

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A/Mira de Béjaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de

Magister

En Microbiologie Appliquée

Thème

**Intérêt probiotique d'un alicament anti EPEC
à base de *Lactobacillus paracasei***

Présenté par : M^{elle} TITELI Fatiha

Devant le jury :

Président : Mr BENALLAOUA S.

Professeur

Université de Béjaia

Rapporteur: M^{me} SADOUN D.

Professeur

Université de Béjaia

Examineurs:

M^{me} ZAIDI R.

Maître de conférences

Université de Béjaia

M^r IGUEROUADA M.

Maître de conférences

Université de Béjaia

Invitée : M^{me} AMRANE Y.

Docteur

2006 /2007

*Cette étude a été réalisée au Laboratoire de
Microbiologie Appliquée de l'université
A.Mira de Béjaia.*

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes remerciements tout d'abord au « **Bon Dieu** » pour la patience et la santé qui m'ont été utiles tout au long de mon parcours.

Ma profonde gratitude est exprimée à ma chère promotrice **M^{me} SADOUN D.** professeur à l'université de Béjaia, pour ses orientations, ses précieux conseils et ses encouragements. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie **M^r BENALLAOUA S.** professeur à l'université de Béjaia qui m'a fait l'honneur de bien vouloir accepter de présider le jury et de porter son jugement sur ce modeste travail.

Mes sincères remerciements sont adressés à **M^{me} ZAIDI R. et M^r IGUEROUDA M.** maîtres de conférences à l'université de Béjaia, pour nous avoir honoré par leur présence et d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse mes vifs remerciements au docteur **M^{me} AMRANE Y.** médecin en anatomie et cytologie pathologiques, et **M^r DROUI A.** pour leur aide précieuse.

Je remercie aussi Monsieur le Doyen de la faculté de nous avoir autorisé à travailler dans l'animalerie durant les Week-ends et jours fériés.

Tous les membres du Laboratoire de Microbiologie Appliquée et particulièrement l'équipe de Microbiologie du Lait et des Probiotiques, ainsi que tous mes collègues et ami(e) s sont chaleureusement remerciés.

Ma reconnaissance à toutes les personnes (enseignants, étudiants, et autres) qui m'ont aidée de près ou de loin pour mener à bien ce travail.

Dédicaces

À mes très chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon grand amour, mon estime, ma reconnaissance et ma profonde affection. Je ne saurais vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi, et ce que vous faites jusqu'à présent. Que Dieu vous garde et vous accorde longue vie.

À mes chers frères

En témoignage d'un amour spécial et de leur soutien permanent au cour des études.

À mes chères sœurs

En témoignage de mon profond respect et amour et de leur soutien moral et encouragements permanents. Avec toute mon affection fraternelle, je vous dédie ce travail.

À mes ami(e)s.

À tous ceux qui me sont chers.

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
--------------------------	----------

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. ORIGINE ET DEVELOPPEMENT DE LA MICROFLORE INTESTINALE	3
II. LES DIARRHEES INFANTILES	5
1. Définition	5
2. Agents associés aux diarrhées infantiles	5
2.1. Virus entériques	5
2.2. Parasites	5
2.3. Agents bactériens	6
2.3.1. Mécanisme d'action d'EPEC	8
3. Traitement des diarrhées	9
III. PROBIOTIQUES	10
1. Critères de sélection des probiotiques.....	11
2. Intérêt des lactobacilles probiotiques dans le traitement des diarrhées infantiles	12
3. Intérêt de l'association de probiotiques au traitement antibiotique de la diarrhée	13
IV. LACTOBACILLUS PARACASEI	15
1. Généralités	15
2. Taxonomie	15
V. LAITS INFANTILES	17
1. Généralités	17
2. Lactosérum	20
2.1. Définition	20
2.2. Composition.....	20
2.3. Utilisation du lactosérum en alimentation infantile	21

VI. Rappel sur le tube digestif du lapin.....	22
--	-----------

PARTIE PRATIQUE

MATERIEL & METHODES

I. MISE AU POINT DE LA FORMULE DE LAIT 50/50	24
1. Préparation du lactosérum	24
2. Préparation du mélange 50/50	24
II. SOUCHES UTILISEES	25
1. Revivification des souches.....	25
2. Vérification de la pureté des souches	25
3. Vérification du sérotype de la souche d'EPEC	26
4. Standardisation des <i>inocula</i>	26
III. SUIVI DE LA CROISSANCE DE <i>Lb. paracasei</i> DANS	
LE LAIT 50/50	27
IV. MISE EN EVIDENCE DE L'ANTAGONISME DE <i>Lb. paracasei</i>	
ENVERS LA SOUCHE d'EPEC EN MILIEU SOLID.....	28
1. Test de spots.....	28
2. Test de puits.....	28
V. ANTAGONISME <i>in vitro</i> EN MILIEU LIQUIDE DE <i>Lb. paracasei</i>	
ENVERS EPEC	29
VI. ETUDE <i>in vivo</i> DE L'ANTAGONISME DE <i>Lb. paracasei</i>	
ENVERS EPEC	30
1. Provocation de la diarrhée.....	30
2. Traitement	31
3. Dénombrement d' <i>E. coli</i>	31
4. Dissection	31
VII. REALISATION DES COUPES HISTOLOGIQUES	35
1. Préparation des lames.....	35
2. Etalement et coloration histologique	36
3. Observation microscopique	37

VIII. ETUDE STATISTIQUE	37
-------------------------------	----

RESULTATS & DISCUSSION

I. VERIFICATION DES ESPECES BACTERIENNES IMPLIQUEES

DANS L'ETUDE	38
--------------------	----

1. <i>Lactobacillus paracasei</i>	38
---	----

2. <i>Escherichia coli</i> enteropathogène (EPEC O ₁₁₁ B ₄).....	39
---	----

2.1. Aspects culturels	39
------------------------------	----

2.2. Identification biochimique.....	39
--------------------------------------	----

II. STANDARDISATION DES <i>inocula</i>	40
--	----

III. CROISSANCES DE <i>Lb. paracasei</i> DANS LE LAIT 50/50	41
---	----

IV. MISE EN EVIDENCE DE L'ANTAGONISME DE *Lb. paracasei*

ENVERS EPEC SUR MILIEU SOLIDE	42
-------------------------------------	----

1. Test de spots.....	42
-----------------------	----

2. Test de puits.....	43
-----------------------	----

V. ANTAGONISME *in vitro* EN MILIEU LIQUIDE DE *Lb. paracasei*

ENVERS EPEC	45
-------------------	----

VI. ETUDE <i>in vivo</i>	47
--------------------------------	----

1. Dénombrement d' <i>E. coli</i> avant contamination des lapins	47
--	----

2. Implantation d'EPEC et apparition de l'état diarrhéique	48
--	----

3. Traitement des lapins par <i>Lb. paracasei</i>	49
---	----

4. Dénombrement d' <i>E. coli</i> dans les contenus intestinaux et coliques	55
---	----

VII. ETUDE DES OBSERVATIONS DES COUPES HISTOLOGIQUES	57
--	----

CONCLUSION	61
------------------	----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Liste des abréviations

ADH : Adénine déshydrogénase
ADN : Acide desoxyribonucléique
APRIA : Association Pour la Recherche en Industrie Agriculture
ARN : Acide ribonucléique
BGP : Gélose Lactosée au Pourpre de Bromocrésol
BFP : Bandel-Forming Pilus
BSH : Bile Salt Hydrolase
DAEC : Diffusoadherente *Escherichia coli*
ECD: *Escherichia coli* Diarrhéigénique
eae: EPEC attaching and effacing
EAEC: Entéroagréative *Escherichia coli*
EAF: Effacing Attaching Factor
ECM: Extra Cellular Matrix
EHEC: Enterohemorragic *Escherichia coli*
EIEC: Enteroinvasive *Escherichia coli*
EPEC: Enteropathogen *Escherichia coli*
ETEC: Enterotoxigenic *Escherichia coli*
FAO: Food and Agriculture Organisation
Ig A: Immunoglobuline A
Ig D: Immunoglobuline D
Ig G: Immunoglobuline G
Ig M: Immunoglobuline M
IP: Inositol Phosphate
LDH: Lysine déshydrogénase
LMA : Laboratoire de Microbiologie Appliquée
log: Logarithme décimal
MRS: Man Rogosa Sharp
ODC : Ornithine décarboxylase
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ONPG: Ortho-Nitrophenol-B-D Galactopyranoside
PCA: Plat Count Agar
PCR: Polymerase Chain Reaction
PKC: Phosphokinase C
REPEC: Rabbit Enteropathogenic *Escherichia coli*
RM: Rouge de méthyle
STEC: Shigatoxin *Escherichia coli*
TDA: Tryptophane désaminase
TGI: Tractus Gastro-Intestinal
Tir: Translocate Intimin Receptor
UFC: Unité Formant Colonie
VRBG : Gélose Glucosée Biliée au Crystal Violet et au Rouge neutre

Liste des figures

	Page
Figure 1: Facteurs influençant la colonisation du TGI du nouveau né	3
Figure 2 : Mécanisme d'action d'EPEC au niveau de la cellule intestinale	9
Figure 3 : Les critères de sélection des microorganismes probiotiques	11
Figure 4 : Proportion en protéines du lait de vache, de lait humain et des formules de lait infantile	18
Figure 5 : Appareil digestif du lapin	22
Figure 6 : Systèmes d'amplification de la surface de la muqueuse intestinale	23
Figure 7 : Protocole de dénombrement d' <i>E. coli</i> dans les selles des lapins	32
Figure 8 : Les différentes étapes de la dissection	34
Figure 9 : Morphologie de <i>Lb. paracasei</i> après coloration de Gram	38
Figure 10 : La croissance de <i>Lb. paracasei</i> dans le lait 50/50	41
Figure 11 : Résultat du test de spot	42
Figure 12 : Résultat du test de puits	43
Figure 13: Résultats de la croissance d'EPEC <i>in vitro</i> dans le lait 50/50 en présence de différents taux d' <i>inocula</i> de <i>Lb. paracasei</i>	45
Figure 14: Evolution des comptes fécaux d' <i>E. coli</i> au cours de l'étude <i>in vivo</i>	49
Figure 15: Coupes histologiques des intestins grêles des lapins disséqués	58
Figure 16: Coupes histologiques des colons des lapins disséqués	59

Liste des tableaux

Tableau I : Différentes combinaisons réalisées pour l'étude de l'antagonisme <i>in vitro</i> de <i>Lb. paracasei</i> en vers EPEC	29
Tableau II : L'étape de la circulation (déshydratation, éclaircissement, imprégnation)	35
Tableau III: Etapes de la coloration histologique	36
Tableau IV : Résultats d'identification de <i>Lb. paracasei</i>	38
Tableau V : Aspects culturels d' <i>E. coli</i> sur milieux gélosés	39
Tableau VI : Résultats de l'identification de la souche d' <i>E. coli</i>	39
Tableau VII: Comptes fécaux d' <i>E. coli</i> dans les portions intestinales	55

Liste des tableaux en annexes

Annexe 1: Données bibliographiques

Tableau I : Composition en protéines, glucides, et lipides du lait humain et du lait de vache

Tableau II : Composition type de lactosérum doux et acide (g/l)

Tableau III : Caractères d'identification de la souche *d'E. coli* O₁₁₁ B₄

Annexe 2 : Résultats

Tableau I: Résultats de la croissance de *Lb. paracasei* dans le lait 50/50

Tableau II: Antagonisme en milieu liquide de *Lb. paracasei* envers *E. coli*

Tableau III: Comptes fécaux (log) *d'E. coli* du lot 1 durant l'expérimentation animale

Tableau IV: Comptes fécaux (log) *d'E. coli* du lot 2 durant l'expérimentation animale

Tableau V: Analyse de la variance des résultats des comptes fécaux *d'E. coli* durant la période de l'administration d'EPEC aux deux lots

Tableau VI: Analyse de la variance des résultats des comptes fécaux *d'E. coli* au 1^{er} jour de traitement

Tableau VII: Analyse de la variance des résultats des comptes fécaux *d'E. coli* au 2^{ème} jour de traitement

Tableau VIII: Analyse de la variance des résultats des comptes fécaux *d'E. coli* au 3^{ème} jour de traitement

Tableau IX: Analyse de la variance des résultats des comptes fécaux *d'E. coli* au 4^{ème} jour de traitement

Tableau X: Analyse de la variance des résultats des comptes fécaux *d'E. coli* au 5^{ème} jour de traitement

Tableau XI: Analyse de la variance des résultats des comptes fécaux *d'E. coli* au 6^{ème} jour de traitement

Tableau XII: Analyse de la variance des résultats des comptes fécaux *d'E. coli* au 7^{ème} jour de traitement

Tableau XIII : Analyse de la variance des résultats de l'antagonisme de *Lb. paracasei* envers *E. coli* dans le lait 50/50

Tableau XIV : Comparaison par le test de Student des résultats de l'étude de l'antagonisme en milieu liquide entre les combinaisons 2 et 3

Annexe 3 : Composition des milieux de culture

Tableau I : Milieu MRS

Tableau II : Bouillon nutritif

Tableau III: PCA (Plate Count Agar)

Tableau IV: VRBG (Gélose Glucosée Biliée au Crystal Violet et au Rouge neutre)

Tableau V : BCPL (Gélose Lactosée au Pourpre de Bromocrésol)

Glossaire

- **Aliments fonctionnels** : aliments enrichis à l'aide de composants sélectionnés tels que les minéraux, les vitamines, oligoéléments, microorganismes vivants (bactéries) dont le but au delà de la fonction alimentaire est de produire un effet spécifique favorable à la santé (Encyclopédie Wekipedia).
- **Prébiotiques** : composants alimentaires non digestibles, exerçant un effet favorable sur la flore intestinale en améliorant de ce fait la santé (Wekipedia).
- **Symbiotiques** : combinaison synergique d'un probiotique et d'un prébiotique ou de deux probiotiques (Wekipedia).
- **Dysenterie** : maladie infectieuse ou parasitaire, provoquant une diarrhée douloureuse ou sanguinolente (LAROUSSE, 1997).
- **Entérocolite** : inflammation des muqueuses de l'intestin et du colon (LAROUSSE, 1997).
- **Axénique** : Se dit d'un animal de laboratoire exempt de tout germe saprophyte ou pathogène (Wekipedia).
- **Alicament** : C'est une invention de l'industrie agroalimentaire combinant la notion d'aliment et de médicament dans le cadre d'une alimentation fonctionnelle. Il s'agit d'incorporer un nutriment destiné à soigner (ou prévenir l'apparition de) certaines maladies dans un aliment de consommation courante (Wekipedia).

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les diarrhées infectieuses représentent la principale cause de morbidité et de mortalité dans le Monde, affectant principalement les enfants. Douze (12) millions d'enfants des pays en développement meurent avant l'âge de 5 ans, et 70% de ces décès sont dus à cinq problèmes de santé publique parmi lesquels figure la diarrhée. Cette dernière est principalement causée par des agents pathogènes entériques incluant les virus, les bactéries et les parasites.

Escherichia coli diarrhéigénique est considéré comme l'organisme entéro-pathogène particulièrement impliqué dans les pays en développement (Vu Nquyen *et al.*, 2006).

En Algérie, la diarrhée due à *E. coli* entéro-pathogène (EPEC) est considérée comme la première cause responsable de mortalité infantile et la 2^{ème} cause de morbidité après les infections respiratoires aiguës.

En 1999, 21692 enfants de moins de cinq ans ont été hospitalisés pour diarrhée dont 1374 décéderont par déshydratation. L'incidence annuelle est de 2,5 épisodes de diarrhées par enfant et par an soit dix millions de cas. La répartition des cas est saisonnière avec un pic estival, ce qui explique la nécessité de renforcer la lutte chaque été en Algérie (Benbernou *et al.*, 2000).

L'évolution de la demande d'aliments sains « healthy foods » stimule l'innovation et le développement de nouveaux produits dans l'industrie alimentaire à travers le Monde (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002).

Ces dernières années, ce concept a été dirigé vers les additifs alimentaires qui peuvent exercer un effet positif sur la composition de la microflore intestinale : probiotiques et prébiotiques (Buriti Flavia *et al.*, 2005).

Avec l'émergence de la résistance bactérienne aux antibiotiques, et la suppression des agents pathogènes par voie naturelle, le concept de la biothérapie a attiré plus d'attention. Ce concept est une pratique qui utilise des bactéries commensales bénéfiques (probiotiques) pour prévenir ou traiter la colonisation de l'hôte par des organismes pathogènes (Martin *et al.*, 2004).

Les souches de bifidobactéries et de lactobacilles sont les microorganismes les plus utilisés comme probiotiques, additionnées aux laits infantiles. Ces bactéries abaissent la fréquence et la durée de certains types d'infections intestinales notamment des diarrhées. Les mécanismes impliqués dans l'inhibition et la destruction de l'agent causal de la diarrhée sont divers et nombreux : la compétition aux récepteurs sur la muqueuse intestinale, la compétition aux nutriments, la production de substances antibactériennes et la stimulation du système immunitaire (Lu et Walker, 2001).

Dans de nombreux pays, des chercheurs étudient la mise au point de produits de remplacement du lait maternel. Ces produits doivent présenter une valeur nutritionnelle égale à celle du lait de femme et pouvoir être incorporés à des formules pour bébés et être utilisés en allaitement mixte. Pour la fabrication de telles formules à partir de lait de vache, il est d'usage d'ajouter du lactosérum (sous produit de fromagerie) riche en protéines sériques, et qui est généralement rejeté dans les eaux résiduaires devenant de plus en plus source de pollution.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude qui a pour objectifs :

- La détermination de l'effet antibactérien de *Lactobacillus paracasei* à l'égard d'*E. coli* enteropathogène (EPEC) responsable de diarrhées infantiles
- La mise au point d'un alicament antidiarrhéique (lait infantile 1^{er} âge à base de lait écrémé additionné de lactosérum) fermenté au *Lb. paracasei*.
- Enfin, l'étude *in vivo* de l'effet antidiarrhéique de l'aliment sur des lapins contaminés par EPEC. Après dissection des lapins, des coupes histologiques de portions intestinales et coliques sont réalisées pour l'observation de l'éventuel effet de *Lb. paracasei* sur la restructuration de la muqueuse intestinale après une diarrhée.

I. ORIGINE ET DEVELOPPEMENT DE LA MICROFLORE INTESTINALE

A la naissance, le tractus gastro-intestinal (TGI) des nourrissons est stérile, mais il devient rapidement colonisé par une microflore dense et complexe.

Le TGI de l'Homme constitue un écosystème complexe pour une communauté de microorganismes diverse et vaste, représentant approximativement 400 espèces cultivables (Bourlioux, 1994 ; Hooper et Gordon, 2000).

Immédiatement après la naissance, la colonisation du TGI du nouveau-né a lieu. Elle dépend de plusieurs facteurs (figure 1).

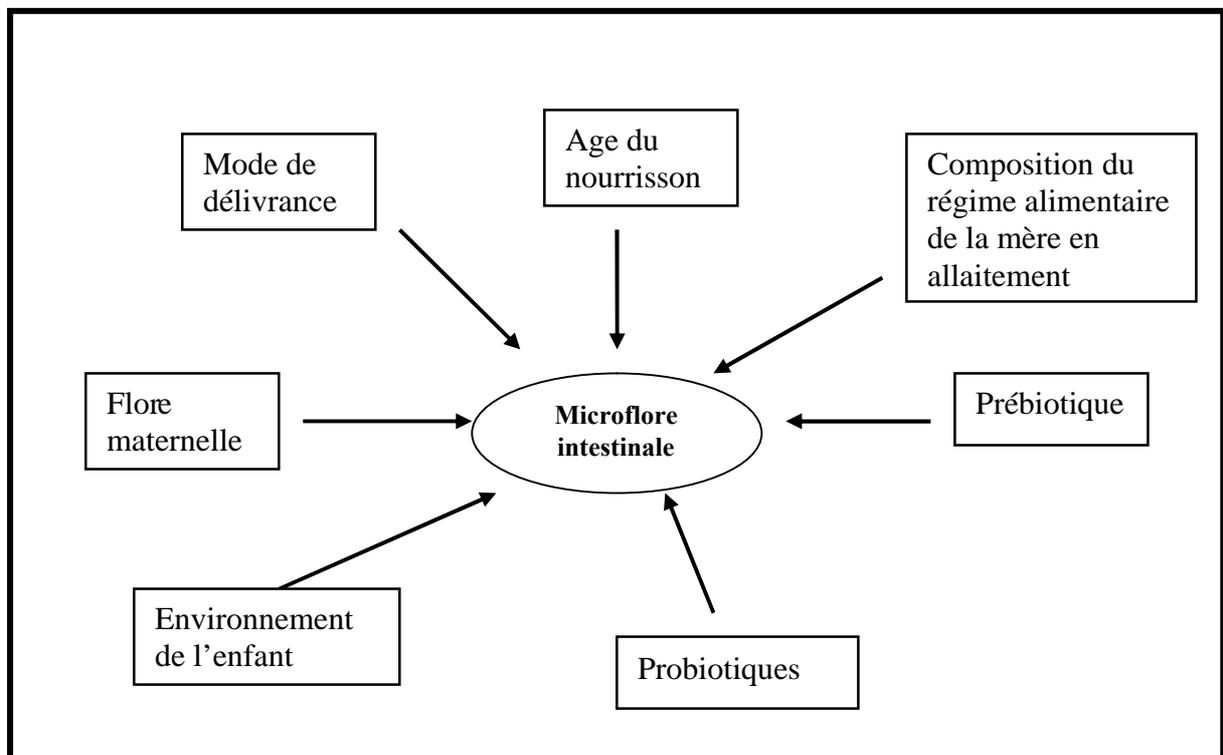


Figure 1: Facteurs influençant la colonisation du TGI du nouveau né (Bourlioux *et al.*, 2003).

