 ± 0,1	07 ± 0,1	00 ± 0,0	08 ± 0,7	00 ± 0,0	04 ± 0,1	11 ± 0,2	13 ± 0,2	04 ± 0,1	00 ± 0,0	05 ± 0,1	04 ± 0,1	00 ± 0,0	00 ± 0,0
<i>Salmonella sp.</i>	06 ± 0,7	03 ± 0,1	00 ± 0,0	00 ± 0,0	00 ± 0,0	00 ± 0,0	06 ± 0,7	05 ± 0,1	07 ± 0,2	08 ± 0,7	00 ± 0,0	00 ± 0,0	00 ± 0,0	05 ± 0,1
<i>Proteusmirabilis</i>	00 ± 0,0	00 ± 0,0	05 ± 0,1	07 ± 0,2	06 ± 0,7	07 ± 0,2	00 ± 0,0	00 ± 0,0	00 ± 0,0	00 ± 0,0	00 ± 0,0	00 ± 0,0	00 ± 0,0	00 ± 0,0

Dans ce travail, nous avons remarqué que les souches de lactobacille isolées étaient très actives contre la croissance d'*Escherichia sp.* où on a enregistré des zones d'inhibition de l'ordre de  $13 \pm 1,2$  ;  $15 \pm 0,6$  ;  $18 \pm 0,6$  ;  $12 \pm 0,4$  et  $22 \pm 1,6$  pour les souches LBB28, LBB31, LBB37, LBB39 et LBB50 respectivement, toutefois les autres lactobacille sont montrés une faible activité vis-à-vis ces pathogènes.

Des résultats similaires ont été observés par Erdourul et Erbulur, (2006) ; Bey (2009) et Medouakh *et al.*, (2010) qui ont démontré que les souches de lactobacilles inhibent la croissance des bactéries pathogènes par la production d'agents antimicrobiens tels que les bactériocines.

Les bactériocines agissant généralement sur la membrane cytoplasmique des cellules sensibles et cela par la formation de petits pores membranaires (Luquet et Courrieu, 2005), le résultat de cette action est un efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composants de la force proton motrice FPM : un composant électrique, le potentiel électrique et un composant chimique, le gradient du pH. La FPM joue un rôle central dans la synthèse de l'ATP, le transport actif et la mobilité bactérienne et donc sa désorganisation entraîne la cessation rapide des activités cellulaires et la mort de la cellule (Luquet et courrieu, 2005 ; Dortu et Thonart, 2009).

D'après Silva *et al.*, (1987) ; les traitements des affections intestinales par les bactéries lactiques peuvent être due aux plusieurs mécanismes d'action tel que la production de substances antimicrobiennes. Certaines bactéries lactiques ont la capacité de produire des substances antimicrobiennes comme le peroxyde d'hydrogène, les bactériocines ou encore les acides organiques. *Lb. Rhamnosus GG* produit par exemple des composés tels que le peroxyde d'hydrogène et le pyroglutamate qui inhibe la croissance de plusieurs bactéries Gram positives et Gram négatives.

Certaines bactéries lactiques produisent également des bactériocines qui présentent une action antibactérienne avec un large spectre d'action (Moll *et al.*, 1999 ; Naidu *et al.*, 1999).

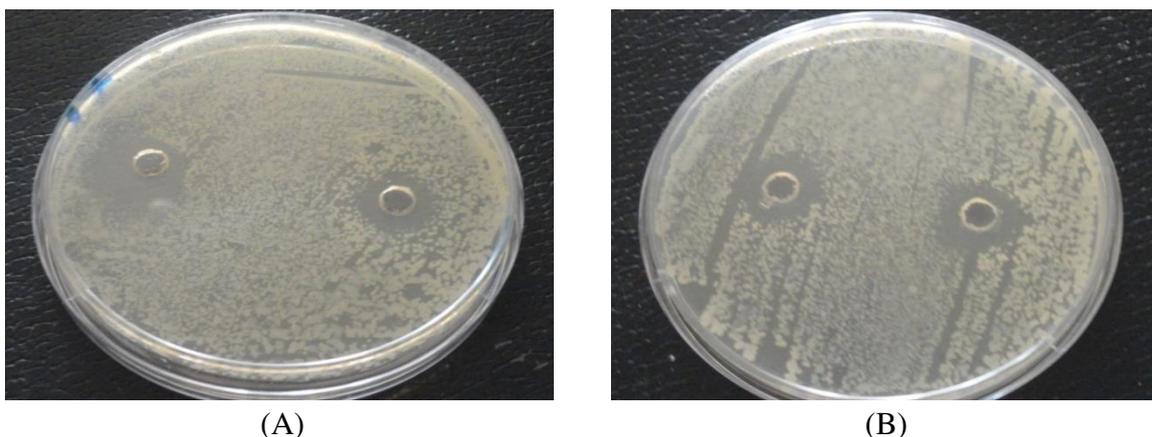
En outre Servin, (2004) et Tejero-Sarinena *et al.*, (2012) ont démontré qu'en milieu acide, la compétitivité bactérienne des lactobacilles est avantagée par rapport aux autres bactéries à cause de leur tolérance à l'acidité.

Lors d'expériences, *in vitro*, certains auteurs ont proposé une action synergétique entre les substances protéiques antimicrobiennes et les acides organiques pour expliquer l'action inhibitrice des bactéries probiotiques. Ainsi, Gopalet *al.*, (2001) ont mené une série d'expériences pour étudier l'inhibition, *in vitro*, d'une souche d'*E. coli* entérotoxigène par *L. rhamnosus* DR20, *L. acidophilus* HN017 et *Bifidobacterium lactis* DR10. Le prétraitement d'*E. coli* avec les surnageants de culture des bactéries réduit l'adhésion de ce pathogène avec les cellules Caco-2. Les auteurs ont suggérer que les substances protéiques antibactériennes inhibe *E. coli* en agissant en synergie avec le ou les acide(s) produit(s).

Plusieurs études ont montré l'effet des souches de lactobacilles contre les entéropathogènes utilisées dans notre étude comme *E. coli* entéropathogènes (Alakomi et *al.*, 2000 ; Gopal et *al.*, 2001 ; Servin 2004), et *Salmonella Typhimurium* (Servin, 2004 ; Hütt et *al.*, 2006 ; Rishi et *al.*, 2011; Tham et *al.*, 2011).

Ainsi, les données relatives à l'activité antibactérienne des souches probiotiques de lactobacilles sont abondantes dans la littérature. Toutefois, il est important de noter que chaque souche est unique et les mécanismes associés à des souches particulières ne peuvent pas être extrapolés à tous les microorganismes probiotiques (FAO/OMS, 2002).

Les observations sont illustrées par la figure 08 qui démontre l'effet antagoniste de la souche LBB31 sur *Escherichia sp.* et *Salmonella sp.*



**Figure 08:** L'effet inhibiteur de surnagent de la souche LBB31 sur *Escherichia sp.* (A) et *salmonelle sp.* (B).

Chaque souche doit être étudiée de façon indépendante. De plus en plus d'équipes de recherche travaillent actuellement pour identifier ces mécanismes d'action de probiotiques particuliers contre certains pathogènes.

Dans notre étude, nos souches ont montré une forte activité antibactérienne ; ceci renforce leur choix pour une éventuelle utilisation, après des études cliniques, dans l'inhibition des bactéries entéropathogènes impliquées dans les diarrhées infantiles.

### **2.3.2. Etude de la survie des souches lactiques dans les conditions extrêmes du tube digestif**

Les études actuelles confirment que pour que les probiotiques exercent des effets bénéfiques dans le tractus gastro-intestinal, ils doivent survivre lors du passage vers l'estomac (Cherbut, 2001) ; mais pour atteindre ce dernier compartiment du tube digestif, elles doivent résister au cours de leur passage aux conditions hostiles de l'estomac telle que l'acidité et l'action des sels biliaires (Dunne et *al.*, 2001).

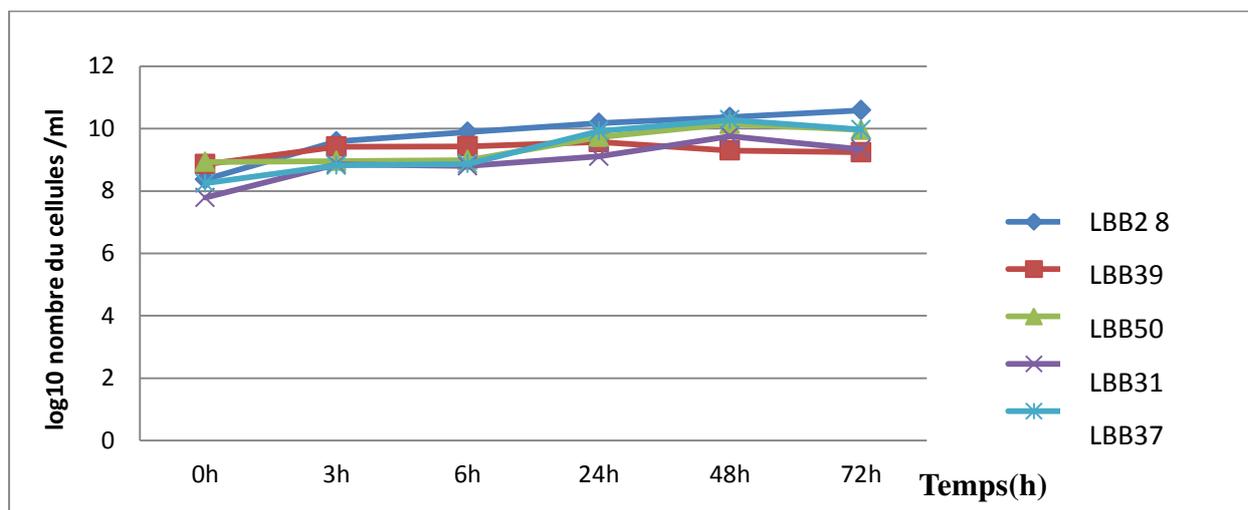
En général, les bactéries lactiques en cultures isolées montrent une variation importante à pousser dans un milieu synthétique en présence d'acide et de sels biliaires (Dilmi Bouras, 1991). Chaque jour, l'estomac humain secrète environ 3 litres de jus gastrique avec un pH autour de 2 (Smith, 1995), et la période de passage du bol alimentaire à travers l'estomac est estimée à environ 90 minutes, où le stress pour les microorganismes commence (Berrada et *al.*, 1991).

Afin d'atteindre cet objectif nous avons testé la croissance des cinq souches de bactéries lactiques qui ont montré un effet antagoniste important sur le développement des bactéries pathogènes (LBB28, LBB31, LBB37, LBB39 et LBB50) en fonction du temps (0 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h) à différents pH (2.5, 4.5, 6.5) en présence et en absence de 0.3 % de sels biliaires, les souches ont montré des variations de croissance considérables dans ces milieux synthétiques.

#### ***a) Survie à pH 6.5 en absence et en présence de sels biliaires***

Les résultats relatifs à la croissance de nos souches lactiques à pH 6,5 en absence de sels biliaires sont montrés dans la figure 9. A pH 6.5, similaire au pH intestinal, nous avons enregistré une croissance très importante de toutes les souches testées. En effet, le nombre reste supérieure à  $10^8$  UFC/ mL après 3h d'incubation à 37 C°. La croissance des souches reste toujours élevée où elle augmente de façon considérable en fonction du temps pour

atteindre des valeurs maximales après 48 h d'incubation ( $2.32 \times 10^{10}$  UFC/ mL pour LBB28,  $1,92 \times 10^{10}$  UFC/ mL pour LBB37,  $1.44 \times 10^{10}$  UFC/ mL pour LBB50,  $5,70 \times 10^{10}$  UFC/ mL pour LBB31 et  $2 \times 10^9$  UFC/ mL pour LBB39). Une légère diminution est détectée après 72h d'incubation pour les souches LBB31 et LBB39 ( $2.19 \times 10^9$  et  $1.73 \times 10^9$ ) et qui peut être expliquée par une production de métabolites secondaires toxiques par les souches lactiques et qui sont responsables d'autolyse.

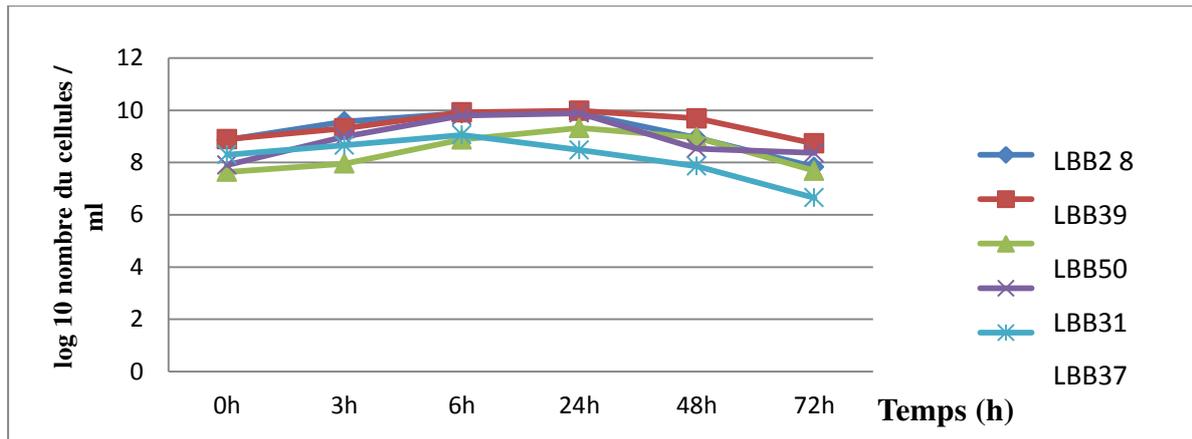


**Figure 09 :** Croissance de LBB39, LBB28, LBB50, LBB31, LBB37 à pH 6.5 en absence de sels biliaries en fonction du temps.

Lorsque 0.3% de sels biliaries sont additionnées au milieu de culture les souches résistent et continuent à croître comme l'indique la figure 10 où leurs valeurs de charges bactériennes dépassent  $10^8$  UFC/ mL après 48h d'incubation pour toutes les souches. Ces charges commencent à diminuer progressivement après 72 h d'incubation à  $37^{\circ}\text{C}$ , de légères différences non significatives ( $P < 0,05$ ) sont à signaler entre les souches.

En effet, Dacosta (2001) a montré que les souches de bactéries lactiques ont l'aptitude à supporter des conditions similaires à celles du tube digestif.

Les recherches de Dilmi Bouras (2002), montrent que les bactéries lactiques se développent normalement en fonction du temps en absence et en présence de sels biliaries à pH 6.5.

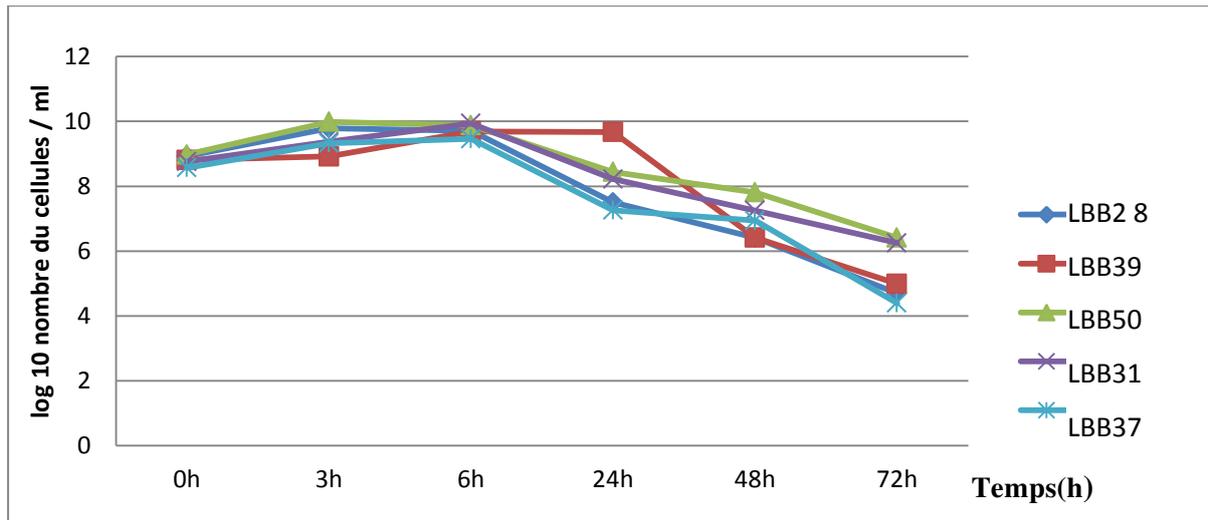


**Figure 10:** Croissance de LBB39, LBB28, LBB50, LBB31, LBB37 à pH 6.5 en présence de sels biliaries en fonction du temps.

D'après les résultats obtenus on peut conclure que les lactobacilles résistent à pH de 2.5, 4.5 et 6.5 en absence et en présence d'une concentration élevée de sels biliaries (0.3%) avec des différences de croissance considérables ( $P < 0,05$ ) selon les espèces, ceci est confirmé par Molin (2001), qui a montré que la souche *Lactobacillus plantarum* survie à son passage dans le tube digestif, il trouve que certaines souches de lactobacilles se développent normalement à pH 3 et 4 et résistent même à pH voisin de 2.

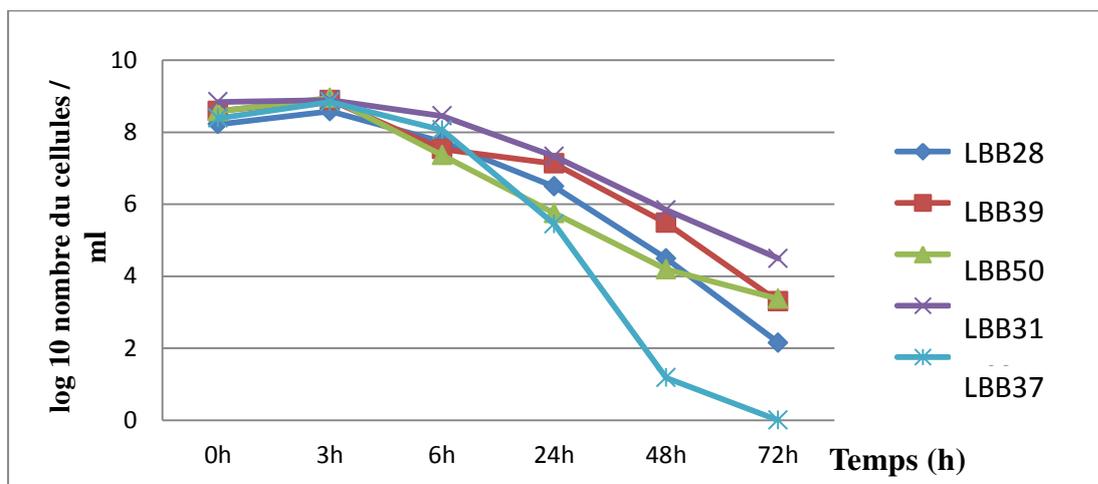
**b) Survie à pH 4.5 en absence et en présence de sels biliaries**

Les résultats relatifs à la croissance de nos souches lactiques à pH 4,5 en absence de sels biliaries sont montrés dans la figure 11. Le pH 4.5, représentant le pH de l'estomac au moment ou juste après le repas, les souches ont montré une très bonne résistance, après 6 h d'incubation, les charges bactériennes atteignent des chiffres supérieures à  $10^9$  UFC/ mL pour toutes les souches. Cependant, après 24 h d'incubation, ce nombre diminue progressivement pour atteindre des valeurs inférieures à  $10^7$  UFC/ mL. La diminution du nombre de bactéries continue avec le temps et reste aux alentours de  $10^4$  UFC/ mL pour LBB39, LBB28, LBB37 et  $10^6$  UFC/ mL pour LBB50, LBB31 après 72 h.



**Figure 11:** Croissance de LBB39, LBB28, LBB50, LBB31, LBB37 à pH 4.5 en absence de sels biliaries en fonction du temps.

Les résultats de croissance des cinq souches de lactobacilles à pH 4,5 et en présence de 0,3% de sels biliaries sont démontrés dans la figure 12. D’après ces résultats nous avons remarqué que l’addition de 0.3 % de sels biliaries à pH 4,5 a modifié le comportement des souches lactiques (figure 12). Les souches ont montré une très bonne résistance, après 3 h d’incubation où les charges bactériennes sont supérieures à  $3,8 \times 10^8$  UFC/ mL pour toute les souches testées. Ce nombre diminue en fonction du temps mais reste supérieur à  $10^7$  UFC/ mL après 6h pour la plupart des souches. La diminution du nombre de bactéries continue progressivement avec le temps et reste aux alentours de  $10^4$  UFC/ mL pour LBB39, LBB50, LBB31 et  $1,41 \times 10^2$  UFC/ mL pour LBB28. Après 72 h d’incubation dans ces conditions nous avons enregistré l’absence de la souche LBB37.



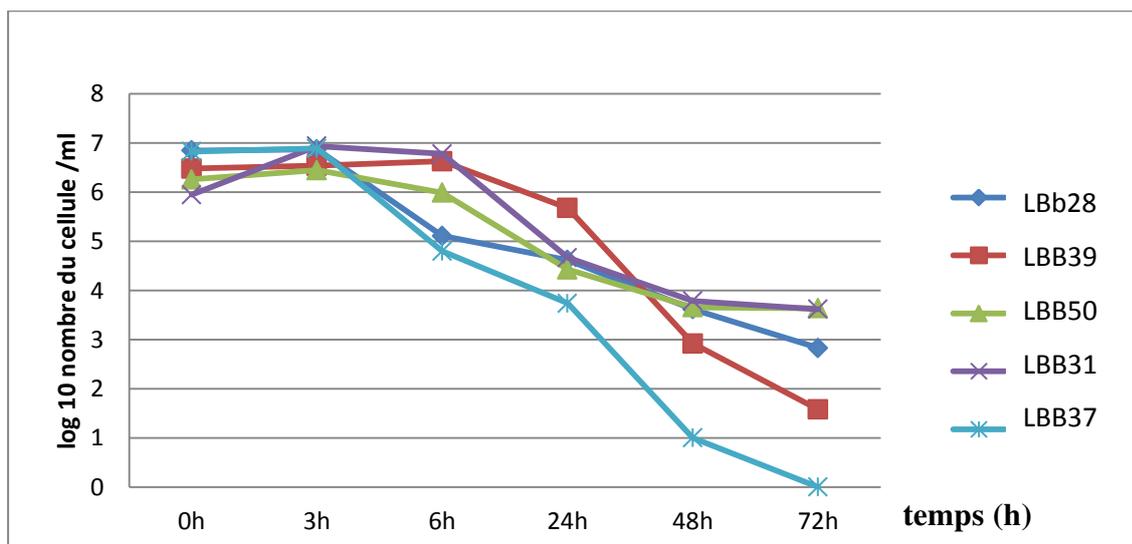
**Figure 12:** Croissance de LBB39, LBB28, LBB50, LBB31, LBB37à pH 4.5 en présence de sels biliaries en fonction du temps.

On remarque que la plupart des souches ont une très bonne croissance à pH 4.5 et résistent à ce même pH en présence de 0,3% de sels biliaires. Ces résultats sont en analogie avec ceux de Dilmi Bouras (1991) ; qui a montré que les bactéries lactiques ont des comportements variables *vis -à -vis* des sels biliaires et à pH 4.5.

Les mêmes constatations ont été faites par Saadi (2006), qui a montré que les souches pures mésophiles de *Lactobacillus paracasei* présentent une bonne résistance et montre un taux de survie élevé à pH 4,3 en absence et en présence de 0,3 % de sels biliaires.

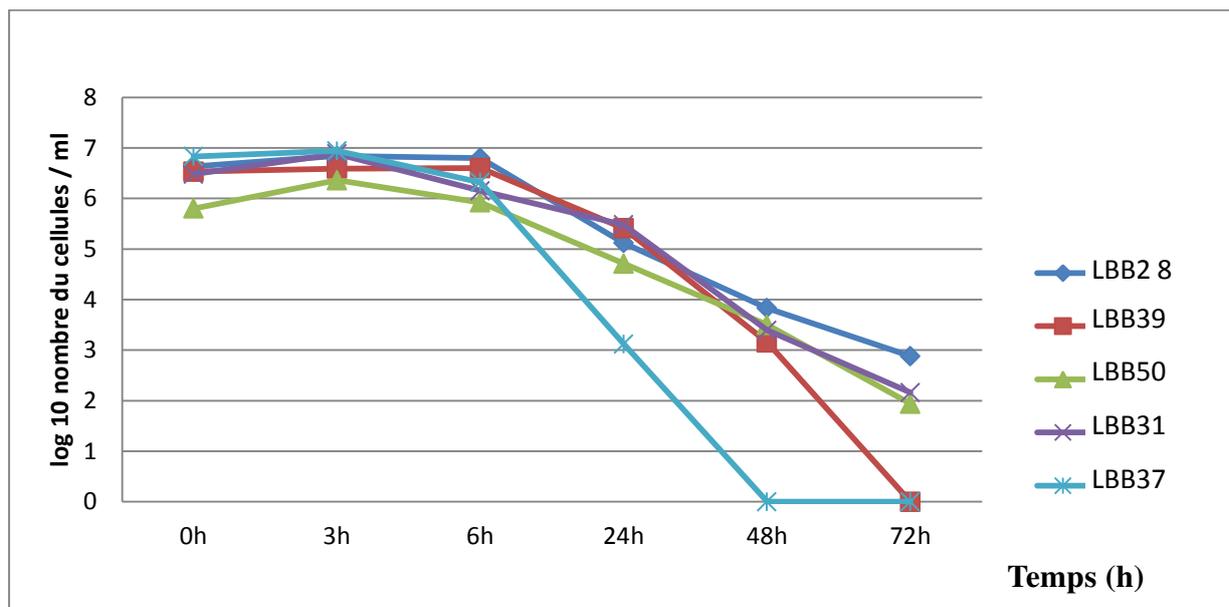
**c) Survie à pH 2.5 en absence et en présence de sels biliaires**

Les résultats relatifs à la croissance des cinq souches lactiques à pH 2,5 en absence de sels biliaires sont montrés dans la figure 13. Nous avons remarqué que les lactobacilles testées présentent une sensibilité variable selon les souches, en effet, les souches LBB28, LBB31, LBB50, LBB39 et LBB37 ont montré une résistance significative et persistent avec des charges supérieures à  $10^7$  UFC/ mL. Après 6 h d'incubation, ce nombre diminue pour atteindre des valeurs inférieurs à  $10^6$  UFC/ mL pour les souches LBB28, LBB31 et LBB50 et des valeurs de l'ordre de  $10^5$  pour les souches LBB39 et LBB37. La diminution du nombre de bactéries continue progressivement pour atteindre des valeurs de l'ordre de  $10^3$  UFC/ mL après 48 h pour LBB28, LBB31 et LBB50, alors qu'il atteint des valeurs de l'ordre de  $10^2$  UFC/ mL pour la souche LBB39. Toutefois, nous avons remarqué l'absence de la souche LBB37 après 72 h d'incubation dans ces conditions.



**Figure 13:** Croissance de LBB39, LBB28, LBB50, LBB31, LBB37 à pH 2.5 en absence de sels biliaires en fonction du temps.

Les résultats de croissance de ces souches à pH 2,5 et en présence de 0,3% de sels biliaires sont démontrés dans la figure 14. D'après la figure 14, on note que les souches LBB37 et LBB39 sont sensibles a ce pH et en présence de 0.3 % de sels biliaires tandis que la croissance de LBB28, LBB31 et LBB50 reste importante. En effet, le nombre des cellules vivantes enregistrées reste supérieur à  $10^6$  UFC/ mL après 3 h d'incubation. Ce nombre diminue pour atteindre des valeurs inférieurs à  $10^2$  UFC/ mL pour les souches LBB28, LBB31 et LBB50 après 72h d'incubation dans ces conditions.



**Figure 14** : Croissance de LBB39, LBB28, LBB50, LBB31 et LBB37 à pH 2.5 en présence de sels biliaires en fonction du temps.

En effet Drouault, (2002) et Corthier, (2004) ont démontré que les bactéries lactiques ont la capacité de survivre à des pH trop acides (jusqu'à 2.5) mais cette capacité varie beaucoup selon le genre et l'espèce. La survie à pH 3 pendant 2 heures est considérée par convention comme la tolérance optimale d'une souche probiotique à l'acidité (Usman, 1999).

La croissance des souches de lactobacilles à pH acide montre que ces dernières résistent au pH=2.5, cette propriété permet l'utilisation de ces bactéries comme des candidats probiotiques testés. Des résultats similaires ont été trouvés par Santiago et *al.*, (2009).

Les lactobacilles isolés dans notre travail, ont montré des comportements très différents vis-à-vis de leurs résistances au pH et en présence de 0,3% de sels biliaires. Ces résultats montrent que nos souches peuvent être utilisées comme des candidats probiotiques. Certains auteurs incriminent les différences de résistance à la paroi cellulaire. En effet, le maintien de l'intégrité de la paroi est un point important de la résistance à l'acidité puisque la paroi

constitue pour la bactérie la première barrière contre les agressions externes (Drouault, 2002 et Corthier, 2004).

La survie des bactéries dans les conditions du tube digestif est un critère incontournable de sélection de souches probiotiques (FAO/OMS, 2006), cependant, c'est une fonction complexe mettant en jeu de nombreux mécanismes permettant aux bactéries de survivre à des environnements successifs très divers (pH bas, présence de sels biliaries).

Il est connu que les bactéries possèdent des mécanismes inductibles connus sous le nom de tolérance au stress acide (Foster et Hall, 1991 ; Turpin, 2011).

D'après Van de Guchte et *al.*, (2002) ; la plupart des bactéries lactiques comme les lactobacilles sont naturellement bien adaptés à pH acide, et sont capables de produire des acides, et de fonctionner à un pH bas.

Lors d'un stress, les acides peuvent diffuser passivement à travers la paroi bactérienne pour se dissocier dans le cytoplasme en protons et dérivés chargés aux quels la membrane bactérienne est imperméable (Présser et *al.*, 1997). Les lactobacilles peuvent réagir au stress acide par trois mécanismes (Lim et *al.*, 2000; Lorca et *al.*, 2002): en limitant l'entrée des acides dans leur cytoplasme, en alcalinisant le milieu intracellulaire grâce aux ATPases (Poolman et *al.*, 1991 ; Nanatani et Abe, 2011) et en protégeant les macromolécules contre les dérivés chargés par les protéines chaperonnes dont la fonction est d'assister d'autres protéines en assurant un repliement spatial adéquat (Lim et *al.*, 2000; Lorca et *al.*, 2002).

Il y a un autre mécanisme de résistance au pH acide qui s'appelle la fermentation malolactique, réalisée par les espèces hétérofermentaires, le L-malate est décarboxylé dans le cytoplasme par les enzymes malolactiques pour produire le L-lactate et du CO<sub>2</sub>. Cette décarboxylation permet l'alcalinisation du cytoplasme et la production d'ATP (Poolman et *al.*, 1991 ; Nanatani et Abe, 2011).

Toutefois, on peut constater que le pH, lui seul n'est pas un bon critère pour évaluer la résistance des souches probiotiques au cours de leur passage de l'estomac. L'un des rôles des acides biliaries est l'inhibition de la prolifération de bactéries dans la partie supérieure de l'appareil digestif, chez l'Homme, par désassemblage des membranes biologiques. La concentration moyenne de la bile intestinale est considérée comme étant de 0.3 % P/ V (Parasad et *al.*, 1998).

Marteau et *al.*,(1995) ont clairement démontré, *in vitro* que les sels biliaires avaient un effet bactericide. De la même manière que pour l'acidité gastrique, cette étude démontre une différence dans la sensibilité aux sels biliaires entre les espèces bactériennes. Les sels biliaires ont un effet détergent sur les membranes cellulaires résultant en une augmentation de la perméabilité cellulaire.

Les lactobacilles sont capables de métaboliser les acides biliaires ce qui peut contribuer à leur protection contre la bile. La déconjugaison de ces acides est l'un de ces mécanismes. Elle est catalysée par les biles salts hydrolyse (BSH) qui libèrent les glycines (taurines du noyau stéroïde ce qui a pour effet de diminuer la solubilité de la bile à bas pH et de réduire ses activités détergentes (Adamowicz et *al.*, 1991). Bien que l'activité BSH soit très répandue chez les lactobacilles, il n'existe pas toujours de relation directe avec leur capacité à résister à la bile (Moser et Savage, 2001 ; Begely et *al.*, 2006).

Un autre mécanisme responsable de la résistance aux sels biliaires est l'extrusion de la bile. Ce mécanisme est réalisé grâce à des systèmes d'efflux dont la famille des multidrug résistance (MDR). Les MDR sont ainsi responsables de la résistance à de nombreux composés toxiques comme les antibiotiques, les solvants organiques, les détergents et les sels biliaires. Ces systèmes sont très répandus chez les Gram négatifs et Gram positifs (Putman et *al.*, 2000). La première caractérisation d'un système à efflux de type MDR chez les lactobacilles à été réalisée chez *Lb. brevis*, démontrant ainsi son rôle dans la résistance à des composés toxiques (Sami et *al.*, 1997).

### **III. Identification moléculaire**

La souche de lactobacille qui a donné une forte activité antibactérienne et un taux de survie intéressant dans les conditions extrêmes du tube digestif est retenue pour une éventuelle identification moléculaire. Ainsi que les souches les plus incriminées dans les diarrhées ont été choisies aussi pour une identification moléculaire.

A cet effet, la région d'ADN, codant de la sous unité ribosomale 16S rRNA est amplifiée par la technique de la PCR. Les ADNs des souches isolées ont été extraits à raison de 03 échantillons par souche.

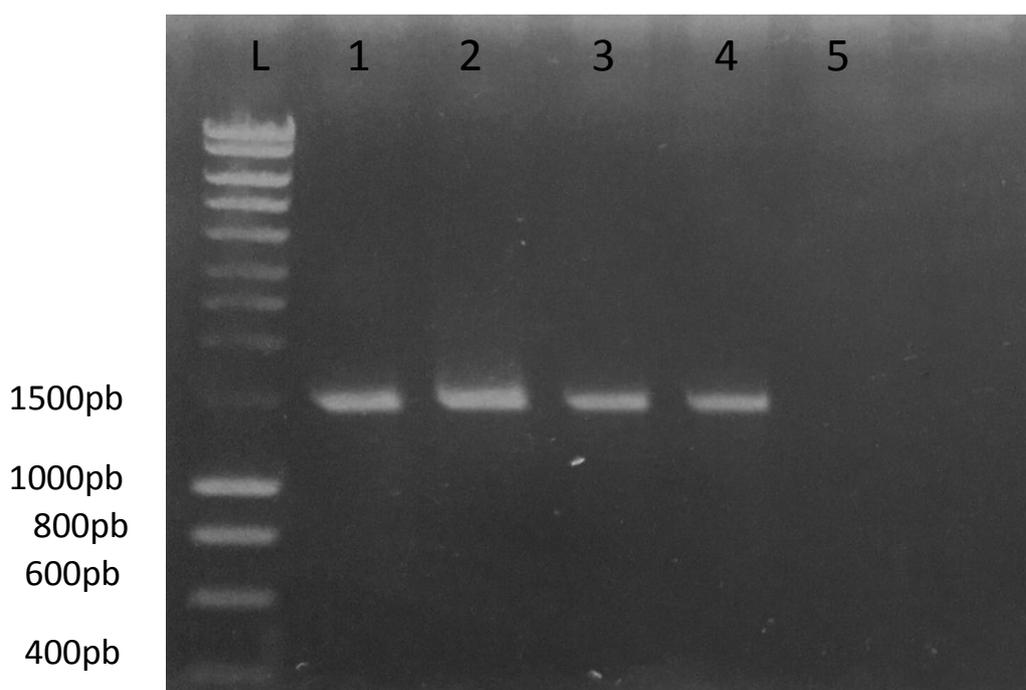
De nos jours il existe une large gamme de kits disponible sur le marché et la présence d'une grande diversité de techniques laborieuses ont permis l'extraction de l'ADN génomique

et plasmatique. Cependant, les facteurs temps et coût de la manipulation limitent leurs applications (Rowland, 2003). La pertinence de la technique (Boiling DNA extraction) a été démontrée, notamment en ce qui concerne la qualité du génome extrait. En outre, la rapidité de sa mise en évidence et son faible coût, ont fait de la méthode, une technique de choix appliquée dans les laboratoires de recherche en biologie moléculaire (Queipo et *al.*, 2007).

Le séquençage du gène codant la sous-unité 16S RNA offre un outil de choix pour l'identification génétique des bactéries, car cette région persiste très stable et à l'abri des mutations (Emanuel et *al.*, 2009). De nombreuses études ont accordé une importance spéciale à l'identification génétique des bactéries (Adley et *al.*, 2009 et Wu et *al.*, 2006). Avec l'accumulation des données indispensables sur ce gène et leur publication dans les banques de données, la notion des amorces universelles de la région 16S RNA est engendrée.

Dans ce travail, le choix des amorces universelles 27f et 1492r est opté, car lors de la réalisation des analyses bioinformatiques et les simulations *in Silico*, il semble que ces amorces s'hybrident avec la majorité des membres du règne bactérien (Arzu et *al.*, 2011).

Les fragments amplifiés obtenus sont séparés selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel d'agarose. Les résultats de la comparaison des fragments d'ADN amplifiés avec le marqueur de taille a montré que la taille 1500 de ces fragments se retrouve correctement avec la bande spécifique du marqueur de taille 1500 pb (figure 15). Ces résultats concordent avec les travaux réalisés par (Wu et *al.*, 2006 ; Adley et *al.*, 2009 et Arzu et *al.*, 2011). En effet, cette catégorie de gènes se caractérisent par un fragment d'ADN d'une taille située entre 1400-1550 bp (Emanuel et *al.*, 2009).



**Figure 15:** Migration sur gel d'agarose des ADN amplifiés des souches isolées. L: Marqueur de taille 1KB (Eurogentec, belgium), 1-4 : souches isolées, 5 : témoin (eau).

✓ *Résultats de l'analyse In silico des séquences*

Les séquences traitées ont été comparés à la base des données NCBI>BLAST via le site d'internet : [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

L'analyse BLAST des séquences d'ADNr 16S correspondant aux souches identifiées a confirmé leur identification préalable par identification biochimique.

Le principe étant si deux séquences sont similaires, il y'a de très forte chance qu'elles ont la même fonction. Cette comparaison est effectuée à l'aide de logiciels de comparaison de séquences BLAST. La comparaison avec la totalité des séquences nucléotidiques indexées dans cette base, a permis d'établir l'identité des souches sélectionnées et l'indication du degré d'homologie. ces derniers sont illustrés dans les figures ci-dessous.

Sequences producing significant alignments:

Select [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Salmonella enterica subsp. diarizonae strain 11-01853, complete genome</a>	1821	12725	100%	0.0	99%	<a href="#">CP011289.1</a>
<a href="#">Salmonella enterica subsp. diarizonae strain 11-01855, complete genome</a>	1821	12725	100%	0.0	99%	<a href="#">CP011288.1</a>
<a href="#">Salmonella enterica subsp. diarizonae gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: GTC 1733</a>	1816	1816	100%	0.0	99%	<a href="#">AB273735.1</a>
<a href="#">Salmonella enterica subsp. diarizonae strain DSM 14847, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1797	1797	98%	0.0	99%	<a href="#">NR_044373.1</a>
<a href="#">Salmonella enterica subsp. enterica serovar Anatum str. USDA-ARS-USMARC-1735, complete genome</a>	1794	12470	100%	0.0	99%	<a href="#">CP007584.2</a>
<a href="#">Salmonella enterica subsp. enterica serovar Anatum str. USDA-ARS-USMARC-1781, complete genome</a>	1794	12415	100%	0.0	99%	<a href="#">CP014666.1</a>
<a href="#">Salmonella enterica subsp. enterica serovar Anatum str. USDA-ARS-USMARC-1766, complete genome</a>	1794	12470	100%	0.0	99%	<a href="#">CP014665.1</a>
<a href="#">Salmonella enterica subsp. enterica serovar Anatum str. USDA-ARS-USMARC-1728, complete genome</a>	1794	12476	100%	0.0	99%	<a href="#">CP014664.1</a>
<a href="#">Salmonella enterica subsp. enterica serovar Anatum str. USDA-ARS-USMARC-1677, complete genome</a>	1794	12476	100%	0.0	99%	<a href="#">CP014663.1</a>
<a href="#">Salmonella enterica subsp. enterica serovar Anatum str. USDA-ARS-USMARC-1783, complete sequence</a>	1794	14239	100%	0.0	99%	<a href="#">CP014661.1</a>
<a href="#">Salmonella enterica subsp. enterica serovar Anatum str. USDA-ARS-USMARC-1765, complete genome</a>	1794	12476	100%	0.0	99%	<a href="#">CP014659.1</a>
<a href="#">Salmonella enterica subsp. enterica serovar Anatum str. USDA-ARS-USMARC-1736, complete genome</a>	1794	12476	100%	0.0	99%	<a href="#">CP014657.1</a>

**Figure 16:** Une homologie (identité) de 99 % de séquence de *Salmonella sp.* avec *Salmonella entericasub sp. Diarizonae*.

Sequences producing significant alignments:

Select [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Escherichia fergusonii strain CCFM8346, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1731	1731	100%	0.0	98%	<a href="#">KJ803903.1</a>
<a href="#">Shigella sp. 4104, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1729	1729	99%	0.0	98%	<a href="#">FJ405328.1</a>
<a href="#">Uncultured bacterium clone 16saw29-1a01.p1k, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1729	1729	99%	0.0	98%	<a href="#">EF603488.1</a>
<a href="#">E.coli, 16S ribosomal RNA</a>	1729	1729	99%	0.0	98%	<a href="#">Z83204.1</a>
<a href="#">Escherichia fergusonii strain Z3, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1727	1727	100%	0.0	98%	<a href="#">HQ259938.1</a>
<a href="#">Escherichia coli strain H15, complete genome</a>	1725	12073	99%	0.0	98%	<a href="#">CP010178.1</a>
<a href="#">Swine manure pit bacterium T4, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1725	1725	99%	0.0	98%	<a href="#">KT709535.1</a>
<a href="#">Escherichia coli strain RCB371, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1725	1725	99%	0.0	98%	<a href="#">KT260583.1</a>
<a href="#">Escherichia coli strain RCB363, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1725	1725	99%	0.0	98%	<a href="#">KT260575.1</a>
<a href="#">Shigella flexneri strain CICC 21534, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1725	1725	100%	0.0	98%	<a href="#">K1643932.1</a>

**Figure 17:** Une homologie (identité) de 98% de séquence d'*Escherichia sp.* avec *Escherichia fergusonii*.

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Proteus mirabilis strain ALK419 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2102	2102	99%	0.0	98%	<a href="#">KC456549.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Proteus mirabilis strain D27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2102	2102	99%	0.0	98%	<a href="#">JX293281.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Proteus sp. BUR10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2098	2098	98%	0.0	98%	<a href="#">KF887019.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Proteus penneri strain Z2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2097	2097	99%	0.0	98%	<a href="#">HQ259933.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Proteus mirabilis strain ALK418 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2093	2093	98%	0.0	98%	<a href="#">KC456548.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Proteus mirabilis strain ALK042 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2093	2093	98%	0.0	98%	<a href="#">KC456537.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacterium NLAE-zl-H243 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2091	2091	98%	0.0	98%	<a href="#">JX006463.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bacterium NLAE-zl-H106 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2091	2091	98%	0.0	98%	<a href="#">JX006344.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Proteus penneri strain YCY34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2091	2091	98%	0.0	98%	<a href="#">JF775423.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Proteus mirabilis strain G1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2091	2091	98%	0.0	98%	<a href="#">HQ259932.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Proteus mirabilis strain BNI6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2089	2089	98%	0.0	98%	<a href="#">KP717560.1</a>

**Figure 18:** Une homologie (identité) de 98% de séquence de *Proteus sp.* avec *Proteus mirabilis*.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Enterococcus faecalis strain LD33, complete genome</a>	2573	10271	100%	0.0	100%	<a href="#">CP014949.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lactobacillus plantarum strain PFK2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2573	2573	100%	0.0	100%	<a href="#">DQ295035.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Enterococcus faecalis strain L12, complete genome</a>	2567	10271	100%	0.0	99%	<a href="#">CP018102.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Enterococcus faecalis strain BSR2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2567	2567	100%	0.0	99%	<a href="#">KY203669.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Enterococcus faecalis strain L9, complete genome</a>	2567	10271	100%	0.0	99%	<a href="#">CP018004.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Enterococcus faecalis DNA, complete genome, strain: W11</a>	2567	10271	100%	0.0	99%	<a href="#">AP017623.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Enterococcus faecalis strain KB1, complete genome</a>	2567	10249	100%	0.0	99%	<a href="#">CP015410.1</a>

**Figure 19:** Une homologie (identité) de 100% de séquence de *Lactobacillus sp.* avec *Lactobacillus planctarum*.

L'analyse bioinformatique des données issues du séquençage a indiqué un taux de similitude de 99% de séquence de *Salmonella sp.* avec *Salmonella enterica subsp. Diarizonae*. De même, la souche *Escherichia sp.* a présenté un taux de similitude de 98% avec *Escherichia fergusonii*. Cependant le degré d'homologie de la souche *Proteus sp.* est

équitable à 98% avec la souche de *Proteus mirabilis*. Finalement, la souche *Lactobacillus sp.* semble avoir un taux de similitude de 100% avec *Lactobacillus planctarum*. Les souches identifiées ont été enregistrées au centre Wallon de Bio-Industrie (CWBI) et dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès : *Escherichia fergusonii* atKJ803903.1 ; *Proteus mirabilis* KC456549.1 ; *Salmonella enterica subsp. Diarizonae* AB273735.1 et *Lactobacillus plantarum* DQ295035.1

#### **VI. Etude *in vivo* de l'activité antagoniste de *Lactobacillus plantarum* vis-à-vis *E. coli* entéropathogène (EPEC)**

La composition et les fonctions de la microflore intestinale sont influencées par divers facteurs liés au changement des conditions physiologiques de l'hôte (âge, état de santé...) de la composition du régime alimentaire et des circonstances environnementales (contamination par les pathogènes, antibiothérapie, hygiène...). Les facteurs majeurs influençant la microflore gastro-intestinale sont les contaminations par les pathogènes et l'antibiothérapie (Mitsuok, 1989 et Hopkins et Mc Farlane, 2002).

Selon Flanagan et Singh (2006), la diarrhée est l'effet secondaire le plus fréquent de l'antibiothérapie. Suite à la prise d'antibiotiques, la diarrhée se limite à une simple modification de la consistance des selles ou à une diarrhée à minima (moins de trois selles par jour et sans fièvre), réversible rapidement, à l'arrêt du traitement antibiotique et ne donnant pas lieu le plus souvent à une consultation médicale. Cependant, ces diarrhées bénignes peuvent se transformer en diarrhées aiguës qui peuvent provoquer la mort du nourrisson, suite à des prises répétées d'antibiotiques causant des dysfonctionnements de la flore bactérienne colique.

Plusieurs travaux révèlent le fait que les antibiotiques sont souvent prescrits de façon inadéquate ou pour une durée trop longue. Une sur-utilisation des antibiotiques dans les hôpitaux contribue à une augmentation des coûts du système de santé et expose les patients à des effets secondaires potentiels. Elle favorise le développement des infections nosocomiales comme la diarrhée associée à *Clostridium difficile*, et l'émergence des bactéries résistantes nécessitant l'utilisation d'antibiotiques plus puissants et plus coûteux et souvent plus toxiques (Thomas et Stevenson, 2003).

Si les antibiotiques soignent bon nombre d'infections, ils pourraient contribuer à précipiter la survenue de maladies atropiques, le développement de germes entéropathogènes,

comme le *rotavirus*, voir le déclenchement de maladies inflammatoires de l'intestin (Rousseau, 2002).

Dans certains cas, le déséquilibre de la microflore peut être très favorable à la prolifération de microorganismes opportunistes pathogènes, tel que EPEC responsable de diarrhée aiguë infantile (Prager et al., 2009), pouvant compromettre la santé et la vie de l'hôte et spécialement du nourrisson. Il serait donc impératif de rechercher des solutions alternatives permettant la restauration de l'équilibre de la microflore intestinale de l'hôte.

L'utilisation des probiotiques telles que les Lactobacilles s'est avérée une alternative prometteuse.

L'amoxicilline est un antibiotique très fréquemment prescrit chez l'enfant. Afin de confirmer les résultats significatifs, obtenus dans l'étude *in vitro* de l'effet antagoniste de *Lactobacillus plantarum* vis-à-vis EPEC, une expérimentation animale était nécessaire pour voir l'impact des différents traitements (antibiotiques, contamination à EPEC et ingestion de *Lactobacillus plantarum*. Une étude *in vivo* a été réalisée sur des lapins holoxéniques âgés de 30 jours.

#### **4.1. Recherche d'*E. coli* dans le lait premier âge**

La recherche d'*E. coli* dans le lait, utilisé comme vecteur dans cette étude *in vivo* a révélé l'absence de cette espèce. Aujourd'hui, les produits laitiers sont de plus en plus utilisés comme vecteur de probiotiques (Braseger, 2002 ; Hamma, 2009).

#### **4.2. Evolution du nombre de *Lb. plantarum* et d'EPEC dans les fèces des lapins**

Du fait que l'étude a porté sur des lapins holoxéniques (à flore non contrôlée), un dénombrement d'*E. coli* et de *Lb. plantarum* dans les selles a été effectué avant expérimentation. Ceci a pour but d'estimer le compte fécal moyen de ces espèces chez les lapins.

Les analyses bactériologiques ont révélé l'absence d'*E. coli* dans les selles des lapins de différents lots. Effectivement, chez certaines espèces de lapins, *E. coli* n'est retrouvé qu'à partir du 45<sup>ème</sup> jour. Néanmoins, selon Baker, (1998) ; dans l'interprétation du statut microbiologique des animaux de laboratoire, l'infection n'est pas synonyme de maladie. Ceci indique seulement la présence de microorganismes qui pourrait être pathogènes, opportunistes ou commensaux.

A l'inverse, au niveau de la flore colique humaine, *E. coli* est la bactérie anaérobie facultative prédominante. Cette bactérie colonise typiquement le tractus gastro-intestinal de l'enfant quelques heures après sa naissance (Amrouche, 2005). Chez le nouveau-né, elle se retrouve à un taux de  $10^4$  à  $10^8$  UFC/g par gramme de fèces (Courcol, 2002). Dans une étude réalisée par Dilmi Bouras et Sadoun (2002), il a été démontré que chez un enfant sain âgé de 30 jours, les enterobactéries représentent environ  $3 \times 10^7$  entérobactéries par gramme de selles.

Les résultats relatifs à l'évolution du nombre de *Lactobacillus sp.* et d'EPEC dans les selles de lapins de différents lots sont représentés dans les figures 20 et 21, respectivement. D'après ces figures, il apparaît que les quantités de biomasse des deux espèces bactériennes varient considérablement selon le type du traitement.

Pour le lot témoin, dont les animaux n'ont reçu aucun traitement, nous n'avons enregistré aucune différence significative entre les quantités de biomasse de *Lactobacillus sp.* durant toute la période d'expérimentation, où le nombre variaient entre  $10^5$  et  $10^6$  UFC/g entre le premier et le 18<sup>ème</sup> jour d'expérimentation, ceci peut être expliqué par la présence de lactobacilles dans la flore originelle des lapins. Des résultats similaires ont été obtenus par (Menad, 2010).

Les résultats des comptes fécaux (Tableaux 20 et 21, Annexe V) de *Lactobacillus sp.* et d'EPEC sont représentés dans les figures (30 et 31).

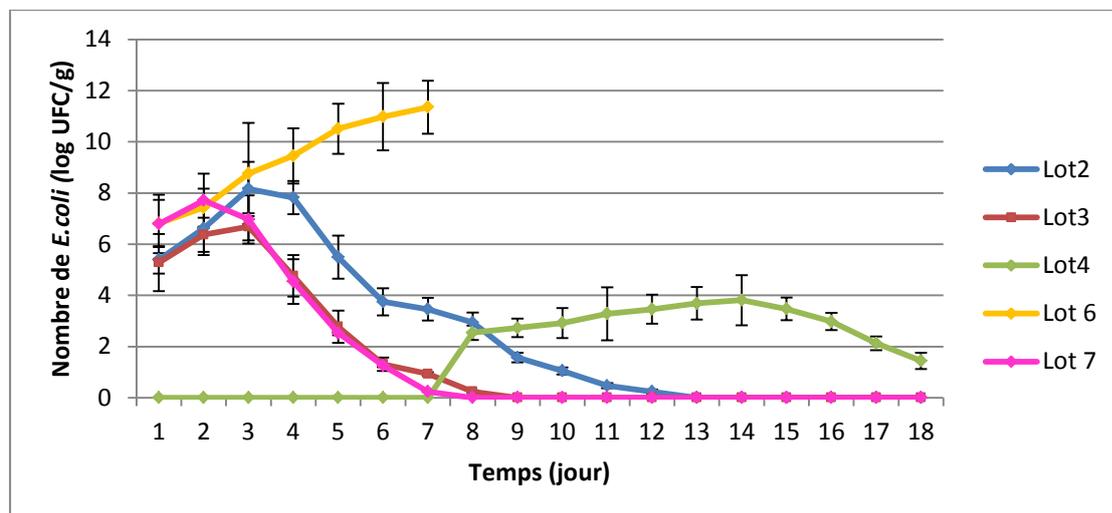
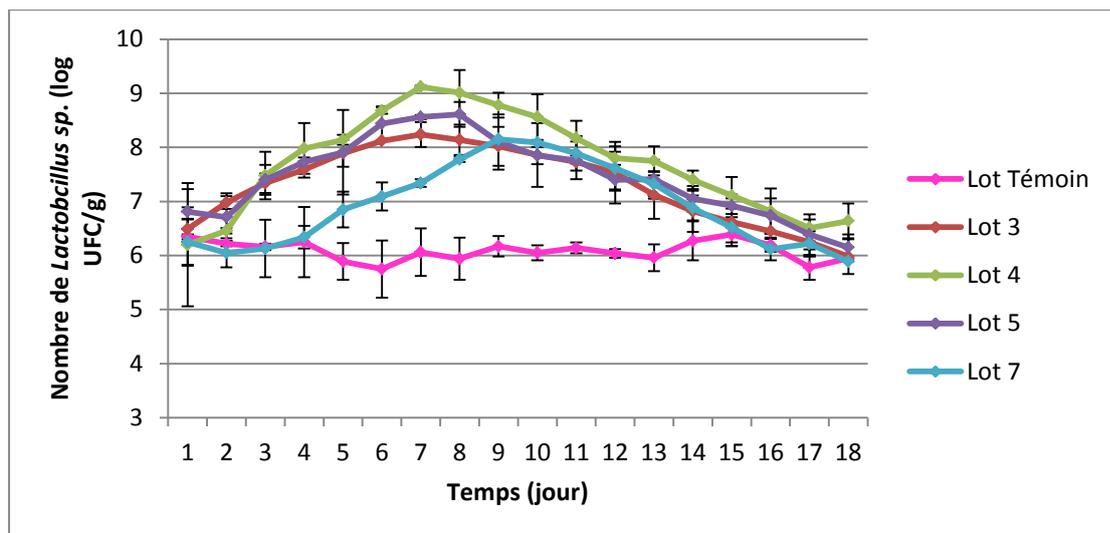


Figure 20 : Evolution du nombre d'EPEC dans les fèces des lapins.



**Figure 21** : Evolution du nombre des Lactobacilles dans les fèces des lapins.

En ce qui concerne le deuxième lot, dont les animaux ont reçu l'entéropathogène en association à une antibiothérapie, nous avons remarqué une augmentation significative ( $P < 0.05$ ) du nombre d'*E. coli* dans les selles des animaux entre le 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> jour de traitement. En effet, la quantité de biomasse de ce germe enregistrée le premier jour de l'expérience est de l'ordre de  $2,4 \cdot 10^5 \pm 0,89$  UFC/g. Ce nombre augmente pour atteindre  $1,44 \times 10^8 \pm 0,97$  UFC/g, puis cette biomasse commence à diminuer pour atteindre de valeurs respectives de l'ordre de  $3 \cdot 10^5 \pm 1,23$ ,  $2,88 \cdot 10^3 \pm 0,56$ ,  $1,73 \pm 0,008$  et  $01 \pm 00$  UFC/g après le 5<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup>, 12<sup>ème</sup> et 18<sup>ème</sup> jour d'expérience. Ceci est expliqué par l'action bactéricide de l'amoxicilline sur l'entéropathogène.

En général, lors d'une intervention antibiotique thérapeutique ou préventive, la microflore est profondément modifiée par élimination des germes sensibles. Ainsi, l'amoxicilline, qui diffuse bien à travers l'épithélium, inhibe la croissance des entérobactéries (Merad et Merad, 2001).

Cependant, nous avons remarqué dans nos expériences que l'aspect des selles reste légèrement liquide, ceci est dû à l'action de l'antibiotique. Selon Sizonenko, (1996) ; toutes les familles d'antibiotiques peuvent induire une diarrhée, mais certaines avec une fréquence plus élevée.

En ce qui concerne les animaux du 3<sup>ème</sup> lot qui ont reçu l'entéropathogène et le lactobacille simultanément, nous avons noté une augmentation significative ( $P < 0.05$ ) du nombre de *Lactobacillus sp.* dans les selles jusqu'au 9<sup>ème</sup> jour d'expérience où on a enregistré

une quantité de biomasse de l'ordre de  $1,04 \times 10^8 \pm 2.09$  UFC/g de selle, puis le nombre commence à diminuer pour atteindre des valeurs de l'ordre de  $10^6$  en fin d'expérience.

Selon Raibaud et Ducluzeau, (1989) ; le nombre important de lactobacilles présents dans les selles après arrêt du traitement peut être expliqué par l'implantation, ce qui est expliqué par un transit passif de l'inoculum bactérien qui survit à l'action bactéricide et/ou bactériostatique des diverses substances gastro-intestinales.

Pour ce même lot, nous avons noté que le nombre de *E. coli* augmente jusqu'au 3<sup>ème</sup> jour de traitement où on a décompté  $4,78 \times 10^6 \pm 1.97$  UFC/g de selle, puis le nombre diminue significativement ( $P < 0.05$ ) pour disparaître à partir du 8<sup>ème</sup> jour d'expérience, ceci peut être expliqué par un phénomène d'antagonisme entre le probiotique et la bactérie responsable de diarrhée. Les selles ont un aspect normal (Annexe III, figure 11.A) et tous les animaux guérissent au bout de 6<sup>ème</sup> jour.

Les animaux du 4<sup>ème</sup> lot ont reçu 1 mL de lait fermenté par le probiotique pendant sept jours, puis 1 mL de lait inoculé par le germe pathogène durant une semaine. Le dénombrement de *Lactobacillus sp.* a montré que le nombre augmente significativement ( $P < 0.05$ ) jusqu'au 11<sup>ème</sup> jour d'expérience où on a enregistré des quantités de biomasse de l'ordre de  $10^8$  UFC/g de selle. La présence de lactobacilles dans les selles après le 7<sup>ème</sup> jour est expliquée par le phénomène d'implantation des bactéries lactiques. À partir du 11<sup>ème</sup> jour nous avons noté une diminution progressive du nombre de *Lactobacillus sp.* dans les selles pour atteindre des valeurs de l'ordre de  $2.51 \times 10^6$  UFC/g au bout de 16<sup>ème</sup>, 17<sup>ème</sup> et 18<sup>ème</sup> jours d'expérience. Les selles des animaux de ce lot ont un aspect normal (Annexe III, figure 11.A).