Le mode de délivrance, l'utilisation d'antibiotiques, le niveau d'hygiène, et le mode d'allaitement sont connus pour exercer une influence significative sur le nombre et les espèces des microorganismes qui colonisent l'intestin (Yoshioka *et al.*, 1983).

Un changement touche la flore du nouveau né après l'allaitement, et vers la seconde année de sa vie, cette flore intestinale devient similaire à celle de l'adulte et reste relativement stable durant la vie (Saunier et Doré, 2002).

La complexité et la diversité du microbiote intestinal augmentent le long du TGI. Les plus hautes densités sont enregistrées dans l'iléon avec approximativement 10^8 bactéries/ g de contenu, et 10^{12} bactéries/ g de contenu colique (Berg, 1996).

Les souches d'*E. coli* sont les plus importantes souches d'entérobactéries qui représentent 10^8 à 10^9 cellules/g. Les nouveaux nés ont des taux élevés d'entérobactéries qu'ils ont acquises durant l'accouchement, et moins fréquemment du personnel en contact avec eux, comparativement aux adultes, qui acquièrent continuellement de nouveaux types d'*E. coli* provenant des aliments et qui rentrent en compétition avec la flore résiduelle (Bettelleim *et al.*, 2003).

Ahrné *et al.*, (2005) ont étudié l'évolution du développement de quatre espèces de lactobacilles chez les enfants âgés de 2 semaines à 18 mois, et ils ont rapporté qu'après 18 mois, *Lb. paracasei* prédomine la population des lactobacilles avec 22% suivi de *Lb. plantarum* avec 6%.

Normalement, un équilibre existe entre la pro-santé et l'anti-santé de l'organisme. Cependant, quand cet équilibre est perturbé par des facteurs environnementaux ou physiologiques, une disposition aux maladies infectieuses et immunoinflammatoires est augmentée (Gill et Guarner, 2004).

Les désordres intestinaux, le traitement antibiotique, le stress, et les changements du régime alimentaire influencent la microflore de l'individu engendrant un déséquilibre. La réduction dans la microflore normale a des effets négatifs sur la santé de l'Homme, et peut être fréquemment associée avec une grande sensibilité de l'hôte aux infections dont la diarrhée causée par les bactéries entéropathogènes (Fooks et Gibson, 2002).

II. DIARRHEES INFANTILES

1. Définition

Une diarrhée aiguë est définie par une émission fréquente et abondante de selles, liquides. Les causes sont multiples : bactériennes, virales, parasitaires, toxiques, médicamenteuses, inflammatoires, vasculaires ou psychiques.

Les diarrhées aiguës infectieuses sont les plus fréquentes. Elles sont bénignes dans les pays développés. L'évolution clinique est rapidement favorable, le microorganisme responsable n'est identifié que dans une minorité de cas et un traitement anti-infectieux est rarement nécessaire. Dans les pays en développement, ces diarrhées sont une cause majeure de mortalité infantile (Bigard, 2001).

2. Agents associés aux diarrhées infantiles

2.1. Virus entériques

Il y a quatre types de virus causant la diarrhée chez l'Homme : rotavirus, astrovirus, calcivirus humains, et adenovirus entériques.

Les rotavirus causent 25 à 70 % des cas de gastroentérites sévères et requièrent une hospitalisation chez les bébés (O'Ryan *et al.*, 2005).

2.2. Parasites

Les infections causées par les protozoaires et les helminthes apparaissent dans les régions où l'eau potable est absente et/ou l'environnement sanitaire est significativement détérioré.

Parmi les agents parasitaires, on trouve *Entamoeba histolytica*, *E. moshkovskii*, *Giardia albicans* (O'Ryan *et al.*, 2005).

2.3. Agents bactériens

Les agents bactériens responsables des diarrhées infantiles sont divers: *Campylobacter jejuni/coli*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Vibrio cholerae*, *Clostridium defficile*, ...

E. coli diarrhéigénique (ECD) est la cause importante des diarrhées endémiques et épidémiques dans le Monde (O’Ryan *et al.*, 2005).

Ces organismes ont été classés en six catégories, mais Nataro et Kaper (1998) les ont subdivisé en 8 pathovares :

- *E. coli* enteropathogène (EPEC) (typique et atypique)
- *E. coli* enteroinvasive (EIEC)
- *E. coli* diffusoadhérente (DAEC)
- *E. coli* enteroagregative (EAEC)
- *E. coli* enterohémorragique (EHEC)
- *E. coli* producteur de shiga toxines (STEC)
- *E. coli* enterotoxinogène (ETEC).

Les souches d’EPEC sont différenciées en deux catégories : EPEC typiques qui expriment la formation d’une liaison (à la cellule hôte) par un pili (BFP), et EPEC atypiques qui sont déficientes du plasmide codant au facteur d’adhérence responsable de la morphogénèse du BFP d’EPEC (Pelayo *et al.*, 1999 ; Vieira *et al.*, 2001).

Ces différentes classes d’ECD sont identifiées par la présence de gènes codant des facteurs de virulence spécifiques qui sont absents chez les souches non pathogènes.

Les pathotypes cités précédemment sont classés sur la base de leurs caractéristiques cliniques et leurs propriétés de virulence (Rappelli *et al.*, 2005).

Ce groupe d’ECD est l’agent bactérien le plus détecté dans les études réalisées dans les pays en développement, causant 30 à 40% de diarrhées aiguës chez les enfants.

- ❖ EAEC, EPEC, et ETEC causent des diarrhées endémiques, et ils sont fréquemment retrouvés chez les enfants âgés de moins de 2 ans.
- ❖ ETEC causent la diarrhée du voyageur dans les pays en développement.
- ❖ EIEC est l'agent de la diarrhée aqueuse et de la dysenterie chez les enfants âgés de 12 à 48 mois (O'Ryan *et al.*, 2005).

Dans une étude menée par Franzolin *et al.* (2005) au Salvador, Bahia et Brésil, sept catégories parmi les huit d'*E. coli* diarrhéigénique ont été détectées. Durant la même étude, l'isolat le plus fréquent était EPEC atypique à 10,1%, suivi par ETEC avec 7,5 % et EAEC avec 4,2 %. Dans une autre étude réalisée par Dow *et al.* (2006) en Libye, seuls les pathotypes EPEC et EAEC ont été retrouvés avec une dominance d'EPEC.

Les souches d'EPEC étaient les premières rapportées par John Bray en 1945 comme étant la cause de diarrhée en pédiatrie à Londres. Au début des années 1950, dans les pays développés notamment en France, EPEC était responsable de gastroentérites infantiles, causant la mort de nombreux nourrissons. C'est pourquoi de nombreux sérums furent développés pour détecter par agglutination les sérogroupes dits EPEC (Prère et Fayet, 2005).

2.3.1. Mécanisme d'action d'EPEC

La première étape de ce mécanisme consiste à l'adhérence d'EPEC aux cellules épithéliales par la formation d'une liaison au pili (BFP) (figure 2).

Après cet attachement initial, les microvillosités sont perturbées et EPEC secrète différents facteurs de virulence à travers un système de sécrétion III dans la cellule hôte. EPEC s'attache aux protéines Tir (Translocation intimin receptor) par leur protéine membranaire intimine. L'activation des protéines kinases C (PKC) et l'inositol triphosphate (IP3) et la libération du Ca^{2+} apparaissent dans les cellules épithéliales. Plusieurs protéines du cytosquelette, spécialement l'actine, sont attirées au site de fixation d'EPEC. Des réarrangements cytosquelettiques apparaissent après la liaison Tir-intimine aboutissant à la formation d'une structure de piédestal (Lu et Walker, 2001).

L'infection par EPEC s'effectue initialement par l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales, et à priori par la capacité d'une protéine membranaire l'intimine à causer des lésions d'attachement et d'effacement dans le mucus intestinal (Rodriguez *et al.*, 2004; Prère et Fayet, 2005). Après colonisation, EPEC cause des changements dans le fonctionnement des cellules épithéliales en incluant des altérations marquées dans la perméabilité des cellules (Czerucka et Rampal, 2002 ; Clarke *et al.*, 2003).

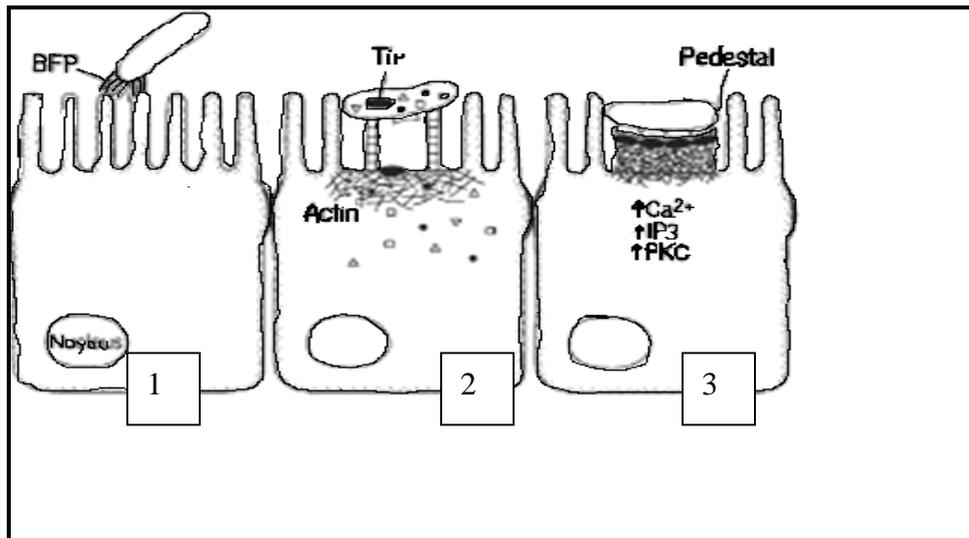


Figure 2 : Mécanisme d'action d'EPEC au niveau de la cellule intestinale (Lu et Walker, 2001).

L'immunité contre les infections à EPEC se développe graduellement durant l'enfance suite aux réponses immunitaires dues aux infections microbiennes répétées dans le tractus gastro-intestinal (Fernandes Campos *et al.*, 2002).

3. Traitement des diarrhées

Selon Cézard *et al.* (2002), la diarrhée est due à un déséquilibre entre l'absorption et la sécrétion intestinale d'eau et d'électrolytes. C'est pourquoi le traitement des diarrhées aiguës de l'enfant repose essentiellement sur la correction des pertes en eau et en électrolytes et sur le maintien de l'équilibre hydroélectrolytique. Cela est possible par l'utilisation des solutions de réhydratation orale, associée à une réalimentation précoce.

En dehors des antibiotiques qui ont des indications spécifiques, les médicaments considérés comme antidiarrhéiques (inhibiteurs de la motricité intestinale, les antisécrétoires, et les agents intraluminaux) sont pour la majorité des traitements adjuvants visant à améliorer le confort du patient. Ces médicaments ont des mécanismes d'action très différents les uns des autres (Cézard *et al.*, 2002 ; Enoncé de la société Canadienne de pédiatrie, 2003).

L'utilisation de ces médicaments antidiarrhéiques est préconisée du fait que le traitement antibiotique affecte le microbiote intestinal causant une réduction de certains anaérobies totaux comme les bifidobactéries. Les bactéries commensales potentiellement pathogènes (*Clostridium difficile*, *Escherichia coli*) peuvent alors prendre le dessus conduisant à un déséquilibre de la microflore colique. Cela induit des modifications au niveau de la capacité fermentaire avec une diminution de la production des acides gras à courte chaîne, perturbant ainsi l'absorption de l'eau et du sel et réduisant ainsi l'apport énergétique pour les cellules épithéliales, ce qui aggrave d'avantage l'état diarrhéique (Cinquin, 2005).

De plus, dans plusieurs pays, il y a une augmentation de l'antibiorésistance de la majorité des bactéries pathogènes entériques en incluant *Schigella* sp., les pathotypes d'*E. coli* associés aux diarrhées, *Campylobacter jejuni/coli* et *Salmonella* sp. Ces agents sont résistants à plusieurs classes d'antibiotiques (O'Ryan *et al.*, 2005).

Dans le but de soulever les problèmes associés aux déséquilibres de la flore intestinale, ou pour améliorer généralement la santé de l'hôte, le concept de la modulation de la microflore humaine par l'administration de probiotiques a été établi (Marcenler *et al.*, 2003 ; Shanahan, 2003).

III. PROBIOTIQUES

L'intérêt des bactéries lactiques ou probiotiques en matière de santé humaine a été proposé au début du siècle passé, en 1907 par Metchnikoff. Selon lui, les lactobacilles pouvaient réduire la putréfaction intestinale en modifiant la microflore de l'intestin, et aussi prolonger la vie des consommateurs (Drouault et Corthier, 2001).

En 2002, l'OMS et la FAO ont défini précisément les probiotiques comme « une culture pure ou mixte de microorganismes vivants, qui une fois administrés à l'Homme ou à l'animal avec des taux adéquats "affectent" bénéfiquement l'hôte par l'amélioration de la flore indigène ».

1. Critères de sélection des probiotiques

Pour être probiotique, un microorganisme doit avoir un certain nombre de critères qui sont résumés dans la figure 3:

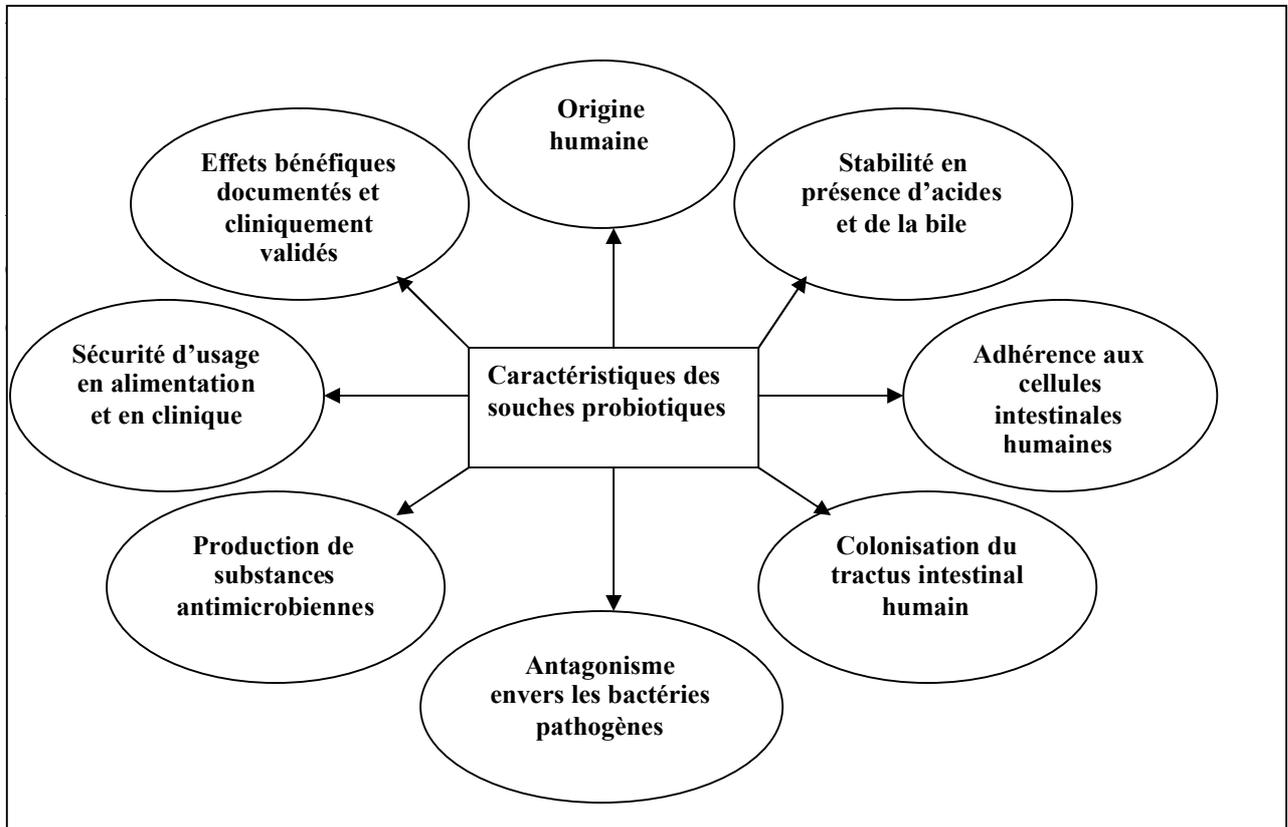


Figure 3 : Les critères de sélection des microorganismes probiotiques (Mosilhey, 2003).

L'adhésion à la muqueuse intestinale de l'Homme est actuellement considérée comme un élément essentiel pour les bactéries probiotiques dans le but d'exercer leur action positive (Morelli *et al.*, 2006).

Malgré le manque de preuves vérifiables, quelques études sont apparues et indiquent la relation entre l'adhésion *in vitro* et la colonisation *in vivo* (Cesena *et al.*, 2001 ; Castagliuolo *et al.*, 2005).

Récemment, il a été indiqué que l'adhésion à la muqueuse intestinale est une propriété bactérienne importante, reliée aux effets bénéfiques des lactobacilles durant l'inflammation (Gueimonde *et al.*, 2006).

La propriété d'adhésion a été observée en utilisant des essais *in vitro* avec des cultures de cellules intestinales humaines. Mais l'efficacité de la colonisation *in vivo* a été déduite à partir des échantillons de selles (Morelli *et al.*, 2006).

2. Intérêt des lactobacilles probiotiques dans le traitement des diarrhées infantiles

Les lactobacilles représentent un groupe hétérogène de bactéries lactiques anaérobies ou micro-aérophiles. Ils sont habituellement présents dans la microflore intestinale de l'adulte sain où ils constituent une partie de cette dernière (Ahrne *et al.*, 1998 ; Mohamadzadeh *et al.*, 2005).

Ils sont communément utilisés comme probiotiques avec des effets spécialement contre les diarrhées aiguës des enfants (Reid *et al.*, 2003).

Des études microbiologiques ont indiqué que *Lb. paracasei* est parmi les espèces de lactobacilles prédominantes dans la cavité buccale, et qu'elle est fréquemment détectée dans les fèces humains (Dal Bello *et al.*, 2003 ; Dal Bello et Hertel, 2006).

Dans une étude réalisée par Nomcova *et al.*, (1999), l'administration de *Lb. paracasei* diminue significativement le nombre de Clostridies et d'Entérobactéries dans les selles de porcs allaités. L'efficacité de *Lb. reuteri* dans le traitement de la diarrhée aiguë au rotavirus a été démontrée par Shonikova *et al.* (1997).

L'étude menée en Algérie par Bouderaa (1994), a montré l'efficacité du traitement et de la prévention de la diarrhée infantile chez les nourrissons ayant reçu du lait fermenté par *Bf. breve* et *Streptococcus thermophilus* en comparaison au groupe n'ayant reçu que du lait infantile (Martine, 2000).

En effet, l'étude réalisée par Sarker *et al.*, (2005) au Bangladesh sur des enfants âgés de 4 à 24 mois souffrant de diarrhée, a montré que l'administration de *Lb. paracasei* dans une solution de réhydratation orale était très efficace pour traiter les diarrhées infectieuses autres que celles causées par les rotavirus.

3. Intérêt de l'association de probiotiques au traitement antibiotique de la diarrhée

La diarrhée est causée par la croissance rapide de la bactérie pathogène en cause dans l'intestin grêle et le colon. Les probiotiques sont utilisés comme agents thérapeutiques efficaces dans le cas où la cause exacte de la diarrhée est inconnue. Ainsi administré dans le yaourt, *Lactobacillus GG* était efficace dans le contrôle de la diarrhée induite par l'érythromycine (Bezkorovainy, 2001).

La supplémentation des formules de lait infantile avec des probiotiques prévient la diarrhée chez les enfants à hospitalisation chronique. La souche de *Lactobacillus GG* est la plus utilisée dans les études sur l'effet des probiotiques sur la diarrhée (Vandenplas, 1999). Selon Goldin (1992), l'administration de cette souche dans les solutions de réhydratation orale tend à réduire la durée de la diarrhée, bien que cet effet semble être limité aux gastroentérites virales. Cette souche peut aussi diminuer la durée de la diarrhée associée aux antibiotiques (Rautanen *et al.*, 1998 ; Vanderhoof *et al.*, 1999). Une supplémentation journalière avec des probiotiques vivants durant et après une antibiothérapie permet de réduire la perturbation de la microflore intestinale et aussi de réduire l'incidence et le nombre total de souches résistantes aux antibiotiques (Plummer *et al.*, 2005).

Lactobacillus GG a été bénéfique comme traitement prophylactique des maladies gastro-intestinales (Marteau *et al.*, 2001), et de la diarrhée en particulier, chez les enfants qui n'ont pas été nourris au sein (Guarner et Malagelada, 2003).

Une réduction de la diarrhée a été observée chez des enfants qui avaient reçu un traitement antibiotique supplémenté avec des lactobacilles en comparaison à ceux recevant l'amoxicilline durant 10 jours chez lesquels la diarrhée était intense (Heyman, 2000).

IV. LACTOBACILLUS PARACASEI

1. Généralités

Lactobacillus paracasei fait partie du groupe II (*Streptobacterium*) des bactéries lactiques de la classification de Orla-Jensen. Ce groupe représente des lactobacilles homofermentaires mésophiles et ils peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat (Bourgeois et Larpent, 1996 ; Guiraud, 2003). Le glucose est transformé en 2 molécules de lactate et la transformation est effectuée par la voie d'Embden-Meyerhof dont l'enzyme clé est la fructose 1-6 diphosphate aldolase. Les pentoses peuvent être fermentés en lactate et acétate par la voie hétérofermentaire dont l'enzyme clé est la pentulose phosphocétolase (De Roissart et Luquet, 1994). Ce groupe renferme des souches à catalase négative et produisant de l'acide lactique L.

Lb. paracasei est une souche active de l'intestin grêle. Elle a des activités enzymatiques lui permettant de jouer un effet barrière et de limiter l'expression pathogénique de certaines bactéries indésirables. Elle est présente dans les produits Triphidus ® 5 (Anonyme 1).

Les souches de *Lb. paracasei* sont potentiellement utilisées comme des cultures ajoutées au lait de fromagerie pour améliorer le développement d'arômes (Antonsson, *et al.*, 2003), et contrôler les activités microbiennes indésirables telles que celles de Clostridies et des lactobacilles formant les gaz (Christensen *et al.*, 2006).

2. Taxonomie

Le groupe *Lb. casei* comprend les espèces : *Lb. zae*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, et *Lb. rhamnosus*. Les trois dernières sont utilisées comme probiotique chez l'Homme et l'animal.

Historiquement, ce groupe comprenait seulement une espèce : *Lb. casei* qui était divisé en 5 sous- espèces : *Lb. casei* ssp. *casei*, *alactosus*, *pseudopantarum*, *tolerans* et *rhamnosus* (Klein *et al.*, 1998).

C'est en 1989 que Collins et ses collaborateurs proposaient la reclassification du groupe *Lb. casei*. Ils décrivaient deux nouvelles espèces : *Lb. paracasei* et *Lb. rhamnosus*. Cependant, la description de nouvelles espèces était basée sur des expériences d'homologie ADN/ADN, et la description phénotypique était très limitée (Klein *et al.*, 1998).

Dicks *et al.* (1996), proposaient une révision du groupe *Lb. casei*. D'après ces auteurs, *Lb. paracasei* et toutes les espèces proches doivent être incluses dans l'espèce *Lb. casei*.

Selon Klein *et al.* (1998), ce groupe est subdivisé en 4 sous-groupes :

1. *Lb. zae* : Sa souche type est ATCC15820^T, auparavant rattachée à *Lb. rhamnosus*.
2. *Lb. casei* : qui engloberait maintenant les souches de *Lb. paracasei*, mais ce changement n'est pas accepté par tous.
3. *Lb. paracasei* : pour ceux qui restent fidèles à l'ancienne classification.
4. *Lb. rhamnosus* : Sa souche type est ATCC7469^T.

Toutes ces espèces comportent des souches probiotiques (Dagosta, 2001).

Ward et Timmins (1999) ont pu différencier entre *Lb. casei*, *Lb. paracasei* et *Lb. rhamnosus* par la PCR.

Selon la nomenclature courante basée sur l'homologie ADN/ADN, la majorité des souches de *Lb. casei* étaient identifiées comme appartenant à l'espèces *Lb. paracasei*.

Actuellement, les souches de *Lb. casei/paracasei*, *Lb. zae*, et *Lb. rhamnosus* sont représentées par le groupe de *Lb. casei*, l'un des 3 groupes des lactobacilles (Holzapfel et Schillinger, 2002).

Selon Kaplan et Hothinks (2003), *Lb. paracasei* était classé comme *Lb. plantarum*, mais il a été reclassé tel que *Lb. paracasei* en se basant sur le typage ribosomique et le séquençage de l'ARN 16S.

V. LAITS INFANTILES

1. Généralités

Le lait maternel est l'aliment naturel pour la croissance rapide de l'enfant, car il fournit tous les nutriments nécessaires et en proportions équilibrées.

Originellement, les formules de lait infantiles étaient basées sur le lait de vache non modifié contenant 80% de caséine et 20% de protéines sériques (Lien, 2003). Cependant, un excès de protéines provoquait dans le côlon le développement d'une microflore dite de putréfaction avec des selles alcalines, excellent milieu de culture pour les microorganismes pathogènes (Cinquin, 2005).

En comparaison avec le lait de vache, le lait humain est plus fluide avec un rapport 60 : 40 de protéines sériques /caséine (Lien, 2003).

La composition protéique, glucidique, et lipidique du lait humain et du lait de vache est indiquée dans le tableau I en Annexe 1.

Le taux de protéines dans les formules infantiles doit donc être réduit pour rétablir une concentration protéique voisine de celle retrouvée dans le lait maternel. De plus, les protéines du lait de vache sont des molécules étrangères pour l'organisme humain. La conséquence immunologique est l'intolérance aux protéines du lait de vache qui peut avoir des conséquences sévères sur la santé de l'enfant (diarrhée, choc allergique, troubles digestifs, ...) (Host, 2002). La composition protéique du lait de vache, du lait de femme, et des formules infantiles est représentée dans la figure 4.

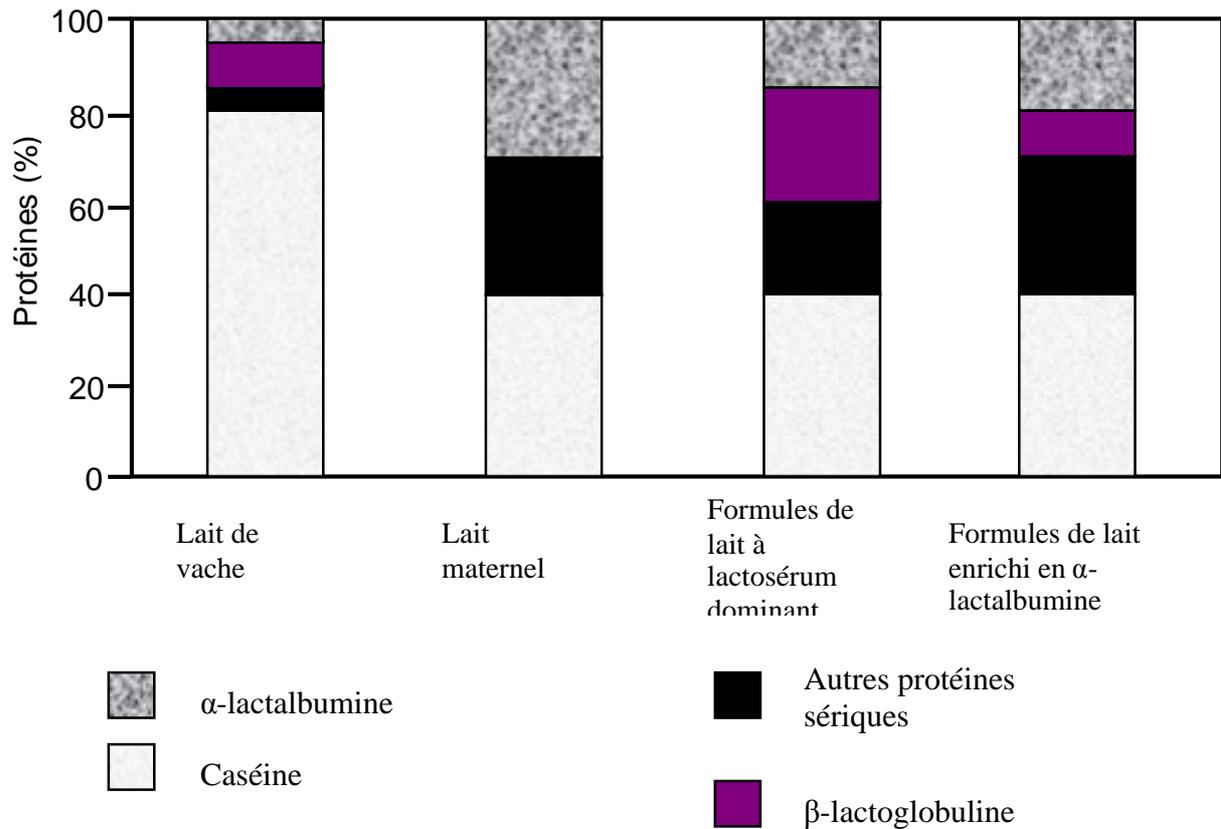


Figure 4 : Proportion en protéines de lait de vache, de lait humain et des formules de lait infantile (Lien, 2003).

En 1961 la première formule de lait infantile à base de lait de vache, avec une dominance de lactosérum a été développée. Le profil protéique de cette formule et les apports nutritionnels recommandés pour l'enfant ressemblaient à ceux du lait humain. De plus, la méthode de production de ces formules où le lactosérum déminéralisé est prédominant avait comme résultat la diminution de la concentration minérale par rapport au lait de vache (Lien, 2003).

L'évolution des connaissances scientifiques et des procédés industriels de fabrication a permis d'améliorer la qualité nutritionnelle des laits infantiles afin d'obtenir des préparations lactées proches du lait maternel (Cinquin, 2005).

Cependant, le lait humain contient des hormones, des facteurs immunitaires, des facteurs de croissance, des enzymes et des cellules viables, qui ne peuvent pas être ajoutés à ces préparations.

L'introduction de formules enrichies en nutriments destinées à des enfants après une hospitalisation est un exemple d'un nouveau type de formule désignée pour répondre aux exigences de ces enfants ayant des besoins nutritifs spéciaux (Carver, 2003).

La supplémentation de ces formules par des nutriments ou ingrédients (nucléotides, lactoferrine, acides gras polyinsaturés) pouvant avoir une action préventive contre les infections et les risques allergiques, est une approche plus spécifique de la fabrication des laits infantiles. La voie la plus intéressante et sans doute la plus prometteuse est l'ajout de probiotiques et/ou prébiotiques pour l'amélioration de ces formules infantiles. Cette amélioration a pour objectif de favoriser la colonisation du microbiote intestinal par les bifidobactéries et les lactobacilles afin d'obtenir chez les enfants nourris avec des laits infantiles une microflore similaire à celle retrouvée chez les nourrissons allaités au sein, et renforcer leur protection contre les troubles gastro-intestinaux (Carver, 2003).

Il a été démontré que les formules infantiles contenant des probiotiques permettaient de traiter et de prévenir les diarrhées associées aux rotavirus et aux bactéries pathogènes chez les jeunes enfants (Chouraqui *et al.*, 2004 ; Salvini *et al.*, 2004).

2. Lactosérum

Le lactosérum est un produit "découvert" il y a plus de 3000 ans avant Jésus Christ, par des bédouins lors du transport de lait : l'acidification et la coagulation par la chaleur provoquaient la formation d'un liquide au dessous d'un caillé de lait (De Witt, 1998).

Pendant de nombreuses années, considéré comme un déchet encombrant, un sous produit des fromageries et de caséineries, le lactosérum était épandu dans les champs ou utilisé tel quel pour l'alimentation animale. Mais les contraintes sur les rejets devenant de plus en plus sévères, ont permis la mise au point de procédés de traitement et de valorisation devenant impératifs depuis les années 70. Le développement de techniques de séparation par membrane, en particulier l'ultrafiltration a permis de répondre en partie à cette nouvelle donnée (Jacquet-Violleau, 1999).

2.1. Définition

Le lactosérum est un dérivé de la fabrication fromagère et de celle de caséines. C'est le liquide résiduel obtenu après l'action de la présure pour l'obtention du fromage (lactosérum doux), ou l'acidification par des bactéries lactiques (lactosérum acide).

Après la précipitation des protéines, le lactosérum se présente sous forme d'une solution jaune verdâtre, due à la présence de riboflavine (Roufik, 2001).

2.2. Composition

Le lactosérum est la phase liquide se séparant du caillé lors de la transformation du lait en fromage ou de la production de caséine. Un lactosérum « acide » est obtenu après coagulation du lait par précipitation des caséines à leur pH isoélectrique de 4,6. L'acidification peut être obtenue par fermentation. Par contre, si la coagulation du lait provient de la déstabilisation des micelles de caséines sous l'action de la présure, le lactosérum obtenu est dit « doux ». Le lactosérum est donc un milieu dilué complexe

dont la composition dépend du lait d'origine et du procédé de coagulation des caséines (Roufik, 2001).

Le lactosérum, constitué essentiellement d'eau, contient du lactose, des minéraux et des protéines (Roufik, 2001). Le tableau II en Annexe 1 montre la composition des deux types de lactosérum.

Les lactosérums ont globalement une composition quasi identique à celle du lait privé de sa caséine et de sa matière grasse. La matière sèche représente 65 à 71g/l de lactosérum. Globalement les matières sèches contenues dans le lactosérum sont riches et pour 100g des matières sèches on trouve : 70-80g de lactose; 10-14g de matière azotée; 7-12g de matière minérale; 0,05-0,6g de matière grasse (APRIA, 1973).

Les protéines du lactosérum représentent environ 20% de la totalité des protéines laitières et sont principalement constituées de β - lactoglobuline (56,60%), d' α - lactalbumine (18,24%), d'immunoglobulines (6-12%) et de sérum albumine (6-12%). De plus, elles contiennent de la lactoferrine, du lysozyme et des fragments de caséines anciennement connus sous le nom de protéose-peptone (Lemay, 2000).

2.3. Utilisation du lactosérum en alimentation infantile

Le lactosérum est un produit intéressant par ses teneurs en protéines, sa richesse en acides aminés indispensables (lysine et tryptophane), en lactose et la présence de nombreuses vitamines du groupe B tel que la thiamine et la riboflavine. La valeur nutritionnelle de ce sous produit de fromagerie conduit de plus en plus à son utilisation dans l'alimentation humaine (Schuck *et al.*, 2004).

Le lactosérum était utilisé pour fabriquer des laits infantiles en poudre. Cela a été l'une des premières utilisations des poudres de lactosérum doux, mais les quantités utilisées étaient bien assez faibles (APRIA, 1973).

VI. Rappel sur le tube digestif du lapin

L'appareil digestif chez les mammifère est composé en générale d'une succession de compartiments dont la muqueuse est en contact avec le bol alimentaire : la bouche, l'oesophage, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum puis iléon), le cæcum, le côlon (proximal et distal), puis le rectum aboutissant à l'anusc. Celui du lapin est très particulier : l'intestin grêle représente une faible part du tractus digestif (56% de la longueur et 12% du volume de l'ensemble intestin grêle-cæcum-côlon), alors que le cæcum est très développé : en volume, il représente 90% de l'ensemble intestin grêle-cæcum côlon, alors que pour la plupart des espèces domestiques, il compte seulement pour 4 à 11% de cet ensemble (figure 5).

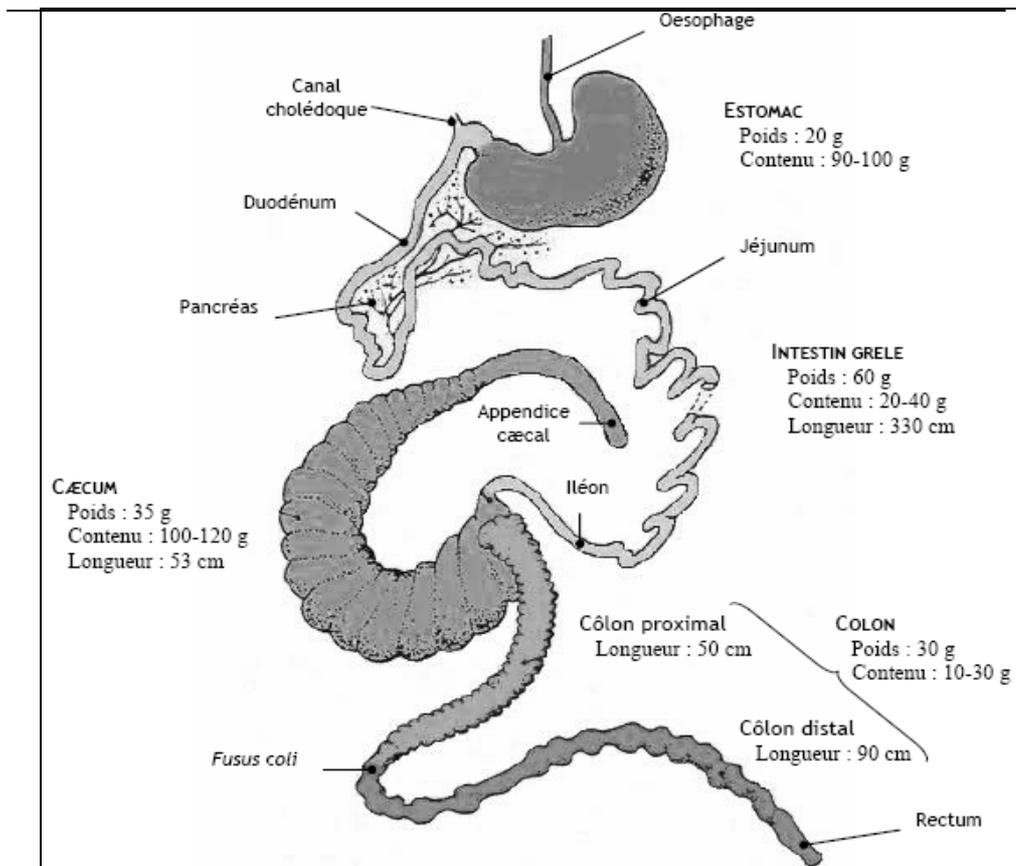


Figure 5 : Appareil digestif du lapin (Lebas *et al.*, 1997).

L'intestin grêle représente une augmentation considérable de la surface d'échange entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. Au plan anatomique, il mesure environ 3 mètres de long chez l'adulte, et est replié en anses intestinales. Il est classiquement divisé en 3 parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. A la surface de la paroi intestinale, les valvules conniventes, replis circulaires macroscopiques, participent également à l'augmentation de la surface d'échange. Puis, la muqueuse présente d'innombrables petites évaginations de quelques centaines de μm appelées villosités. Au niveau cellulaire, les entérocytes présentent à leur surface apicale une multitude de replis : les microvillosités (figure 6).