Ce qui concerne le dénombrement d'*E. coli*, nous avons noté son absence dans les selles des lapins durant toute la première semaine, toutefois, de faibles quantités de biomasse ont été enregistré dans les selles des lapins après administration d'*E. coli* aux animaux où on a enregistré des valeurs respectives de l'ordre de  $3,46 \times 10^2 \pm 0.69$ ,  $2,95 \times 10^3 \pm 0.98$  et  $27,5 \pm 0.38$  UFC/g en 8<sup>ème</sup>, 15<sup>ème</sup> et 18<sup>ème</sup> jours d'expérience respectivement. Ceci est expliqué par l'effet préventif du lactobacille administré aux animaux avant la réception d'*E. coli*.

Plusieurs auteurs ont attribué ces résultats à la diffusion passive des acides organiques à travers la membrane bactérienne sous leur forme non dissociée et l'acidification du cytoplasme après dissociation qui se traduit par l'inhibition de l'activité enzymatique

cellulaire des pathogènes acidosensibles. (Aiba et *al.*, 1998 ; Alakomi et *al.*, 2000 ; Servin et *al.*, 2003; Lavermicocca et *al.*, 2008).

D'après Fooks et Gibson (2002), l'inhibition de la croissance des pathogènes peut également s'effectuer par un processus de restriction des nutriments. Il est évident que la capacité des microorganismes à entrer en compétition pour limiter les nutriments disponibles est un facteur non négligeable qui détermine la composition du microbiote. Ainsi, une augmentation du nombre de lactobacilles obtenue lors d'un traitement probiotique permettrait de diminuer les substrats disponibles pour l'implantation de microorganismes pathogènes.

En ce qui concerne les animaux du 5<sup>ème</sup> lot qui ont reçu une dose thérapeutique d'antibiotique et du lait fermenté par *Lactobacillus sp.* pendant une semaine, nous avons remarqué que le nombre de ce probiotique augmente significativement ( $P < 0.05$ ) à partir du premier jour pour atteindre  $2,75 \times 10^8 \pm 1.59$  UFC/g au bout du 6<sup>ème</sup> jour, ce nombre reste important puis il commence à s'atténuer pour atteindre  $5,49 \times 10^6 \pm 1.26$  UFC/g après 16 jours d'expérience. Les selles ont un aspect légèrement visqueux ce qui est expliqué par l'effet de l'amoxiciline.

La résistance naturelle des lactobacilles à une gamme d'antibiotiques cliniquement importants permet leur utilisation comme probiotiques «surs» ou leur emploi en thérapie de combinaison, antibiotique / probiotique, contre les infections bactériennes (Raza et *al.*, 1995 ; Buydens et *al.*, 1996 ; Pant et *al.*, 1996). En effet, de récentes études ont été menées sur les probiotiques, en combinaison avec des antibiotiques, comme une alternative à l'antibiothérapie chez l'Homme, en raison de l'émergence et l'augmentation des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques (Borriello et *al.*, 2003, Rishi et *al.*, 2011). Toutefois, selon Sami et *al.*, (1997) ; Saarela et *al.*, (2000) ; FAO/OMS, (2002), il est important de confirmer que la résistance aux antibiotiques de la souche probiotique est d'origine intrinsèque ou est portée par des éléments génétiques hautement transférables, tels que les plasmides et les transposons.

Pour les animaux du 6<sup>ème</sup> lot qui ont reçu 1 mL de lait inoculé par *E. coli* pendant 7 jours nous avons enregistré une augmentation significative ( $P < 0.05$ ) du nombre de cette espèce dans les selles pour atteindre  $2,23 \times 10^{11} \pm 1.69$  UFC/g en 6<sup>ème</sup> jour. Après 7 jours d'expérience nous avons noté la mortalité de la totalité des animaux de ce lot. Les selles étaient très visqueuses et sanglante ce qui est due à l'action invasive d'*E. coli* (Annexe III, figure 11.B).

Les lapins du 7<sup>ème</sup> lot qui ont reçu pendant 48 heures la souche d'*E. coli* puis ils ont reçu 1 mL de lait fermenté par le lactobacille pendant 7 jours, le dénombrement d'*E. coli* dans les selles des animaux de ce lot a montré que le nombre d'*E. coli* augmente significativement jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour d'expérience pour atteindre  $2,7 \times 10^7 \pm 1.6$  UFC/g, puis ce nombre commence à diminuer progressivement pour disparaître à partir du 7<sup>ème</sup> jour.

Des études cliniques ont démontré que les infections gastro-intestinales causées par la diarrhée du voyageur, diarrhée due aux *rotavirus* et diarrhée associée aux antibiotiques, peuvent être contrecarrées avec succès par l'utilisation de probiotiques (Plummer et al., 2004).

#### **4.3. Etude histologique**

Afin d'étudier l'effet d'une antibiothérapie, d'une contamination à *E. coli* et l'intérêt préventif et/ou curatif de *Lactobacillus plantarum* sur la muqueuse intestinale, des coupes histologiques des intestins de lapins représentatifs de chaque lot expérimental ont été réalisées.

Des photos ont été réalisées avec un microscope Zeiss Axiovert 200M- objectif 20 et camera couleur Zeiss, les résultats obtenus sont démontrés dans les figures 22, 23, 24, 25, 26, 27 et 28.

D'après ces figures, il apparaît que les muqueuses des lapins du premier, deuxième et sixième lot, étaient les plus affectés où nous avons remarqué une grande destruction des cellules de la muqueuse.

Pour les lapins du premier lot (traités par l'amoxiciline uniquement), leurs intestins sont très atteints. La muqueuse a pratiquement disparu et la musculature est très fine. Au niveau de la muqueuse, nous avons remarqué que la *Lamina propria* a presque disparu, on ne voit que ses traces (Figure 22).

Ces observations montrent l'état délabré dans lequel se trouvent les tissus intestinaux des lapins souffrant de diarrhées aiguës.

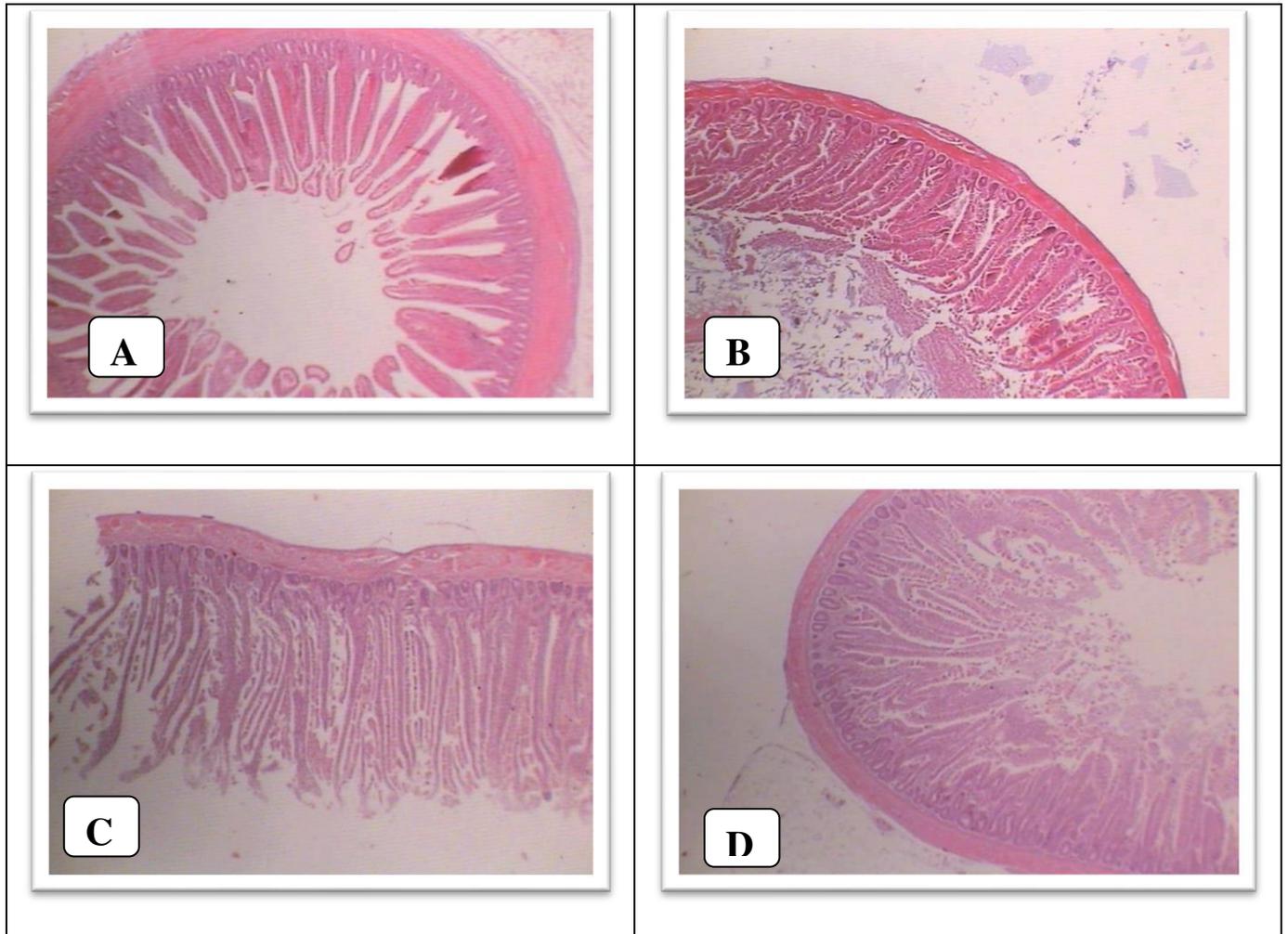
Une coloscopie réalisée sur des patients souffrants de colite hémorragiques post-antibiotique par un dérivé de la pénicilline, a montré des lésions de sièges variables sous forme de fragilité de la muqueuse du purpura (Marteau, 2005).

En effet, la diarrhée à l'issu d'une antibiothérapie exprime une condition dans laquelle l'intestin est irrité et tente de se débarrasser rapidement et brusquement de son contenu (Frield et Zurich, 2008).

La diarrhée n'est pas toujours liée à la prolifération des pathogènes mais aussi aux modifications métaboliques en rapport avec l'altération de l'intestin. Par exemple, la réduction notable de la digestion des glucides complexes comme a été décrit par Rigaud, (2003).

Selon Pochart (2004), la toxicité de plusieurs antibiotiques tels que l'amoxicilline, la clindamycine, la néomycine pour la muqueuse intestinale a été invoquée mais il reste à noter que la pathogénie des diarrhées associées aux traitements antibiotiques n'est pas parfaitement connue.

Par conséquent, toute modification de l'écosystème est susceptible d'induire des altérations au niveau de la muqueuse intestinale, c'est ainsi que les perturbations de la flore induites par l'antibiothérapie sont susceptibles d'altérer la muqueuse intestinale chez le rongeur (Schumann et *al.*, 2005 ; Pochart, 2004).



**Figure 22** : Observations microscopiques des coupes histologiques à partir des intestins des lapins du lot 1 (Antibiotique uniquement) qui présentent une atrophie intestinale avec dégradation de la muqueuse intestinale.

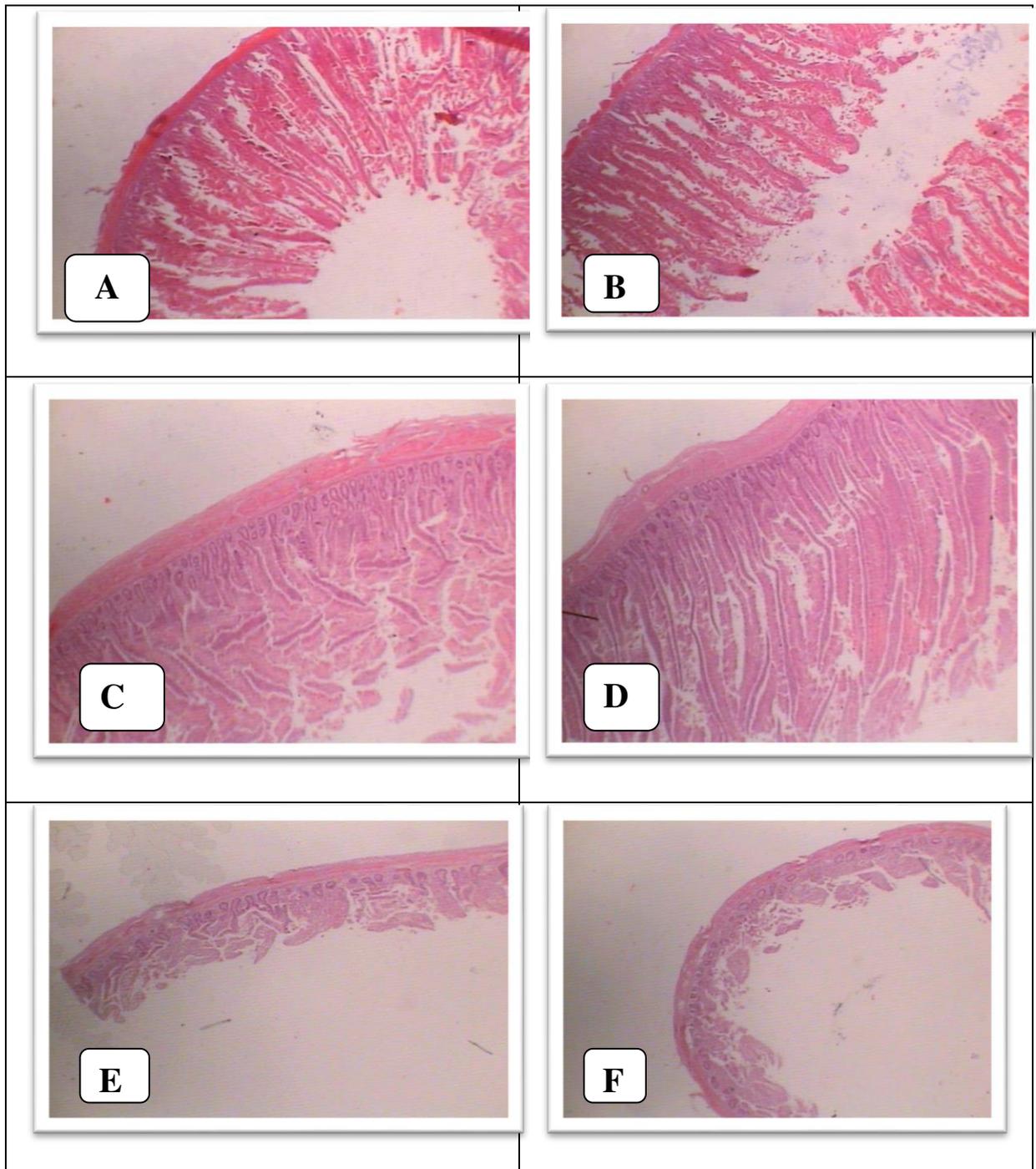
Les mêmes observations microscopiques (figure 23 et 24) ont été obtenues pour les lapins du deuxième lot (traités par l'antibiotique et le germe diarrhéique *E. coli*) et sixième lot (ont reçu uniquement le germe *E. coli*). Nous avons remarqué une dégradation de la paroi et de la muqueuse intestinale, un rétrécissement de la lumière intestinale et un changement d'aspect (forme et couleur).

Même si, les traitements antibiotiques soignent un bon nombre d'infections, ils peuvent altérer la réponse immunitaire et contribuer à précipiter la survenue de maladies atopiques par le déclenchement de maladies inflammatoires de l'intestin (Rousseau, 2002). L'entérocolite ulcéro-nécrosante, la colonisation de l'intestin par des germes multi-résistants et les infections nosocomiales concernent 10 à 30% des prématurés souvent mis sous antibiotiques (Pochart, 2004). Cependant, peu d'études décrivent les effets d'amoxicilline sur la flore totale de l'enfant (Brunser et *al.*, 2006 ; Pochart, 2004).

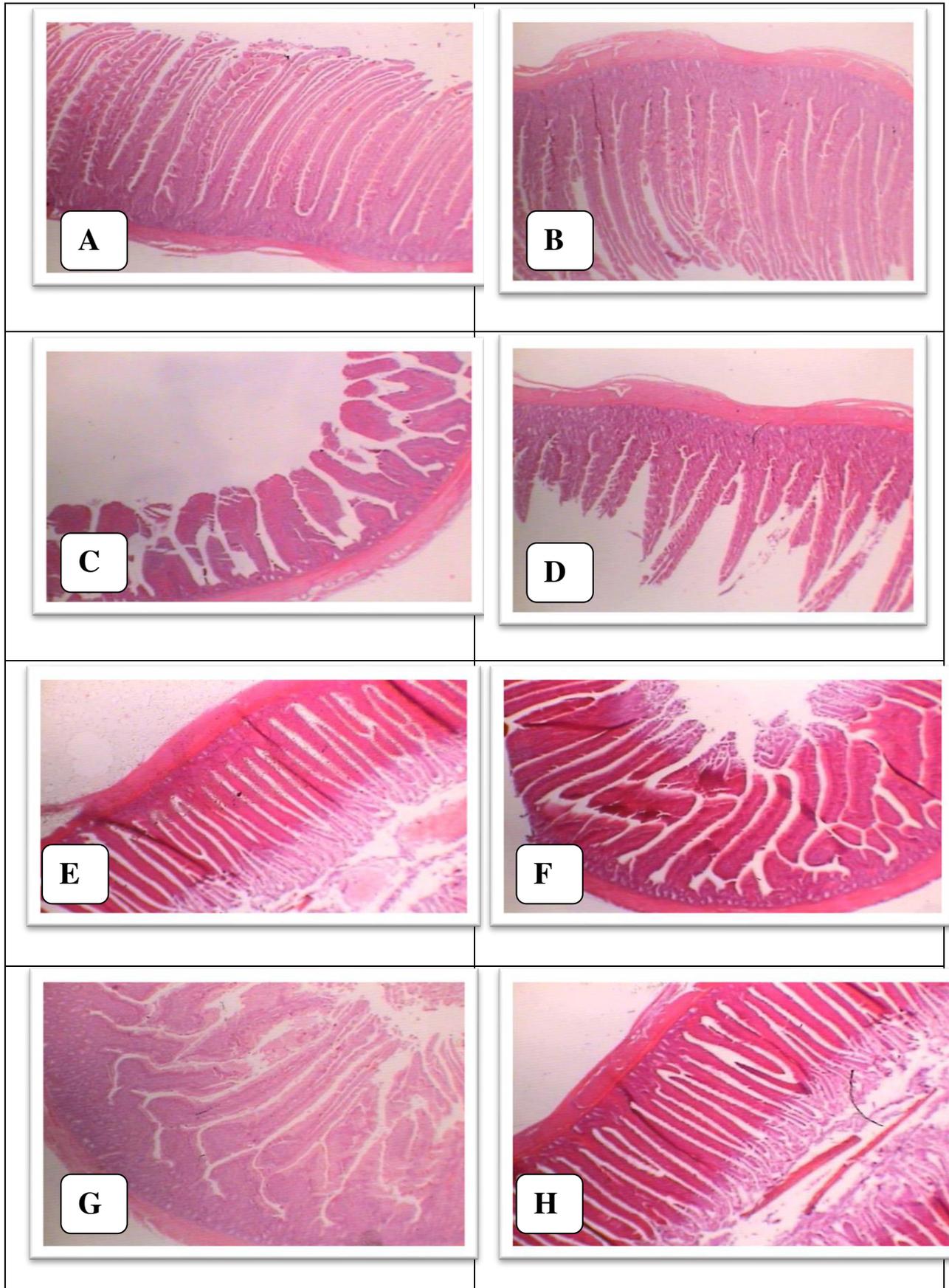
L'apparition de la diarrhée au bout du 3<sup>ème</sup> jour et sa persistance chez les lapins du 2<sup>ème</sup> lot indiquent l'implantation d'*E. coli*, germe responsable de diarrhée aigue chez les enfants (Lu et Walker, 2001).

En effet, pour exercer son action *E. coli* doit en premier lieu s'implanter au niveau de la muqueuse intestinale, ce qui provoque des lésions d'attachement et d'effacement caractéristiques et qui peuvent être observées au niveau des biopsies intestinales de l'homme et de l'animal (Lu et Walker, 2001 ; Valance et Finlay, 2000).

Des coupes histologiques sur les intestins de souris diarrhéiques ont montré la colonisation des cellules épithéliales intestinales par *E. coli*. Cette colonisation est attribuée au phénomène de compétitivité aux sites d'adhésion, causant de graves lésions (Neish, 2002 ; Kelly et al., 2005). La majorité des microorganismes pathogènes tel que *E. coli* et *C. difficile* sont responsables de colites pseudomembraneuses associées aux antibiotiques. *E.coli* colonise la surface épithéliale et cause une inflammation par la production de cytotoxines (Neish, 2002). Les figures ci-dessous montrent l'état de dégradation des intestins causé par *E. coli* et l'antibiotique.



**Figure 23 :** Observations microscopiques des coupes histologiques à partir des intestins des lapins du lot 6 (EPEC uniquement) qui présentent une atrophie intestinale avec dégradation de la muqueuse intestinale.

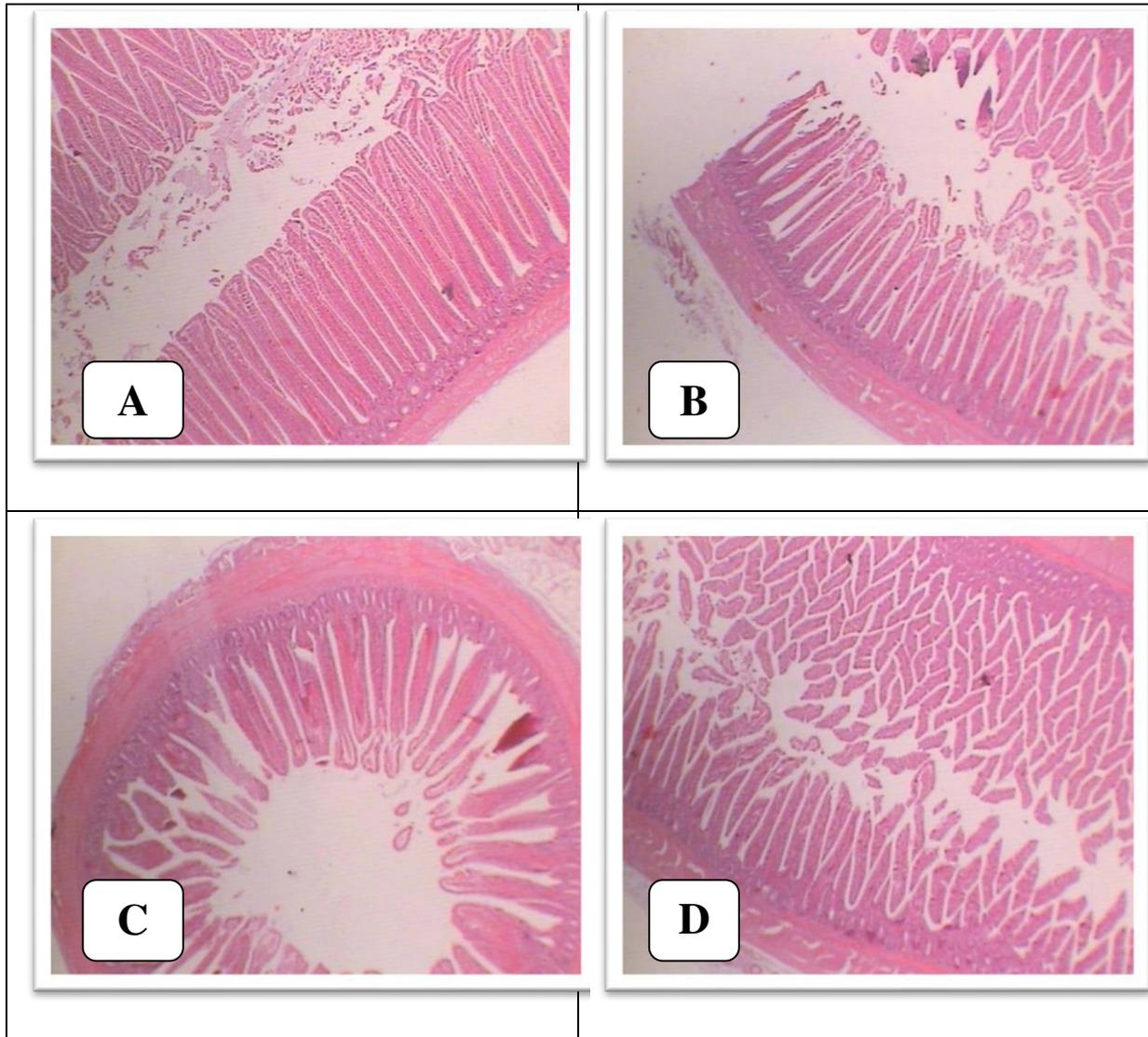


**Figure 24:** Observations microscopiques des coupes histologiques à partir des intestins des lapins du lot 2 (EPEC + antibiotique).

Généralement, les diarrhées associées aux traitements antibiotiques et d'origine bactérienne sont dues à quatre types de phénomènes : production d'entérotoxines, de cytotoxines à l'origine de dégradation cellulaire, adhésion de pathogènes à la muqueuse intestinale et invasion de la muqueuse avec inflammations et ulcérations. Chacun de ces mécanismes est à l'origine de perte d'eau et d'électrolyte. Dans d'autres cas, on invoque la toxicité de produits (amoxicilline, acide clavulanique, clindamycine) pour la muqueuse intestinale (Yildirim et *al.*, 1999).

Au terme du traitement, les lapins du lot 3 (antibiotique + *E. coli* + probiotique) (figure 25), nous avons remarqué que les séquelles étaient moins graves mais restent importantes, l'intestin est toujours atteint. Toutefois, il semble que la muqueuse soit plus présente bien que le plateau ait tendance à desquamer.

Hermendez-Manjarrez et *al.*, (2000) ont montré qu'*E. coli* est capable d'induire des lésions dans l'épithélium intestinal en entraînant la destruction de la bordure en brosse. Cependant, après quelques jours de l'arrêt du traitement, on observe un rétablissement de la paroi qui a retrouvé son aspect naturel pour les lapins de ce même lot (lot 03) ou les probiotiques d'intérêt sont ingérés. Cela nous permet de penser que la présence de probiotiques pendant une période déterminée au niveau des intestins facilite la reconstitution des tissus intestinaux. En effet, la flore intestinale, peut jouer un rôle important dans la maladie humaine telle que les colites ulcéreuses, maladie de Crohn et l'inflammation du colon.

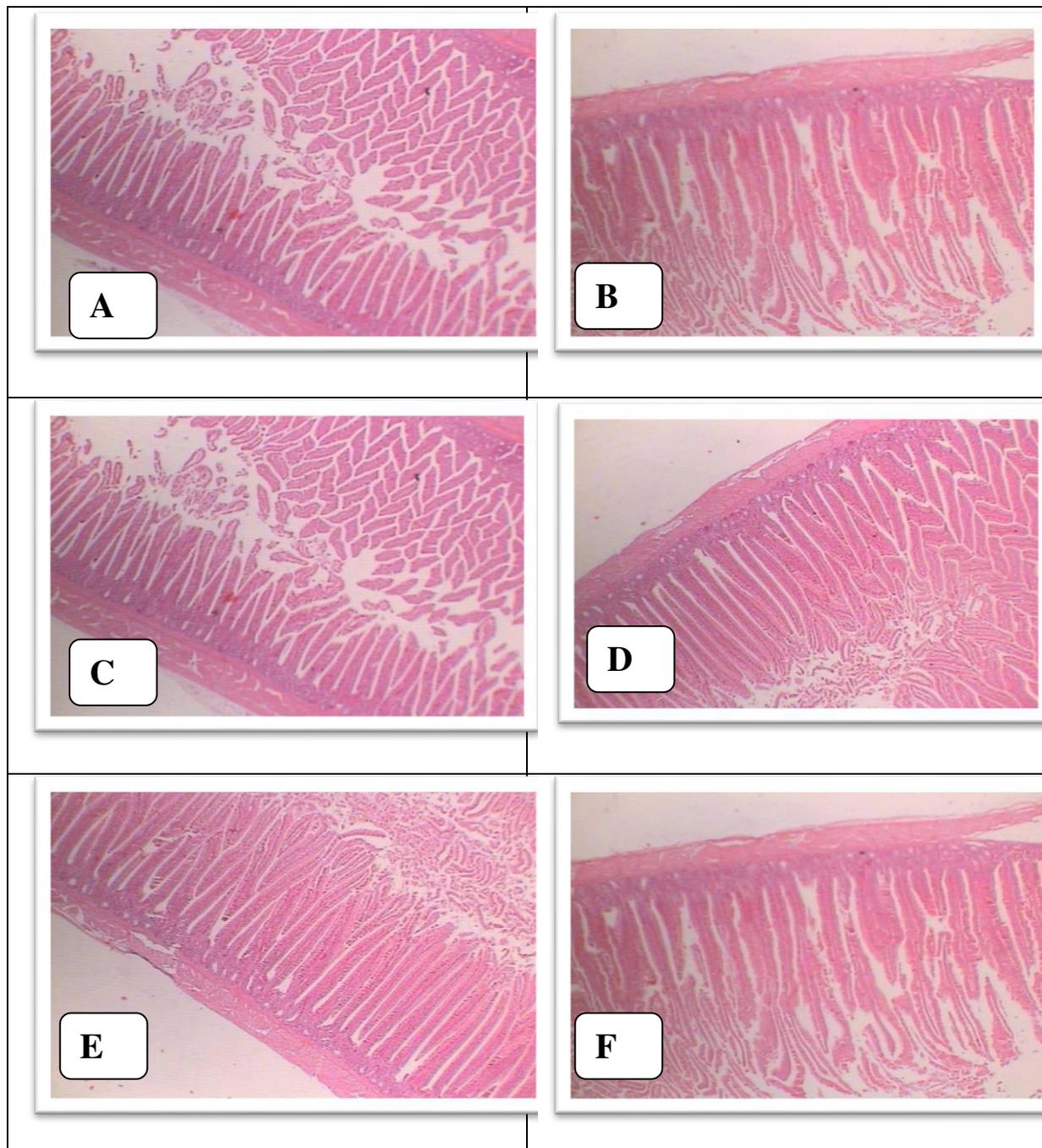


**Figure 25** : Observations microscopiques des coupes histologiques à partir des intestins des lapins du lot 3 (Antibiotique + lactobacilles + EPEC).