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

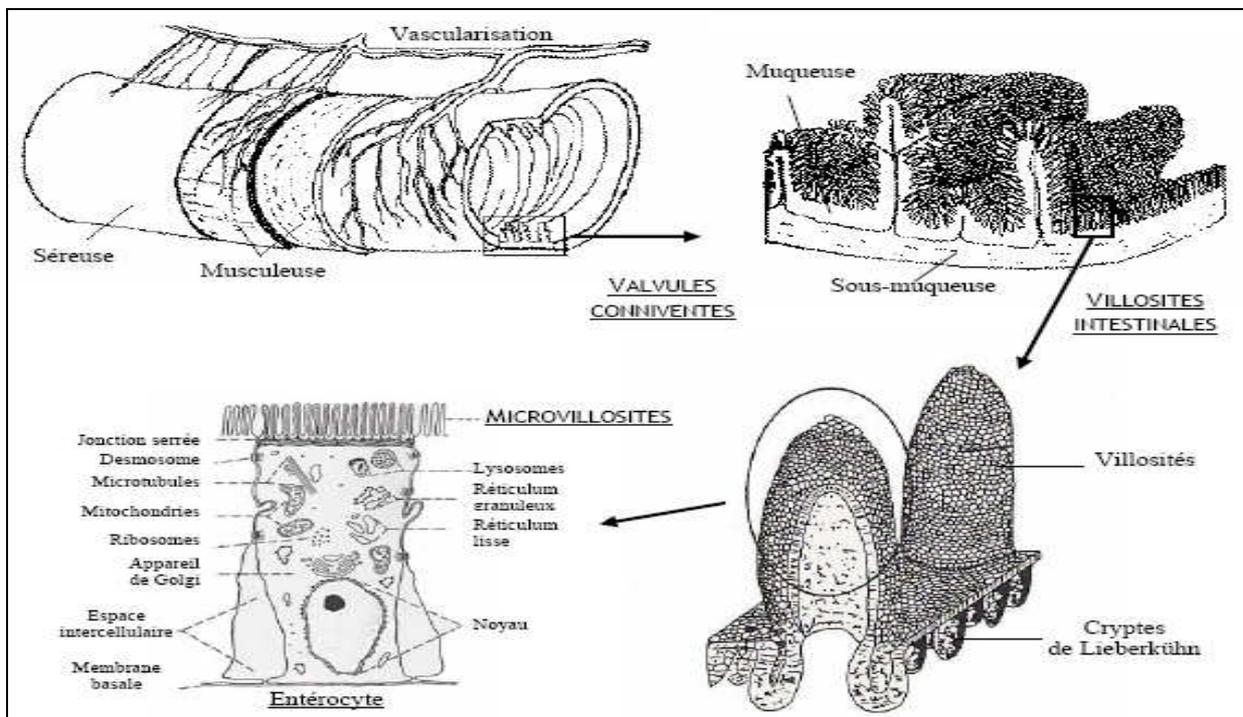


Figure 6 : Systèmes d'amplification de la surface de la muqueuse intestinale (Gallois, 2006)

I. MISE AU POINT DE LA FORMULE DE LAIT 50/50

Le lait infantile 50/50 (lait écrémé/lactosérum) mis au point par Asselate (2006) sera fermenté par *Lb. paracasei*, et sera utilisé comme alicament dans l'étude *in vivo*.

1. Préparation du lactosérum

Le lactosérum est préparé comme suit :

- 100g de lait écrémé sont dissouts dans un litre d'eau distillée stérile (pH=7) par agitation à l'aide d'un agitateur magnétique. Le lait ainsi préparé est stérilisé par tyndallisation (chauffage à 75°C/30 mn trois fois toutes les 24h).
- Une fois le lait stérilisé, 2 à 3 pincées de présure en poudre sont stérilement ajoutées au lait pour permettre la précipitation des protéines (caséines) du lait et obtention du lactosérum. La présure est inactivée par chauffage à 60°C/30mn.

2. Préparation du mélange 50/50

- Le mélange 50/50 de lait écrémé et de lactosérum est préparé dans des flacons de 200 ml. Un volume de 100 ml de lactosérum est ajouté à 100 ml de lait écrémé stérile.
- Pour vérifier la stérilité du mélange, un test est réalisé en ensemençant en masse 1 ml du mélange sur gélose nutritive et incubé à 30°C et 43°C / 24 à 48h.
- Le mélange de lait écrémé/lactosérum est utilisé comme milieu de culture pour la suite du travail.

II. SOUCHES UTILISEES

Le micro-organisme utilisé comme probiotique dans cette étude est une souche de *Lactobacillus paracasei* isolée par SAIT (2004) à partir des selles d'un nourrisson et identifiée comme telle par séquençage de l'ARN 16S.

La souche cible est une souche d'*Escherichia coli* entérotoxigène (EPEC :O₁₁₁ B₄) isolée et identifiée par Hamma (2001), et qui est responsable de diarrhées infantiles.

Ces deux souches font partie de la collection bactérienne du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'université A. Mira de Béjaïa.

1. Revivification des souches

- Les souches de *Lb. paracasei* et d'EPEC étaient conservées dans le bouillon MRS et sur gélose nutritive inclinée (GN) respectivement à 4°C.
- Leur revivification consiste à transférer 1 ml de la souche de *Lb. paracasei* et une ansée d'EPEC dans les bouillons MRS (pH 6,5) et bouillon nutritif (pH 7,1) respectivement. Ces bouillons sont incubés à 37°C/ 24h.

2. Vérification de la pureté des souches

Avant toute utilisation des souches, une vérification de leur pureté est indispensable. Après quelques repiquages successifs, des tests rapides et simples permettent de vérifier la pureté des souches :

- Aspect des colonies obtenues après isolement sur gélose MRS à 37°C / 48h pour la souche *Lb. paracasei*, et sur VRBG, BCP et EMB à 37°C/24h pour la souche d'EPEC.
- Coloration de Gram.
- Test de la catalase.

En plus de ces tests, le test de la fermentation des sucres est effectué pour la souche de *Lb. paracasei*.

Test de la fermentation des sucres

La fermentation de quelques sucres par la souche de *Lb. paracasei* est testée selon la méthode de Desmazeud (1996).

Ce test consiste à l'ensemencement de 10 ml de bouillon MRS et la récupération du culot après 24 h d'incubation à 37°C par centrifugation à 8000g pendant 20 mn à 4°C. Le culot récupéré est lavé à l'eau physiologique stérile à deux reprises, puis resuspendu dans de l'eau physiologique. Cette suspension sert à ensemencer un bouillon MRS sans sucres, additionné uniquement du sucre à tester à raison de 0,5 % et un indicateur coloré (rouge de chlorophénol) à raison de 0,02% (Guireaud et Galzy, 1980) préalablement préparé.

Par la suite le bouillon est incubé en anaérobiose à 37°C pendant 24 h à 4 jours. La fermentation se traduit par un virage de la couleur du rouge au jaune.

3. Vérification du sérotype de la souche d'EPEC

Avant la réalisation de l'étude *in vivo*, il était indispensable de vérifier le sérotype de la souche d'EPEC. Pour cela, une goutte du sérum anti-EPEC est mise en contact avec une colonie d'EPEC sur une lame propre. Après quelques minutes on vérifie la formation d'un agglutinat (Gallois, 2006).

4. Standardisation des *inocula*

Du fait que l'activité de tout agent antibactérien est dépendante de la densité de la suspension cellulaire de la souche cible utilisée (Leroy et De Vuyst, 2001), une standardisation des *inocula* des deux souches est indispensable.

Après revivification des souches, un isolement de la souche de *Lb. paracasei* sur la gélose MRS (pH 6,5) est effectué.

Après la période d'incubation à 37°C/48 h, trois colonies identiques et bien isolées sont repiquées dans 10 ml de bouillon MRS (pH 6,5). Au bout de 18h d'incubation à 37°C, un dénombrement des colonies est effectué après la réalisation d'une série de dilutions décimales allant jusqu'à 10⁻⁹.

La même procédure est répétée avec la souche d'EPEC en repiquant deux colonies identiques dans le bouillon nutritif (pH 7,1). Le dénombrement est effectué sur la gélose VRBG (pH 7,4) après incubation à 44°C /24h.

III. SUIVI DE LA CROISSANCE DE *Lb. paracasei* DANS LE LAIT 50/50

L'*inoculum* préparé à partir de trois colonies isolées sur gélose MRS est standardisé à 10^6 cellules /ml après 18 h d'incubation à 37°C.

A partir de cette culture, une série de tubes en double contenant 9 ml de lait 50/50 stérile estensemencée par 1 ml de l'*inoculum* de départ. Après chaque intervalle de temps (4 heures), un tube est pris à partir duquel 1 ml de la culture subit un dénombrement sur boîte de Petri. Au terme de 48 h d'incubation à 37°C, les colonies sont dénombrées.

IV. ETUDE *in vitro* : MISE EN EVIDENCE DE L'ANTAGONISME DE *Lb. paracasei* ENVERS LA SOUCHE D'EPEC SUR MILIEU SOLIDE

Pour la détection de l'activité antagoniste de la souche test, deux tests sont utilisés. Leur principe est basé sur la diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de culture pour inhiber la croissance de la souche cible (*E. coli*).

1. Test des spots

L'activité antibactérienne de *Lb. paracasei* à l'égard d'EPEC est mise en évidence par un test d'antagonisme direct qui est le test des spots. Après avoir rempli les boîtes de Pétri avec la gélose MRS (solidifiée et séchée), 5µl de la suspension bactérienne de la souche *Lb. paracasei* (obtenue après 18 h d'incubation à 37°C) sont déposés en spots. Les boîtes sont séchées près du bec Benzün pendant 30 min puis incubées à 37°C/24 h (Bayoub *et al.*, 2006).

Après la période d'incubation, la gélose MRS est recouvertes de 5 ml d'une gélose semi-molle de PCA en surfusion ensemencée avec 0,1ml d'une culture fraîche de la souche d'EPEC à 10⁶cellules/ml, puis incubées à 37°C/24h. Au terme de la période d'incubation, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré.

2. Test de puits

Le surnageant de la culture fraîche de *Lb. paracasei* est collecté par centrifugation à 8000 g/20mn à 4°C.

Des boîtes de Petri en double couche sont préparées en introduisant environ 20ml de la gélose semi-molle PCA dans les boîtes et après solidification, on les recouvre avec 5ml d'une gélose de PCA en surfusion ensemencée à raison de 10⁶ cellules/ml à partir d'une culture de 18h d'*E. coli*.

Après solidification, des puits de 6mm de diamètre et de 4 mm de profondeur sont creusés dans la gélose à l'aide d'une baguette en verre stérile (Aslim *et al.*, 2005). Le fond des puits est scellé à l'aide de quelques gouttes de la gélose PCA (Tagg et McGiven, 1971).

Après séchage des boites (30min à la température du laboratoire), les puits sont remplis avec environ 100µl du surnageant de culture à l'état brut de la bactérie test.

La diffusion du surnageant de culture (substances antibactériennes) dans la gélose est obtenue après entreposage des boites pendant 1h à 4°C. Les boites sont ensuite incubées pendant 18 h à 37°C (Petros *et al.*, 2006).

L'activité antibactérienne est détectée par la présence de zones d'inhibition autour des puits.

V. ANTAGONISME *in vitro* EN MILIEU LIQUIDE DE *Lb. paracasei* ENVERS EPEC

L'étude de l'antagonisme *in vitro* de la souche probiotique à l'égard de la souche d'EPEC en milieu liquide est effectuée en culture mixte dans le lait 50/50.

Dans le but de déterminer l'*inoculum* pour lequel la souche de *Lb. paracasei* a le maximum d'activité, trois *inocula* de cette dernière sont testés à savoir : 10^7 , 10^8 , 10^9 cellules /ml.

La culture mixte des deux souches *Lb. paracasei* et EPEC est réalisée tel qu'il est indiqué dans le tableau I :

Tableau I : Différentes combinaisons réalisées pour l'étude de l'antagonisme *in vitro* de *Lb. paracasei* en vers EPEC

	EPEC	<i>Lb.paracasei</i>	Lait 50/50
1^{ère} combinaison	1 ml(10^7)	1ml (10^{10})	8 ml
Concentration réelle	10^6 /ml	10^9 /ml	
2^{ème} combinaison	1ml (10^7)	1ml (10^9)	8 ml
Concentration réelle	10^6 /ml	10^8 /ml	
3^{ème} combinaison	1ml (10^7)	1ml (10^8)	8 ml
Concentration réelle	10^6 /ml	10^7 /ml	
Témoin	1ml (10^7)		9ml
Concentration réelle	10^6 /ml		

La culture est incubée à 37°C, et le dénombrement est effectué après 6, 12, 15, 18, 21 et 24 h d'incubation.

Le suivi de la croissance bactérienne d'EPEC est basé sur le dénombrement par comptage des colonies sur milieu VRBG.

VI. ETUDE *in vivo* DE L'ANTAGONISME DE *Lb. paracasei* ENVERS EPEC

L'étude a porté sur 10 lapins holoxéniques, âgés de 30 jours. Ces lapins sont repartis en deux lots de quatre lapins chacun et repartis dans des cages individuelles. Les deux autres sont utilisés comme témoins : un témoin diarrhéique et un témoin sans aucun traitement.

L'élevage de ces lapins est effectué au niveau de l'animalerie (bien aérée et propre) de l'université de Béjaia. Ces animaux ont été d'abord installés une semaine avant, dans le milieu qui leur était réservé pour éviter toute instabilité de leur microflore intestinale qui serait due au stress ou au régime alimentaire. Chaque lapin est placé seul dans une cage conçue pour ce genre d'expérimentation.

Pour estimer le nombre d'*E. coli* dans la flore fécale, un dénombrement a été effectué sur gélose BCP avant de procéder à l'expérimentation.

1. Provocation de la diarrhée

La diarrhée est provoquée par l'administration par voie orale d'une dose journalière de 1 ml du mélange de lait/lactosérum 50/50 contenant 2.10^7 cellules/ml d'EPEC (préferment).

Le préferment à EPEC est préparé tous les jours durant la période de contamination, et cela par ensemencement de deux colonies de 24 heures (isolées sur gélose nutritive), dans 10 ml de lait 50/50 et incubées à 37°C/ 18 h.

2. Traitement

Juste après l'apparition de la diarrhée, les lapins sont traités comme suit:

- ❖ Lot 1: les lapins reçoivent 1 ml de la formule de lait 50/50 stérile par voie orale.
- ❖ Lot 2: les lapins reçoivent 1 ml de lait 50/50 fermenté avec *Lb. paracasei*.

Ce lait fermenté est préparé quotidiennement par l'ensemencement de deux colonies de 48 heures isolées sur gélose MRS dans 10 ml de lait 50/50 stérile et incubées 18 h à 37°C.

Ce traitement est suivi jusqu'à disparition complète de l'état diarrhéique.

3. Dénombrement de *E. coli*

Avant chaque dénombrement, la cage du lapin est nettoyée.

Le dénombrement d'*E. coli* est effectué tous les matins pendant toute la période de l'expérimentation animale, et il est réalisé comme suit :

- durant la période de contamination par EPEC ;
- durant les 7 jours de traitement avec *Lb. paracasei*;

Après 4 heures de l'administration de la dose d'EPEC ou de traitement, les selles sont recueillies à l'aide d'une spatule stérile dans une boîte de Petri stérile et immédiatement transportées au laboratoire pour procéder au dénombrement.

La procédure de dénombrement est rapportée dans la figure 7.

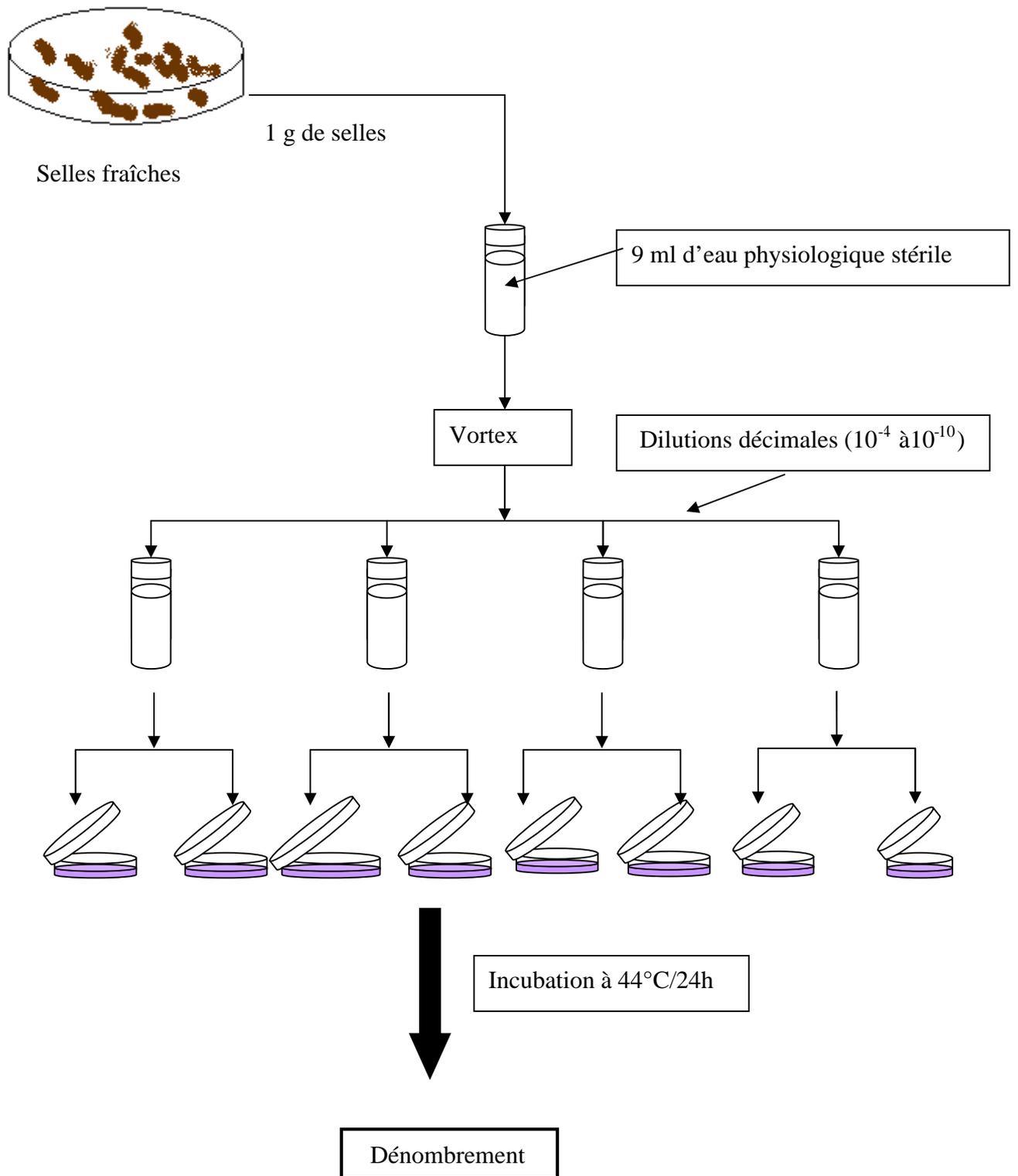


Figure 7: Protocole de dénombrement d'*E. coli* dans les selles des lapins.

L'état sanitaire, le comportement, et les selles (aspect, consistance et volume) des lapins ont été suivis au terme de l'étude.

4. Dissection

La dissection est effectuée à différentes étapes de l'expérimentation animale :

- Un lapin n'ayant reçu aucun traitement (témoin) est disséqué après 7 jours du début de l'étude.
- Un autre lapin est disséqué dès apparition d'un état diarrhéique persistant.
- Un troisième lapin rendu diarrhéique est disséqué après sept jours de traitement avec le lait fermenté au *Lb. paracasei*.
- Un quatrième lapin diarrhéique et n'ayant reçu que du lait 50/50 stérile est également disséqué après sept jours de déclenchement de la diarrhée.

Les étapes de la dissection sont représentées sur la figure 8. Elle est réalisée comme suit :

- Après l'installation du lapin (anesthésié avec un tampon imbibé de chloroforme dans une cloche) sur une plaque stérile et dans une zone stérile, une petite incision au niveau du ventre est réalisée à l'aide d'une lame de dissection stérile.
- A l'aide d'une pince stérile, la peau est soigneusement écartée.
- Des portions de l'intestin et du colon sont prélevées et mises dans 100 ml de formol à 10%.

Pour évaluer le nombre d'*E. coli* dans l'intestin et le colon, le contenu de ces portions est récupéré dans une boîte de Petri stérile pour servir à un dénombrement d'*E. coli* après avoir réalisé des dilutions décimales, et les boîtes sont incubées à 44°C/24 h.

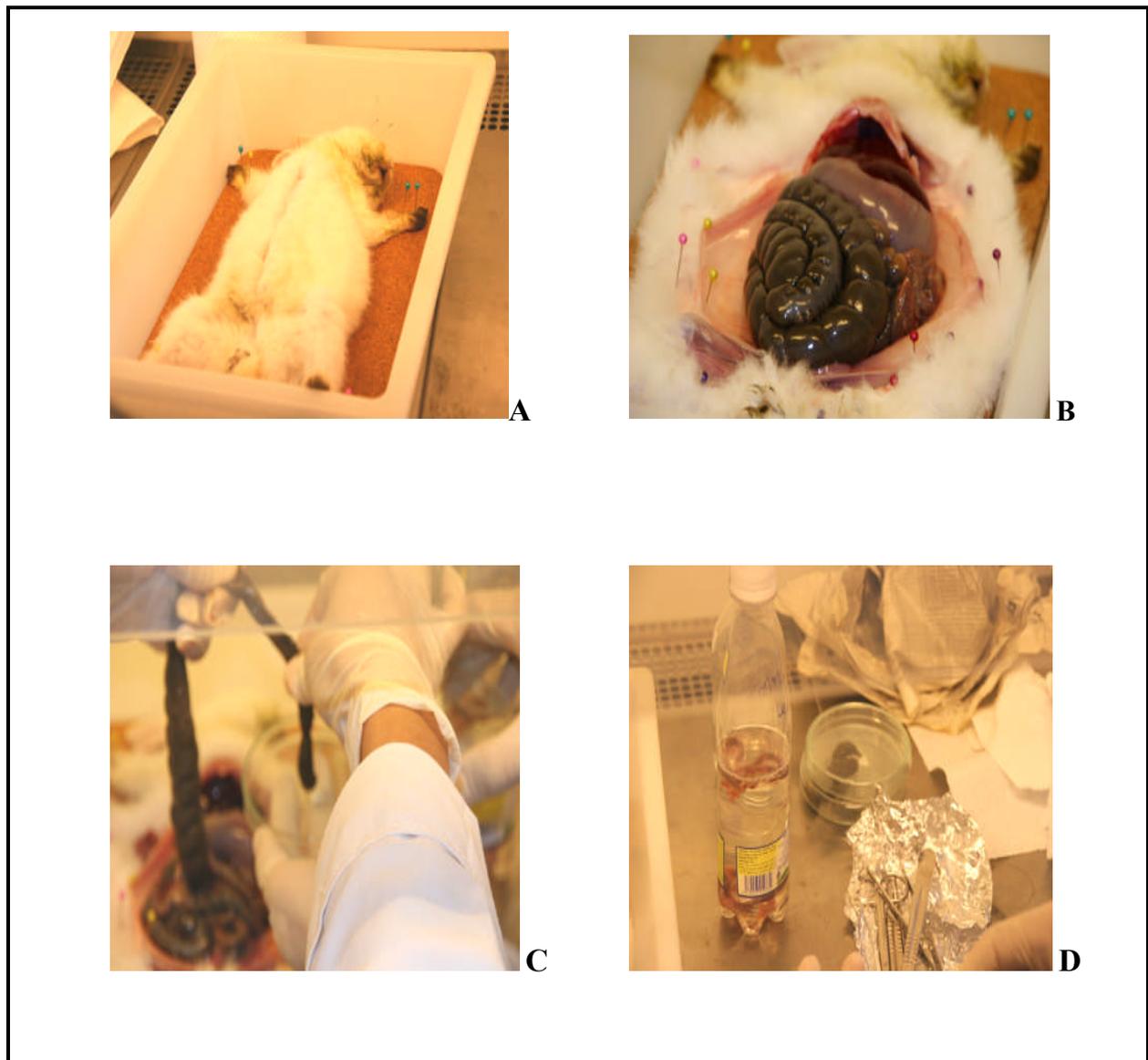


Figure 8 : Les différentes étapes de la dissection.

A : Fixation du lapin "anesthésié au chloroforme" sur une plaque

B : Ecartement de la peau

C : Récupération des contenus intestinal et colique

D : Fixation des portions coliques et intestinales dans le formol

VII. REALISATION DES COUPES HISTOLOGIQUES

1. Préparation des lames

Les coupes histologiques des portions intestinales et coliques des lapins disséqués sont réalisées au niveau du laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques du D^r AMRANE (Béjaia), selon la méthode de Hould (1984). Cette méthode consiste en plusieurs étapes : la circulation (déshydratation, éclaircissement, imprégnation), l'enrobage, la microtomie, l'étalement, et la coloration. Les étapes de la circulation sont résumées dans le tableau II :

Tableau II : L'étape de la circulation (déshydratation, éclaircissement, imprégnation)

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

2. Etalement et coloration histologique

Pour pouvoir couper au microtome, les segments sont enrobés dans des blocs de paraffine. Les coupes histologiques réalisées au microtome (5µm d'épaisseur) sont étalées sur des lames. Ces dernières subissent une coloration qui est effectuée selon les étapes décrites dans le tableau III :

Tableau III: Etapes de coloration histologique

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

3. Observation microscopique

L'observation microscopique des lames préparées est réalisée au microscope photonique (grossissement x 40), muni d'un appareil photographie.

VIII. ETUDE STATISTIQUE

Dans le but de voir si une différence significative existe entre les résultats obtenus, une analyse statistique est réalisée.

Les tests utilisés dans cette étude statistique sont le test de l'analyse de la variance de Fisher-Snedecor et le test de Student (Liorzou, 1985).

➤ Signification des symboles utilisés

CM_f : Carré moyen factoriel.

CM_r : Carré moyen résiduel.

ddl : Degré de liberté.

F_{the} : Valeur critique déterminée de la table de distribution de Snedecor : p= 0,95, 0,99, ou 0,999.

F_{obs} : Valeur du facteur de Fisher-Snedecor observée ou calculée.

SCE_f : Somme des carrées et des écarts factoriels.

SCE_r : Somme des carrées et des écarts résiduels.

SCE_t : Somme des carrées et des écarts totaux.

t_{obs} : Valeur t calculée.

t_{the} : Valeur t de la table de Student.

V_f : Variation factorielle.

V_r : Variation résiduelle.

V_t : Variation totale.

La différence entre les résultats est dite significative quand les valeurs de **F_{obs}** et **t_{obs}** sont supérieures ou égales à celles de **F_{the}** et **t_{the}**.

I. VERIFICATION DES ESPECES BACTERIENNES IMPLIQUEES DANS L'ETUDE

1. *Lactobacillus paracasei*

La souche probiotique utilisée dans cette étude (*Lb. paracasei*) a donné sur gélose MRS de petites colonies blanchâtres avec un diamètre de 1mm.

Les différents tests de vérification de l'identité de cette souche sont résumés dans le tableau IV (Sait, 2004):

Tableau IV : Résultats d'identification de *Lb. paracasei*

Test	Résultats
Gram	+
Catalase	-
Maltose	+
Mannitol	+
Galactose	+
Inositol	-
Thréalose	+
Lactose	+
Cellobiose	+
Fructose	+
Mannose	+
Rhamnose	-
salicine	+
Conclusion	<i>Lactobacillus paracasei</i>



Figure 9: Morphologie de *Lb. paracasei* après coloration de Gram (12,5x100x5)

2. *Escherichia coli* enteropathogène (EPEC) O₁₁₁B₄

2.1. Aspects culturels

L'isolement de la souche d'*E. coli* sur différents milieux de culture a donné les résultats rapportés dans le tableau V :

Tableau V : Aspects culturels d'*E. coli* sur milieux gélosés

Milieu de culture	Aspect
VRBG	Colonies roses arrondies
BCP	Colonies jaunâtres arrondies
EMB	Colonies violettes foncé avec reflet métallique et un centre opaque

2.2. Identification biochimique

Quelques tests essentiels pour l'identification de la souche d'*E. coli* ont été réalisés.

Les résultats sont indiqués dans le tableau VI :

Tableau VI : Résultats de l'identification de la souche d'*E. coli*

Test	Résultats
Gram	-
Catalase	+
Mobilité	+
VP/RM	-/+
Indole	+
Mannitol	+
Glucose	+
Galactose	+
Lactose	+
H ₂ S/CO ₂	-/+

+ : positif

- : négatif

Ces résultats ont permis de confirmer que la souche est une souche d'*E. coli*. Les résultats de l'identification complète réalisée par Hamma (2001) sont présentés dans le tableau III en Annexe 1.

La confirmation de l'appartenance de cette souche au sérotype O₁₁₁B₄ a été effectuée en utilisant le sérum anti *E. coli* O₁₁₁B₄ (Institut Pasteur d'Alger), et une agglutination a été observée sur la lame (résultat positif).

Donc l'ensemble de ces résultats confirme qu'il s'agit bien de la souche EPEC O₁₁₁B₄ incriminée dans les diarrhées des nourrissons de moins d'un an.

II. STANDARDISATION DES *inocula*

Après 18 h d'incubation pour les deux espèces bactériennes, le nombre de cellules viables par ml de culture est de :

- 10⁷ cellules /ml pour EPEC
- 10¹⁰ cellules /ml pour *Lb. paracasei*

Pour obtenir les taux d'*inocula* nécessaires aux études ultérieures, des dilutions ont été réalisées.

III. CROISSANCE DE *Lb. paracasei* DANS LE LAIT 50/50

La croissance de la souche étudiée a été suivie dans le lait 50/50. La figure 10 représente la courbe de croissance de cette souche.

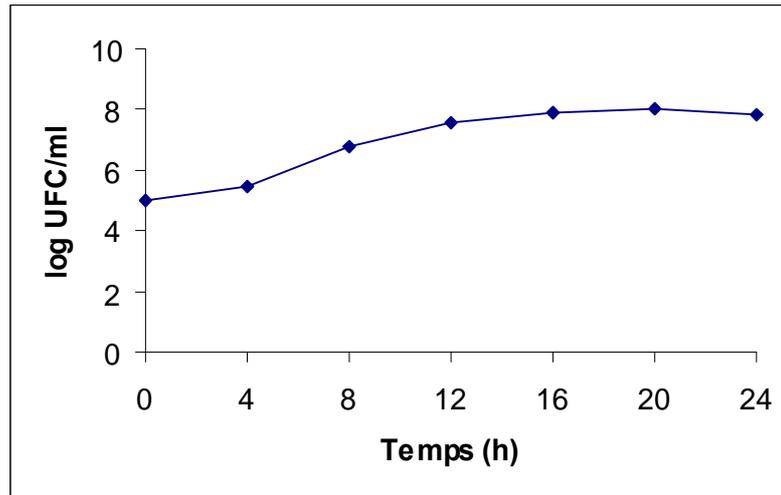


Figure 10 : Croissance de *Lb. paracasei* dans le lait 50/50

Cette figure indique que *Lb. paracasei* suit une croissance normale dans le lait 50/50, où on distingue les trois phases essentielles de la croissance bactérienne.

IV. MISE EN EVIDENCE DE L'ANTAGONISME DE *Lb. paracasei* ENVERS EPEC SUR MILIEU SOLIDE

1. Test de spots

Le test d'antagonisme direct utilisé est le test de spot. Le résultat de ce test est indiqué dans la figure 11.

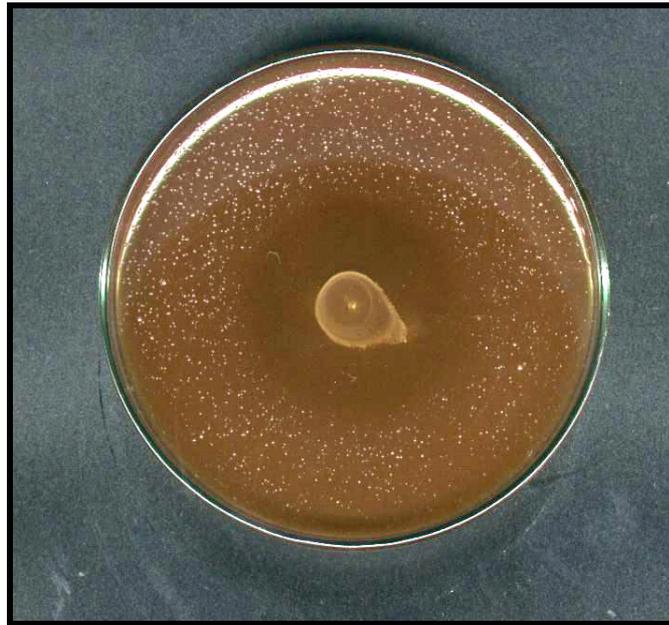


Figure 11: Résultat du test de spot

La figure 11 montre une bonne activité antibactérienne de la souche test avec un diamètre de zone d'inhibition de 17 mm. Cela indique que *Lb. paracasei* est capable de synthétiser des substances antibactériennes à l'égard d'*E. coli*.

2. Test de puits

Après 24 h d'incubation à 37°C, une zone d'inhibition de 14 mm de diamètre autour du puit a été observée (figure 12).



Figure 12 : Résultat du test de puits

Selon les résultats de ces deux tests (spot et puits), on peut conclure que la souche de *Lb. paracasei* a un effet inhibiteur vis-à-vis d'*E. coli*. Cette inhibition peut être due à la production d'un ou de plusieurs métabolites qui peuvent être des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, ou encore des substances antibactériennes de nature protéique.

D'après Atanassova *et al.* (2003), une souche de *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* M3 (isolée d'un fromage Bulgare), était capable de produire une substance antimicrobienne de nature protéique. Cette substance a été purifiée, et son spectre d'action a été testé envers plusieurs microorganismes à savoir : *Lb. bulgaricus* 340, *Listeria innocua* F, *Bacillus subtilis*, *Salmonella* sp., *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* HB 101, et 25 souches de levures.

Les résultats ont indiqué que *Lb. paracasei* M3 avait un large spectre d'activité.

Rodriguez *et al.* (2000) ont isolé des souches de *Lb. paracasei* productrices de bactériocines actives sur plusieurs genres bactériens (*Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, ...).

En plus des substances de nature protéique, l'effet antibactérien de *Lb. paracasei* peut être dû à la production d'un autre agent antimicrobien qui est le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Ocana *et al.* (1999) ont montré que les souches de *Lb. paracasei* F2 et F28 génèrent des taux élevés de H₂O₂ inhibant la croissance de *Staphylococcus aureus* démontré sur boîte de Petri.

Jacobsen *et al.* (1999) et Topisirovic *et al.* (2006) ont étudié *in vitro* l'activité antibactérienne *Lb. paracasei* à l'égard de quelques espèces pathogènes :

L. monocytogenes, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *S. typhimurium*, ...

V. ANTAGONISME *in vitro* EN MILIEU LIQUIDE DE *Lb. paracasei* ENVERS EPEC

Cette étude a été réalisée en suivant l'évolution du nombre d'EPEC (ensemencé à 10^6 cellules/ml) en fonction du temps (h), en présence de trois taux différents (10^7 , 10^8 et 10^9 cellules /ml) de la souche test (*Lb. paracasei*).

Les résultats rapportés dans la figure 13 montrent que la souche d'EPEC cultivée seule (témoin) suit une courbe de croissance normale, et atteint la phase exponentielle au bout de 6h d'incubation.

Tandis qu'en culture mixte, la croissance d'EPEC en présence des trois taux d'*inocula* de *Lb. paracasei*, suit une stabilisation ou une réduction du nombre initial.

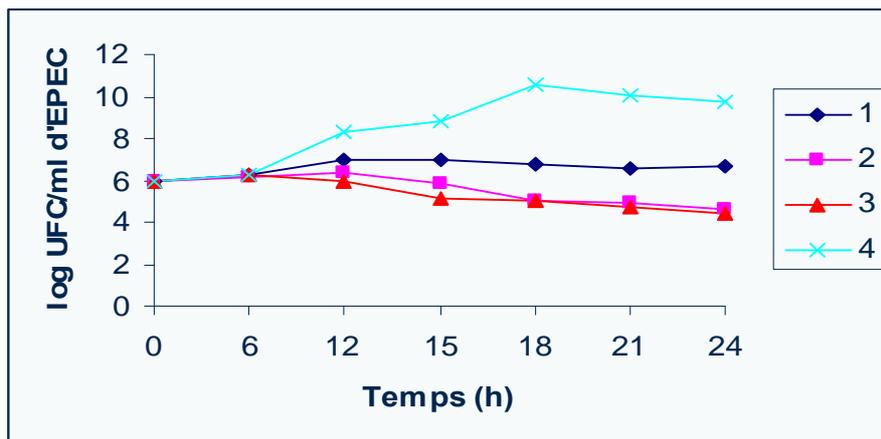


Figure 13: Résultats de la croissance d'EPEC *in vitro* dans le lait 50/50 en présences de différents taux d'*inocula* de *Lb. paracasei*.

- 1 : 10^6 /ml d'EPEC + 10^7 /ml de *Lb. paracasei*
- 2 : 10^6 /ml d'EPEC + 10^8 /ml de *Lb. paracasei*
- 3 : 10^6 /ml d'EPEC + 10^9 /ml de *Lb. paracasei*
- 4 : Croissance d'EPEC en culture pure

- Stabilisation : de 0 à 12h :

Dans cette phase, on observe une augmentation du nombre d'EPEC en présence de 10^7 /ml, 10^8 /ml de *Lb. paracasei*, et une petite diminution avec 10^9 /ml de cette dernière à partir de 6h d'incubation.

Ce résultat peut être expliqué par le fait que la souche de *Lb. paracasei* n'a pas le taux de cellules nécessaire qui lui permet d'exercer son effet antagoniste.

- Réduction : de 12 à 24 h

Durant cette phase, une diminution remarquable du nombre d'EPEC est observée pour les trois taux de *Lb. paracasei* avec cependant des différences significatives (tableau VIII, Annexe 2) entre 10^7 /ml d'une part et 10^8 /ml et 10^9 / ml d'autre part.

En effet, on n'observe pas de différences notables entre 10^8 /ml et 10^9 /ml ($t_{\text{obs}} (0,980 < t_{\text{the}} (2,179))$) (tableau XIV, Annexe 2). Pour ces deux taux, EPEC subit quasiment la même inhibition. Ainsi le taux de 10^8 UFC/ml de *Lb. paracasei* sera retenu pour l'étude *in vivo* et ensemencé dans le lait 50/50 (lait écrémé/lactosérum).

Selon la figure 13, le maximum d'inhibition est obtenu entre 18 et 24h d'incubation. Cette période correspond au début de la phase stationnaire de la croissance de *Lb. paracasei* tel qu'indiqué sur la figure 10. Ce résultat est similaire à celui rapporté par Atanassova *et al.* (2003) où l'activité antimicrobienne de *Lb. paracasei* M3 étudiée était maximale en fin de phase exponentielle.

La diminution du nombre d'EPEC dans la culture mixte peut être interprétée par les effets antagonistes de la souche test. On suppose que cette souche a produit des substances ou des métabolites qui ont un effet antibactérien à l'égard d'EPEC.

Caridi (2002) a montré qu'une souche de *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* avait une activité antibactérienne à l'égard d'*E. coli* très marquée. Cette inhibition a été attribuée à la production de substances assimilées aux bactériocines.

VI. ETUDE *in vivo*

1. Dénombrement d'*E. coli* avant contamination des lapins

Dans le but d'évaluer les comptes fécaux d'*E. coli* chez les lapins, un dénombrement de cette espèce bactérienne dans les selles fraîches a été réalisé avant l'administration de la souche d'EPEC.

Après dénombrement, une moyenne de $8,25 \cdot 10^2$ cellules d'*E. coli* /g de selles a été enregistrée. Or, dans l'étude réalisée par Bendali (2003) sur des souris, une moyenne de $4,8 \cdot 10^4$ cellules /g de selles a été retrouvée avant contamination de ces dernières. Cette différence du compte fécal d'*E. coli* dans le contenu intestinal est probablement dû à la différence de colonisation des deux espèces animales.

La microflore digestive du lapin évolue avec l'âge, notamment au moment du sevrage. Elle est caractérisée par la dominance de bactéries anaérobies strictes de genre *Bacteroides*, que l'on retrouve à tous les niveaux du tube digestif. Clostridies et bifidobactéries sont aussi présents, mais l'autre particularité de la microflore du lapin réside dans le fait que la microflore aero-anaérobie facultative, quantitativement moins importante, ne comporte pas ou très rarement des lactobacilles ainsi qu'une population réduite ou absente d'*E. coli*, chez le lapin sevré. De même, les entérocoques sont présents de façon irrégulière (Guillot et Ruckebusch, 1994).

Cependant, toute augmentation de la flore colibacillaire intestinale au delà de 10^4 UFC/ml du contenu caecal est anormale chez le lapin (Marlier *et al.*, 2003).