Durant ces dernières années, l'intérêt est porté sur l'emploi de probiotiques lors de diarrhées infectieuses, notamment la colite pseudomembraneuse. Les probiotiques peuvent prévenir et même faire disparaître les colites des souris, spontanément. Ces effets sont liés au phénomène de compétition sur les sites d'adhésion, à la production de bactériocine, ou en inhibant le processus inflammatoire.

Des études randomisées sur des souris ont montré que le maintien d'une flore normale peut renverser et faire disparaître les signes de l'inflammation chez les souris. Ainsi, Gomes et *al.*, (1999) ; ont trouvé que de nombreux probiotiques tels que les lactobacilles et bifidobactéries peuvent délivrer un signal à l'épithélium notamment la régulation épithéliale des composants carbohydrates. Les figures ci-dessous montrent des coupes histologiques des

intestins des lapins qui ont reçu un traitement préventif par *Lactobacillus sp.* avant d'être contaminer par *E. coli* et l'antibiotique.



**Figure 26:** Observations microscopiques des coupes histologiques à partir des intestins des lapins du lot 4 (Lactobacilles + EPEC) traitement préventif.

Un certain nombre de travaux utilisant des probiotiques ont été réalisés chez l'animal puis chez l'homme pour prévenir la cancérogenèse. Plusieurs auteurs, ont montré que certains probiotiques pouvaient diminuer l'activité d'enzymes, de mutagènes ou des acides biliaries

secondaires, qui pourraient être impliqués dans la cancérogenèse colique. De même, l'administration orale de divers probiotiques diminue la cancérogénicité de l'azoxymétane chez le rat, et notamment l'apparition de cryptes aberrantes. Barton, (2000) ; ont observé un moindre risque d'adénome colique de grande taille chez les sujets consommant du yaourt plus de trois fois par semaine.

Deux essais randomisés contrôlés ont montré que l'administration orale de *L. casei* diminuait de manière significative le risque de récurrence de tumeur superficielle de la vessie chez l'homme (Robin et Rouchy, 2001 ; Amrouche, 2005).

Une forte administration de probiotiques, qui pourtant ne sont qu'en transit, s'oppose aux effets nocifs des antibiotiques notamment ceux à large spectre (Rigaud, 2003 ; Guarner et al., 2008).

En ce qui concerne les lapins qui ont été traités par le probiotique associé à une prise d'amoxicilline (lot 05, figure 27) ou à une contamination d'*E. coli* (lot 07 pour l'effet curatif ; figure 28), les observations microscopiques ne révèlent aucune modification importante de la paroi intestinale et de la muqueuse, par rapport au groupe témoin. Ces résultats témoignent l'effet barrière du probiotique ou d'une protection exercée par nos probiotiques d'intérêt à l'égard de l'action d'*E. coli* et de l'amoxicilline.

D'une manière générale, les observations microscopiques montrent que l'ingestion des *Lactobacillus plantarum* associé à une antibiothérapie et dans le cas d'une contamination d'*E. coli* peut réduire voire même faire disparaître les effets néfastes de ces derniers (atrophie intestinale, destruction des structure tissulaires).

Plusieurs travaux ont démontré un effet thérapeutique significatif de plusieurs probiotiques, notamment *Lb. Rhamnosus GG* sur la durée des diarrhées en cas de gastroentérites (Camarri et al., 1981 ; Majamaa et al., 1995 ; Shonikova et al., 1997).

Certaines bactéries lactiques ont une forte adhésion au tractus digestif (Isolauri et al., 1991 ; Bernet et al., 1994 ; Dilmi Bouras, 2006 ; 2007). L'adhésion des bactéries lactiques à l'épithélium intestinal interférerait avec celle des agents pathogènes par saturation des sites de fixation. Les bactéries lactiques capables d'adhérer *in vitro* à l'épithélium humain et animal sont principalement des lactobacilles et certaines bifidobactéries (Chauvière et al., 1992 ; Bernet et al., 1993 ; Coconnier et al., 1993).

Certaines études ont montré que *B. bifidum* et *Lb. acidophilus* sont capables d'inhiber l'adhésion de *Salmonella typhimurium* et de la bactérie entéropathogène *E. coli* aux cellules Caco-2 (Coconnier et al., 1992 ; Bernet et al., 1993).

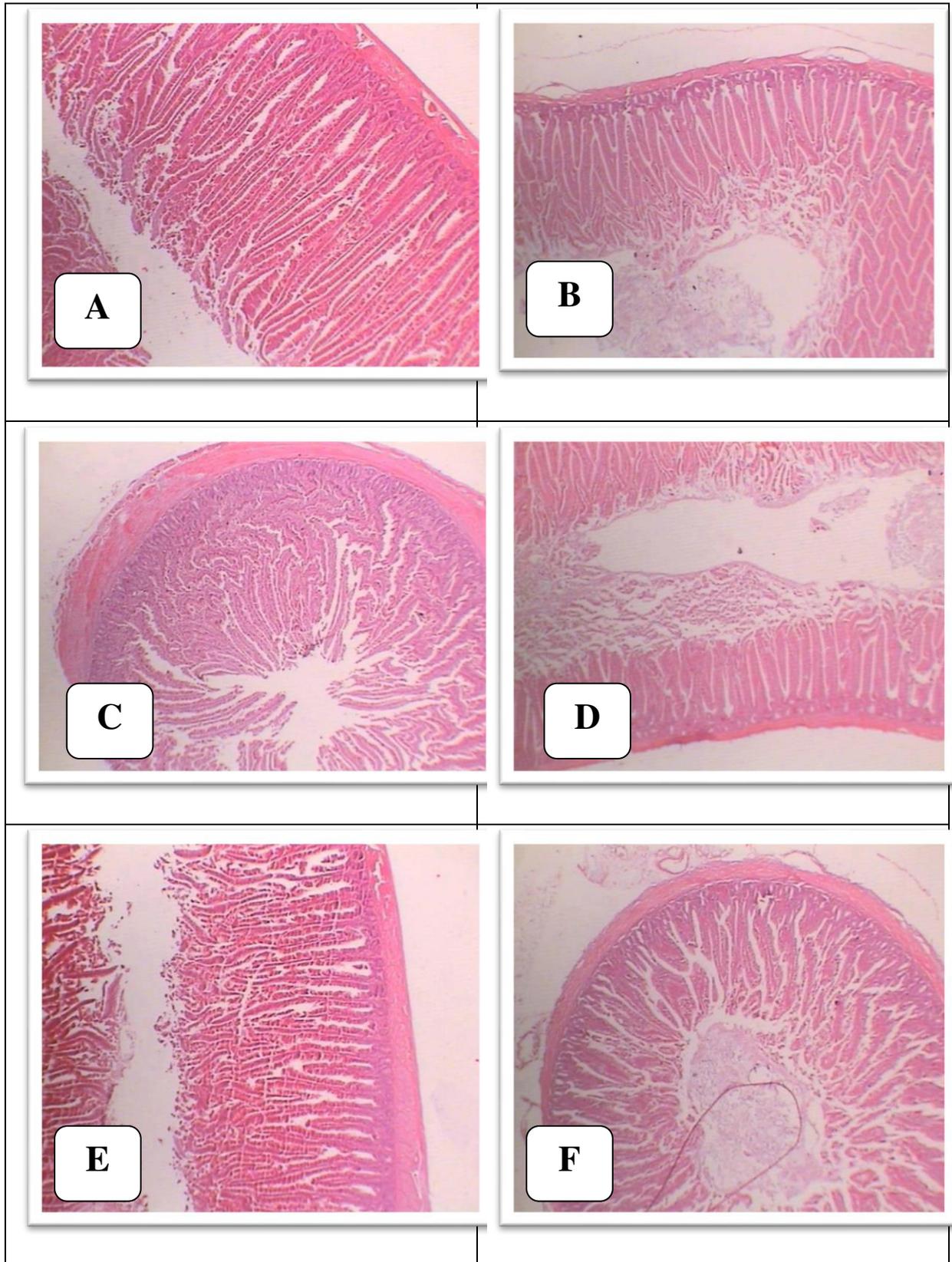
Les probiotiques améliorent l'équilibre microbien du tractus gastro-intestinal humain et interviennent dans les traitements des diarrhées infectieuses, des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) et dans la prévention du cancer colique expérimental (Corthier et al., 2007).

Le rôle protecteur d'une colonisation précoce et abondante par des bactéries lactiques a été suggéré à partir d'études sur des modèles animaux d'entérococolite ulcéro-nécrosante. Chez les patients enfants, la diversité de l'écosystème est extrêmement réduite, comme l'ont montré des études utilisant des approches moléculaires (Pochart, 2004 ; Magne et al., 2006).

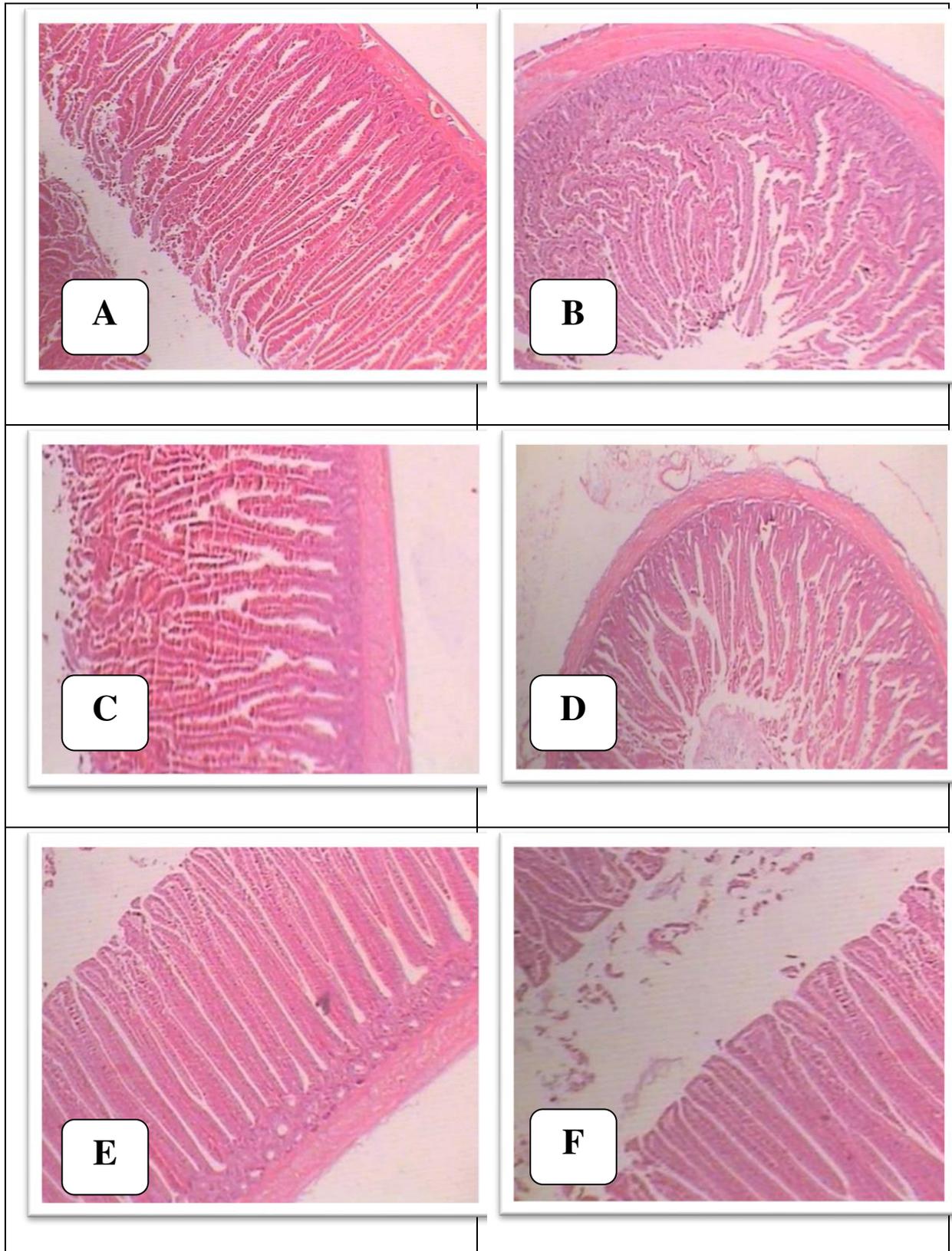
Les probiotiques pourraient agir en limitant l'implantation des germes pathogènes par compétition au niveau des sites de fixation pour la colonisation (Amrouche, 2005 ; Hurre et al., 2008). Certains probiotiques augmentent *in vitro* sur des lignées intestinales humaines l'expression de mucines et modifient la glycosylation apicale de cellules ; cet effet pourrait être relié à l'inhibition, observée par ailleurs avec certains probiotiques (Hurre et al., 2008).

L'ensemble des études clinique chez l'homme convergent vers une modulation de l'immunité innée (activation de phagocytose et de lymphocyte NR) par l'administration orale de différentes souches de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Boclé, 2005) ce qui est très important sachant que, la plupart des maladies intestinales sont dues au dysfonctionnement du système immunitaire intestinale. Des études récentes apportent l'effet probiotique de ces bactéries même mortes et plus particulièrement de leur ADN.

Dans un modèle de colite chimiquement induite par la DSS (Dextran Sulfate Sodium), l'ADN d'un mélange de bactéries lactique (produit VLS#3®) contenant : *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *L. casei*, *L. plantarium* et *Streptococcus thermophilus* administré dans l'estomac ou par voie sous cutanée réduit l'inflammation de la muqueuse intestinale. Le même résultat était obtenu par administration intra- gastrique du mélange probiotique viable ou tué [irradiation]. Cependant, certains effet n'étaient obtenus qu'avec des probiotiques ingérés vivants (Amrouche, 2005 ; Boclé, 2005).



**Figure 27 :** Observations microscopiques des coupes histologiques à partir des intestins des lapins du lot 5 (Antibiotiques + lactobacilles).



**Figure 28** : Observations microscopiques des coupes histologiques à partir des intestins des lapins du lot 7 (Antibiotiques + traitement curatif par les lactobacilles).

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La diarrhée n'est pas seulement un état occasionnel gênant, mais aussi une cause majeure de mortalité dans le monde et en particulier, chez les enfants dans les pays en voie de développement. En Algérie le taux de morbidité et de mortalité reste toujours très élevé et représente un sérieux problème de santé public.

L'objectif principal de cette étude était d'isoler et d'identifier des souches responsables des diarrhées chez les nourrissons et des souches de lactobacilles à caractères probiotiques dans la perspective de leur utilisation pour la prévention et le contrôle des diarrhées infectieuses infantiles.

A partir de différents laits nous avons isolé une collection de 82 souches de lactobacilles parmi 100 souches de bactéries lactiques.

150 échantillons diarrhéiques prélevés dans la région de Chlef ont été l'objet d'un isolement des bactéries pathogènes. Leurs culture sur milieu spécifique permettent à l'étude bactériologique de s'orienter vers ces bactéries, leurs tailles, formes, contour, odeurs et donc permettent de les différencier des autres groupes de bactéries, leurs mobilités, leurs pouvoirs fermentatifs des sucres (glucose, saccharose et lactose) et leurs équipements enzymatiques (ODC, ADH, LDC, tryptophane désaminase, uréase...). Les résultats ont montré une prédominance des infections intestinales d'origine bactérienne causées par *Escherichia sp.* (92%) suivie par *Salmonella sp.* (7,33%) puis *Proteus sp.* (0,66%).

Par ailleurs, l'étude de l'activité antibactérienne des souches des lactobacilles contre les bactéries pathogènes isolées à partir des diarrhées a montré un profil d'inhibition intéressant. L'activité antimicrobienne est recherchée en utilisant le test des puits après neutralisation du pH et du peroxyde en ajoutant de la catalase. Les résultats de ce test montrent un large spectre d'activité. Ces bactéries produisent probablement une substance antimicrobienne active.

Par rapport à l'évaluation de leurs aptitudes probiotiques :

- L'étude de l'habilité à survivre dans des conditions gastriques simulées (action combinée de la bile et pH) a conduit à 05 souches résistantes. Le taux le plus élevé a été observé avec *L. plantarum* LBC50, suivie par *L. fermentum* LBC37.

- L'étude de l'habilité, de ces 05 souches résistantes au jus gastrique simulé, aux conditions mimant l'intestin a conduit à 04 souches présentant une bonne tolérance aux sels biliaries. Le taux de résistance le plus élevé a été observé avec *L. plantarum* LBC50.

L'évaluation des aptitudes probiotiques a conduit donc à une sélection d'une souche de lactobacille à haut profil probiotique via l'ensemble des critères testés.

Leur identification, comme recommandé pour les nouvelles souches a été confirmée par le séquençage du gène ADNr 16S. L'analyse bioinformatique des données issues du séquençage a indiqué un taux de similitude de 99% de séquence de *Salmonella sp.* avec *Salmonella enterica subsp. Diarizonae*. De même, la souche *Escherichia sp.* a présenté un taux de similitude de 98% avec *Escherichia fergusonii*. Cependant le degré d'homologie de la souche *Proteus sp.* est équitable à 98% avec la souche de *Proteus mirabilis*. Finalement, la souche *Lactobacillus sp.* semble avoir un taux de similitude de 100% avec *Lactobacillus plantarum*. Les souches identifiées ont été enregistrées au centre Wallon de Bio-Industrie (CWBI) et dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès : *Escherichia fergusonii* atKJ803903.1 ; *Proteus mirabilis* KC456549.1 ; *Salmonella enterica subsp. Diarizonae* AB273735.1 et *Lactobacillus plantarum* DQ295035.1.

Pour conclure, nous avons voulu confirmer *in vivo* l'activité anti-*E. coli* des lactobacilles observée *in vitro* à l'aide d'un modèle d'infection chez le lapin. Ainsi des infections à *E. coli* ont été provoquées par voie orale chez des lapins holoxéniques et la souche de *Lactobacillus plantarum* a été administrée de manière préventive et sous forme de traitement toujours par voie orale. Les lapins ayant reçu le traitement avec la souche *Lactobacillus plantarum* montraient des signes d'infection moins importants que celles qui n'avaient reçu aucun traitement.

D'autre part, il serait aussi intéressant de caractériser et de comprendre, au niveau cellulaire et moléculaire le(s) mécanisme(s) par lequel(s) les souches de lactobacilles exercent leurs effets contre *E. coli*. Cette recherche s'inscrit dans une perspective d'une future utilisation des souches probiotiques sélectionnées dans le contrôle des diarrhées infectieuses infantiles, par conséquent d'autres études sont nécessaires pour justifier leur emploi en tant que telles. Ces études doivent être axées sur :

- L'étude de leurs mécanismes d'action ;
- La confirmation de leur profil de résistance aux antibiotiques ;
- L'évaluation de leurs aptitudes technologiques ;
- Etude du gène responsable de la production des " bactériocines " ;
- Application du génie génétique pour la sélection des souches améliorées afin de produire des cultures probiotiques à usage thérapeutique.

### Références bibliographiques

- ✓ **Ababsa A., (2012).** Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait. Mémoire de magister en Génie microbiologie. Université Ferhat Abbas Sétif. P111.
- ✓ **Abratt V.R. et Reid S.J., (2010).** Oxalate-degrading bacteria of the human gut as probiotics in the management of kidney stone disease. *Adv. Appl. Microbiol.*, 72: 63-87.
- ✓ **Adamowicz M., Kelley P.M. et Nickerson K.W., (1991).** Detergent (sodium dodecyl sulfate) shock proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 173: 229-233.
- ✓ **Adams M.R. et Hall C.J., (1988).** Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int. J. Food. Sci. Technol.*, 23: 287– 292.
- ✓ **Adley C., Khalil A., Camila M., Kamila O. et Vijayalakshmi V., (2009).** Design of specific DNA primers to detect the *Bacillus cereus* group species. *IEEE Sensors Applications Symposium*, 9:17-19.
- ✓ **AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments), (2005).** Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme.
- ✓ **Aiba Y., Suzuki N., Kabir A. M., Takagi A. et Koga Y., (1998).** Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am. J. Gastroenterol.*, 93: 2097-2101.
- ✓ **Alakomi L., Skytta E., Sareela T., Mattila-Sandholm T., Lavta-Kala K. et Helander I.M., (2000).** Permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Env. Microbiol.*, 66 (5): 2001- 2005.
- ✓ **Albert M.J., Faruque A.G., Neogi P.B., Ansaruzzaman M., Bhuiyan N.A., Alam K. et Akbar M.S., (1995).** Controlled study of *Echerichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. *J. Clin. Microbiol.*, 33(4): 973 – 977.
- ✓ **Alvarez-Olmos M. I. et Oberhelman R. A., (2001).** Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clin. Infect. Dis.*, 32: 1567– 1576.
- ✓ **Amrouche T., (2005).** Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries : analyse *in vitro* et étude *in vivo* des mécanismes moléculaires impliqués. Thèse de Doctorat. Université de Laval Québec. P175.

- ✓ **Anastasio M., Pepe O., Cirillo T., Palomba S., Blaiotta G. et Villani F., (2010)** Selection and use of phytate-degrading LAB to improve cereal-based products by mineral solubilization during dough fermentation. *J. Food. Sci.*, 75: 28-35.
- ✓ **Andersson R., (1986).** Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplasts of gram-negative bacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food. Microbiol.*, 3: 149-160.
- ✓ **Anderssen E.L., Diep D.B., Nes, Eijsink V.G.H. et Nissen-Meyer J., (1998).** Antagonistic of *Lactobacillus plantarum* C1: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin. *A. Appl. and Environ. Microbiol.*, 64: 2269- 2272.
- ✓ **Arzu C. C., Nilgun T., Birgul O. et Cumhur C., (2011).** The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16S rRNA gene sequences and ARDRA analyses isolated from geothermal regions of Turkey. *Braz. J. Microbiol.*, 309-324.
- ✓ **Aubry P., (2003).** Les diarrhées infectieuses : Médecine tropicale des pays de l'océan indien. **Centre René Labusquière, Institut de Médecine Tropicale. Université de Bordeaux.**
- ✓ **Aubry P., (2005).** Giardiase et syndrome de malabsorption intestinale. *Médecine tropicale*, 65 : 383-385.
- ✓ **Aubry P., (2013).** Les Salmonelloses. Médecine Tropicale. P6.
- ✓ **Avril J. L., (1995).** Diagnostic microbiologique des diarrhées infectieuses aiguës. *Rev. Fr. de gastroentérologie*, 309: 810-813.
- ✓ **Axelsson L.T., (2004).** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In *Lactic Acid Bacteria-Microbiology and functional aspects*. Edited by Salminen S., Wright A., et Ouwehand A., 3<sup>ème</sup> Ed Marcel Dekker, Inc. NewYork: 1-66.
- ✓ **Ayad E.H.E., Nashat S., El-Sadek N., Metwaly H. et El-Soda M., (2004).** Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiol.*, 21 : 715- 725.
- ✓ **Badis A., Guetarni D., MoussaBoudjema B., Henni D.E. et Kihal M., (2004).** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21: 579-588.

- ✓ **Bahri F., (2014).** Isolement et caractérisation des souches de lactobacilles à caractères probiotiques à partir des selles d'enfants. Mémoire de doctorat en Microbiologie appliquée. Université Costantine I. P124.
- ✓ **Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W. et Schleifer K. H., (1992).** The prokaryotes. Edition Springer Verlage. New yourk. P1155.
- ✓ **Barefoot S.F. et Klaenhammer T.R., (1983).** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45: 1808-1815.
- ✓ **Barinov A., Bolotin A., Langella P., Maguin E. et Van De G., (2011).** Genomics of the genus *Lactobacillus*. In « Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research » Sonomoto and Yokota/ Caister Academic Press. Ed. Norfolk. United kingdom: 3-32.
- ✓ **Barton M., (2000).** Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews*, 13: 299- 279.
- ✓ **Begely M., Hill C., et Gahan C.G.M., (2006).** Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Apl. Env. Microbiol.*, 72(3): 1729-1738.
- ✓ **Belkhenchir D., (1985).** Les diarrhées du jeune enfant. Thèse de Doctorat en Médecine. ISM Université d'Alger. P227.
- ✓ **Benbernou L., Poudinar F., Chaou M. et Grancaud J.P., (2000).** Guide de prise en charge de la diarrhée chez l'enfant. Ministère de la santé et de la population. Direction de la prévention et santé maternelle et infantile. P35.
- ✓ **Benkerroum N., Ghouati Y. et Ghalfi H., (2007).** Screening for bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria from various Moroccan food Products and partial characterization of putative bacteriocins. *Biotechnol.*, 6: 481- 488.
- ✓ **Bensaleh M.N., (2010).** Gastroentérite aigue chez l'enfant. Mémoire Docteur en Médecine. Université d'Alger. P98.
- ✓ **Bensenouci A. et Mazouni M., (1995).** Elément de pédiatrie, les diarrhées aigue de l'enfant. Office des publications vétérinaires : P415.
- ✓ **Bernet M.F., Brassart D., Neeser J.R. et Servin A.L., (1993).** Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 4121-4128.

- ✓ **Berrada N., Lemeland J.F., Larache G., Thouvenot P. et Piaia M.S., (1991).** *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* 74: 409 – 413.
- ✓ **Berry E.D., Liewen M.B., Mandigo R.M. et Hutkins R.W., (1995).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus* during manufacture of fermented semi-dry sausage. *J. Food Protect.*, 53: 194-197.
- ✓ **Bey F., (2009).** Etude de l'interaction antagoniste entre *Lactibacillus sp.* et quelques souches d'entérobactéries. Thèse de Magister. Université d'Oran Es-Senia. P96.
- ✓ **Bhan M.K., Mahalanabis D., Pierce N.F, Rollins N., Sack D. et Santosham M., (2006).** Département de la santé et du développement de l'enfant et de l'adolescent. OMS. Le traitement de la diarrhée : manuel à l'usage des médecins et autres personnels de santé qualifiés. 4<sup>ème</sup> édition.
- ✓ **Bissonnette F., Labrie S.,Deveau H., Lamoureux M. et Moineau S., (2000).** Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 83:620-627.
- ✓ **Björkroth J. et Holzapfel W., (2006).** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds). *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community* (3<sup>rd</sup> edition). Springer Verlag. New York, USA: 267-319.
- ✓ **Boclé J.C., (2005).** Effets de probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'Homme adulte. *French Food Safety Agency*, 1- 128.
- ✓ **Bocquet A, Bresson J.L., Brienda.,Chouraqui J.P. et Darmaun D., (2002).** Traitement médicamenteux des diarrhées aiguës infectieuses du nourrisson et de l'enfant. *Archives de Pédiatrie*, 9(6): 610 -619.
- ✓ **Borriello S.P., Hammes W.P., Holzapfel W., Marteau P., Schrezenmeir J., Vaara M. et Valtonen V., (2003).** Safety of Probiotics That Contain *Lactobacilli* or *Bifidobacteria*. *Clin. Inf. Dis.*, 36: 775– 780.
- ✓ **Borthakur A., Gill R.K., Tyagi S., Koutsouris A., Alrefai W.A., Hecht G.A., Ramaswamy K. et Dudeja P.K., (2008)** .The probiotic *Lactobacillus acidophilus* stimulates chloride/hydroxyl exchange activity in human intestinal epithelial cells. *J. Nutr.*, 138: 1355-1359.

- ✓ **Bossi A., Rinalducci S., Zolla L., Antonioli P., Righetti P.G .et Zapparoli G., (2007).** Effect of tannic acid on *Lactobacillus hilgardii* analysed by a proteomic approach. *J. Appl. Microbiol.*, 102: 787-795.
- ✓ **Bottazzi V., (1988).** An introduction to rod shaped lactic bacteria, *Biochimie*, 70: 303-315.
- ✓ **Boudjema K., (2008).** Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactosérum par *Streptococcus thermophilus*. Mémoire de magister. Université M'Hamed Bougara de Boumerdes : 5-19.
- ✓ **Bourgeois C.M. et Bouix M., (1980).** La flore lactique .In : Techniques d'analyse et de contrôle dans les Industrie agroalimentaires .3<sup>ème</sup> Ed. Tec et Doc., Paris : 28-59.
- ✓ **Bourgeois C.M., Mescle J., Zucca J. et Larpent J.F., (1996).** Microbiologie alimentaire (tome 1). Ed. Lavoisier. Paris : 29-245.
- ✓ **Bourree P., (1989).** Dictionnaire de parasitologie. Edition. Ellipses. Paris :126 - 127.
- ✓ **Braeger C. et Zurich D., (2006).** Utilité des pré ou probiotiques comme supplément au lait maternel. *Paediatrica*, 17(2) : 35 – 58.
- ✓ **Braseger C., (2002).** Le rôle des probiotiques dans la prévention et le traitement de la gastro-entérite aigue chez l'enfant. *Pédiatr. Resch.*, 13(5) : 29- 33.
- ✓ **Bravo L., (1998).** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 56: 317-333.
- ✓ **Brunser O., Figueroa G., Gotteland M., Haschke-Becher E., Magliola C., Rochat F., Cruchet S., Palframan R., Gibson G., Chauffard F. et Haschke F., (2006).** Effects of probiotic or prebiotic supplemented milk formulas on fecal microbiota composition of infants. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* ,15: 368-376
- ✓ **Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, (1981).** Diarrhées d'origine parasitaire, 59(2): 175-187.
- ✓ **Burgess C.M., Smid E.J. et Van Sinderen D., (2009).** Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: An overview. *Int. J. Food Microbiol.*, 133: 1-7.
- ✓ **Buydens P. et Debeuckelaere S., (1996).** Efficacy of SF 68 in the treatment of acute diarrhea. A placebo-controlled trial. *Scand. J. Gastroenterol.*, 31(9): 887-891.
- ✓ **Calder P.C., Krauss-Etschmann S., de Jong E.C., Dupont C., Frick J.S., Frokiaer H., Heinrich J., Garn H., Koletzko S., Lack G., Mattelio G., Renz H., Sangild P.T., Schrezenmeir J., Stulnig T.M., Thymann T., Wold A.E. et Koletzko B.,**

- (2006). Early nutrition and immunity - progress and perspectives. *Br. J. Nutr.*, 96: 774-790.
- ✓ **Camarri E., Belvisi A., Guidoni G., Marini G., Frigerio G. A., (1981).** Double-blind comparison of two different treatments for acute enteritis in adults. *Chemotherapy*, 27: 466-470.
  - ✓ **Campana R., Federici S., Ciandrini E. et Baffone W., (2012).** Antagonistic Activity of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 on the Growth and Adhesion/Invasion Characteristics of Human *Campylobacter jejuni*. *Curr. Microbiol.*, 64: 371–378.
  - ✓ **Carina Audisio M. et Maria C.A., (2010).** Bactriocin like substance produced by *lactobacillus salivarius subsp .Salivarius* CRL 1384 with anti listeria and anti salmonella effect. *Res. J. Microbio.*, 5(7) : 667-675.
  - ✓ **Cecconi D., Cristofolletti M., Milli A., Antonioli P., Rinalducci S., Zolla L. & Zapparoli G., (2009).** Effect of tannic acid on *Lactobacillus plantarum* wine strain during starvation: A proteomic study. *Electrophoresis*, 30: 957-965.
  - ✓ **Cerf M. et Hagiage M., (1992).** Diarrhées aiguës d'origine infectieuse. Edition Techniques. Encycl. Méd. Chir. Paris-France, Gastro-entérologie, P20.
  - ✓ **Cézard J.P., Bellaiche M., Viala J. et Hugot J.P., (2007).** Traitement médicamenteux des diarrhées aiguës du nourrisson et de l'enfant. *Archives de pédiatrie*, 14: 169- 175.
  - ✓ **Cézard J.P., Chouraqui J.P., Girardet J.P., Gottrand F. et le Groupe francophone d'hépatologie, gastroentérologie et nutrition pédiatriques, (2002).** Traitement médicamenteux des diarrhées aiguës infectieuses du nourrisson et de l'enfant. *Archives de Pédiatrie*, 9: 620-628.
  - ✓ **Chaigneau C., (2007).** Prise en charge de la diarrhée aigue du nourrisson en médecine générale : enquête dans le département de Vienne. Thèse de Doctorat en Médecine. Université de Poitiers,France. P99.
  - ✓ **Chauvière G., Coconnier M.H., Kernéis S., Fourniat J. et Servin A.L., (1992).** Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 1689-1696.
  - ✓ **Cherbut C., (2001).** Prébiotiques et fonctions gastro-intestinales : Revue des effets et des perspectives. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 38(6): 346-354.