Selon ces auteurs, les colibacilles pathogènes des lapins (REPEC) sont similaires aux EPEC humains, et ils ont le même mode d'action : ils s'attachent à la muqueuse intestinale où ils provoquent l'effacement et la lésion des villosités intestinales.

2. Implantation d'EPEC et apparition de l'état diarrhéique

Le déséquilibre qui touche la microflore intestinale peut conduire à la diarrhée. Une dose de 2.10^7 /ml d '*E. coli* entéropathogène était suffisante pour déclencher la diarrhée après 5 jours d'administration de cette dernière.

Au bout de ces 5 jours, le nombre d '*E. coli* a augmenté de $8,25.10^2$ à $1,75.10^7$ /g dans les selles.

L'évolution des comptes fécaux d '*E. coli* dans les deux lots au terme de l'expérimentation est présentée sur la figure 14, et dans les tableaux III et IV de l'Annexe 2.

D'après la figure 14, on constate que la diarrhée n'est pas apparue immédiatement après l'administration de 10^7 /ml d'EPEC. Cela est dû au fait qu'un grand nombre de cette souche est détruit avant d'arriver à l'intestin grêle et au côlon. Cette diminution du nombre peut être le résultat de l'effet du pH gastrique, des sels biliaires, et aussi de l'effet barrière de la microflore intestinale.

Le nombre d '*E. coli* qui arrive à l'intestin (pH neutre) augmente suite à l'implantation et à la multiplication de cette souche. De plus, l'apport quotidien d'EPEC permet d'augmenter le nombre de cette souche jusqu'à arriver à la dose infectante qui est supérieure à 10^6 /ml (Harris, 2006).

L'analyse de la variance des comptes fécaux d '*E. coli* durant la période d'administration d'EPEC (tableau V, Annexe 2) a montré qu'il n'y a aucune différence significative entre les deux lots ($F_{\text{obs}} (0,185 < F_{\text{the } 0,95} (4,08))$).

3. Traitement des lapins par *Lb. paracasei*

Dès l'apparition d'une diarrhée persistante, les lapins du lot1 recevaient quotidiennement 1 ml de lait 50/50 stérile, et ceux du lot 2 recevaient une dose journalière de 1ml contenant 10^8 /ml de *Lb. paracasei* durant 7 jours.

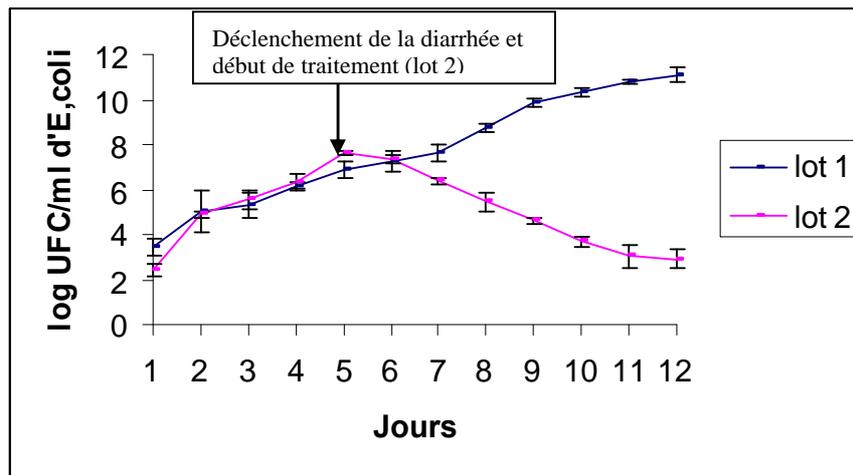


Figure 14: Evolution des comptes fécaux d'*E. coli* au cours de l'étude *in vivo*.

Chez les lapins du lot1 (non traités) recevant 1ml de la formule de lait 50/50 stérile, l'état diarrhéique a persisté 7 jours après l'arrêt de la contamination. Durant cette période, l'état de santé des lapins s'est détérioré (diminution de prise d'aliments, changement de comportement).

Au terme de cette période, on a noté que le volume des selles devenait de plus en plus grand avec un aspect mou.

Cette élévation du nombre d'*E. coli* après l'arrêt de contamination qui augmente de 4 log ($1,75.10^7$ /g au début de la diarrhée à $1,28.10^{11}$ /g en fin d'expérimentation) peut s'expliquer par l'implantation et la multiplication de la souche d'EPEC au niveau des cellules épithéliales qui sont favorisées par l'état immunitaire immature des lapins.

Par contre chez les lapins traités (lot 2), le nombre d'*E. coli* commence à diminuer 24 h après le traitement. Cette diminution devient hautement significative après 48 h de la prise du traitement ($F_{\text{obs}}(24,28) > F_{\text{the}}(0,99) 13,7$).

Après 4 jours, une réduction de 4 log ($2,15 \cdot 10^7$ à $4,7 \cdot 10^3/\text{g}$) a été enregistrée. C'est au terme de cette période que l'état diarrhéique a disparu en notant la reprise de l'aspect et de la consistance des selles et une amélioration de l'état sanitaire des lapins.

Au 7^{ème} jour de traitement, les comptes fécaux d'*E. coli* paraissent retrouver leur valeur initiale.

L'analyse de la variance des résultats de cette étude après chaque jour de traitement (tableaux VI à XII en Annexe 2) a montré que la différence du nombre d'*E. coli* dans les selles de lapins des deux lots, devenait très hautement significative à partir du 3^{ème} jour de traitement ($F_{\text{obs}}(637,95) > F_{\text{the}}(0,999) (35,5)$).

Donc, la différence du compte fécal d'*E. coli* chez les lapins des deux lots ne serait due qu'au traitement administré (lait 50/50 fermenté au *Lb. paracasei*).

Ces résultats sont en corrélation avec ceux retrouvés par Asselate (2006), qui a noté une diminution significative ($p < 0,05$) du nombre d'*E. coli* chez les lapins traités par le lait 50/50 fermenté par *Lb. acidophilus*. Par contre chez les lapins ayant reçu ce lait stérile, l'état diarrhéique a persisté même après l'arrêt de la contamination par EPEC.

Les résultats obtenus au terme de cette étude montrent l'effet bénéfique du lait fermenté au *Lb. paracasei* sur la diarrhée à EPEC. Cet effet bénéfique est exercé par l'accumulation de divers mécanismes *in vivo* :

Dans l'intestin grêle, le principal obstacle à la survie des probiotiques est la présence de sels biliaries. Les expériences de la croissance en présence de sels biliaries sont associées à une autre variable : l'apparition de sels biliaries non conjugués dans le milieu (Bezkorovainy, 2001). La déconjugation est faite par la selbiliairehydrolase (BSH) qui est présente chez les lactobacilles et les bifidobactéries (Begley *et al.*, 2006).

Les sels biliaires non conjugués représentent un meilleur agent de lyse bactérienne par rapport aux sels biliaires conjugués (Bezkorovainy, 2001).

Dans une étude récente, dix sept souches de *Lb. casei* (probablement *Lb. paracasei*) étaient capables de croître en présence de 0,5% de bile sans deconjugation des sels biliaires (Bertazzoni *et al.*, 2004). L'activité hydrolytique des sels biliaires (BSH) peut conduire à la résistance des bactéries lactiques à la toxicité de ces sels conjugués dans le duodénum. Elle est aussi un facteur important pour la colonisation (Begley *et al.*, 2006).

Les bactéries probiotiques possèdent divers mécanismes d'action sur les bactéries pathogènes en incluant les facteurs d'adhérence et/ou d'agrégation qui aident l'adhésion et la colonisation.

Récemment, Marzotto *et al.*, (2006) ont rapporté (dans leur étude réalisée sur des enfants âgés de 12 à 24 mois alimentés avec un lait fermenté au *Lb. paracasei*) que *Lb. paracasei* A survit dans les selles chez 92 % des enfants examinés, une semaine après l'administration du lait fermenté. Cela montre la capacité de la souche étudiée à passer à travers la barrière gastro-intestinale et à dominer temporairement la communauté des lactobacilles dans les différents environnements intestinaux.

Dans plusieurs études, il a été indiqué que l'association des prébiotiques aux probiotiques a un effet positif sur ces derniers. Les prébiotiques protègent et stimulent la croissance des souches probiotiques (Regnault, 2002).

Cela a été aussi rapporté par Morelli (2003), qui a montré que l'administration d'une préparation symbiotique de *Lb. paracasei* permet de retrouver cette souche dans les selles des volontaires sains. Cette espèce devient numériquement la plus dominante des autres lactobacilles isolés à partir des échantillons fécaux, et apparaît persistante dans le colon après 3 jours de l'arrêt de la consommation de la préparation symbiotique.

L'un des facteurs les plus importants pour la sélection des souches probiotiques est leur aptitude à adhérer à la surface intestinale. Dans leur étude, Juntunen *et al.* (2001), ont montré que *Lb. paracasei* F19 adhère à la muqueuse intestinale durant la diarrhée au rotavirus. Effectivement, l'inhibition de l'adhésion d'*E. coli* aux cellules épithéliales par des souches de *Lb. paracasei* a été démontrée *in vitro* (Petros *et al.*, 2006). Dans cette étude, deux souches de *Lb. paracasei* (*Lb. paracasei* ssp. *tolerans* ACADC 4037 et *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* ACA-DC221) avaient une bonne inhibition de l'adhérence d'*E. coli* et *S. typhimurium* aux cellules épithéliales Caco-2. D'ailleurs, plusieurs agents pathogènes dont EPEC ne peuvent exercer leur effet néfaste dans l'intestin qu'après avoir été attachés à la muqueuse intestinale (Clarke *et al.*, 2003), et l'action bénéfique des probiotiques est expliquée par leur pouvoir d'interférer avec l'adhérence d'agents pathogènes à la muqueuse intestinale. Des études *in vitro* utilisant des cultures cellulaires montrent que les souches probiotiques elles même s'attachent aux cellules intestinales et procèdent à la colonisation de l'intestin. Ce phénomène est un mécanisme empêchant l'adhérence des autres bactéries pathogènes (Bezkonovainy, 2001).

L'administration de *Lb. paracasei* aux lapins souffrant de la diarrhée a permis une diminution significative du nombre d'EPEC et la disparition de l'état diarrhéique. Cet effet bénéfique est dû, non seulement à l'action de *Lb. paracasei*, mais aussi au nombre élevé de lactobacilles totaux et de bifidobactéries obtenu après la consommation de lait fermenté contenant la souche probiotique. Ces lactobacilles et bifidobactéries exercent à leur tour, leur effet antagoniste à l'égard de l'agent causal de la diarrhée (EPEC).

L'administration de *Lb. paracasei* associé aux prébiotiques augmente le nombre total des lactobacilles et des bifidobactéries dans l'écosystème gastro-intestinal (Morelli *et al.*, 2003 ; Bomba *et al.*, 2002).

Selon Marteau *et al.* (2004), plusieurs auteurs reportaient que quelques souches de bifidobactéries et de lactobacilles ingérés diminuaient la concentration fécale de *Bacteroides*, *Clostridium*, et *E. coli*, et quelquefois augmentaient aussi les taux des bifidobactéries et des lactobacilles endogènes.

De plus, l'administration du surnageant d'une culture à 10^9 cellules de *Bf. adolescentis* /ml aux souris rendues diarrhéiques, avait un effet antagoniste envers EPEC, et a permis la disparition de la diarrhée (Laribi, 2001).

Bendjeddou (2001) et Hamma (2001), ont montré que des souches de bifidobactéries ont été capables d'inhiber la croissance d'EPEC *in vitro* et *in vivo* respectivement. *Bf. infantis* produit des substances de nature protéique ayant une activité antibactérienne *in vitro* et *in vivo* envers la souche d'EPEC (Bendali, 2003).

L'adhésion et la colonisation de la muqueuse intestinale ont été reliées à la capacité de moduler le système immunitaire. Dans l'étude réalisée par Ibnou-Zekri *et al.* (2003) sur des souris axéniques, la production des IgA spécifiques à *Lb. paracasei* était significativement élevée dans les plaques de Payer. D'après cette étude, *Lb. paracasei* stimule le système immunitaire, qui peut être l'un des mécanismes par lequel cette souche probiotique exerce ces effets bénéfiques pour la santé.

Les probiotiques sont non seulement utilisés dans le traitement de la diarrhée, mais aussi utilisés pour traiter d'autres maladies. Verdu *et al.* (2004), ont rapporté que l'effet de *Lb. paracasei* (probiotique) sur la motilité de l'intestin se traduit par une atténuation de l'hypercontractilité post-infection du muscle. Ils suggèrent que les probiotiques peuvent être utilisés dans le traitement du syndrome de l'intestin irrité. L'ingestion de lait fermenté contenant *Lb. paracasei*-33 ($2 \cdot 10^9$ UFC/pot) pendant 30 jours, a permis d'améliorer la qualité de vie des patients souffrant d'une rhinite allergique (Wang *et al.*, 2004).

Cet effet inhibiteur de la souche probiotique contre la souche pathogène peut être la conséquence d'une compétition aux récepteurs sur la muqueuse intestinale, la compétition aux nutriments, la production de substances antibactériennes, la stimulation du système immunitaire, et la production d'acides gras volatils (Lu et Walker, 2001).

La libération des protéines ECM-binding par les lactobacilles probiotiques peut fournir un autre mécanisme possible pour l'antagonisme bactérien contribuant à l'effet bénéfique des souches probiotiques (Schillinger *et al.*, 2005).

Pour exercer un effet bénéfique, les probiotiques doivent être présents à un nombre au moins égal à 10^6 cellules/ml (g) dans le produit à la date de péremption. Ceci du fait que la dose thérapeutique minimale journalière est de 10^8 à 10^9 cellules /ml (Shimakawa *et al.*, 2003). Ainsi, la dose de 10^8 *Lb. paracasei* /ml administrée aux lapins dans le lait 50/50 fermenté pourrait être suffisante pour obtenir un effet thérapeutique.

4. Dénombrement d'*E. coli* dans les contenus intestinaux et coliques

Après la dissection des lapins, le contenu des portions intestinales et coliques a été recueilli dans des boîtes de Petri stériles pour servir au dénombrement d'*E. coli*. Les résultats sont présentés dans le tableau VII.

Tableau VII: Comptes fécaux d'*E. coli* dans les portions intestinales

	Côlon	Intestin grêle
Lapin témoin sans EPEC	2,39.10 ³	2,04.10 ³
Lapin témoin diarrhéique	1,62.10 ⁵	1,49.10 ⁵
Lapin recevant le lait 50/50 stérile	9,05.10 ⁸	6,88.10 ⁸
Lapin recevant le lait 50/50 fermenté par <i>Lb. paracasei</i>	7,5.10 ³	4,98.10 ³

Après dissection des lapins, le dénombrement d'*E. coli* dans les contenus intestinal et colique montre que le lapin non contaminé par EPEC avait un nombre réduit d'*E. coli* par rapport aux autres (2.10³/ml).

Après 5 jours de contamination par EPEC, un nombre de 1,49.10⁵ et 1,62.10⁵/ml a été enregistré respectivement dans les contenus intestinal et colique. Cela indique qu' *E. coli* s'implante sur la muqueuse intestinale du lapin où il va proliférer et causer la diarrhée.

Au 7^{ème} jour de traitement par le ferment de *Lb. paracasei*, le nombre d'*E. coli* a significativement diminué dans les contenus intestinal et colique où on a noté que le nombre reprend sa valeur initiale. Cela confirme l'effet probiotique *in vivo* des lactobacilles.

Dans leur étude Bomba *et al.* (2002) ont montré que l'administration de *Lb. paracasei* associée aux maltodextrines diminuait le nombre d'*E. coli* colonisant le jejunum des porcs gnotoxeniques d'un log en comparaison avec le groupe témoin.

Le nombre d'*E. coli* dans le contenu intestinal et colique du lapin qui a reçu le lait 50/50 stérile reste encore élevé ($6,88.10^8$ et 9.10^8 /ml respectivement) même après 7 jours de l'arrêt d'administration d'EPEC.

Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle la souche de *Lb. paracasei* a un effet antagoniste contre l'implantation d'*E. coli* entéropathogène dans la muqueuse intestinale. Cet effet a permis de diminuer le nombre d'*E. coli* dans le contenu intestinal et colique, et de mener ces nombres aux valeurs initiales avant toute contamination par EPEC.

Cependant, on remarque chez tous les lapins disséqués, que le nombre d'*E. coli* dans le colon est un peu supérieur à celui retrouvé dans l'intestin grêle. Cela peut être expliqué par les conditions d'anaérobiose plus accentuées dans le colon, ce qui favorise le développement des aero-anaerobies dont *E. coli*, et par le fait que le séjour dans le colon est plus long.

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

VII. ETUDE DES OBSERVATIONS DES COUPES HISTOLOGIQUES

Les photos de différentes coupes histologiques (figure 15 et 16) montrent que les villosités intestinales et les cryptes coliques des lapins témoins diarrhéiques et témoins non traités, sont plus touchées par rapport aux profils des villosités observés chez les lapins témoins n'ayant pas reçu EPEC et ceux traité par *Lb. paracasei*.

Ces observations sont faciles à distinguer au niveau des coupes histologiques des intestins des deux lapins (témoin diarrhéique et lapin non traité, photos 2 et 3 de la figure 15). On remarque que les villosités de l'intestin grêle du lapin diarrhéique sont de petite taille et déchiquetées aux extrémités supérieures, et ne montrent pas une intégrité histologique le long du profil de la villosité (photo 2).

Par contre les villosités du lapin traité apparaissent grandes avec une restructuration histologique apparente (photo 4 de la figure 15) en comparaison au témoin diarrhéique et à celles du lapin non traité. Cela atteste de l'effet bénéfique escompté de *Lb. paracasei* administré durant la période de traitement.

Bien que les conditions environnementales au niveau de l'intestin grêle ne soient pas propices à la croissance d'EPEC et de *Lb. paracasei*, cela n'a pas empêché ce dernier d'exercer son effet bénéfique au niveau de l'intestin grêle, permettant un meilleur rétablissement de l'état diarrhéique.

Les photos des coupes histologiques de l'intestin et du côlon (témoin diarrhéique et lapin traité) montrent que pour le même individu, on constate que les cryptes du côlon sont plus touchées par rapport aux villosités de l'intestin (photo 2 et 3 de la figure 15 et 16).

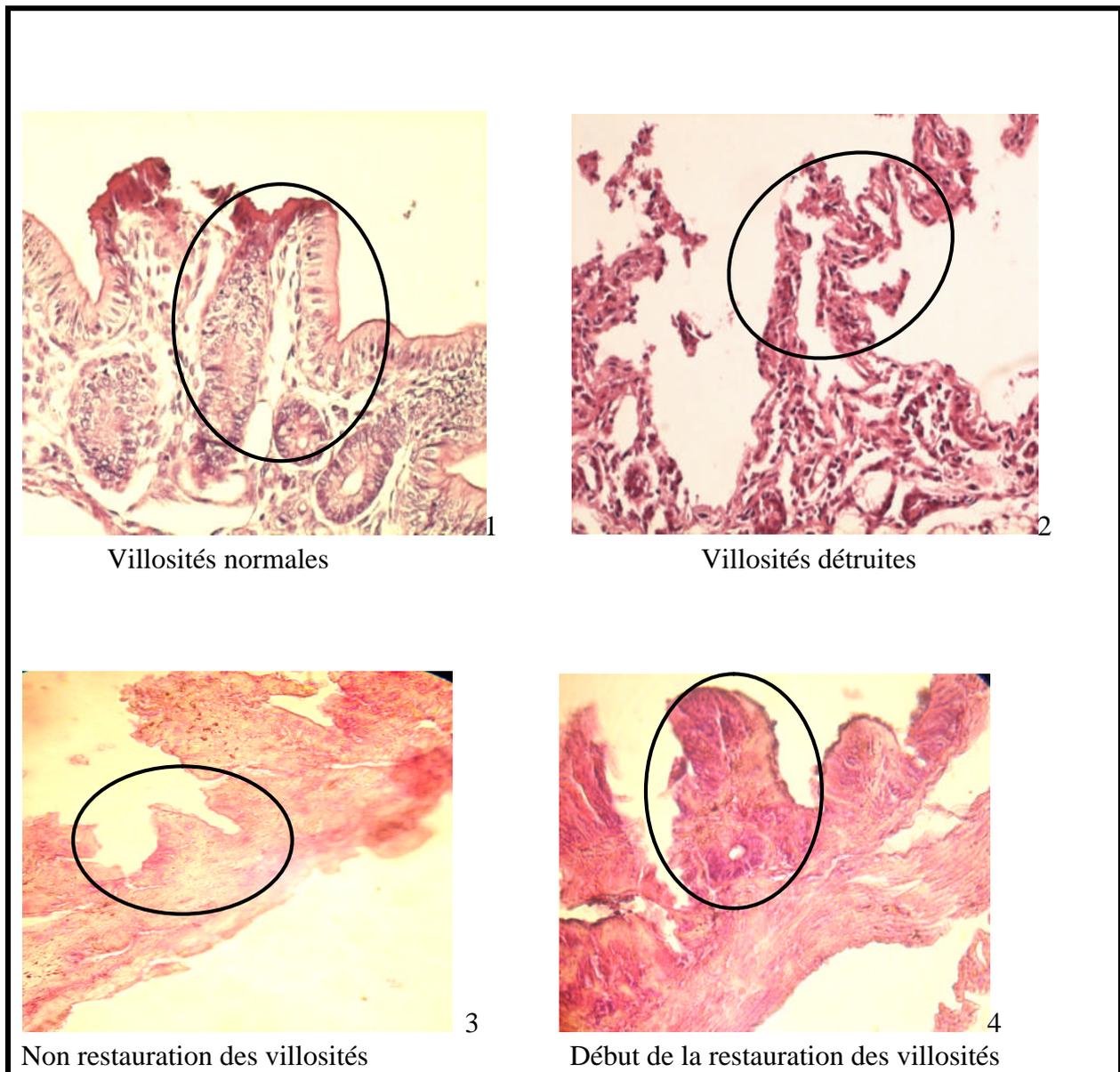


Figure 15: Coupes histologiques des intestins grêles des lapins disséqués (8x40x5).