- ✓ **Chouraqui J.P., (2002).** Etablissement de l'écosystème intestinal et rôle de l'alimentation. *Gastro-enterologie et nutrition pédiatrique*. CHU de Grenoble. 4- 5.
- ✓ **Cinquin C., Le Blay G., Fliss I. et Lacroix C., (2005).** Developpement and validation of a three-stage continuous culture with immobilized fecal microbiota to simulate infant colon fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1 – 171.
- ✓ **Cintas L.M., Herranz C., Hernandez P.E., Casaus M.P., NES I.F. et Hernandez P.E., (2001).** Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Sci. Technol. Int.*, 7(4): 281-305.
- ✓ **Clarke H. et Cowan S. T., (1952).** Biochemical methods for bacteriology. *J. of General Micro.*, 6: 187–197.
- ✓ **Coconnier M.E., Bernet M.F., Kernéis S., Chauvière G., Fourniat J. et Servin A.L., (1993).** Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiol. Lett.*, 110: 299-306.
- ✓ **Coconnier M.E., Klaenhammer T.R., Kernéis S., Bernet M.F. et Servin A.L., (1992).** Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2034-2039.
- ✓ **Coker C., Poore C.A. et Mobley H.L., (2000).** Patogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes and Infection*. Institut Pasteur, 2(12): 1497-1505.
- ✓ **Commission d'Evaluation des Produits et Prestations, (2006).** Avis de la Commission. <http://www.has-sante.fr>.
- ✓ **Condon S., (1987).** Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Micro. Letters*, 46(3): 269-280.
- ✓ **Corrieu G. et Luquet F. M., (2008).** Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Ed. Lavoisier. Paris. France : 472 -849.
- ✓ **Corrieu G., et Luquet F.M., (2008).** Bactéries lactiques et probiotiques. Edition Tec. Et Doc, Lavoisier. Paris France : 9, 10, 25, 51.
- ✓ **Corthier G., (2004).** Les bénéfiques santé des probiotiques. *Danone nutritopics*, 29: 1-13.
- ✓ **Corthier G., Sokol H. et Doré J., (2007).** Diversité du microbiote et de ces fonctions. *Obésité*, 2(3): 215- 220.

- ✓ **Coudeyras S. et Forestier C., (2010).** Microbiote et probiotiques: impact en santé humaine. *Can. J. Microbiol.*, 56 (8) : 611–650.
- ✓ **Courcol R., (2002).** Infections digestives : objectifs pédagogiques. *Pédiatr. Reserch.* 67: 194- 302.
- ✓ **Cover T.L. et Aber R.C., (1989).** *Yersinia enterocolitica*. *N. Angl. Méd.*, 321: 16-21.
- ✓ **Cremonini F. et Talley N.J., (2005).** Irritable bowel syndrome: epidemiology, natural history, health care seeking and emerging risk factors. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 34: 189- 204.
- ✓ **Cristfaro E.H., Mattu F. et Wurhmann J.J., (1974).** Involment of the raffinose family oligosaccharides in flatulence. In: Sipple HL, McNatt KW (Eds) Sugar in nutrition. *Academic Press New York*, 313.
- ✓ **Crivelli C., Demarta A. et Peduzzi R., (2001).** Intestinal secretory immunoglobulin A (sIgA) response to Aeromonas exoproteins in patients with naturally acquired Aeromonas diarrhea. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 30: 31-35.
- ✓ **Curiel J.A., Rodriguez H., de Las Rivas B., Anglade P., Baraige F., Zagorec M., ChampomierVerges M., Munoz R .et de Felipe F.L., (2011).** Response of a *Lactobacillus plantarum* human isolate to tannic acid challenge assessed by proteomic analyses. *Mol. Nutr. Food. Res.*, 55(10): 1454-1465.
- ✓ **Curk D. et Mac Phail A., (1996).** Précision des mesures de vitesse de croissance des streptocoques lactiques dans le lait Basées sur la méthode de dénombrement microbien par formation de colonies. Etude de référence avec *lactococcuslactis*. *Lait*, 69: 433-447.
- ✓ **Dabadié A., (1999).** Diarrhée aigue du nourrisson. *Pediatrica* : 473 – 482.
- ✓ **Dacosta Y., (2001).** Probiotiques et probiotiques. Ed :Yves DACOSTA. Paris : 3- 21.
- ✓ **Daoudi L., (2000).** Purification, développement d’anticorps monoclonaux spécifiques et détection immunoenzymatique de la nisine Z, une bactériocine produite par *lactococcus lactis biovar diacetyl actis* UL719 pour l’obtention du grade de maitre ès science (MSC). Département des sciences des aliments et nutrition faculté des sciences de l’agriculture et de l’alimentation, Université laval Canada.
- ✓ **De Man J.C., Rogosa M., Sharpe, M.E., (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. App. Bacteriol.*, 23(1): 130-135.

- ✓ **De Martinis E. C. P., Pùblio M. R. P., Santarosa P. R. et Freitas F. Z., (2001).** Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged brazilian meat and meat products. *Braz. J Microbiol.*, 32: 32-37.
- ✓ **De Roissard H. et Luquet F.M., (1994).** Bactéries lactiques. 2<sup>ème</sup> Ed., Lorica Uriage. P600.
- ✓ **De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. et Whiteman W. B., (2009).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg London, New York, 3: 19-20.
- ✓ **de Vrese M., Stegelmann A., Richter B., Fenselau S., Laue C. et Schrezenmeir J., (2001).** Probiotics: compensation for lactase insufficiency. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 421-429.
- ✓ **Deegan L. H., Cotter P. D., Hill C. et Ross P., (2006).** Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.*, 16: 1058-1071.
- ✓ **Delarras C., (2007).** Microbiologie Pratique Pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle Sanitaire. Edition technique et documentation Lavoisier. Paris: 128 -129-347.
- ✓ **Déléze G., (2009).** De « mettre au repos le tube digestif » à « nourrir l'intestin ». Evolution et concepts actuels dans le traitement de la diarrhée aigüe de l'enfant. Société suisse de pédiatrie (SSP). <http://www.swiss-paediatrics.org/guidelines/dirrhées.htm>.
- ✓ **Delmée M., (2001).** Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin. Microbiol. Infect.*, 7: 411- 416.
- ✓ **Delmée M., (2003).** Les microorganismes impliqués dans les infections du tractus digestif. Cours de Microbiologie médicale. Faculté de médecine. Université Catholique de levain, 1-3.
- ✓ **Desmazeaud M., (1983).** Comment les bactéries lactiques se comportent elles dans le lait?. *Techniques laitière*, 976: 11-14.
- ✓ **Devoyod J. J. et Poullain F., (1988).** Les leuconostocs Propriétés : Leur rôle en technologie laitière. *Lait*, 68 : 249-280.
- ✓ **Dilmi Bouras A. et Sadoun D., (2002b).** Survie des ferments du yaourt dans le tube digestif du lapin, *Lait*, 82: 245- 253.

- ✓ **Dilmi Bouras A., (1991).** Assimilation du cholestérol par les bactéries lactiques. Thèse de Magistère. INA El-Harrach, Alger : P149.
- ✓ **Dilmi Bouras A., (2002).** Survie de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* et leur action sur le métabolisme du cholestérol. Thèse de doctorat d'état. INA El-Harrach, Alger : 1- 99.
- ✓ **Dilmi Bouras A., (2006).** Assimilation *in vitro* of cholesterol by yogurt bacteria. *Annals of agricultural and Environmental Medecine*, 13: 49-53.
- ✓ **Dilmi Bouras A., Koiche M. et Tabti M., (2007).** The effect of *Lactobacillus-paracasei* on the rabbit's cholesterolemia. *Afr. J. of Biotechnology*, 6(24) : 2840-2845.
- ✓ **Diouf S., Sarr M.S., Abdellahi O.C., et Fall M., (1990).** Malnutrition et diarrhée chez l'enfant au CHU de Dakar. Aspect clinique, épidémiologique et biologique. *Med. Af.*, 37 : 29- 32.
- ✓ **Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T. et Shah N.P., (2007b).** [alpha]-Galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. *Food Chemistry*, 104: 10-20.
- ✓ **Dortu C. et Thonart P., (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13: 143-154.
- ✓ **Doumandji A., Hellal A. et Saidi N., (2010).** Purification de la bactériocine à partir de *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiol. Ind. San et Environn.*, 4(2): 25-47.
- ✓ **Drouault S., Anba J., Corthier G., (2002).** *Streptococcus thermophilus* is able to produce a  $\beta$ -galactosidase active during its transit in the digestive of germ free mice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(2): 936-941.
- ✓ **Dubé M.H., (2004).** Probiotiques et *Clostridium difficile*, Centre d'information sur les médicaments. *Clin Microbiol Infect.*, 15(12): 1 – 19.
- ✓ **Duchmann R., Kaiser I., Hermann E., Mayet W., Ewe K. et Meyer Zum Buschenfelde K.H., (1995).** Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.*, 102: 448-455.
- ✓ **Duggan A., (1996).** Who valid are clinical sigus of deshydratation in infants? *J. Pediatr. Gastro-Enterol. Nut.*, 22: 56 – 61.

- ✓ **Duggan C. et Nurko S., (1997).** « Feeding the gut »: The scientific basis for continue d enteral nutrition during acute diarrhée. *J. of Pediatrics*, 131(6): 801-808.
- ✓ **Duhamel J.F., Arion A., De Schreve G.I., Dager S. et Laurans M., (1999).** Traitement médicamenteux des diarrhées aiguës de l'enfant. Journées de techniques avancées de gynéco-obstétrique, périnatalogie et pédiatrie (JTA).
- ✓ **Dunne C., O'Mahony L., Murphy L., Thornton G., Morissey 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. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 386- 392.
- ✓ **Dupeyron C., (1997).** Les diarrhées aiguës bactériennes : causes et mécanismes. Edition of diarrhea and faeces. *Development and Health*, 128 :21.
- ✓ **Dupont C. Benhamou P., Gendrel D. et Raymond J., (1999).** Les diarrhées aiguës de l'enfant. Pathologie Science. John Libbey Eurotext. Paris, P110.
- ✓ **Dupont C., (2000).** Flore du nourrisson et immunité intestinale: implications et perspectives en alimentation infantile pour les prébiotiques, *Arch. Pédiatrie*, 7 :252–255.
- ✓ **Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E. et Relman D.A., (2005).** Diversity of the human intestinal microbialflora. *Science*, 308(5728):1635–1638.
- ✓ **Eklund T., (1989).** Organic acids and esters. In: Gould, G.W. (Ed.), *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures. Elsevier Applied Science*. London:161-200.
- ✓ **El Omari J., (2007).** La maladie diarrhéique a l'échelle nationale et dans la region de marrakech de l'Enfants de moins de 5 ans dans le service de Pédiatrie du centre de santé. Thèse de doctorat : 35-60.
- ✓ **El Ouardi A. et Chami A., (2001).** Interest and limits of the biochemical identification system in the diagnosis of Enterobacteria. Rabat, Morocco, Institut de Formation aux Carrieres de Santé : 6- 17- 26.
- ✓ **Emanuel G. et Lorrence H. G., (2009).** Practical handbook of microbiology. CRC press USA., 13: 9360- 9365.
- ✓ **Erdourul Z. et Erbulur F., (2006).** Isolation and Characterization of Lactobacillus bulgaricus and Lactobacillus casei from Various Foods. *Turk J Biol*, 30: 39-44.

- ✓ **Erlend L., Anderssen D. B. D., Ingolf F. N., Vincent G. H., Eijsink N. M., (1998).** Antagonistic Activity of *Lactobacillus plantarum* C11: Two New Two-Peptide Bacteriocins, Plantaricins EF and JK, and the Induction Factor Plantaricin A. *App. Envir.l Microbio.*, (64)6: 2269–2272.
- ✓ **Eutamene H., Lamine F., Chabo C., Theodorou V., Rochat F., Bergonzelli G.E., Corthesy-Theulaz I., Fioramonti J. et Bueno L., (2007).** Synergy between *Lactobacillus paracasei* and its bacterial products to counteract stress-induced gut permeability and sensitivity increase in rats. *J. Nutr.*, 137: 1901-1907.
- ✓ **Falk P.G., Hooper L.V., Midtvedt T. et Gordon J.I., (1998).** Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 1157-1170.
- ✓ **FAO/OMS, (2001).** Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS) .Working Group Report.Cordoba, Argentina.
- ✓ **FAO/OMS, (2002).** Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS).Working Group Report. London, Ontario, Canada.
- ✓ **FAO/OMS, (2002).** Guidelines for the evaluation of probiotics in food.Working Group Report. London, Ontario, Canada.
- ✓ **Farber J.M., (1991).** Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology. *J. Food Prot.*, 54: 58-70.
- ✓ **Fauchère J.L., (1990).** Bactério-Fiches : Examen cyto bactériologique au cours des infections digestives. Ellipses, Paris, P167.
- ✓ **Faure C. et Besnard M., (1998).** Diarrhée aigüe du nourrisson. *Méd. Chir. Pédiat.*, P6.
- ✓ **Fedorak R. N. et Madsen K.L., (2004).** Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 20:146 –55.
- ✓ **Feng Y. et Xiao L., (2011).** Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin.Microbiol.*, 24 (1): 110-40.

- ✓ **Ferraz R.R., Marques N.C., Froeder L., Menon V.B., Siliano P.R., Baxmann A.C. et Heilberg I.P., (2009).** Effects of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium breve* on urinary oxalate excretion in nephrolithiasis patients. *Urol. Res.*, 37: 95-100.
- ✓ **Flanagan J. et Singh H., (2006).** Microemulsion: a potential delivery system for bioactives in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(3): 221–237.
- ✓ **Fodha I., Chouikha A., Dewar J., Trabelsi A., Boujaafar N. et Steele A.D., (2007).** Prevalence of adenovirus antigens in children presenting with acute *diarrhoea*. *Med. Trop*, 67: 256-258.
- ✓ **FohomTayou B., (2010).** Prise en charge de la diarrhée aiguë chez les enfants de moins de 5ans dans le service de pédiatrie du centre de santé de référence de la commune du district de Bamaco. Thèse de doctorat : 67-98.
- ✓ **Fontaine O., (2008).** Nouvelles recommandations de l'OMS pour la prise en charge clinique de la diarrhée. *Fortbildung Paediatrica*, 19(5) : 25 – 27.
- ✓ **Fooks L. J. et Gibson G. R., (2002).** Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88: 39-49.
- ✓ **Foster J.W., Hall H.K., (1991).** Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 173: 5129-5135.
- ✓ **François Z.N., Florance F.A., Paul M. F., Féliciten M. et El Soda M., (1986).** Biochemical properties of some thermophilic lactic acid bacteria strains from traditional fermented milk relevant to their technological performance as starters cultures. *Biotechnology*, 6(1):14-21.
- ✓ **Fredereghi M., (2005).** Les bactéries lactiques. In : « Bactériologie alimentaire compendium d'hygiène des aliments ». Ed.Lavoisier. Paris- France :101-130.
- ✓ **Frey L. et Hubert J.C., (1993).** Lactobacilles, oxygène, métabolisme et antagoniste. *Lait : Métabolisme- Régulation*, 73: 133- 144.
- ✓ **Fried L. et Zurich C., (2008).** Colon irritable. *Fortbild uag/ formation continue*, 156: 275- 286.
- ✓ **Gaillot O., (2008).** Identification des Entérobactéries. *J. Appl. Microbiol.*, 99: 223-229.
- ✓ **Gamba P., (2001).** Enquête sur la prise en charge du nouveau-né par le médecin généraliste. Thèse de Doctorat en Médecine. Université de Paris :7 - 69.

- ✓ **Gibson G.R., Rouzaud G., Brostaff J. et Rayment R., (2005).** Final technical report for FSA project Ref G01022. An evaluation of probiotic effects in the human gut: *microbial aspects* : 8-12.
- ✓ **Gill A.O. et Halley R.A., (2003).** Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *Int. J. Food Microbiol.*, 80: 251-259.
- ✓ **Gilman J. et Cashman K.D., (2006).** The effect of probiotic bacteria on transepithelial calcium transport and calcium uptake in human intestinal-like Caco-2 cells. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 7: 1-5.
- ✓ **Giordano M.O., Ferreyra L.J., ISA M.B., Martinez L.C., Yudowsky S.I. et Andnates S.V., (2001).** The epidemiology of acute viral gastroenteritis in hospitalized children in Cordoba city, Argentina: an insight of disease burden. *Rev. Inst. Med.Trop.*, 43(4): 193-197.
- ✓ **Giraffa G., Chanishvili N. et Widyastuti Y., (2010).** Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, 161(6) : 480- 487.
- ✓ **Gomes A. M. P. et Malcata F. X., (1999).** *Bifidobacterium spp.* And *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 139-157.
- ✓ **Gopal P.K., Prasad J., Smart J. et Gill H.S., (2001).** *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.*, 67(3): 207-216.
- ✓ **Gottrand F., (2006).** Dysmicrobisme de l'enfant. Diarrhée post-antibiotique. *La revue du praticien* : 13 – 18.
- ✓ **Grases F., Costa-Bauza A. et Prieto R.M., (2006).** Renal lithiasis and nutrition. *Nutr. J.*, 5: 23.
- ✓ **Grimont P.A.D., (1997).** Systématique et identification .In: *Traité de Microbiologie Clinique*. Ed: Eyquem A., Alouf J., Montagnier L., Piccin Padova C., 37: 339- 356.
- ✓ **Grossman H., Duggan E., McCamman S., Welchert E. et Hellerstein S., (1980).** The dietary chloride deficiency syndrome. *Pediatrics*, 66: 366-374.
- ✓ **Guanalini et Fasano A., (1993).** Acute infection diarrhea management of digestive and liver disorders in infants and children. Amstram, Elsevier Science Publishers.

- ✓ **Guarner F., Khan A.G., Garisch J., Eliakim R., Gangl A., Thomson A., Krabshuis J. et Mair T., (2008).** Probiotiques et prébiotiques. WHO Practice Guidelines. P23.
- ✓ **Guessas B., (2007).** Les particularités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat. Université d'Oran Es-Senia. P165.
- ✓ **Guiraud J.P. et Rosec J. P., (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. Edition Sain Denis. France : 295- 298.
- ✓ **Guiraud J.P., (1998).** Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agro-alimentaire, Eds. Dunod. Paris. P652.
- ✓ **Gulian C., Bollet C. et De Micco P., (1994).** Contrôle bactériologique de l'eau à l'hôpital. In: Manuel de bactériologie clinique. Paris, Elsevier: 621-41.
- ✓ **Gupta U., Rudramma Rati E.R. et Joseph R., (1998).** Nutritional quality of lactic fermented bitter gourd and fenugreek leaves. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 49: 101-108.
- ✓ **Hagen K.E., Guan L.L., Tannock G.W., Korver D.R. et Allison G.E., (2005).** Detection, characterization, and *in vitro* and *in vivo* expression of genes encoding S-proteins in *Lactobacillus gallinarum* strains isolated from chicken crops. *Appl Environ. Microbiol.*, 71: 6633–6643.
- ✓ **Hall A., Hewitt G., Tuffrey V. et De Silva N., (2008).** A review and meta-analysis of the impact of intestinal worms on child growth and nutrition. *Maten.child. Nutr.*, 1: 118-236.
- ✓ **Hamma S., Cendrine N. et Dadoun D., (2008).** The effect of fermented milk with *Bifidobacterium infantis* on intestinal disorders in the case of antibiotherapy with amoxicillin and contamination with enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Afr. Journ. Of Biotech.*, 7(22).
- ✓ **Hammes W.P. et Hertel C., (2006).** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Chap. 1.2.10. In prokaryotes, 4: 320-403.
- ✓ **Hanauer S.B., (2002).** New steroids for IBD: progress report. *Gut*, 51: 182- 183.
- ✓ **Haraga A, Maikke B.,Ohlson et Samuel I., (2008).** Miller Nature. Reviews, Micro., 6 : 53-66.

- ✓ **Hassaine O., (2013).** Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud Algérien. Thèse de Doctorat. Université d'Oran Es-sénia, 104p.
- ✓ **Heleni S., Lefki P., Nikolaos T. et Evanthia L.T., (2006).** Population, types and biochemical activities of aerobic bacteria and lactic acid bacteria from the air of cheese factories. *Int. J. Dairy Technol.*, 59(3) :200-208.
- ✓ **Hermendez-Manjarrez H.A., Parra-Gavillanes S., Berrocal-Chavez E., Ocana-Navarro A. et Cravioto A., (2000).** Antigen detection in enteropathogenic *Escherichia coli* using secretory immunoglobulin A antibodies isolated from human breast milk. *Infect. Immun.*, 68(9): 5030- 5034.
- ✓ **Hervé P. et Drider D., (2000).** Bactéries lactiques, physiologie, métabolisme génomique et application industrielle. Ed. Economica. P18.
- ✓ **Hickson M., D'Souza A. L., Muthu N., Rogers T. R., Want S., Rajkumar C. et Bulpitt C. J., (2007).** Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind *placebo* controlled trial. *British Medical J.*, 335: 80- 83.
- ✓ **Hopkins M. J., Sharp R. et Macfarlane G. T., (2002).** Variation in human intestinal microbiota with age. *Digestive and Liver Diseases*, 34: 12-18.
- ✓ **Hotchkiss J.H., Chen J.H. et Lawless H.T., (1999).** Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized milk. *J. Dairy Sci.*, 82: 690-695.
- ✓ **Hsieh M. H. et Versalovic J., (2008).** The Human Microbiome and Probiotics: Implications for Pediatrics. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health. Care.*, 38: 309-327.
- ✓ **Hurre A., Klliomaki M., Rautava S., Rinne M., Salminen S. et Isolari B.E., (2008).** Mode of Delivery effect on gut microbiota and humoral immunity. Original paper Neonatology. *Formerly biology of the neonate*, 63: 236- 240.
- ✓ **Hütt P., Shchepetova J., Loivukene K., Kullisaar T. et Mikelsaa R., (2006).** Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero and uropathogens. *J. Appl. Microbiol.*, 100: 1324-1332.
- ✓ **Hwanhlem N., Buradaleng S., Wattanachant S., Benjakul S., Tani A. et Maneerat S., (2011).** Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai

- traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control*, 22: 401-407.
- ✓ **Isolauri E., Juntunen M., Rautanen T., Sillanaukee P. et Koivula T., (1991).** A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics*, 88: 90-97.
  - ✓ **Izard C., Hembree E.A., Dougherty L. M. et Spizziri C. L., (1983).** Changes in facial expressions of 2 to 19 month old infants following acute pain. *Developmental Psychology*, 19: 418–426.
  - ✓ **Jaquemin P. et Jacquemin J.L., (1987).** Abrégés parasitologie clinique. 3<sup>ème</sup> édition. Masson. Paris : 272- 273.
  - ✓ **Joffin J.N., (2002).** Microbiologie générale: Les Entérobactéries. Spectra-Biologie, 17: 527-535.
  - ✓ **Johnson J., Gawejski A., Lesse A. et Russo T., (2003).** Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* as a Cause of Invasive Nonurinary Infections. *J. of Clin. Micro.*, 43 : 5798-5802.
  - ✓ **Joly B. et Reynaud A., (2003).** Entérobactéries: systématique et méthodes de diagnostic. Ed: Lavoisier, Paris, 356: 29-38.
  - ✓ **Jozala A.F., de LencastreNovaes L.C., Cholewa O., Moraes D . et Penna T. C. V. (2005).** Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. *Afr. J. Biotechnol.*, 4(3): 262-265.
  - ✓ **Kandler O., (1983).** Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49 :209-224.
  - ✓ **Kandler O. et Weiss N., (1989).** Regular non spore for mingram positive rods. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 : 1208 – 1234.
  - ✓ **Kelly D., Conway S. et Aminov R., (2005).** Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends Immunol.*, 26: 326–333.
  - ✓ **Kidgell C. Reichard U. Wain J., Topdahl M., Dougan G. et Achtman M. (2002).** *Salmonella Typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50.000 years old . *Infect. Genet. Evol.*, 2: 39-45.
  - ✓ **Klein G., Pack A., Bonaparte C. et Reuter G., (1998).** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 41: 103-125.

- ✓ **Konaté B., (2006).** Surveillance épidémiologique des diarrhées à *rotavirus* chez les enfants de 0 à 59 mois dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel TOURE. Thèse de Médecine, Bamako, Mali.
- ✓ **Korsak N., Clinquart A. et Daube G., (2004).** *Salmonella spp* dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique. *Ann .Méd. Vét.*, 148: 174-193.
- ✓ **Korwin J.D., (2004).** Infection à *Helicobacter pylori* et résistance aux antibiotiques. *La revue de médecine interne*, 25 : 54–64 .
- ✓ **Kunze W.A., Mao Y.K., Wang B., Huizinga J.D., Ma X, Forsythe P. et Bienenstock J., (2009).** *Lactobacillus reuteri* enhances excitability of colonic AH neurons by inhibiting calcium dependent potassium channel opening. *J. Cell. Mol. Med.*, 13(8): 2261-70.
- ✓ **Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M. et Ouhssine M., (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 144: 237-250.
- ✓ **Lahcen A.E.K., (2013).** Gastro-entérite aigue chez l'enfant. Mémoire de doctorat en Médecine. Université de Tlemcen. P94.
- ✓ **Larpent J.P., (1997).** Microbiologie alimentaire. Tec & doc, Lavoisier. Paris. 10-72.
- ✓ **Larpent J.-P., Larpent G. et Monique G., (1997).** Mémento technique de microbiologie. 3<sup>ème</sup> édition TEC et DOC. Paris : 484 - 521.
- ✓ **Larpent, J.P. et Larpent-Gourgaud M., (1997).** Mémento technique de microbiologie. 3<sup>ème</sup> Edition. Ed. TEC et DOC. Paris : 484- 521.
- ✓ **Laurent S., (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire. Poly technica. Paris. P307.
- ✓ **Lavermicocca P., Valerio F., Lonigro S.L., Di Leo A. et Visconti A., (2008).** Antagonistic activity of potential probiotic lactobacilli against the ureolytic pathogen *Yersinia enterocolitica*. *Curr. Microbiol.*, 56: 175 -181.
- ✓ **Law J. et Kolstad A., (1988).** Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. *Appl. Sci.*, 1: 365-365.
- ✓ **Le Minor L. & Richard C., (1993).** *Shigella*. In méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries. Institut Pasteur, Paris : 72-78.
- ✓ **Le Minor L. et Richard C., (1993).** Méthode de laboratoire pour l'identification des Entérobactéries. Institut. Pasteur. Paris, 310-324.

- ✓ **Le Minor L. et Viron M., (1989).** Bactériologie médicale. 2<sup>ème</sup> Edition. Ed. Flammarion médecine et science. Paris : P1107.
- ✓ **LeBlanc J.G., Garro M.S. et Savoy de Giori G., (2004).** Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal, galactozidase activity and fermentation products. *App. Microb. and Cell Phys.*, 65: 119 – 123.
- ✓ **Leclerc H., Gaillard J.L. et Simonet M., (1995).** Microbiologie générale : la bacterie et le monde bactérien. Ed. Doin, Paris, P535.
- ✓ **Lemberg D. A., Ooi C.Y. et Day A. S., (2007).** Probiotics in pediatric gastrointestinal diseases. *J. Paediatr. Child. Health.*, 43: 331–336.
- ✓ **Lenoir J., Hermier J. et Weber F., (1992).** Les groupes microbiens d'intérêts laitiers. Ed.Cidil : 30- 50.
- ✓ **Leroy F. et De Vuyst L., (2004).** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Food. Sci. Technol.* 15: 67-78.
- ✓ **Leveau J.Y., Boiux M. et De Roissart H.B., (1991).** La flore lactique: technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires. 2<sup>ème</sup>Ed., Tec et Doc, Lavoisier. Paris : 2-40.
- ✓ **Lim E.M., Ehrlich S.D. et Maguin E., (2000).** Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *Electrophoresis*, 21: 2557-2561.
- ✓ **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.
- ✓ **Lonnerdal B. et Lien E.L., (2003).** Nutritional et physiologie significance of alpha-lactalbumin in infants. *Nutr. Rev.*, 61: 295- 305.
- ✓ **Lorca G.L., Font de Valdez G. et Ljungh A., (2002).** Characterization of the protein-synthesis dependent adaptive acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 4: 525-532.
- ✓ **Lu L. et Walker W.A., (2001).** Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Americ. Journ. Clin. Nutr.*, 73: 1124- 1130.
- ✓ **Luquet F.M. et Correiu G., (2005).** Bactériocines de Bactéries lactiques. In: Bactéries lactique et probiotiques. Tec et Doc .Ed., Paris. France : 113-194.
- ✓ **Mac Faddin J. F., (2000).** Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3<sup>ème</sup> Ed. Lippincott Williams et Wilkins. Philadelphia.

- ✓ **Macdonald T.T. et Monteleone G., (2005).** Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*, 307: 1920-1925.
- ✓ **Magne F., Abely M., Boyer F., Morville P., Pochart P. et Suau A., (2006).** Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 57: 128-138.
- ✓ **Magnusson J., Strom K., Roos S., Sjogren J. et Schnurer J., (2003).** Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 219 : 129– 135.
- ✓ **Majamaa H., Isolauri E., Saxelin M., Vesikari T., (1995).** Lactic acid bacteria in the treatment of acute *rotavirus* gastroenteritis. *J. Pediatr. Gastroent. Nutr.*, 20: 333-338.
- ✓ **Marchal N. et Bourdon J. L., (1982).** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin, Paris.P505.
- ✓ **Marchal N., Bourdon J.L. et Richard C., (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3ème Ed. Doin éditeurs. Paris. P520.
- ✓ **Marteau P., (2005).** Une association bactéries probiotiques-vitamines pour la protection contre le rhume et les épisodes pseudo-grippaux. *Clin. Nutr.*, 24 : 479-491.
- ✓ **Marteau P., Gerhardt M.F., Myara A., Bouvier E., Trivin F. et Rambaud J.C., (1995).** Metabolism of bile salts by alimentary bacteria during transit in the human small intestine. *Micro. Ecol. Health Dis.*, 151-157.
- ✓ **Martinot A. et Aurel M., (2006).** Mise au point Formation Médicale Continue : les gastro-entérites aiguës du jeune enfant. *Le Quotidien du Médecin*. 7912 :1-7.
- ✓ **Maryse A. et Danielle C., (2008).** Diagnostic bactériologique direct d'une infection : les prélèvements, principales bactéries en cause, interprétation.Fiche technique. Laboratoire de Bactériologie, Hygiène. Faculté de Médecine Toulouse Rangueil, 1- 8.
- ✓ **Mayra-Makinen A. et Bigret M., (2004).** Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria, in Lactic acid bacteria. Microbiological and Functional Aspect. Third Edition. Marcel Dekker : 175- 198.
- ✓ **Medouakh L., Ait Abdeslam A. et Bensoltane A., (2010).** Antagonistic activity of *Lactobacillus sp.* Against *Helicobacter pylori*. *Inter. J. Of Micro. Res.*, 1(3): 80- 86.

- ✓ **Menad N., (2010).** Pouvoir antagoniste des probiotiques vis-à-vis *Salmonella typhimurium* chez les souris NMRI SWISS. Thèse de Magister. Université d'Oran Es-Sénia. P86.
- ✓ **Merad H. et Merad R., (2001).** Toxicité des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 91: 17- 21.
- ✓ **Michael F. et Zurich, (2008).** Colon irritable. *Pediatrica*.19(5) : 20 – 24.
- ✓ **Michail S., Sylvester F., Fuchs G. et Issenman R., (2006).** Clinical efficacy of probiotics: review of the evidence with focus on children. NASPGHAN Nutrition Report Committee. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*,43: 550-557.
- ✓ **Mitsuok T. et Rotio M., (1992).** The human gastro-intestinal tract. In BJB wood Ed. the lactic acid bacteria. Elsevier applied Science. Londn et New York: 69- 114.
- ✓ **Mitsuoka T., (1989).** Microbes in the intestine. Ed. Yakult Honsha Co., Tokyo, Japan
- ✓ **Moares C. C., Burkert J. F. M. et Kalil S. J., (2010).** Phycocyanin Extraction Process for Large-Scale Use. *J. of Food Biochemistry*, 34(1): 133.
- ✓ **Molin G., (2001).** Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 380-385.
- ✓ **Moll G. N., Konings W. N. et Driessen J. M., (1999).** Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76: 182.
- ✓ **Montville T.J., Winkowski K. et Ludescher R.D., (1995).** Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *International Dairy Journal.*, 5: 797-814.
- ✓ **Moser S.A. et Savage D.C., (2001).** Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:3476-3480.
- ✓ **Moubareck C., Gavini F., Vaugien L. et Butel MJ., (2005).** Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria, *J. Antimicrob. Chemother.*, 55: 38 – 44.
- ✓ **Moulinier C., (2003).** Parasitologie et mycologie médicales éléments de morphologie et biologie. Edition Lavoisier. Paris : 769.
- ✓ **Mouterde O., (2007).** Solutions de réhydratation orale et diarrhée aiguë : état des lieux. *Archives de pédiatrie*, 14:165 -168.
- ✓ **Mullaney E.J., Daly C.B. et Ullah A.H., (2000).** Advances in phytase research. *Adv. Appl. Microbiol.*, 47: 157-199.

- ✓ **Naganda Y.L., (1986).** Etiologie virale et bactérienne et gastro-enterite aigue infantile A kinshasa ; *Annales de la société belge de médecine tropicale*, 66: 331-7.
- ✓ **Nagpal R., Kumar A., Kumar M., Behare P.V., Jain S. et Yadav H., (2012).** Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review. *FEMS Micro. Letters*, 334(1): 1–15.
- ✓ **Naidu A.S., Bidlack W.R. et Clemens R.A., (1999).** Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 39: 13- 126.
- ✓ **Nanatani K. et Abe K., (2011).** Energy generation coupled with decarboxylation reaction in lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research*. Sonomoto and Yokota/ Caister Academic Press. Ed., Norfolk. United kingdom: 67- 88.
- ✓ **Narva M., Collin M., Lamberg-Allardt C., Karkkainen M., Poussa T., Vapaatalo H. et Korpela R., (2004).** Effects of long-term intervention with *Lactobacillus helveticus*-fermented milk on bone mineral density and bone mineral content in growing rats. *Ann. Nutr. Metab.*, 48: 228-234.
- ✓ **Navaro J., (2002).** Les allergies alimentaires en pédiatrie. *Objectif Nutritionnel*, 62: 1– 4.
- ✓ **Neish A.S., (2002)** .The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microbes Infect.*, 4: 309- 317.
- ✓ **Noir F., Einarsson K., Lidbeck A., Orrhace K. et Nord C.E., (1991).** Effet d'acide lactique produisant bactéries sur la microflore intestinale humaine pendant traitement ampicillin, *J. Infecter. Dis.*, 23: 247-254.
- ✓ **Novel G., (1993).** Les bactéries lactiques. In : *Microbiologie industrielle: les microorganismes d'intérêt industriel*. Leveau J-Y., Bouix M. Ed. Tec & Doc. Lavoisier: 170-374.
- ✓ **Ogawa M., Shimizu K., Nomoto K., Takahashi M., Watanuki M., Tanaka R., Tanaka T., Hamabata T., Yamasaki S. et Takeda Y., (2001).** Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. *Infect. Immun.* 69: 1101-1108.
- ✓ **OMS (Organisation Mondiale de la Santé), (2008).** Réseaux mondiaux de surveillance de la gastroentérite à *rotavirus*, 2001-2008 In : *Le relevé épidémiologique hebdomadaire*, 47: 421–428.

- ✓ **OMS (Organisation Mondiale de la Santé), (2013).** Les maladies diarrhéiques. Aide mémoire n°330. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/fr/>.
- ✓ **OMS, (2015).** **Statistiques sanitaires mondiales**, publiée sur le site : [www.who.int/fr](http://www.who.int/fr).
- ✓ **OMS/ UNICEF, (1990).** Déclaration d'innocenti sur l'allaitement maternel dans les années 90, une initiative mondiale. Cahier d'étude et de recherche, P8.
- ✓ **Orla-Jensen S., (1919).** The lactic acid bacteria. Copenhagen I, Kommission.
- ✓ **Osawa R., Kuroiso K., Goto S. et Shimizu A., (2000).** Isolation of tannin-degrading lactobacilli from humans and fermented foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3093-3097.
- ✓ **Ouwehand A.C., Salminen S., et Isolauri E., (2002).** Probiotics and overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82: 279 – 289.
- ✓ **Ouwehand A.C. et Vesterlund S., (2003).** Health aspects of probiotics. *Drugs*, 6: 573- 580.
- ✓ **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.
- ✓ **Ozgun D., et Vural H.C., (2011).** Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system. *J.M.G.G.*, 3(3): 46-49.
- ✓ **Paderson C.A., (2008).** Probiotiques: bienfaits au-delà des fonctions nutritionnelles de base. *AAFC*, 1-4.
- ✓ **Pant A. R., Graham S. M., Allen S. J., Harikul S., Sabchareon A., Cuevas L. et Hart C. A., (1996).** *Lactobacillus GG* and acute diarrhoea in young children in the tropics. *J. Trop. Pediatr.*, 42: 162- 165.
- ✓ **Parada J.L., Caron C.R., Bianchi P.A., Medeiros et Ricardo C., (2007).** Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Braz. Arch. of Bio. and Tech.*, 50: 521– 542.
- ✓ **Parasad J., Gill H., Smart J., Gopal P.K., (1998).** Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy J.*, 8: 993-1002.
- ✓ **Perry J.J., Staley J.T. et Lory S., (2004).** Bactéries Gram-Positives: Firmicutes et Actinobacteria. In: « Microbiologie ». Ed. Dunod, Paris. France : 471-50.

- ✓ **Piard J.C. et Desmazeaud M., (1991).** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: Oxygen metabolites and catabolism en-products. *Lait*, 71: 525- 541.
- ✓ **Pilet C., Bourdon J.L., Toma B., Marchal N. et Balbastre C., (1981).** Bactériologie médicale et vétérinaire. Systématique bactérienne Doins, Paris:109- 187.
- ✓ **Plantaz D., (2005).** Diarrhée aigue du nourrisson. Corpus Médicale. Faculté de Medecine de Grenoble, France : 1 – 5.
- ✓ **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. *Inter. Micro.*, 7: 59- 62.
- ✓ **Pochart P., (2004).** Biodiversity of the stool flora in childre. *Gastro., Hypato. and Nutr.*, 3- 7.
- ✓ **Podschem R., Pietsch S., Holler C. et Ullmann U., (2001).** Incidence of Klebsiella species in surface waters and their expression of virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 : 3325- 3327.
- ✓ **Poolman B., Molenaar D., Smid E.J., Ubbink T., Abee T., Renault P.P. et Konings W.N., (1991).** Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *J. Bacteriol.*, 173: 6030- 6037.
- ✓ **Popoff M.Y., Bockemuhl J. et Gheesling L.L., (2004).** To the Kauffmann –White scheme. *Res. Microbiol.*, 155: 568-570.
- ✓ **Prager R., Fruth A., Siewert U., Strutz U. et Tschape H., (2009).** *Escherichia coli* encoding Shiga toxin 2f as an emergine human pathogen. *Int. J. Med. Microbiol.*, 118: 456- 463.
- ✓ **Preidis G. A., Hill C., Guerrant R. L., Ramakrishna B. S., Tannock G. W. et Versalovic J., (2011).** Probiotics, enteric and diarrheal diseases, and global health. *Gastroenterology*, 140: 8-14.
- ✓ **Prescott L. M., Harley J. P. et Klein D. A., (2010).** Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition. P1088.
- ✓ **Presser K.A., Ratkowsky D.A. et Ross T., (1997).** Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 2355- 2360.

- ✓ **Programme de lutte contre les maladies diarrhéiques et les infections respiratoires aiguës des enfants de 0 à 04 ans révolus, (2005).** Publication de l'Institut National de la Santé Publique (INSP). Alger.
- ✓ **Putman M., van Veen H.W. et Konings W.N., (2000).** Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 672- 693.
- ✓ **Queipo Maria I., Juan De Dios C., Manuel M., Maria J. B. et Pilar M., (2007).** Preparation of Bacterial DNA Template by Boiling and Effect of Immunoglobulin G as an Inhibitor in Real-Time PCR for Serum Samples from Patients with Brucellosis. *Clin. Vaccine Immu.*, 15(2) : 293 -296.
- ✓ **Quero Maria I., Juan De Dios C., Manuel M., Maria J. B. et Pilar M., (2007).** Preparation of Bacterial DNA Template by Boiling and Effect of Immunoglobulin G as an Inhibitor in Real-Time PCR for Serum Samples from Patients with Brucellosis. *Clin. Vaccine Immunology.*, 15(2) : 293-296.
- ✓ **Quigley E.M., (2008).** The efficacy of probiotics in IBS. *J. Clin. Gastroenterol.*, 42(2): 85- 90.
- ✓ **Raccach M. C., Grath R. et Daftarian H., (1989).** Antibiosis of some lactic acid bacteria including *Lactobacillus acidophilus* to ward *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 9(1): 25- 32.
- ✓ **Raibaud P. et Ducluzeau R., (1989).** Etude de colonisation bactérienne du tractus gastro-intestinal à l'aide des modelés expérimentaux. *Rev. Sci. Tech. Of Int. Epiz.*, 8(2): 361- 373.
- ✓ **Ramnielsberg M., Müller E. et Radier F., (1990).** Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Arch. Microbio.*, 154 : 249-252.
- ✓ **Randremanana R., (2012).** Impacts de l'environnement sur les diarrhées infantiles à Madagascar: Analyse du risque *Campylobacter*. Thèse de doctorat. 54-67.
- ✓ **Regnault J.P., (2002).** Infection gastro-intestinales et intra -abdominales in Elément de microbiologie et d'immunologie. Decarie éditeur. Montréal-Québec.
- ✓ **Reid G., Sanders M.E., Gaskins H.R., Gibson G.R., Mercenier A., Rastall R., Roberfroid M., Rowland I., Cherbut C. et Klaenhammer T.R., (2003).** New scientific paradigms for Probiotics and prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.*, 37: 105– 118.

- ✓ **Reuter G., Klein G., et Goldberg M., (2001).** Identification of probiotic cultures in food samples. *Food Res. Intern.*, 35(21): 117-124.
- ✓ **Richard C. et Proskauer V., (1978).** Méthode rapide pour l'étude de rouge de méthyle. *Ann. Inst. Past.*, 122: 979-986.
- ✓ **Rigaud D., (2003).** An intestine: the prodigal of adaptation and cooperation. The bocage, Dijon. *Objective Nutrition*, 67: 1- 6.
- ✓ **Rink R., Kuipers A., Boef E., Leenhouts K., Driessen A. et Moll G.N., (2005).** L'antibiotic Structures as Guidelines for the Design of Peptides That Can Be Modified by L'antibiotic Enzymes. *Biochemistry*, 44(24): 8873-8882.
- ✓ **Rishi P., Preet S. et Kaur P., (2011).** Effect of *L. plantarum* cell-free extract and cotrimoxazole against *Salmonella Typhimurium*: a possible adjunct therapy. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 10:9.
- ✓ **Roberrfroid M., (2002).** Aliments fonctionnels. Ed: Tec et Doc. Paris, P88.
- ✓ **Roberta Freschi C., Luiz Fernando O., Silva C. et Celso José Bruno O., (2005).** Comparison of DNA-extraction methods and Selective Enrichment broths on the detection of *Salmonella Typhimurium* in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). *Braz. J. Microbiol.*, 36(4) : 1678-4405.
- ✓ **Robin J.M. et Rouchy A., (2001).** Les probiotiques. *Nutranews*. 1- 10.
- ✓ **Robin S. et Roche S., (2002).** Virologie : les coprocultures. DES de bactériologie. P4.
- ✓ **Rosenfeldt V., Benfeldt E., Nielsen S.D., Michaelsen K.F., Jeppesen D.L., Valerius N.H. et Paerregaard A., (2003).** Effect of probiotic Lactobacillus strains in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111: 389- 395.
- ✓ **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. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 21: 411-416.
- ✓ **Rousseau P.N., (2002).** Les probiotiques : premiers vaccins alimentaires. *Health Food*. 51 : 1- 3.
- ✓ **Rowland L.J., Mehra S., Dhanaraj A.L., Ogden E.L., Slovin J.P. et Ehlenfeldt M.K., (2003b).** Development of EST-PCR markers for DNA fingerprinting and genetic relationship studies in blueberry (*Vaccinium*, section , Cyanococcus). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 128: 682- 690.

- ✓ **Roza S., Graham S.M., Allem S.J., Sultana S., Cuevas L. et Hart C.A., (1998).** *Lactobacillus GG* promotes recovery from acute nonbloody diarrhea in Pakistan. *Pediatr. Infe. Dis. J.*, 14: 107- 111.
- ✓ **Ruemmele F.-M. and Goulet O., (2007).** Probiotiques et pathologies digestives de l'enfant. *Cah. Nutr.Diet.*, 42 : 45–50.
- ✓ **Saadi F., (2006).** Effet de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* extrêmophiles sur le taux de cholestérol. Mémoire de Magister. Université de Chlef. Algérie, 65- 88.
- ✓ **Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J. et Mattila-Sandholm T., (2000).** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.*, 84: 197– 215.
- ✓ **Salminen S., Ouwehand A. et Von Wright A., (2004).** Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects, 3<sup>rd</sup> ed. Marcel Dekker. New York: 375-395.
- ✓ **Sami M., Yamashita H., Hirono T., Kadokura H., Kitamoto K., Yoda K. et Yamasaki M., (1997).** Hop-resistant *Lactobacillus brevis* contains a novel plasmid harboring a multidrug resistance-like gene. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84: 1-6.
- ✓ **Sanger F., Nicklen S. et Coulson A.R., (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 74 : 5463- 5467.
- ✓ **Santiago-Gómez M.P., Thanh H.T., De Coninck J., Cachon R., Kermasha S., Belin J.M., Gervais P. et Husson F., (2009).** Modeling hexanal production in oxidoreducing conditions by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem.*, 44: 1013-1018.
- ✓ **Schillinger U. et Luke F., (1989).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 1901- 1906.
- ✓ **Schumann A., Nutten S., Donnicola D., Comelli E.M., Mansourian R., Cherbut C., Cortesey-Theulaz I. et Garcia-Rodenas C., (2005).** Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome. *Physiol. Genomics.*, 23(2): 235- 45.
- ✓ **Segondy M., (2007).** Novel respiratory viruses and their diagnosis. *Mt. pédiatrie*, 15(2): 123-132.

- ✓ **Sembene B., (2002).** Etude de la fermentation traditionnelle de cymbium pepo (mollusque Gastéropode): Caractérisation de la Microflore et qualités organoleptiques du yeet. Thèse de Doctorat. Université de Dacar. P69.
- ✓ **Servin A.L. et Coconnier M.H., (2003).** Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best. Pract. Reser. Clin. Gastro.*, 5: 741- 754.
- ✓ **Servin A.L., (2004)** .Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.*, 28: 405- 440.
- ✓ **Sholeva Z., Stefanova S. et Chipeva V., (1998).** Screening of antimicrobial activities among Bulgarian lactobacilli strains. *J. Culture Collections*, 2: 15-20.
- ✓ **Shornikova A.V., Casas I.A., Mykkanen H., Salo E. et Vesikari T., (1997).** Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 16: 1103- 1107.
- ✓ **Siegumfeldt H., Rechinger K.B. et Jakobsen M., (2000).** Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapide drop in extracellular pH. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 2330- 2335.
- ✓ **Sifour M., Ouled-Haddar H. et Idoui T., (2016).** Microencapsulation de *Lactobacillus plantarum*, probiotique isolé du jabot de poulet : Etude de la stabilité dans les conditions du tube digestif. Proceeding des 10<sup>èmes</sup> journées des sciences vétérinaires.
- ✓ **Silva M., Jacobus N.V., Deneke C. et Gorbach S.L., (1987).** Antimicrobial substance from a human lactobacillus strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31: 1231- 1233.
- ✓ **Singleton P., (1994).** Abrégé de bactériologie. 2<sup>ème</sup> édition. Masson. Paris. P247.
- ✓ **Sizonenko P.C. et Griscelli C., (1996).** Précis de Pédiatrie. Ed : Payot Lausanne. Doin. Paris, P1646.
- ✓ **Smith J. L. et Palumbo O. S. A., (1983).** Use of Starter Cultures in Meats. *J. of Food Protection*, 46 (11): 997- 1006.
- ✓ **Smith T., (1995).** The digestive system In The human body. Collingwood. Ken Fin Books: 150- 173.

- ✓ **Société canadienne de pédiatrie, (2006).** La réhydratation par voie orale et la réalimentation rapide dans le traitement de la gastroentérite infantile. *Pediatric. Child. Health.*, 11(8): 535–539.
- ✓ **Songre-Ouattara L.T., Mouquet-Rivier C., Icard-Verniere C., Humblot C., Diawara B. et Guyot J.P., (2008).** Enzyme activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel (ben-saalga) of functional interest in nutrition. *Int. J. Food Microbiol.*, 128: 395- 400.
- ✓ **Spandorfer PR., Alessandrini EA., Joffe M.D., Localio R. et Shaw K.N., (2005).** Oral versus intravenous rehydration of moderately dehydrated children: a randomized, controlled trial. *Pediatrics*, 115(2): 295 – 301.
- ✓ **Stanton C., Gardiner G., Meehan H., Collins K., Fitzgerald G., Lynch P. B. et Ross R. P., (2001).** Market potential for probiotics. *Am. J. of Clin. Nutr.*, 73: 476 - 483.
- ✓ **Stiles M.E. et Holzapel W.H., (1997).** Review article Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36 :1-29.
- ✓ **Streurer M. et Spalinger H.J., (2008).** La gastroentérite aigüe chez l'enfant – Une urgence fréquente au cabinet médical. *Forum Med. Suisse.*, 8(23) : 432 – 435.
- ✓ **Sullivan P.B., (1998).** Nutrition management of acute diarrhoea. *Nutrition*, 14: 758 – 762.
- ✓ **Sutra L., Federighi M. et Jouve J.L., (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire. Ed : Polytechnica, Paris, 308(6) : 31-249.
- ✓ **Syndifrais, (2005).** Yaourt et laits fermentés. *Santé. Nutrition. Flore*, 24: 6.
- ✓ **Szajewska H., Skórka A., Ruszczyński M. et Gieruszczak-Bialek D., (2007).** Meta-analysis: *Lactobacillus GG* for treating acute diarrhoea in children. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 25: 871–881.
- ✓ **Tabasco R., Paarup T., Janer C., Pelaez C. et Requena T., (2007).** Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei subsp. paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *Inter. Dairy J.*, 23: 250- 255.
- ✓ **Talarico T.L. et Dobrogosz W.J., (1989).** Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33: 674-679.

- ✓ **Tannock G.W., (1999).** Analysis of the intestinal microflora. *A renaissance*, 76: 265-278.
- ✓ **Tejero-Sarinena S., Barlow S.J., Costabile A., Gibson G.R. et Rowland I., (2012).** *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, 18(5): 530- 538.
- ✓ **Teuber M. et Geis A., (2006).** The genus *Lactococcus*. Chapter 1.2.7. Prokaryotes, 4: 205- 228.
- ✓ **Tham C.S.C., Peh K.K., Bhat R. et Liong M.T., (2011).** Probiotic properties of bifidobacteria and lactobacilli isolated from local dairy products. *Ann. Microbiol.*, 62(3): 1079- 1087.
- ✓ **Thomas C. et Stevenson M.R., (2003).** Antibiotics and hospital-recquired *Clostridium difficile* associated diarrhoea : a systematic review. *Journal. Antimicrob. Chimother.*, 51: 1339- 1350.
- ✓ **Todorov S.D., Van Reenen C.A et Dicks L.M., (2004).** Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarium* ST13BR, a strain isolated from barely beer. *J. Gen. Appl. Microbio.*, 150: 149-157.
- ✓ **Tong J. L., Ran Z.H., Shen J., Zhang C. X., Xiao S.D., (2007).** Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 25: 155–168.
- ✓ **Tortora G.J., Funke B. R. et Case C. L., (2003).** Introduction à la microbiologie. Ed. Renouveau pédagogique NC Saint – Laurent. Québec.25: 763- 765.
- ✓ **Tsague L.-D., Nguendo Yongsi H.-B. et Teijokem M.-C., (2007).** Alternatives thérapeutiques après échec d'un traitement de première intention dans les parasitoses digestives de l'adulte immunocompétent. *Gastnterol. Clin. Biol.*, 54(2) : 79-90.
- ✓ **Tuohy K.M., Probert H.M., Smejkal C. W. et Gibson G. R., (2003).** Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*, 8(15): 692-700.
- ✓ **Turpin A.N., (2011).** Etude des coordinations musculaires par l'extraction des synergies Application au geste d'aviron. Thèse de Doctorat de l'université de Nantes France. 150 p.

- ✓ **Turrone S., Vitali B., Bendazzoli C., Candela M., Gotti R., Federici F., Pirovano F. et Brigidi P., (2007).** Oxalate consumption by lactobacilli: evaluation of oxalyl-CoA decarboxylase and formyl-CoA transferase activity in *Lactobacillus acidophilus*. *J. Appl. Microbiol.*, 103: 1600- 1609.
- ✓ **UNICEF/OMS: United Nations Children’s Fund/ Organisation Mondiale de la Santé, (2009).** Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. *Lancet* 14: 1-2
- ✓ **Urbain D., Belaiche J., De Vos M., Fiasse R. et Hiele M., (2001).** Le traitement de la diarrhée aiguë. *Louvain Med.*, 120: 362 – 372.
- ✓ **Usman H.A., (1999).** Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *J. Dairy Sci.*, 82: 243 – 248.
- ✓ **Vallance B.A. et Finaly B.B., (2000).** Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97(16): 8799-8806.
- ✓ **Van de Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S.D. et Maguin E. (2002).** Stress responses in lactic acid bacteria. *Ant. Van. Lee.*, 82: 187- 216.
- ✓ **Vande P., Engbaeck K., Piot P. et Hench C., (1994).** Bactériologie clinique, Technique de base pour le laboratoire. Ed OMC. Genève. P121.
- ✓ **Vasiljevic T., et Shah N.P., (2008).** Probiotics From Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy. J.*, 18: 714 –728.
- ✓ **Vats P. et Banerjee U.C., (2004).** Production studies and catalytic properties of phytases (myoinositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme Microb. Technol.*, 35: 3- 14.
- ✓ **Vaughan E.E., Mollet B. et Devos W.M., (1999).** Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel. *Cur. Opin. Biotechnol.*, 10: 505- 510.
- ✓ **Villaluengaa C.M. et Rosario M., (2007).** Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic. *Instituto de Fermentaciones Industriales*, 13(6): 116 – 122.
- ✓ **Wagner M.K. et Moberg L.J., (1989).** Present and future use of traditional antimicrobials. *Food Technol.*, 1: 143-147.

- ✓ **Walter J., (2008).** Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74 : 4985– 4996.
- ✓ **WGO: World Gastroenterology Organisation, (2008).** Probiotiques et prébiotiques. Recommandation pratique.
- ✓ **Wheelis M., (2008).** Principles of modern microbiology. Jones and Bartlett Publishers; Inc., Sudbury, MA, P528.
- ✓ **WHO/FAO, (2001).** Human vitamin and mineral requirements, Food and Agriculture Organization. Rome, P:286.
- ✓ **Wolvers D., Antoine J.M., Myllyluoma E., Schrezenmeir J., Szajewska H. et Rijkers G.T., (2010).** Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of infections by probiotics. *J. Nutr.* ,140: 698-712.
- ✓ **Wu X.Y., Mark J., Walkerb M. H. et James C., (2006).** Development of a group specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *J. of Micro. Methods*, 64: 107- 119.
- ✓ **Yildirim Z., Winter D.K. et Johson M.G., (1999).** Purification amino acid sequence and mode of action of Bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J. Food Prot.*, 86: 47- 51.
- ✓ **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, P61.
- ✓ **Zocco M.A., dal Verme L.Z., Cremonini F., Piscaglia A.C., Nista E.C., Candelli M., Novi M., Rigante D., Cazzato I.A., Ojetti V., Armuzzi A., Gasbarrini G. et Gasbarrini A., (2006).** Efficacy of *Lactobacillus GG* in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol. Ther.*, 23: 1567- 1574.

## ANNEXE I : Milieux d'isolement

**Tableau 1:** Composition du milieu MRS agar (Man Rogosa Sharp) (g/L)

Composants	Quantité (g/L)
Peptone de caséine	10.00
Extrait de viande	08.00
Extrait de levure	04.00
D (+) glucose	20.00
Di- potassium hydrogénophosphate	02.00
Tween 80	01.00
Di-ammonium hydrogénéocitrate	02.00
Sodium acétate	05.00
Magnesium sulfate	00.20
Manganèse sulfate	00.40
Agar	14.00

Le pH final prêt à l'emploi est de 5.7 à 25 °C.

**NB :** La composition de bouillon est la même que celle de la gélose mais dépourvue d'agar, le pH final du M17 bouillon devient 6.9 et celui du MRS est 6.4.

**Tableau 2 :** Composition du milieu EMB (g/L)

Composants	Quantité (g/L)
Peptone	10.00
Lactose	10.00
Phosphate bi potassique	02.00
Iosine	0,40
Bleu de méthylène	65 mg
Agar	15

Autoclaver 15mn à 120°C.