1 : Témoin sans EPEC

2 : Témoin diarrhéique

3 : Lapin diarrhéique non traité recevant le lait 50/50 stérile

4 : Lapin diarrhéique traité (recevant le lait 50/50 fermenté au *Lb. paracasei*)

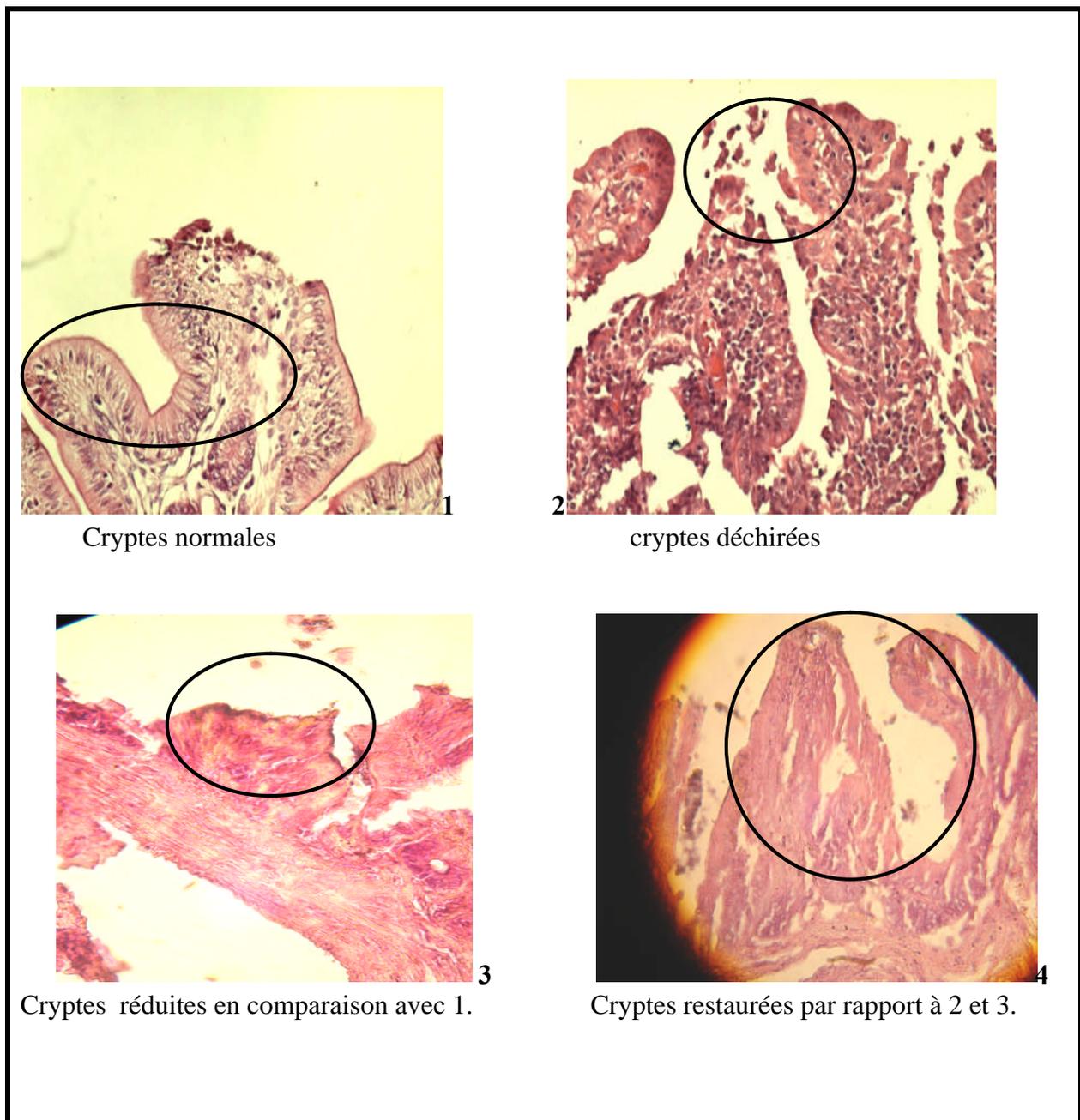


Figure 16 : Coupes histologiques des colons des lapins disséqués (8x40x5).

1 : Témoin sans EPEC

2 : Témoin diarrhéique

3 : Lapin diarrhéique non traité recevant le lait 50/50 stérile

4 : Lapin diarrhéique traité recevant le lait 50/50 fermenté au *Lb. paracasei*

Les villosités intestinales et les cryptes coliques du lapin traité par le probiotique (photo 4 des figures 15 et 16), montrent une restructuration apparente. Elles apparaissent de grande taille par rapport au témoin non traité dont les cryptes du côlon sont presque effacées et de petite taille (photo 3 de la figure 16). Cela confirme que cette restructuration a pu être favorisée par le probiotique en exerçant son effet antagoniste contre EPEC. Cet antagonisme entraîne l'inhibition de la prolifération d'EPEC au niveau de l'épithélium, permettant l'arrêt du processus d'effacement des microvillosités causé par EPEC. Cet effet a permis aux microvillosités de se restructurer et de se développer en augmentant leur taille en absence de stress causé par la fixation et la prolifération d'EPEC.

Les résultats obtenus permettraient de conclure à l'efficacité du traitement de la diarrhée à EPEC avec la souche de *Lb. paracasei* par l'administration orale *via* du lait 50/50 fermenté.

CONCLUSION

Dans cette étude, l'antagonisme de la souche de *Lactobacillus paracasei* envers une souche d'*Escherichia coli* entéropathogène (EPEC) de sérotype O₁₁₁ B₄ a été testé en utilisant les cellules bactériennes dans le test de spots et leur surnageant dans le test des puits. Les résultats ont montré que *Lactobacillus paracasei* avait une bonne activité antibactérienne à l'égard de la souche cible avec des diamètres de zone d'inhibition de 17 et 14 mm dans le test de spots et de puits respectivement.

Cet effet antibactérien a été aussi étudié en culture mixte dans le lait 50/50 (lait écrémé/lactosérum), en présence de 10⁷, 10⁸ et 10⁹ cellules de *Lb. paracasei* / ml. Au terme de cette étude, il a été démontré qu'il existe une différence significative de l'inhibition de la croissance d'*E. coli* avec 10⁷ et 10⁸ cellules/ ml de la souche test. Avec 10⁹ cellules /ml de *Lb. paracasei* on a observé une activité inhibitrice similaire à celle de 10⁸/ml. Le maximum d'inhibition est observé à partir de 18h d'incubation qui correspond au début de la phase stationnaire de la croissance de *Lb. paracasei*.

L'étude *in vivo* a porté sur dix lapins holoxéniques âgés de 30 jours répartis en deux lots contenant chacun 4 lapins, et les deux autres sont utilisés comme témoin diarrhéique et témoin sans EPEC.

Les lapins des deux lots reçoivent du lait 50/50 contenant 2. 10⁷/ml d'EPEC chaque jour jusqu'à apparition d'une diarrhée persistante. Au terme de la période de contamination des lapins par la souche d'EPEC, une augmentation du nombre d'*E. coli* dans les selles a été révélée, passant de 8,25.10²/ml à 1,75.10⁷/ml.

Dès le déclenchement de la diarrhée, les lapins du lot 1 reçoivent du lait 50/50 stérile et ceux du lot 2 sont traités par la même formule de lait (50/50) fermenté par *Lb. paracasei* pendant 7 jours.

L'effet antagoniste de *Lb. paracasei* envers EPEC, a été clairement démontré par la diminution des comptes fécaux d'*E. coli* dans la matière fécale des lapins du lot 2.

Après 4 jours, les nombres d'*E. coli* ont diminué de 4 log (passant de 2,15.10⁷ à 4,7.10³/g de selles).

Contrairement au lot 2, les lapins du lot 1 ont un nombre d'*E. coli* qui continue à augmenter même après l'arrêt de l'administration de la souche d'EPEC. Cela montre qu'EPEC a été bien installé dans la muqueuse intestinale où il exerce son effet pathologique.

L'analyse de la variance de ces comptes fécaux au niveau des deux lots montre qu'il existe une différence hautement significative dès le 2^{ème} jour de traitement.

Cet effet antagoniste de *Lb. paracasei* envers EPEC peut être dû à la compétition aux récepteurs sur la muqueuse intestinale, la compétition aux nutriments, la production de substances antibactériennes et la stimulation du système immunitaire. Il peut être aussi attribué à l'inhibition de l'adhérence et de la colonisation de l'épithélium intestinal.

Après dissection des lapins, et dénombrement d'*E. coli* dans les contenus intestinaux et coliques, il a été remarqué que cette espèce bactérienne reste en grand nombre chez les lapins non traités (ayant reçu la formule de lait 50/50 stérile). Par contre, elle tend à reprendre son compte initial chez les lapins ayant reçu du lait 50/50 fermenté par *Lb. paracasei*.

Les coupes histologiques réalisées sur les portions intestinales et coliques montrent bien une restauration des villosités chez les lapins traités par rapport au témoin diarrhéique et aux lapins diarrhéiques ayant reçu le lait 50/50 stérile. Chez ces derniers, les villosités apparaissent réduites et détériorées par l'action d'EPEC.

Ces résultats montrent que la formule de lait 50/50 fermentée au *Lb. paracasei* utilisée dans cette étude est prometteuse ; cela pourrait ouvrir en effet des perspectives pour la mise au point d'un alicament destiné aux nourrissons souffrant d'une diarrhée à EPEC. Par ailleurs, l'introduction de lactosérum dans la formule de l'aliment antidiarrhéique réduirait son rejet dans les rivières, participant ainsi à la protection de l'environnement.

Ahrne, S., Nobaek, S., Jeppson, B., Adlerberth, I., Wold, A.E., et Molin, G., 1998.
The normal *Lactobacillus* flora of healthy rectal and oral mucosa.
Journal of Applied Microbiology. 85: 88-94.

Amrouche, T., 2005.

Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des Bifidobactéries: Analyse *in vitro* et étude *in vivo* des mécanismes moléculaires impliqués.
Thèse de doctorat en Sciences et Technologie des Aliments.
Université Laval. Quebec.16-49.

Anonyme 1: www.healthwomen.com.tw/lp300.htm

Antonsson, M., Molin, G., et Ardo, Y., 2003.

Lactobacillus strains isolated from Danbo cheese and their function as adjunct cultures in a cheese model system.
International Journal of Food Microbiology. 85 : 159-169.

APRIA., 1973.

Les lactosérums. Traitements et utilisation.
Edit Lavoisier TEC&Doc. 1-43.

Arhné, S., Lönnermark, E., Wold, A.E., Aberg, N., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegard, I-L., Molin, G., et Adlerberth, I., 2005.

Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants.
Microbiology and Infection.7: 1256-1262.

Aslim, B., Yuksedag, Z.N., Sarikaya, E., et Beyatli Y., 2005.

Determination of the bacteriocin like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkist dairy products.
Swiss Society of Food Science and Technology. 38: 691-694.

Asselate, A., 2006.

Intérêt de la mise au point d'un lait écrémé 1^{er} age fermenté au *Lactobacillus acidophilus* (dans la lutte antidiarrhéique à EPEC).
Mémoire de magister en Microbiologie Appliquée.
LMA. Université A. Mira Béjaia, 62p.

Atanassova, M., Choiset, Y., Dalgalarondo, M., Chobert, J-M., Dousset, X., Ivanova, I., et Haertlé, T., 2003.

Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3.
International Journal of Food Microbiology. 87: 63-73.

Bayoub, K., Elotmani, F., Assobhei, O., Jaoua, S., et Soukri, A., 2006.

Contribution à l'étude des bactériocines produites par des souches isolées du lait fermenté traditionnel « Raïb ».

Congrès international de Biochimie Agadir. 09-12.

Begley, M., Hill, C., et Gahan Cormac, G.M., 2006.

Bile salt hydrolase activity in probiotics.

Applied and Environmental Microbiology. 72 (3): 1729-1738.

Benbernou, L., Boudinar, F., Chaou, M., GranGaud, J.P., Kaddache, Ch., Khiari, M.E., Lamdjadani, N., Merbout, G., Ouamar, O., Zebiri, A., et Zeroual,Z., 2000.

Guide de prise en charge de la diarrhée chez l'enfant.

Ministère de la santé et la population.

Direction de la prévention.

Sous direction de santé maternelle et infantile.1-45.

Bendali, F., 2003.

Caractérisation préliminaire et purification partielle de la substance antibactérienne produite par *Bifidobacterium infantis*. Etude de son activité *in vivo* à l'égard d'*E. coli* enteropathogène (EPEC).

Mémoire de magister en Biochimie Microbiologie.

LMA. Université A. Mira Béjaia, 128p.

Bendjeddou, K., 2001.

Étude de l'activité antibactérienne de *Bifidobacterium infantis* et de sa bactériocine à l'égard d'*Escherichia coli* enteropathogène isolée de selles de nourrissons diarrhéiques.

Mémoire de magister en Biochimie Microbiologie.

LMA. Université A. Mira Béjaia, 91p.

Berg, R.D., 1996.

The indigenous gastrointestinal microflora.

Trends Microbiology. 4: 430- 435.

Bertazzoni, M. E., Benini, A., Marzotto, M., Sbarbati, A., Ruzzenente, O., Ferrarion, R., Hendriks, H., et Dellaglio, F., 2004.

Assesment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional foods.

International dairy journal. 14: 723-736.

Bettelleim K. A., Beutin, L., Gleir, K., Pearce, J.L., Luke, R.K.J., et Zimmermann, S., 2003.

Serotypes of *E. coli* isolated from healthy infants in Berlin, Germany and Melbourne. Australia.

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 26 (1): 55-63.

Bezkorovainy, A., 2001.

Probiotics: determinants of survival and growth in the gut.
American Journal of Clinical Nutrition. 73 (2): 399S-405S.

Bigard, M-A., 2001.

Guide pratique des maladies du tube digestif.
Mini Ed. Masson. France. 13-19.

Bomba, A., Nemcova, R., Gancareikova, S., Herich, R., Guba, P., et Mudronova, D., 2002.

Improvement of the probiotic effect of micro-organisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids.
British Journal of Nutrition. 88: S95-S99.

Bouderaa, G., 1994.

Effect of fermented infant formula on incidence of diarrhea early weaning. ESPAGN Meeting. Cité dans Martine 2000.

Bourgeois, C.M., et Larpent, J.P., 1996.

Microbiologie alimentaire. Aliments fermentés et fermentations alimentaires.
Ed. TEC&DOC. 4-32.

Bourlioux, P., 1994.

Écologie microbienne du tube digestif et santé.
Cahier de la Nutrition Diététique. XXIX. 6: 333-335.

Bourlioux, P., Koletzko, B., Guarner, F., et Braesco, V., 2003.

The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002.
American Journal of Clinical Nutrition. 78: 675-83.

Buriti Flavia, C.A., Da Rocha, J.S., Assis, G. E., et Saad Susana, M.I., 2005.

Probiotic potential of minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*.
Lebensmittel –Wissenschaftl +Technologie. 38 (2): 173-180.

Caridi, A., 2002.

Selection of *E. coli* inhibiting strains of *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*.
Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 29: 303-308.

Carver, J. D., 2003.

Advances in nutritional modifications of infants formulas.
American Society of Clinical Nutrition. 77: 1550S-4S.

Castagliuolo, I., Galeazzi, F., Ferrari, S., Elli, M., Brun, P., Cavaggioni, A., Tormen, D., Sturniolo, G.C., Morelli, L., et Palu, G., 2005.

Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 43: 197-204.

Cesena, M.C., Morelli, L., Alander, M., Siljander, T., Tuomola, E., Salminen, S., et al., 2001.

Lactobacillus crispatus and its non aggregating mutant in human colonization trials. *Journal of Dairy Science*. 84: 1001-1010.

Cézard, J.P., Couraqui, 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 Pédiatrie. 9 : 620-8.

Chouraqui, J.P., Dominique-Luis, V.E., et Marie-Claire., F., 2004.

Acidified milk formula supplemented with *Bifidobacterium lactis*: impact on infant diarrhea in residential care settings.

Journal of Paediatric Gastroenterology & Nutrition. 38: 288-292.

Christiansen, P., Nielsen, W.E., , Vogensen, K.F, Brogren,C.H., Ardo,Y., 2006.

Heat resistance of *Lactobacillus paracasei* isolated from semi-hard cheese made of pasteurised milk.

International Dairy Journal 16: 1196–1204.

Cinquin, C., 2005.

Développement et validation d'un nouveau model de fermentation colique *in vitro* avec cellules immobilisées.

Thèse de doctorat de science et technologie des aliments.

Université Laval. Québec. 171p.

Clarke S. C., Haigh R.D., Freestone P.P.E., and Williams P.H., 2003.

Virulence of enteropathogenic *E. coli*, a global pathogen.

Clinical Microbiology Reviews. 16 (3): 365-378.

Czerucka, D., Rampal, P., 2002.

Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens.

Microbes and infection. 4: 733-739.

Dacosta, Y., 2001.

Probiotiques et prébiotiques en alimentation humaine.

Ed. Y. Dacosta, Paris. 228p.

Dal Ballo, F., Walter, J., Hammes, W.P., et Heltel, C., 2003.

Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition.

Microbial Ecology. 45 (4): 455-463.

Dal Bello, F., et Hertel, C., 2006.

Oral cavity natural reservoir for intestinal lactobacilli.
Systematic and Applied Microbiology. 29: 69-76.

De Roissart, H., et Luquet, F.M., 1994.

Bactéries lactiques : aspects fondamentaux et technologiques.
Vol 1. Ed Loriga. Grenoble. France. 605.

Desmazeaud, M., 1996.

Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine: utilisation et innocuité.
Cahiers Agricultures. 5 (5) : 331-342.

De Witt, J.N., 1998.

Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products.
Journal of dairy science. 81 (3): 597-608.

Dicks, L.M.T., Du Plessis, E.M., Dellaglio, F., et Lauer, E., 1996.

Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zae* nom. Rev. Designation of ATCC334 as the neotype of *L. casei* subsp. *casei* , and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*.

International Journal of Systematic Bacteriology. 46 (1): 337-340.

Dow, M.A., Toth, I., Malik, A., Herpay, M., Nogrady, N., Ghenghesh, K.S., et Nagy, B., 2006.

Phenotypic and genetic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and enteroaggregative *E. coli* (EAEC) from diarrhoeal and non diarrhoeal children in Libya.

Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. 29: 100-113.

Drouault, S., et Corthier, G., 2001.

Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé.
Veterinar Research. 32: 101-117.

Enoncé de la société canadienne de pédiatrie, 2003.

Le traitement de la diarrhée.

Paediatric Children Health. 8 (7) 463-466.

FAO, 1998.

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

FAO/WHO., 2002.

Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agricultural Organisation of the United Nations and World Health Organisation. Working group report 2002.