**Tableau 3:** Composition du milieu Hektoen (gélose) (g/L)

Composants	Quantité (g/L)
Protéose-peptone	12.00
Extrait de levure	03.00
Chlorure de sodium	05.00
Thiosulfate de sodium	05.00
Sels biliaries	09.00
Citrate de fer ammoniacal	01.50
Salicine	02.00
Lactose	12.00
Saccharose	12.00
Fuschine acide	00.10
Bleu de bromothymol	65 mg
Agar	13mg

## ANNEXE II : Milieux d'identification

**Tableau 4 :** Composition du milieu TSI (Triple Sugar Iron Bio - Rad)

Composants	Quantité (g/L)
Extrait de viande	3
Extrait de levure	3
Peptone	20
Chlorure de sodium	5
Lactose	10
Saccharose	10
Glucose	1
Sulfate ferreux ammoniacal	300mg
Rouge de phénol	24mg
Thiosulfate de sodium anhydre	300mg
Agar	11

pH final 7.4 à 25°C. Répartir en tubes à essai ordinaires (10 mL). Autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes. Laisser reposer en position inclinée de façon à obtenir un culot de 2.5 cm de profondeur.

**Tableau 5:** Composition de milieu du MEVAG

Composants	Quantité (g/L)
Dihydrogénophosphate d'ammonium	1
Chlorure de potassium	0.2
Sulfate de magnésium	0.2
Extrait de levure	1
Glucose	1
Agar	3.2
Solution de pourpre de bromocrésol à 0.2% ou rouge de phénol	7.5 mL

**Tableau 6:** Composition de l'ADH

Composants	Quantité (g/L)
Extrait de levure L-arginine	03.00
Glucose	01.00
Pourpre de bromocrésol	00.16 mg
Ethanol solvant du BCP	01.00 cm <sup>3</sup>
Chlorure de sodium	05.00

Le pH final prêt à l'emploi est de 6.8.

**Tableau 7:** Composition du Mannitol mobilité (g/L)

Composants	Quantité (g/L)
Peptone typique de viande	20.00 g
Mannitol	04.00 g
Rouge de phénol 1%	04.00 mL
Nitrate de sodium	01.00 g
Agar	04.00 g

Le pH final prêt à l'emploi est de 7.6 – 7. Répartir à raison de 10mL par tube. Autoclaver 30 min à 110 °C .Solidifier en culot

**Tableau 8:** Composition du Citrate de Simmons (g/L)

Composants	Quantité g/L
Sulfate de magnésium	0.2
Phosphate mono-ammonique	1
Phosphate bipotassique	1
Citrate de sodium	2
Chlorure de sodium	5
Bleu de bromothymol	0.08
Agar	15

Le pH final prêt à l'emploi est de 6.8.

**Tableau 9:** Composition de l'Urée-indol (g/L)

Composants	Quantité g/L
Urée	2,0
L-tryptophane	0,3
Éthanol à 0.95	1 mL
Rouge de phénol	25 mg
Chlorure de sodium	0.5
Dihydrogénophosphate de potassium	0.1
Hydrogénophosphate de potassium	0.1

Le pH final prêt à l'emploi est de 7. À stériliser par filtration.

**Tableau 10 :** Composition du Mueller-Hinton

Composants	Quantité (g/L)
Extrait de viande	02.00 g
Hydrolisat acide de caséine	17.50 g
Amidon	01.50 g
Agar	10.00 g

### Solution de la méthode à l'Hématéine et à l'Eosine

#### 1- Alcool acide :

- Alcool éthylique à 70% / 1000mL ;
- Acide chlorhydrique concentré : 5 mL.

#### 2- Eau ammoniacale :

- Eau distillée : 1000mL
- Ammoniaque : 2mL.

#### 3- Eosine Y :

- Eosine Y, solution aqueuse à 3% / 100mL ;
- Alcool éthylique à 95% : 125 mL ;
- Eau distillée : 375mL ;
- Acide acétique glacial : 2 gouttes.

### ANNEXE III : Tests d'identification

- **Coloration de Gram**

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre ;
- Prélever un ose d'une colonie et mélanger avec la goutte d'eau physiologique, strier et fixer à la chaleur par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène ;
- Ajouter le Violet de Gentiane pendant 1mn, jeter le colorant ;
- Ajouter le Lugol pendant 1mn ;
- Décolorer avec de l'alcool pendant 30 secondes ;
- Ajouter le deuxième colorant, la Fushine et laisser 1 mn puis laver à l'eau ;
- Sécher la lame et mettre une goutte d'huile à immersion puis passer à l'observation microscopique au grossissement X100.

- **Coloration des coupes histologiques**

- Etuver les lames préparées à 65°C (T° de fusion de la paraffine) afin de déparaffiner les coupes (1-2h) ;
  - Transférer les lames dans deux bains de xylène pendant 3 à 5mn pour mieux déparaffiner les coupes ;
  - Transférer immédiatement après hydratation les coupes dans des bains d'éthanol à concentration décroissante à commencer par deux bains (5mn) d'éthanol absolu, suivis de trois bains d'éthanol à 70, à 75 et à 80% (également d'une durée de 3 à 5 mn chacun) ;
  - Appliquer une hydratation en utilisant l'eau courante pendant 5mn , au terme de ce dernier les coupes subissent une coloration à l'hématéine et à l'éosine selon les étapes suivantes :
    - 1- Déparaffiner et hydrater les coupes à l'eau du robinet ;
    - 2- Rincer à l'eau distillée ;
    - 3- Colorer avec l'hémateine de Harris (15 mn) ;
    - 4- Laver les coupes à l'eau du robinet ;
    - 5-Différencier les coupes dans la solution alcool acide (Annexe II)(1 à 2 plongées) ; déposer ensuite la lame dans un bain d'eau du robinet et vérifier au microscope la différenciation. Les noyaux doivent être rouges et le fond clair ;
    - 6- Laver à l'eau du robinet (2 à 3minutes) ;
    - 7- Bleuir dans l'eau ammoniacale (Annexe II) ;
-

- 8- Laver à l'eau du robinet (15mn) ;
- 9- Colorer dans la solution d'éosine (Annexe II) (15 secondes à 2mn). (L'éosine ne doit produire qu'une coloration cytoplasmique franche et donner une gamme de roses plus ou moins vifs, selon l'intensité de l'acidophilie des divers éléments) ;
- 10- Déshydratation sur lame, éclaircir et monter à l'Eukitt (résine).

**Tableau 11** : Résultats d'examen macroscopiques des isolats bactériens isolés à partir des selles.

Milieu	Indicateur de réaction	Sucre	Virage de l'indicateur	Inhibiteurs	Aspect des boîtes ensemencées
Hektoen	Fuschine acide	Lac Sac Sal	+ : Saumon	Sels biliaires	 <p><b>Figure 01 :</b> Isolement d'<i>Escherichia coli</i> sur milieu Hektoen</p>
			- : vert		 <p><b>Figure02:</b> Isolement de <i>salmonella sp.</i> sur milieu Hektoen.</p>
SS	Rouge neutre	Lac	+ : Rose	Citrate	 <p><b>Figure03 :</b> Isolement de <i>Salmonella sp.</i> sur milieu SS</p>
			- : incolore	Sels biliaires	

**Lac** : lactose. **Sac**: saccharose. **Sal** : salicine.

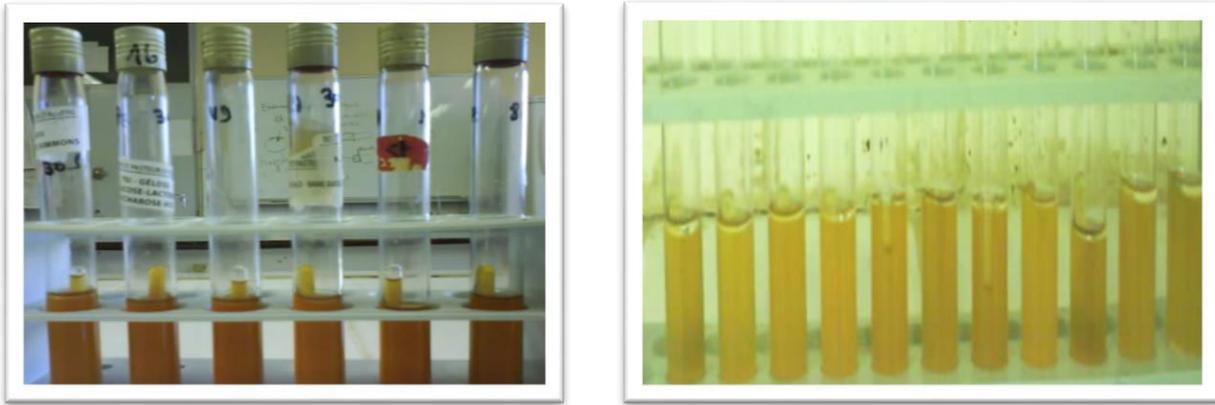


Figure 04 : Type fermentaire des souches isolées

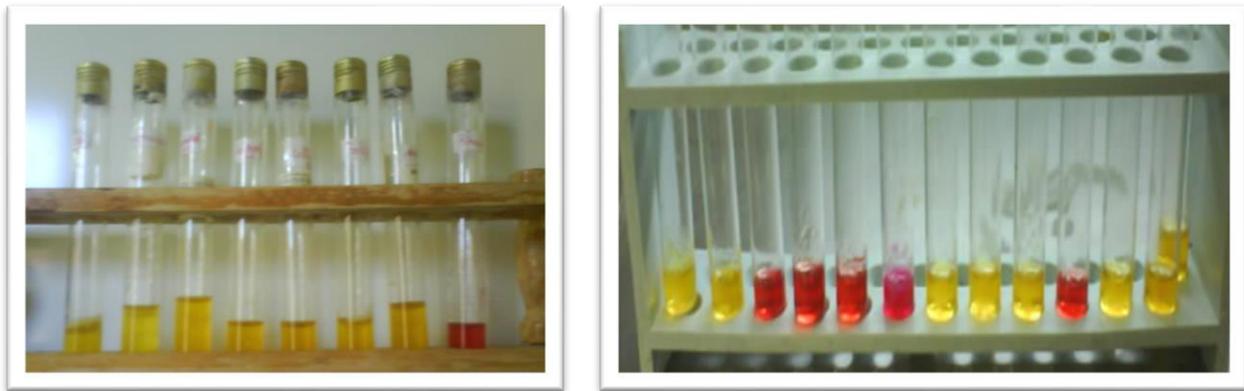
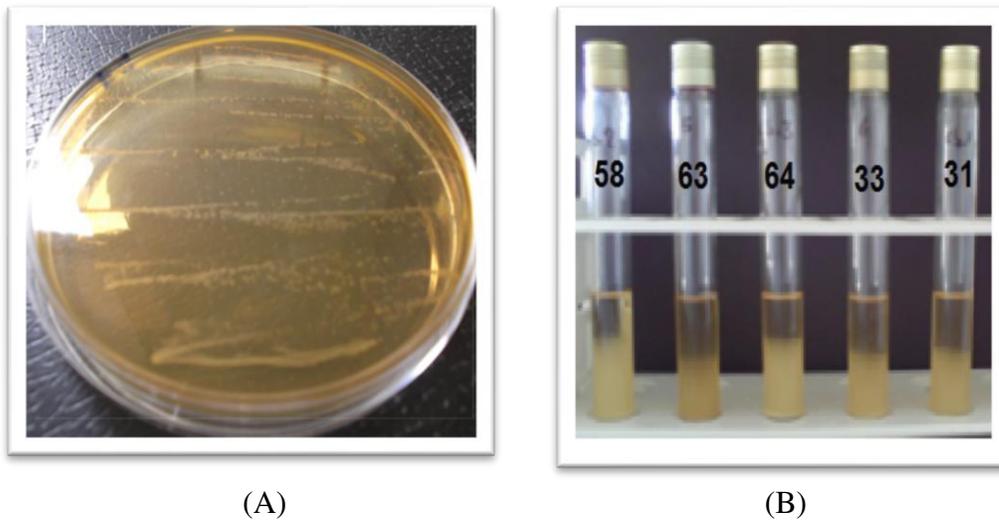


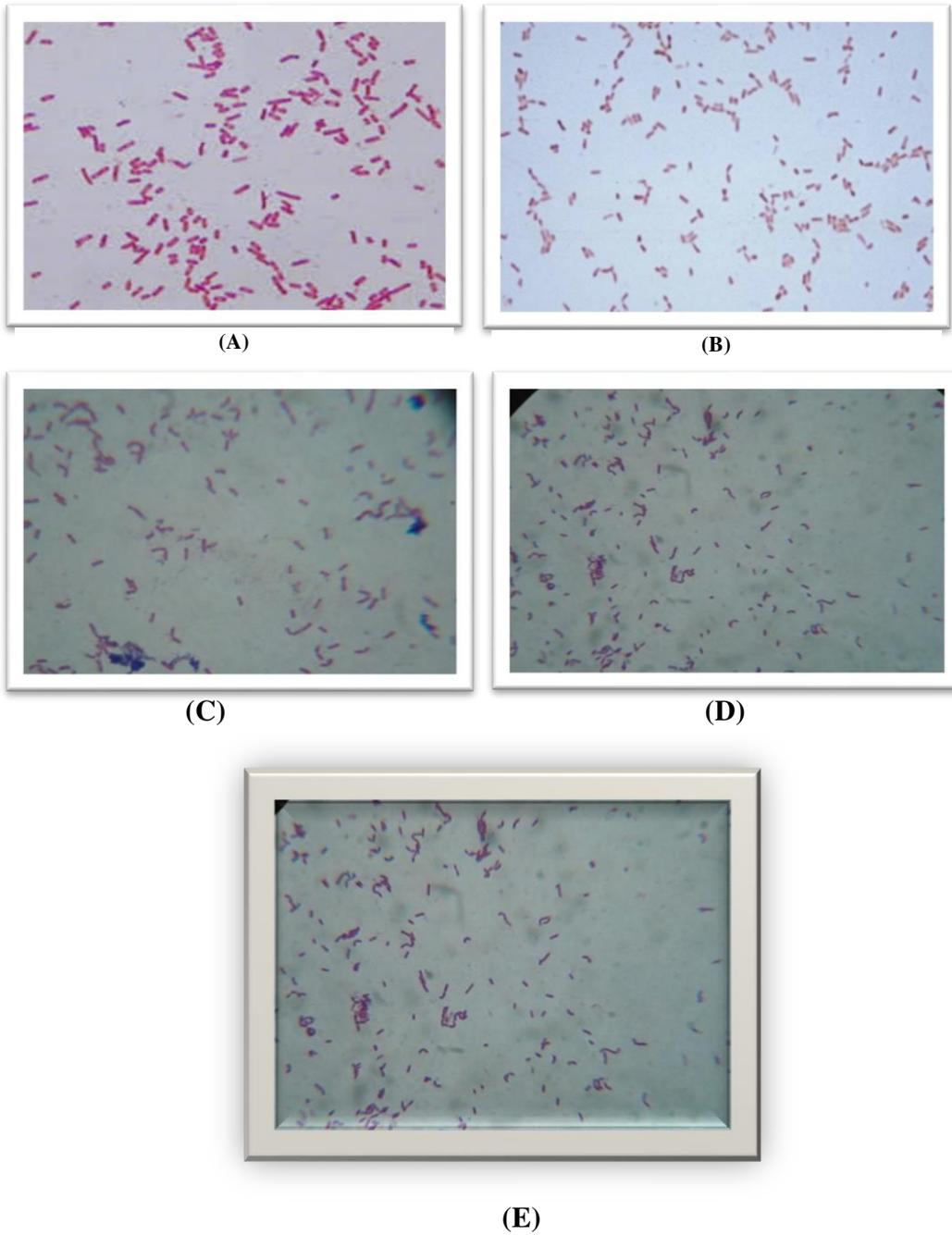
Figure 05 : Profil de fermentation des souches isolées



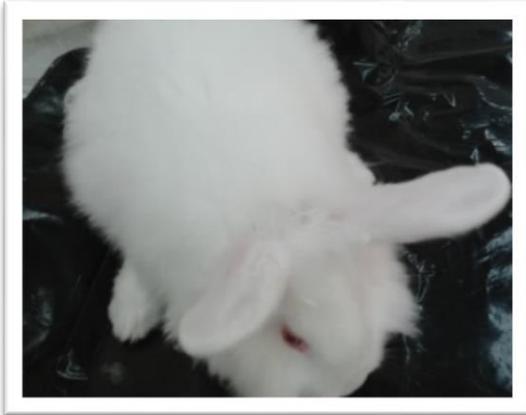
(A)

(B)

Figure 06 : Aspect des colonies sur MRS gélose (A) et culture dans MRS bouillon (B).



**Figure 07:** Résultats de l'examen après la coloration de gram *Esherichia sp.* (A), *Salmonella sp.*(B) et de *Proteus sp.* (C et D), *Lactobacillus sp.* (E) (Grossissement X1000).



**Figure 08 :** Répartition des lapins en lots.



**Figure 09 :** Gavage des lapins



**Figure 10 :** Les observations macroscopiques après dissection des lapins.



(A)



(B)

Figure 11 : Aspect des selles.

Tableau 12: Lecture de la galerie miniaturisée API 20 E

Tests	Substrats	Réactions /Enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
<b>ONPG</b>	Ortho-nitro-phényl-galactosidase	B-galactosidase	Incolore 	Jaune 
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune 	Rouge /orange 
<b>LDC</b>	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune 	Orangé 
<b>ODC</b>	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune 	Rouge /orange 
<b>CIT</b>	Citrate de sodium	Utilisation de citrate	Vert pale/jaune 	Bleu-vert/vert 
<b>H2S</b>	Thiosulfate de sodium	Production de H2S	Incolore/grisâtre 	Dépôt noir/fin liserié 
<b>Urée</b>	Urée	Uréase	Jaune 	Rouge /orange 
<b>TDA</b>	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA/immédiat Jaune 	TDA/immédiat marron foncé 
<b>IND</b>	Tryptophane	Production d'indole	KOVACS/2mm Jaune 	KOVACS/2mm Anneau rouge 
<b>VP</b>	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VPI+VPII/10mn Incolore 	VPI+VPII/10mn Rose Rouge 
<b>Gel</b>	Gélatinase de kohn	Gélatinase	Non diffusion 	Diffusion du pigment noir 

**ANNEXES**

<b>Glu</b>	Glucose	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert 	Jaune 
<b>MAN</b>	Manitol	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert 	Jaune 
<b>INO</b>	Inositol	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert 	Jaune 
<b>SOR</b>	Sorbitol	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert 	Jaune 
<b>RHA</b>	Rhamnose	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert 	Jaune 
<b>SAC</b>	Saccharose	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert 	Jaune 
<b>MEL</b>	Melibiose	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert 	Jaune 
<b>AMY</b>	Amygdaline	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert 	Jaune 
<b>ARA</b>	Arabinose	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert 	Jaune 

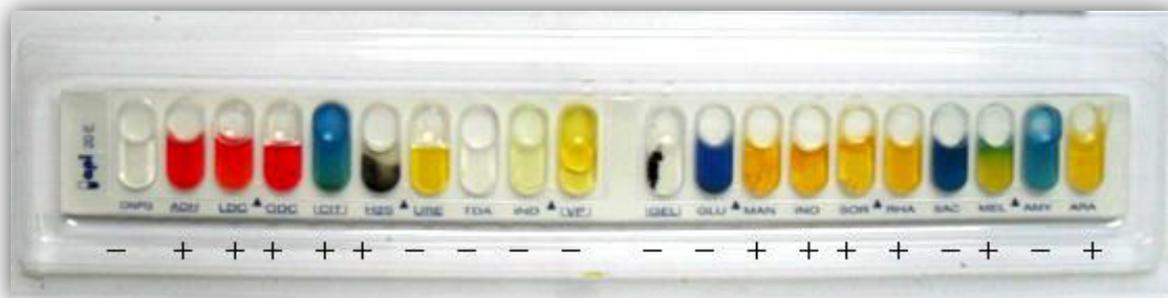


Figure 12: Galerie API 20<sup>E</sup> pour *Salmonella* sp.

Lecture d'*Escherichia* sp. sur galerie API 20E

	ARA	AMY	MEL	SAC	RHA	SOR	INO	MAN	GLU	GEL	VP	IND	TDA	URE	H2S	CIT	ODC	LDC	ADH	ONPG
<i>Escherichia</i>				+				+	+			+	-	-	-	-	+	+		+

Lecture de *Salmonella* sp. sur galerie API 20E

	ARA	AMY	MEL	SAC	RHA	SOR	INO	MAN	GLU	GEL	VP	IND	TDA	URE	H2S	CIT	ODC	LDC	ADH	ONPG
<i>Salmonella</i> sp	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-

Lecture de *Proteus sp.* sur galerie API 20E

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
<i>Proteus sp.</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-

## Annexe IV : Les séquences des souches isolées

- Séquence de *Salmonella enterica subsp. Diarizonae*

CGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGG  
 AAAGTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACGTCCGA  
 AGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTTG  
 TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCA  
 CACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA  
 TGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTAC  
 TTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGA  
 AGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA  
 ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCCGATGTGAAATCCCCGGGCTCA  
 ACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGG  
 TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGAC  
 AAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC  
 CACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGCTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACG  
 CGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGG  
 GCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTC  
 TTGACATCCACAGAAAGTTTGCAGAGATGCGAATGTGCCTTTCGGGAACTGTGAAACAGGTG  
 CTGCATGGCT

▪ **Séquence d'*Escherichia fergusonii***

TACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAACAGCTTGCTGCTTCTGCTGACGAGTGGCGGAC  
GGGTGAGTAATGTCTGGGAATCTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTA  
ATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGC  
CCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTC  
TGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGG  
CCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCAT  
TGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG  
GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGA  
TGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAG  
AGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGG  
CGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG  
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGACTTGGGAGGTTGTGCCCTTGAGG  
CGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCAACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAGGTTAAAC  
TCAATGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGGTTTAATTCGATGCAACG  
CGAAGAACCTTACCTGGTTCTTGACATCCACAGAATTTTCAGAAAGAGATATGTTGCCTTCGG

▪ **Séquence de *Proteus mirabilis***

GGGGCTGCGAGCTACACATGCAGTCGAGCGGTACAGGAGAAGCTTGCTTTCTTGCTGACGAG  
CGGCGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCCGATAGAGGGGGATAACTACTGGAAAC  
GGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTTGCACTATC  
GGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCTCT  
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG  
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTAT  
GAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGATAAGGTTAATACC  
CTTGTC AATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
ATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCAAT  
TAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATCTGAAACTGGTTGGCTAGA  
GTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAT  
ACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG  
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTAGAGGTTGTGGT  
CTTGAACCGTGGCTTCTGGAGCTAACGCGTTAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG  
GTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA

TGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGCGAATCCTTTAGAGATAGAGGAGTG  
CCTTCGGGAACGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGGGAAATGTTGG  
GTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAAACT  
CAAAGGAAAAGTGCCTCGGTGATAAACTCGGAAGAAAGGTGGGGGATGGACGTCCAAGTCAT  
CATGGCCCCTTAACAAAATAGGGCTACCCACGTTCTTACAATGGCCCAAATCAAAA

▪ **Sequence de *Lactobacillus plantarum***

AGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA  
ACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAG  
TTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGAC  
CCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGC  
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG  
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCG  
CGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAGTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGA  
CGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG  
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTA  
AAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGG  
AGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGT  
GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCT  
GGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC  
CTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCA  
GTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAA  
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA  
AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAG  
CTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTG  
AGATG

## Annexe V : Les tableaux des résultats

Tableau 13 : Caractéristiques biochimiques des bactéries lactiques.

Les bactéries	LBB1	LBB2	LBB3	LBB4	LBB5	LBB6	LBB7	LBB8	LBB9	LBB10
Origine	LBV	LBV	LBV	LBV	LBV	LBV	LBV	LBV	LBV	LBV
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Type fermentaire	Hété O	Homo	Homo	Homo	Hété O	Hété F	Hété F	Homo	Hété F	Hété O
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Arabinose	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	-	-	+
Maltose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	-	-	(-)
Lactose	+	+	-	(-)	+	+	+	+	(-)	(-)
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(-)
Raffinose	+	-	-	+	+	+	+	(-)	-	(-)
Salicine	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Souche	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus ruminis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus casei</i> sp.	<i>Lactobacillus brevis</i>

Les bactéries	LBB11	LBB12	LBB13	LBB14	LBB15	LBB16	LBB17	LBB18	LBB19	LBB20
Origine	LBV	LBV	LBV	LBV	LBV	LBV	LBG	LBG	LBG	LBG
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Type fermentaire	Hété O	Hété F	Hété O	Hété O	Hété F	Hété F	Homo	Hété O	Hété F	Hété O
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	(-)	(-)	(-)	-	(-)	-	(-)	(-)	(-)
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	-	(-)	(-)	(-)	-	(-)	-	(-)	(-)	(-)
Lactose	+	+	+	+	(-)	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	-	+	(-)	+	+	+
Salicine	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
Souche	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus casei</i> sp.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus Fermentum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>

Les bactéries	LBB21	LBB22	LBB23	LBB24	LBB25	LBB26	LBB27	LBB28	LBB29	LBB30
<b>Origine</b>	LBG	LBG	LBG	LBG	LBG	LBG	LBG	LBG	LBG	LBG
<b>Gram</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Type fermentaire</b>	Homo	Hété O	Hété F	Hété F	Homo	Hété O	Hété O	Hété O	Hété F	Homo
<b>Catalase</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Oxydase</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Glucose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Saccharose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Arabinose</b>	-	+	(-)	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	-
<b>Maltose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Xylose</b>	-	-	(-)	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	-
<b>Lactose</b>	(-)	+	+	(-)	+	+	+	+	+	(-)
<b>Galactose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Raffinose</b>	+	+	+	-	(-)	+	+	+	+	+
<b>Salicine</b>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
	<i>Lactobacillus ruminis</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus casei</i> sp.	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus Fermentum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus ruminis</i>

Les bactéries	LBB31	LBB32	LBB33	LBB34	LBB35	LBB36	LBB37	LBB38	LBB39	LBB40
<b>Origine</b>	LBG	LBG	LBG	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC
<b>Gram</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Type fermentaire</b>	Hété F	Homo	Hété O	Hété F	Hété O	Hété O	Hété O	Hété O	Hété F	Hété F
<b>Catalase</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Oxydase</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Glucose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Saccharose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Arabinose</b>	(-)	-	(-)	-	(-)	+	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>Maltose</b>	+	(-)	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Xylose</b>	(-)	-	(-)	-	(-)	-	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>Lactose</b>	+	(-)	+	(-)	+	+	+	+	+	+
<b>Galactose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Raffinose</b>	+	(-)	+	-	+	+	+	+	+	+
<b>Salicine</b>	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus casei</i> sp.	<i>Lactobacillus Fermentum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus Fermentum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>

Les bactéries	LBB41	LBB42	LBB43	LBB44	LBB45	LBB46	LBB47	LBB48	LBB49	LBB50
Origine	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Type fermentaire	Hété O	Hété F	Hété F	Homo	Homo	Hété F	Homo	Hété O	Homo	Hété F
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	(-)	(-)	(-)	-	-	(-)	(-)	+	-	(-)
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	(-)	+
Xylose	(-)	(-)	(-)	-	-	(-)	(-)	-	-	(-)
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	(-)	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	(-)	(-)	+	+	+	(-)	+
Salicine	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	<i>Lactobacillus Fermentum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>

Les bactéries	LBB51	LBB52	LBB53	LBB54	LBB55	LBB56	LBB57	LBB58	LBB59	LBB60
Origine	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Type fermentaire	Hété F	Hété F	Hété F	Homo	Homo	Homo	Hété F	Hété F	Hété F	Hété O
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	(-)	-	(-)	-	-	-	(-)	(-)	(-)	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	(-)	-	(-)	-	-	-	(-)	(-)	(-)	-
Lactose	+	(-)	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	-	+	(-)	(-)	(-)	+	+	+	+
Salicine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus casei</i> sp.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>

Les bactéries	LBB61	LBB62	LBB63	LBB64	LBB65	LBB66	LBB67	LBB68	LBB69	LBB70
Origine	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC	LBC
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Type fermentaire	Hété O	Hété F	Hété F	Hété O	Hété F	Hété F	Hété O	Hété O	Hété O	Hété O
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicine	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
	<i>Lactobacillus Fermentum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>

+ : réaction positive; - : réaction négative ; LBG : bactéries isolées à partir de lait de chèvre ; LBC : isolées à partir de lait de chamelle ; LBB : isolées à partir de lait de vache ; Homo : Homo-fermentaire ; Hété F : Hétéro-fermentaire facultatives ; Hété O : Hétéro-fermentaire obligatoire .

**Tableau 14 :** Survie des souches lactiques pure à pH 2.5 sans sels biliaires

temps	LBG28	LBC39	LBC50	LBG31	LBC37
0h	$7.08 \times 10^6$	$3.02 \times 10^6$	$1.82 \times 10^6$	$8.91 \times 10^5$	$6.76 \times 10^6$
3h	$7.41 \times 10^6$	$3.47 \times 10^6$	$2.82 \times 10^6$	$8.71 \times 10^6$	$7.76 \times 10^6$
6h	$1.29 \times 10^5$	$4.27 \times 10^6$	$9.77 \times 10^5$	$6.02 \times 10^6$	$6.31 \times 10^4$
24h	$4.17 \times 10^4$	$4.79 \times 10^5$	$2.69 \times 10^4$	$4.68 \times 10^4$	$4.49 \times 10^3$
48h	$4.20 \times 10^3$	$8.32 \times 10^2$	$4.57 \times 10^3$	$6.16 \times 10^3$	10
72h	$6.76 \times 10^2$	38	$4.36 \times 10^3$	$4.17 \times 10^3$	1

**Tableau 15:** Evolution de la croissance des cultures pures à pH 2,5 en présence de 0,3 % de sels biliaires

	<b>LBG28</b>	<b>LBC39</b>	<b>LBC50</b>	<b>LBG31</b>	<b>LBC37</b>
<b>0h</b>	$4.26 \times 10^6$	$3.32 \times 10^6$	$6.31 \times 10^5$	$3.02 \times 10^6$	$6.76 \times 10^6$
<b>3h</b>	$6.92 \times 10^6$	$3.89 \times 10^6$	$2.29 \times 10^6$	$7.58 \times 10^6$	$8.70 \times 10^6$
<b>6h</b>	$6.31 \times 10^6$	$3.98 \times 10^6$	$8.32 \times 10^5$	$1.41 \times 10^6$	$2.08 \times 10^6$
<b>24h</b>	$1.31 \times 10^5$	$2.57 \times 10^5$	$5.13 \times 10^4$	$3.02 \times 10^5$	$1.31 \times 10^3$
<b>48h</b>	$6.76 \times 10^3$	$1.41 \times 10^3$	$3.16 \times 10^3$	$2.45 \times 10^3$	1
<b>72h</b>	$7.58 \times 10^2$	1	87	$1.44 \times 10^2$	1

**Tableau 16:** Survie des souches lactiques pure à pH 4.5 sans sels biliaires

	<b>LBG28</b>	<b>LBC39</b>	<b>LBC50</b>	<b>LBG31</b>	<b>LBC37</b>
<b>0h</b>	$8.56 \times 10^8$	$6.50 \times 10^8$	$9.55 \times 10^8$	$5.75 \times 10^8$	$3.72 \times 10^8$
<b>3h</b>	$6.30 \times 10^9$	$8.31 \times 10^8$	$9.77 \times 10^9$	$2.34 \times 10^9$	$2.14 \times 10^9$
<b>6h</b>	$5.12 \times 10^9$	$4.90 \times 10^9$	$7.58 \times 10^9$	$8.70 \times 10^9$	$2.88 \times 10^9$
<b>24h</b>	$3.16 \times 10^7$	$4.47 \times 10^9$	$2.75 \times 10^8$	$1.66 \times 10^8$	$1.82 \times 10^7$
<b>48h</b>	$2.60 \times 10^6$	$2.57 \times 10^6$	$6.45 \times 10^7$	$1.78 \times 10^7$	$8.71 \times 10^6$
<b>72h</b>	$5 \times 10^4$	$9.77 \times 10^4$	$2.57 \times 10^6$	$1.78 \times 10^6$	$2.45 \times 10^4$

**Tableau 17:** Evolution de la croissance des cultures pures à pH 4.5 en présence de 0,3 % de sels biliaires

	<b>LBG28</b>	<b>LBC39</b>	<b>LBC50</b>	<b>LBG31</b>	<b>LBC37</b>
<b>0h</b>	$1.65 \times 10^8$	$3.89 \times 10^8$	$3.8 \times 10^8$	$6.91 \times 10^8$	$2.45 \times 10^8$
<b>3h</b>	$3.8 \times 10^8$	$6.76 \times 10^8$	$8.91 \times 10^8$	$7.76 \times 10^8$	$6.91 \times 10^8$
<b>6h</b>	$5.37 \times 10^7$	$3.38 \times 10^7$	$2.29 \times 10^7$	$2.82 \times 10^8$	$1.48 \times 10^8$
<b>24h</b>	$3.09 \times 10^6$	$1.35 \times 10^7$	$5.62 \times 10^5$	$2.13 \times 10^7$	$2.82 \times 10^5$
<b>48h</b>	$3.09 \times 10^4$	$3.02 \times 10^5$	$1.54 \times 10^4$	$6.91 \times 10^5$	15
<b>72h</b>	$1.41 \times 10^2$	$1.99 \times 10^3$	$2.34 \times 10^3$	$3.09 \times 10^4$	1

**Tableau 18:** Survie des souches lactiques pure à pH 6.5 sans sels biliaires

	<b>LBG28</b>	<b>LBC39</b>	<b>LBC50</b>	<b>LBG31</b>	<b>LBC37</b>
<b>0h</b>	$2.34 \times 10^8$	$7.24 \times 10^8$	$8.51 \times 10^8$	$6.16 \times 10^7$	$1.78 \times 10^8$
<b>3h</b>	$3.89 \times 10^9$	$2.63 \times 10^9$	$9.12 \times 10^8$	$7.24 \times 10^8$	$6.61 \times 10^8$
<b>6h</b>	$6.76 \times 10^9$	$2.69 \times 10^9$	$9.77 \times 10^8$	$6.31 \times 10^8$	$7.41 \times 10^8$
<b>24h</b>	$1.51 \times 10^{10}$	$3.71 \times 10^9$	$5.37 \times 10^9$	$1.28 \times 10^9$	$8.32 \times 10^9$
<b>48h</b>	$2.34 \times 10^{10}$	$1.99 \times 10^9$	$1.41 \times 10^{10}$	$5.75 \times 10^9$	$1.90 \times 10^{10}$
<b>72h</b>	$3.89 \times 10^{10}$	$1.73 \times 10^9$	$9.12 \times 10^9$	$2.19 \times 10^9$	$9.33 \times 10^9$

**Tableau 19:** Evolution de la croissance des cultures pures à pH 6.5 en présence de 0,3 % de sels biliaires

	<b>LBG28</b>	<b>LBC39</b>	<b>LBC50</b>	<b>LBG31</b>	<b>LBC37</b>
<b>0h</b>	7.41×10 <sup>8</sup>	6.76×10 <sup>8</sup>	4.36×10 <sup>7</sup>	7.94×10 <sup>7</sup>	1.99×10 <sup>8</sup>
<b>3h</b>	3.71×10 <sup>9</sup>	2.04×10 <sup>9</sup>	9.12×10 <sup>7</sup>	9.77×10 <sup>8</sup>	4.57×10 <sup>8</sup>
<b>6h</b>	7.58×10 <sup>9</sup>	8.31×10 <sup>9</sup>	7.58×10 <sup>8</sup>	6.30×10 <sup>9</sup>	1.15×10 <sup>9</sup>
<b>24h</b>	6.76×10 <sup>9</sup>	9.54×10 <sup>9</sup>	2.09×10 <sup>9</sup>	7.76×10 <sup>9</sup>	3.02×10 <sup>8</sup>
<b>48h</b>	8.71×10 <sup>8</sup>	4.89×10 <sup>9</sup>	9.12×10 <sup>8</sup>	3.38×10 <sup>8</sup>	7.24×10 <sup>7</sup>
<b>72h</b>	6.76×10 <sup>7</sup>	5.37×10 <sup>8</sup>	4.78×10 <sup>7</sup>	2.34×10 <sup>8</sup>	4.47×10 <sup>6</sup>

**Tableau 20:** Dénombrement des lactobacilles dans les selles des lapins.

<b>A</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>Lot témoin</b>	2,23 × 10 <sup>6</sup>	1,65 × 10 <sup>6</sup>	1,44 × 10 <sup>6</sup>	1,77 × 10 <sup>6</sup>	7,76 × 10 <sup>5</sup>	5,62 × 10 <sup>5</sup>	1,14 × 10 <sup>6</sup>	8,7 × 10 <sup>5</sup>	1,47 × 10 <sup>6</sup>
<b>Lot3</b>	3,09 × 10 <sup>6</sup>	9,54 × 10 <sup>6</sup>	4,78 × 10 <sup>7</sup>	3,89 × 10 <sup>7</sup>	7,76 × 10 <sup>7</sup>	1,31 × 10 <sup>8</sup>	1,73 × 10 <sup>8</sup>	1,38 × 10 <sup>8</sup>	1,04 × 10 <sup>8</sup>
<b>Lot4</b>	1,58 × 10 <sup>6</sup>	2,88 × 10 <sup>6</sup>	3 × 10 <sup>7</sup>	9,54 × 10 <sup>7</sup>	1,38 × 10 <sup>8</sup>	4,78 × 10 <sup>8</sup>	1,31 × 10 <sup>9</sup>	1,02 × 10 <sup>9</sup>	6,02 × 10 <sup>8</sup>
<b>Lot 5</b>	6,45 × 10 <sup>6</sup>	5,12 × 10 <sup>6</sup>	2,51 × 10 <sup>7</sup>	5,37 × 10 <sup>7</sup>	8,12 × 10 <sup>7</sup>	2,75 × 10 <sup>8</sup>	3,63 × 10 <sup>8</sup>	4,07 × 10 <sup>8</sup>	1,25 × 10 <sup>8</sup>
<b>Lot 7</b>	1,77 × 10 <sup>6</sup>	1,12 × 10 <sup>6</sup>	1,34 × 10 <sup>6</sup>	2,18 × 10 <sup>6</sup>	7,07 × 10 <sup>6</sup>	1,23 × 10 <sup>7</sup>	2,18 × 10 <sup>7</sup>	6,02 × 10 <sup>7</sup>	1,41 × 10 <sup>8</sup>

<b>A</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>
<b>Lot témoin</b>	1,12 × 10 <sup>6</sup>	1,38 × 10 <sup>6</sup>	1,09 × 10 <sup>6</sup>	9,12 × 10 <sup>5</sup>	1,86 × 10 <sup>6</sup>	2,45 × 10 <sup>6</sup>	1,54 × 10 <sup>6</sup>	6,02 × 10 <sup>5</sup>	8,91 × 10 <sup>5</sup>
<b>Lot3</b>	7,24 × 10 <sup>7</sup>	5,37 × 10 <sup>7</sup>	3,38 × 10 <sup>7</sup>	1,31 × 10 <sup>7</sup>	6,60 × 10 <sup>6</sup>	4,16 × 10 <sup>6</sup>	2,81 × 10 <sup>6</sup>	1,77 × 10 <sup>6</sup>	9,54 × 10 <sup>5</sup>
<b>Lot4</b>	3,63 × 10 <sup>8</sup>	1,47 × 10 <sup>8</sup>	6,3 × 10 <sup>7</sup>	5,62 × 10 <sup>7</sup>	2,51 × 10 <sup>7</sup>	2,51 × 10 <sup>7</sup>	6,60 × 10 <sup>6</sup>	3,23 × 10 <sup>6</sup>	4,36 × 10 <sup>6</sup>
<b>Lot 5</b>	7,07 × 10 <sup>7</sup>	5,57 × 10 <sup>7</sup>	2,51 × 10 <sup>7</sup>	2,57 × 10 <sup>7</sup>	1,12 × 10 <sup>7</sup>	1,12 × 10 <sup>7</sup>	5,49 × 10 <sup>6</sup>	2,45 × 10 <sup>6</sup>	1,41 × 10 <sup>6</sup>
<b>Lot 7</b>	1,23 × 10 <sup>8</sup>	7,76 × 10 <sup>7</sup>	4,07 × 10 <sup>7</sup>	2,08 × 10 <sup>7</sup>	7,58 × 10 <sup>6</sup>	7,58 × 10 <sup>6</sup>	1,31 × 10 <sup>6</sup>	1,65 × 10 <sup>6</sup>	7,76 × 10 <sup>5</sup>



**SECTEUR SANITAIRE DE CHATTIA**

Service d.....

Nom du malade :.....

Sexe :.....

Age :.....

Date de prélèvement :.....

Heure du prélèvement:.....

Renseignements cliniques et thérapeutiques utiles :.....

.....

Chettia, le.....

Le Médecin Traitant.

**Partie réservées au laboratoire d'Analyse**

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Le chef de laboratoire.

## CAMEL MILK AND MILKING

# Isolation, identification and characterization of *Lactobacillus plantarum* from camel milk and its antagonist effect against diarrheal bacteria

Meriem Toualbia<sup>1\*</sup>, Abd Elkader Delmi Bouras<sup>1</sup>, Malika Koiche<sup>1</sup>, Mohamed Kerkoud<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Natural Local Bio-Resources, Department of Biology, Faculty of Science, Hassiba Benbouali University, Chlef, BP. 151 Hay Essalem, Chlef 02000, Algeria, <sup>2</sup>DiagGene, 8, Rue le Notre 49066 Angers, France

## ABSTRACT

The main objective of this study is to define probiotic bacteria efficiency against bacterial infantile diarrhea. Lactic acid bacteria (LAB) was used as a natural resource and extracted of camel milk from southern Algeria. The isolation was followed by molecular identification using the 16S rDNA sequencing method. One hundred and fifty fecal samples were collected over 18 months from children suffering from diarrhea and aged 2 years or under. Identification results reveal the isolated lactic bacteria as *Lactobacillus plantarum*. In the other side, a total of 120 fecal samples were positive for bacterial growth, these pathogenic bacteria were identified as: *Escherichia fergusonii* (92%), *Salmonella enterica subsp. Diarizonae* (7.33%) and *Proteus mirabilis* (0.66%). The inhibitory effect study of lactic acid bacteria on pathogenic bacteria shows varying effects of *L. plantarum* in relation to the various pathogenic isolates, mentioning that the most important effect was expressed against *Escherichia fergusonii* with 22 mm. All the results allow us to classify that camel's milk is a natural source rich in lactic acid bacteria, in particular *L. plantarum*, with an inhibitory ability against the pathogenic bacteria responsible for diarrhea. Therefore *L. plantarum* produces bioactive molecules responsible for this effect.

**Keywords:** Antimicrobial; Diarrheal pathogens; *Lactobacillus plantarum*; Milk; Probiotic

## INTRODUCTION

Three to five billion children are affected yearly by infantile diarrhea, and 1.5 to 2.5 million of them die of it. (Santosham, 2002; Dalby-Payne and Elliott, 2004). These figures make of this illness, worldwide disease-causing infants morbidity in developing countries and inflicting significant economic burden to the developed ones (Chow Chung et al., 2010).

If we have to make a ranking of the most killing infant diseases, diarrheal is placed at the forefront, just after respiratory tract infections. This unfortunate diarrheal morbidity lead position is due to infants suffering from improper feeding or rehydration care. Various pathogens such as: *Escherichia coli*, *Salmonella species*, *Klebsiella species* and *Enterobacter species*. (Ali et al., 2005; Diniz-Santos et al., 2005; Parashar et al., 2006) have been blamed, by international reports, for these cases.

In an effort to reduce the above-mentioned figures, doctors have been trying, these last years, to prescribe probiotics as alternative biotherapeutic agents against intestinal pathogenic infections, specifically: *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, that are sold commercially and protect against gastrointestinal pathogenic infection through various mechanisms (Thirabunyanon, 2011).

*Lactobacillus spp* has been praised by several reports and studies for its positive effect on mankind's intestinal flora, Crohn disease prevention and adult and infant protection against diarrhea (Pant et al., 1996).

Through this study, we would like to summarize all the work, and trials made in order to confine, define and analyze camel milk extracted *Lactobacillus plantarum* and analyze its antibacterial effect against diarrheal pathogens.

### \*Corresponding author:

Meriem Toualbia, Laboratory of Natural Local Bio-Resources, Department of Biology, Faculty of Science, Hassiba Benbouali University, Chlef, BP. 151 Hay Essalem, Chlef 02000, Algeria.  
E-mail: me.toualbia@univ-chlef.dz

**Received:** 29 December 2017 ; **Accepted:** 01 April 2018

## MATERIAL AND METHODS

Mothers of 24 months old children were tasked to collect diarrheic fecal samples, put them into clean wide mouthed containers, without using any disinfectant or detergent residue and tight-fitting leak proof lids. The operation took place over 18 months in hospitals located in the following regions of Algeria: Chettia, Chlef and Algiers.

Samples were aseptically collected onto sterile universal bottles with indications of age, gender and time of collection and granted to the Microbiological laboratory of the University of Chlef, in Algeria, then air transferred to DIAGENE Laboratory in France.

The camel milk samples were collected from various regions of the south of Algeria, immediately cooled and sent to the above-mentioned labs in an ice box (4°C), then lactic acid bacteria (LAB) analyzed.

### Microbiological analyses

The fecal specimens were analysed for bacterial pathogens by standard method (Abdullahi et al., 2010).

Lactic Acid Bacteria (LAB) were isolated on de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Spain) agar and broth and incubated at 30°C for 24 to 48 h in order to touse and comply with identification conventional trials and properties assessment. Colonies of LAB purified by re-plating on MRS agar. From 100 isolates, 70 strains were retained. The strains were tested for Gram staining, catalase activity, and mobility. These strains were tested from the growth in NaCl, growth at different temperature and growth at different pH (Khedida et al., 2009). The strains were put into 3% glycerol and stored at -20° C.

### Molecular diagnostic methods for the identification of bacteria

#### DNA preparation

DNA was removed from the bacteria while a fresh colony was placed into 1000µl of sterile distilled water (10<sup>6</sup> cells/ml), heated in Water Bath (Thermo Scientific™) for 10 minutes at 95°C to lyse the cells, that led to DNA release into the water. Heated tubes were placed immediately in Ice for 15min and centrifuged to remove cell debris. The supernatant was hosted into a new tube. Quantity et quality of all extract DNA was checked by NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) and stored at -20° C for next used (Silva et al., 2012).

#### PCR amplification and sequencing

Bacterial Extracted DNA was amplified with Universal Bacterial Primer for the 16S rRNA 27F (5'-AGAGTTTGTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R

(5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') (Eurogentec, Belgium) was used PCR amplification was carried out in a reaction mixture of 50 µl containing 1U of Go Taq hot start Taq DNA polymerase and 1X Go Taq Buffer (Promega, USA), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µM forward primer, 0.5 µM reverse primer, and 5 µl of DNA Template.

The following PCR cycling parameters were performed: a first heating at 95°C for 6 min, then, denaturation process was performed by 35 cycles at 95°C for 30 s, then annealed at 55 °C for 45 s, extended to 72°C for 45 min, and ending by a 10 min final addition at 72 °C. PCR products were examined on agarose gels stained with 1% of Ethidium Bromide (Gel Doc XR+ System, Biorad, USA).

The amplified 16S rDNA PCR products were cleansed with Wizard® SV PCR Clean-Up System (Promega, USA), per the recommendations of the manufacturer). The purified products were sequenced by using 27F and 1492R primers by GATC Biotech (Germany).

Chromatograms of each of the forward and reverse sequences were checked using Chromas Prosoftwares (Technelysium Pty Ltd, Australia). In order to obtain the full-length sequence of each sample, forward and reverse strand sequences were combined using SeqMan software (DNASTAR) with manual adjustment.

Sequence identification were investigated by BLASTn in NCBI search to identify sequence similarity with all available 16S sequences in GenBank (National Centre for Biotechnology Information, Rockville Pike, Bethesda, MD), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### In vitro inhibition test

The agar-well diffusion trial was conducted through an indicator strain overnight culture that was used to inoculate agar growth media at 45°C and poured into Petri dishes (Mallesha et al., 2012).

Inhibition zone diameter was then, measured with calipers in mm. The clear zone around the wells helped define the antimicrobial activity. Mueller-Hinton used for the interaction and the antimicrobial activities.

## RESULTS AND DISCUSSION

Every year, infants and children, from developing countries, who suffered from bacterial infections die due to acute diarrhea caused by the above-mentioned infections. Clearing diarrheal disease related enteropathogens in the country is of a paramount importance to implement effective primary health care activities against

the disease (Ifeanyi Casmir et al., 2010). The result of this study shows that (*Escherichia fergusonii* (92%) to be the predominant bacteria causing diarrhea followed by *Salmonella enterica subsp. diarizonae* (7.33%) then *Proteus mirabilis* (0.66%).

The strains sequenced were identified by partial sequencing of the gene coding for the 16S rDNA. The BLAST program allowed to define the species on NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) with 99% similarity compared with 16s rRNA Genbank sequences strains. The 16S rDNA sequence analysis using GenBank and ribosomal databases (99%) allowed further asserting phylogenetic. Species were identified by sequence homology at 99% as *Escherichia fergusonii* (atKJ803903.1), *Proteus mirabilis* strain (atstrainKC456549.1), *Salmonella enterica subsp. Diarizonae* (atstrainAB273735.1) and *Lactobacillus plantarum* (DQ295035.1) (Figure 1).

*Escherichia fergusonii* (92%) being the most predominant the isolates in the study agrees with the result of Jackson et al. (2011) who reported isolation of *E. coli* (57.4%) from diarrheagenic stool samples from children as predominant isolate.

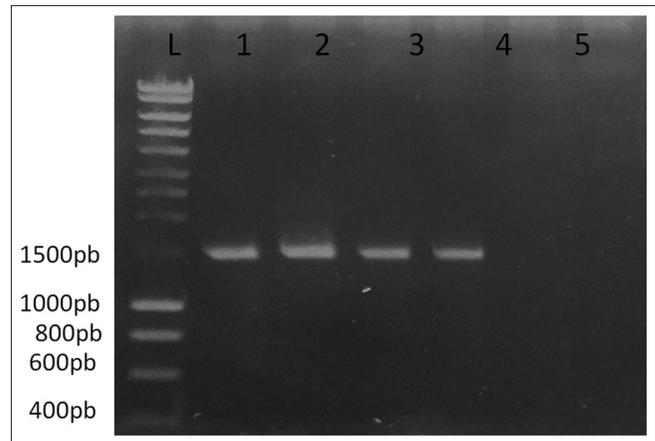
This also is in line with the findings of Al-Jarousha et al. (2010) who investigated the etiology of bacterial enteropathogens causing diarrhea among children and reported that Enterohemorrhagic *Escherichia coli* is the predominant pathogen isolated with 8,3%.

In the present study, the percentage of isolation of *Salmonella enterica ssp.* was 7.33 %, this rate was fully compared to previous studies done in Burkina Faso (2%) and in southeastern and eastern Korea reported by Chong et al. (1991) and in Africa reported by Bonkougou (2013).

Regarding the causes of the diarrhea episodes; they mostly occur due to maternally acquired antibodies. With regards to the time frame of these episodes, they generally, take place during the first two years of life, when the infant start to walk (Okolo et al., 2013).

100 acid bacteria strains were isolated from MRS agar. All of them grew at 30° C, were Gram positive, not-mobile and catalase negative as preliminary characteristics. The strain grows at different temperature (10 and 45°C) and it is characterized by his ability to grow at different pH (2,5 – 4,5 and 6,5). The biochemical and sugar fermentation test are presenting in Table 1.

The strain was identified by partial sequencing of the gene coding for the 16S rDNA. 16S rDNA sequence analysis



**Fig 1.** Representative electrophoretogram of 16s rRNA encoding region amplified by PCR from isolates. L: Ladder 1KB (Eurogentec, Belgium), 1-4: isolates, 5: control (water).

**Table 1: Biochemical characteristics of *L. plantarum***

	Characteristics
Gram	+
Catalase	-
Oxidase	-
RM	+
VP	-
Nitrate	+
Reduction	
Indole	-
Galactose	-
Fructose	+
Glucose	+
Ribose	+
Sorbitol	+
Maltose	-
Xylose	+
Mannitol	+
Sucrose	+
Mannose	-
Saccharose	+
Lactose	+

using GenBank and ribosomal databases(99%) allowed to further asserting the phylogenetic *Lactobacillus plantarum* (DQ295035.1).

### Antagonism effect

The role of lactic acid bacteria as antibacterial agent has been documented (Van Niel et al., 2002). *Lactobacillus plantarum* used in this study was tested for her antagonism effect. The culture was used and halos of inhibition were ranged between 6 to 22 mm against *Escherichia fergusonii*, *Proteus mirabilis* and *Salmonella enterica subsp. diarizonae*. The results revealed that the antibacterial activity of the selected strain could inhibit all tested pathogenic bacteria however at different inhibition levels (Table 2).

**Table 2: Diameter of inhibition (mm) of various pathogenic organisms by *Lactobacillus plantarum***

	<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Salmonella enterica subsp. diarizonae</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	22±0.3mm	14±0.4 mm	6±0.3 mm

**Fig 2.** Antagonism effect of *Lactobacillus plantarum* against *Escherichia fergusonii*.

The summary of the results demonstrate that inhibitive substances are being synthesized by our lactic acid bacteria strain via pathogenic bacteria. Furthermore, these strains produced inhibitive substances act differently on the pathogenic bacteria. The inhibitive substances produced by the lactic acid bacteria can be protein because we have eliminated the effect of acids (Savadogo et al., 2004).

*Lactobacillus plantarum* showed the most antibacterial potency to *Escherichia fergusonii* with 22 mm of diameter (figure 2), these results are in accordance with Mangell et al. findings (Mangell et al., 2002). These latter underscored the protective effect exerted by this strain in intestinal permeability against *Escherichia*.

Selvamohan and Sujitha (2010), showed that *L. plantarum* and its bacteriocins significantly controlled *E. coli* growth, but were least effective for *streptococcus* growth control. When comparing *L. plantarum* with its bacteriocins's antibacterial activity, it showed to be not affected by low temperatures, since its antibacterial activity is not altered at -20 °C.

Nissen et al. (2009) *in vitro* experiment showed that immune system responses, intestinal integrity enhancement, and intestinal metabolic activity can highly be stimulated by *L. plantarum*. In addition, epithelial cells are proven to be protected by *L. plantarum* from *E. coli*-induced damage, per Qin et al. (2009). Thus, all the above proves that *L. plantarum* has a major probiotic potential against diarrhea. Nobaek et al. (2000), also showed that abdominal pain and flatulence can be reduced by fermented foods containing *L. plantarum*.

## CONCLUSION

The present study revealed that *Escherichia fergusonii* (92%) is the predominant entero-pathogen causing diarrhea followed by *Salmonella enterica subsp. diarizonae* (7.33%) and *Proteus mirabilis* (0.66%). It has shown that *L. plantarum* has inhibitory effects against the tested diarrheal micro-organisms. It could be said that organism from milk do have potential in combating children diarrhea.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Natural Local Bio-resources Laboratory, Hassiba Benbouali University of Chlef and the Ministry of Higher Education and Scientific Research for their financial support.

## REFERENCES

- Abdullahi, M., S. O. Olonitola and I. H. Inabo. 2010. Isolation of bacteria associated with diarrhea among children attending some hospitals in Kano metropolis. *J. Pure Appl. Sci.* 3(1): 10-15.
- Ali, M. B., K. S. Ghenghesh, R. B. Aissa, A. Abuhelfaia and M. Dufani. 2005. Etiology of childhood diarrhea in Zliten, Libya. *Saudi Med. J.* 26: 1759-1765.
- Al-Jarousha, A. M., M. A. El Jarou and I. A. El Qouqa. 2010. Bacterial enteropathogens and risk factors associated with childhood diarrhea. *Indian J. Pediatr.* 78(2): 165-170.
- Bonkougou, I. J., K. Haukka, M. Osterblad, A. J. Hakanen, A. S. Traoré, N. Barro, A. and Siitonen. 2013. Bacterial and viral etiology of childhood diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. *BioMed Central Pediatr.* 13: 36.
- Chong, Y., O. H. Kwon, S. Y. Lee, K. S. Chung and T. Shimada. 1991. *Salmonella enterica* subspecies diarizonae bacteremia in an infant with enteritis. *Yonsei Med. J.* 32(3): 275-8.
- Chow, C.M., A.K.C. Leung and L. H. Kam. 2010. Acute gastroenteritis: From guidelines to real life. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 3: 97-112.
- Dalby-Payne, J. and E. Elliott. 2004. Gastroenteritis in children. *Clin. Evid.* 12: 443-454.
- Diniz-Santos, D. R., J. S. Santana, J. R. Barretto, M. G. Andrade and L. R. Silva. 2005. Epidemiological and microbiological aspects of acute bacterial diarrhea in children from Salvador, Bahia, Brazil. *Brazil J. Infect. Dis.* 9: 77-83.
- Ifeanyi, C. I. C., I. R. Nnennaya, A. A. Casmir and I. N. Florence. 2010. Enteric bacteria pathogens associated with diarrhoea of children in the federal capital territory Abuja, Nigeria. *N. Y. Sci. J.* 3(1).
- Jackson, J. C., A. L. Farone, and M. B. Farone. 2011. Bacterial enteropathogens associated with diarrhea in a rural population of Haiti. *Res. Reports Trop. Med.* 2: 129-133.
- Khedida, K. M., B. Faidc, A. Mokhtarib, A. Soulaymanib and Zinedine. 2009. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiol. Res.* 164: 81-91.

- Mallesha, S. R., D. Selvakumar and J. H. Jagannath. 2010. Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw and fermented products and their antibacterial activity. *Recent Res. Sci. Technol.* 2(6): 42-46.
- Mangell, P., M. Nejdfor, M. Wang, S. Ahmé, B. Weström, H. Thorlacius and B. Jeppsson. 2002. *Lactobacillus plantarum* 229v inhibits *Escherichia coli*-induced intestinal permeability. *Digest. Dis. Sci.* 47: 511-516.
- Nissen, L., W. Chingwaru, B. Sgorbati, B. Biavati and A. Cencic. 2009. Gut health promoting activity of new putative probiotic/protective *Lactobacillus* spp. Strains: A functional study in the small intestinal cell model. *Int. J. Food Microbiol.* 135: 288-294.
- Nobaek, S., M. L. Johansson, G. Molin, S. Ahmé and B. Jeppsson. 2000. Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 95: 1231-1238.
- Okolo, M. O., D. E. Garba and E. Stephen. 2013. Isolation and prevalence of bacteria associated with diarrhoea in children visiting hospitals in Anygba. *Am. J. Res. Commun.* 1(8): 121-129.
- Pant, A. R., S. M. Graham, S. J. Allen, S. Harikul, A. Sabchareon, L. Cuevas and C. A. Hart. 1996. *Lactobacillus* GG and acute diarrhea in young children in the tropics. *J. Trop. Pediatr.* 42: 162-165.
- Parashar, U. D., C. J. Gibson and J. S. Bresse. 2006. Glass R I. rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 304-306.
- Qin, H., Z. Zhang, X. Hang and Y. Jiang. 2009. *Lactobacillus plantarum* prevents enteroinvasive *Escherichia coli*-induced tight junction protein changes in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol.* 9: 63.
- Santosham, M. 2002. Oral rehydration therapy: Reverse transfer of technology. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 156: 1177-1179.
- Savadogo, A., C. A. T. Ouattara, I. H. N. Bassole and A. S. Traore. 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pak. J. Nutr.* 3(3): 174-179.
- Selvamohan, T. and S. Sujitha. 2010. Antimicrobial activity of a probiotic *Lactobacillus plantarum* against urinary tract infection (UTI) causing pathogens. *Pharm. Lett.* 2: 432-440.
- Silva, G. A., T. L. Bernardi, P. D. C. Schaker, M. Menegotto and P. Valente. 2012. Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55(2): 319-327.
- Thirabunyanon, M. 2011. Biotherapy for and protection against gastrointestinal pathogenic infections via action of probiotic bacteria. *Maejo Int. Sci. Technol.* 5: 108-128.
- Van Niel, C. W., C. Feudtner, M. M. Garrison and D. A. Christakis. 2002. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: A meta-analysis. *Pediatrics.* 109: 678-84.