Fernandes Campos, R.C.S., Flores Quintana, V.M., et Medina-Acosta, E., 2002.
Prevalent transfer of human colostral IgA antibody activity for the enteropathogenic *Escherichia coli* bundle-forming pilus structural repeating subunit A in neonates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 44: 331–336.

Fooks, L. J., et Gibson, G.R., 2002.
Probiotics as modulators of the gut flora.
British Journal of Nutrition. 88: S29-S49.

Franzolin, M.R., Barbosa Alves, R.C., Keller, R., Gomes Tardelli, .T.A., Beutin, L., Barreto, M. L., Milroy, C., Strina, A., Ribeiro, H., et Trabulsi, L.R., 2005.
Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 100 (4): 359-363.

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

Gill, H.S., et Guarner, F., 2004.
Probiotics and human health: a clinical perspective.
Posigrad Medecin Journal. 80: 516-526.

Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., Salminen, S., 1992.
Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract.
Digestive Diseases Science. 37: 121-128.

Guarner, F., et Malagelada, J-R., 2003.
Gut flora in health and disease.
Lancet Review. 360: 512-519.

Gueimonde, M., Jalonen, L., He, F., Hiramatsu, M., Salminen, S., 2006.
Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli.
Food Research International. 39: 467-471.

Guillot, J.F., et Ruckebush, Y., 1994.
Microflore digestive des animaux, in *Bactéries lactiques*.
Vol 2, Ed Loriga. Grenoble. France: 341-366.

Guiraud, J-P., 2003.
Microbiologie alimentaire.
Ed., DUNOD. Paris, France. 652p.

Guireau, J., et Galzy, P., 1980.

L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires.
Ed. USIN Nouvelle. Paris. 34-40.

Hamma, S., 2001.

Contribution à l'amélioration de l'effet antimicrobien de *Bifidobacterium bifidum* vis-à-vis d'*Escherichia coli* enteropathogene responsable des diarrhées infantiles. Association de *Lactobacillus acidophilus*.
Mémoire de magister en Biochimie- Microbiologie.
LMA. Université A. Mira, Béjaia, 160p.

Harris, L. J., 2006.

Escherichia coli Class Notes PHR 150.
Department of food sciences and technology.
University of California-Davis.
Class Notes PHR. 150: 1-10.

Heyman, M., 2000.

Effect of lactic acid bacteria on diarrheal diseases.
Journal of the American Collection of Nutrition. **19** (2): 137S-146S.

Holzapfel, W.H., et Schillinger, U., 2002.

Introduction to pre- and probiotics.
Food Research International. 35: 109-116.

Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, Rolf, Björkroth, J., et Schillinger, U., 2001.

Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition.
American Journal of Clinical Nutrition. **73**: 365S-73S.

Hooper, L.V., et Gordon, J.I., 2000.

Commensal host bacterial relationships in the gut.
Sciences. 292: 1115-18.

Host, A., Halken, S., Jacobsen, H.P., Christensen, A.E., Herskind, A.M. and Plesner, K. (2002). Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatric Allergy Immunology*. 13: 23-28.

Hould, R., 1984.

Techniques d'histologie et cytologie.
Ed Gécarié. Paris. 65-76.

Ibnou-zekri, N., Blum, S., Schiffrin, E.J., et Weid, T., 2003.

Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties *in vitro*.
Infection and Immunity. **71** (1): 428-436.

Jacobsen, C.N., Rosenfeldt Nielsen, V., Hayford, A.E., Moller, P.L., Michaelsen, K.F., Paerregaard, A., Sandström, B., Tvede, M., et Jakobsen, M., 1999.

Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* ssp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonisation ability of five selected strains. *Applied and Environmental Microbiology*. **45** (11): 4949-4956.

Jacquet Violleau, V., 1999.

Déminéralisation par électrophorèse en présence d'un complexant : application au lactosérum. Thèse de doctorat. Institut National Polyethnique de Toulouse. 45-60.

Juntunen, M., Kirjavainen, A., Ouwehand, A.C., Salminen, J.S., et Isolori, E., 2001.

Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. **8** (2): 293-296.

Kaplan, H., et Hothinks, W.R., 2003.

Metabolism of fructooligosaccharids by *Lactobacillus paracasei* 1195. *Applied and Environmental Microbiology*. **69** (4): 2217-2222.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., et Reuter, G., 1998.

Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 41: 103-125.

Laribi, S., 2001.

Étude *in vivo* et *in vitro* de l'activité antibactérienne de *Bifidobacterium adolescentis* à l'égard d'*Escherichia coli* entéropathogène. Mémoire de Magister en Biochimie-Microbiologie. LMA. Université A.Mira, Béjaia. 57 p.

LAROUSSE. 1997.

Dictionnaire de français. Ed. Larousse-Bordas.

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

Lemay, G., 2000.

Étude de la stabilité thermique des protéines de lactosérum et de leur comportement en solution, en présence de divers dextrans. Mémoire pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M. sc). Université Laval, 84p.

Leroy, F. et De Vuyst, L., 2001.

Growth of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient exhaustion: a nutrient depletion model for the growth of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **67** (10): 4407-4413.

Lien, E.L., 2003.

Infant formulation with increased concentrations of α -lactalbumin.
American Society of Clinical Nutrition. 77: 1555S-85.

Liorzou, A., 1985.

Initiation pratique à la statistique.
Ed. EYROLLES. Paris. 323p.

Lu L. et Walker A., 2001.

Pathogenic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium.
American Journal of Clinical Nutrition.73: 1124-1130.

Marcenler, A., Pavan, S., et Pot, B., 2003.

Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects.
Current Pharmacology Diseases. 8: 99-110.

Marlier, D., Dewree, R., Delleur, V., Licois, D., Lassence, C., Poulipoulis, A., et Vindevogel, H., 2003.

Description des principales étiologies des maladies digestives chez le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*).
Annal Médical Vétérinaire. 147 : 385-392.

Marteau, P., Seksik, P., Lepage, P., et Doré, J., 2004.

Cellular and physiological effects of probiotics and prebiotics.
Mini- Reviews in Medicinal Chemistry. 4: 889-896.

Marteau, R.P., De Vrese, M., Cellier, C.J., et Schreze-meir, J., 2001.

Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics.
American Journal of Clinical Nutrition. 73: 430S-436S.

Martin, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marin, M.L., Olivares, M., Boza, J., Jiménez, J., Fernandez, L., Xaus, J., et Rodriguez, M.J., 2004.

The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics.
Trends in Food Sciences & Technology. 15: 121-127.

Martine, H., 2000.

Effect of lactic acid bacteria on diarrheal diseases.
Journal of the American College of Nutrition.19 (2): 1378-1468.

Marzoto, M., Maffeis, C., Paternoster, T., Ferrario, R., Rizzolli, L., Pellegrino, M., Dellaglio, F., et Torriani, S., 2006.

Lactobacillus paracasei A survives gastrointestinal passage and affects the faecal microbiota of healthy infants.
Research in Microbiology. 157: 857-866.

Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fonden, R., et Saarela, M., 2002.

Technological challenges for future probiotic foods.
International Dairy Journal. **12** (2): 173-182.

Mohamadzadeh, M., Olson, S., Kelina, W.V., Ruthel, G., Demmin, G.L., Warfield, Killy, L., Bavari, S., et Klaenhammer, T.R., 2005.

Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper polarization.
PNAS. 102: 2880- 2885.

Morelli, L., Garbagna, N., Rizzello, F., Zonenschain, D., et Grossi, E., 2006.

In vivo association to human colon of *Lactobacillus paracasei* B21060: Map from biopsies.

Digestive and Liver Disease. **38** (2): 894-898.

Morelli, L., Zonenschain, D., Callegari, M. L., Grossi, E., Maisano, F., et Fusillo, M., 2003.

Assessment of a new symbiotic preparation in healthy volunteers: survival, persistence of probiotic strain and its effect on the indigenous flora.

Nutrition Journal. 2: 1-6.

Mosilhey, S.H., 2003.

Influence of different capsule materials on the physiological properties of microencapsulates *Lactobacillus acidophilus*.

Thèse de Doctorat-Ingenieur (Dr.-Ing) en Food Technology.

Université de Bonn. 166p.

Nataro, J.P., et Kaper, J.B., 1998.

Diarrheagenic *Escherichia coli*.

Clinical Microbiology Reviews. **11** (1): 142-201.

Nomcova, R., Bomba, A., Gancarcikova, S., Herich, R., et Cuba, P., 1999.

Study of the effect of *Lb. paracasei* and farucooligosaccarides on the faecal microflora in wealing piglets.

Berliner Muncher Tierarzl Wschr. 112: 225-228.

O’Ryan, M.MD., Valeria Prado, MD., et Larry K. Pichering, MD., FAAD, 2005.

A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world.

Pediatric Infectious Diseases. 125-136.

Ocana, V.S. , De Ruiz Holgado, A.A., et Nader-Macias, M.E., 1999.

Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina.

FEMS Immunology Medecin Microbiollogy. **23** (2):87-92.

Petros, A.M., Georgia, Z., Christos, M., George, K., Bruno, P., et Effi, T., 2006.
Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products.
International Dairy Journal. 16 (3): 189-199.

Playo, J.S., Scaletsky, I.C., Pedroso, M.Z., Sperandio, V., Giro'n, J.A., Frankel, G., et Trabulsi, L.R., 1999.
Virulence properties of atypical EPEC strains.
Journal of Medicinal Microbiology. 48: 41-49.

Plummer, F.S., Garaiova, I., Sarvotham, T., Cottrell, S.L., Le Scouiller, S., Weaver, M.A., Tang, T., Dee, P., Hunter, J., 2005.
Effects of probiotics on the composition of the intestinal microbiota following antibiotic therapy.
International Journal of Antimicrobial Agents. 26: 69-74

Prère, M.F., Fayet, O., 2005.
A new genetic test for the rapid identification of shiga-toxines producing (STEC), EPEC isolates from children.
Pathologie. 53: 466-469.

Rappelli, P., Folgosa, E., Solinas, M. L., DaCosta, J. L., Pisanu, C., Sidat, M., Melo, J., Cappuccinelli, P., et Colombo, M.M., 2005.
Pathogenic enteric *Escherichia coli* in children with and without diarrhea in Maputo, Mozambique.
FEMS Immunology and Medecin Microbiology. 43: 67-72.

Rautanan, T., Isolori, E., Salo, E., et Vesikari, T., 1998.
Management of acute diarrhoea with low osmolarity orale rehydration solutions and *Lactobacillus* strain GG.
Archive Diseases Children. 79: 157-60.

Regnault, J.P., 2002.
Element de microbiologie et d'immunologie.
Ed. DECARIE. Montréal. Québec. Canada. 106-123.

Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M.T., et Cormick Mc., J.K., 2003.
Potential use of probiotics in clinical practice.
Clinical Microbiology Review. 16: 658-672.

Rodriguez, E., Gonzalez, B., Gaya, P., Nunez, M., et Medina, M., 2000.
Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk.
International Dairy Journal. 10: 7-150.

Rodriguez, J., Thumazini, C.M., Lopes, C.A., et Dantas, O.L., 2004.

Concurrent infection in a dog and colonisation in a child with a human enteropathogenic *Escherichia coli* clone.

Journal of Clinical Microbiology. **42** (3) : 1388-1389.

Roufik, S., 2001.

Les concentrés protéiques du lactosérum : étude comparative de la composition globale, séparation et caractérisation des fractions protéiques.

Mémoire pour l'obtention du grade Maître ès science.

Université Laval, p6-7.

Sait, A., 2004.

Identification des bifidobactéries par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

Mémoire de magister en Biochimie- Microbiologie. Option Microbiologie.

LMA. Université A. Mira, Béjaia.79p.

Salvini, F., Granieri, L., Gemmellaro, L. et Giovannini, M., 2004.

Probiotics, prebiotics and child health: where are we going?

Journal of International Medicine Research. **32**: 97-108.

Sarker, S.A., Sultana, S., Fuchs, G.J., Alam, N.H., Azim, T., Brussow, H., et Hammarstom, L., 2005.

Lactobacillus paracasei Strain ST11 Has No Effect on Rotavirus but Ameliorates the Outcome of Nonrotavirus Diarrhea in Children From Bangladesh.

Pediatrics. **10**: 2004-2334.

Saunier, K., et Doré, J., 2002.

Gastrointestinal tract and the elderly: functional foods, gut microflora and healthy ageing.

Digestif & Liver Disease. **21**:519-24.

Schillinger, U., Guigas, C., et Holzapfel, W.H., 2005.

In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products.

International Dairy Journal. **15**: 1289-1297.

Schuck, P., Bouhallab, S., Durupt, D., Vareille, P., Humbert, J-P., et Marin, M., 2004.

Séchage des lactosérums et dérivés : role du lactose et de la dynamique de l'eau.

Lait. **84** : 213-168.

Shanahan, F., 2003.

Probiotics in inflammatory bowel diseases: therapeutic rationale and role.

Adv. Drug Deliv. Rev. **56**: 809-818.

Shimakawa, Y., Matsubara, S., Yuki, N., Ikeda, M., et Ishikawa F., 2003.
Evaluation of *Bifidobacterium breve* strain yakult-fermented soy milk as a probiotic food.

International Journal of Food Microbiology. **81** (2): 131-136.

Shonicova, A-V., Canas, I., Isolori, E., Mykkanen, H., et Vesikari, T.J., 1997.
Lactobacillus reteri as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children.

Journal of Paediatric Gastroenterology & Nutrition. **24** (4): 399-404.

Tagg, J.R., et McGiven, A.R., 1971.

Essay system for bacteriocins.

Applied Microbiology. **21**(5): 943.

Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Stranhinic, I., et Lozo, J., 2006.

Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation.

International Journal of Food Microbiology. **112** (3): 230-235.

Vandenplas, Y., 1999.

Bacteria and yeasts in the treatment of acute and chronic infectious diarrhea. Part I. Bacteria.

Clinical Microbiology Infection. **5**: 299-307.

Vanderhoof, J.A., Whitney, D.B., Antonson, D.L., Hanner, T.L., Lupo, J.V. et Young, R.J., 1999.

Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in Children. Journal of Pediatrics. **135**: 564-568.

Verdu, E.F., Bercik, P., Bergonzelli, G.E., Huang, X.X., Blennerhasset, P., Rochat, F., Fiaux, M., Mansourian, R., Corthesy-Theulaz, I., et Collins, S.M., 2004.

Lactobacillus paracasei normalizes muscle hypercontractility in a murine model of postinfective gut dysfunction.

Gastroenterology. **127**: 826-837.

Vieira, M.A., Andrade, J.R., Trabulsi, L.R., Rosa, A.C., Dias, A.M., Ramos, S.R., Frankel, G., et Gomes, T.A., 2001.

Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence factor and shiga toxin DNA probe sequences.

Journal of Infection Diseases. **183** (5): 762-772.

Vu Nguyen, T., Le Van, P., Le Huy, C., Nguyen Gia, K., et Weintraub, A., 2006.

Etiology and epidemiology of diarrhea in children in Hanoi, Vietnam.

International Journal of Infectious Diseases. **10** (4): 298-308.

Ward, L.J.I.I., et Timmins, M.J., 1999.

Differentiation of *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Lb. rhamnosus* by polymerase chain reaction.

Letters in Applied Microbiology. 29: 90-92.

Wang, J.L., Kang, L., et Jia, H.L., 2004.

Generation and characterisation of monoclonal antibodies against Botulinum neurotoxin type A (BoNT/A).

Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi. 20 (1): 83-85.

Wikipedia. Encyclopédie libre. <http://fr.Wikipedia.org>

Yoshioka, H., Iseki, K., et Fujita, K., 1983.

Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants.

Pediatrics. 72: 317-21.

Annexe 1: Données bibliographiques

Tableau I : Composition en protéines, glucides, et lipides du lait humain et du lait de vache (FAO, 1998).

	Lait humain	Lait de vache
Valeur energetique (kCl/litre)	690	705
Proteines (g/l)	10,6 g/l	32,0 g/l
Caseines	3,7	26,0
Proteines solubles	6,9	6,0
β- lactoglobuline	-	2,7
α- lactalbumine	3,6	1,5
lactoferrine	1,5	Traces
lysozyme	3,0	Traces
albumine sérique	0,5	0,3
Immonoglobulines	1,0	0,7
IgA sécretoires	1,00	-
IgG	0,01	-
IgM	0,01	-
IgD	traces	-
Glucides (g/l)	75-80,0 g/l	48,0 g/l
Lactose	70,0	48,0
oligosaccharides	5,10	-
Lipides (g/100g de matières grasses)	45,0 g/l	35 g/l
Triglycerides	98,0	96,0 - 98,0
Diglycerides	0,7	0,3 - 1,6
Monoglycerides	Traces	Traces
Phospholipides	0,3	0,2 - 1,0
Cérébrosides	Traces	Traces
Stérols	0,3	0,2 - 0,4
Acides gras libres	0,4	0,1 - 0,4

**Tableau II : Composition type de lactosérum doux et acide (g/l) (Jacquet
Violleau, 1999)**

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

Tableau III : Caractères d'identification de la souche d'*E. coli* O111 B4 (Hamma, 2001).

Caractères	<i>E. coli</i>
Aspect des cellules	Coccobacilles mobiles
Gram	Négatif
Aspect des colonies sur gélose VRBG	Petites rondes, rosâtres
ONPG	+
ADH	-
LDH	+
ODC	+
Citrate	-
H ₂ S	-
Urée	-
TDA	-
Indole	+
VP	-
Gelatine	-
Glucose	+
Mannitol	+
Inositol	-
Sorbitol	+
Rhamnose	+
Saccharose	+
Melibiose	+
Amygdaline	-
Arabinose	+
NO ₃ -NO ₂	+
Oxydase	-
Sérum anti- <i>E. coli</i> O ₁₁₁ B ₄	+

Annexe 2 : Résultats

Tableau I: Résultats de la croissance de *Lb. paracasei* dans le lait 50/50 (log UFC/ml)

Temps (h)	log UFC/ml
0	5
4	5,432
8	6,806
12	7,544
16	7,919
20	8,000
24	7,832

Tableau II: Antagonisme en milieu liquide de *Lb. paracasei* envers *E. coli* (log UFC/ml)

	0h	6h	12h	15h	18h	21h	24h
Combinaison 1	6	6,3	7	6,95	6,79	6,6	6,63
Combinaison 2	6	6,16	6,32	5,83	5,03	4,97	4,57
Combinaison 3	6	6,26	5,9	5,12	4,98	4,76	4,46
Combinaison 4	6	6,26	8,34	8,83	10,54	10,03	9,7

Tableau III: Comptes fécaux (log) d'*E. coli* du lot 1 durant l'expérimentation animale

	lapin 1	lapin 2	lapin 3	lapin 4	moyenne
jour 1	2,698	3,778	3,591	3,562	3,407
jour 2	2,698	4,98	4,672	5,041	5,041
jour 3	5,267	5,093	4,596	6,255	5,303
jour 4	6,448	5,966	6,021	6,276	6,178
jour 5	6,802	6,51	6,653	7,505	6,868
jour 6	7,454	6,737	6,875	7,937	7,251
jour 7	7,83	7,086	8,161	8,161	7,623
jour 8	9,012	8,511	8,753	8,758	8,759
jour 9	9,676	10,247	9,623	9,848	9,849
jour 10	10,34	10,519	10,176	10,345	10,345
jour 11	10,643	10,848	10,838	10,766	10,776
jour 12	10,709	11,645	10,973	11,109	11,109

Tableau IV: Comptes fécaux (log) d'*E. coli* du lot 2 durant l'expérimentation animale

	lapin 1	lapin 2	lapin 3	lapin 4	moyenne
jour 1	2	2,477	2,404	2,822	2,426
jour 2	4,956	4,98	4,672	5,041	4,912
jour 3	5,267	5,093	5,596	6,255	5,553
jour 4	6,448	5,966	6,021	6,949	6,346
jour 5	7,802	7,51	7,653	7,505	7,618
jour 6	7,146	7,161	7,728	7,301	7,334
jour 7	6,372	6,133	6,557	6,477	6,385
jour 8	5,778	5,792	4,665	5,602	5,459
jour 9	4,505	4,874	4,408	4,672	4,615
jour 10	3,863	3,322	3,959	3,556	3,675
jour 11	3,352	2,74	3,799	2,322	3,053
jour 12	3,301	2,698	3,397	2,301	2,924

Tableau V: Analyse de la variance des résultats des comptes fécaux *d'E. coli* durant la période de l'administration d'EPEC aux deux lots

Source de variation	ddl	SCE	CM	F _{obs}
Vf	1	0,5	0,5	0,185
Vr	38	102,72	2,7	
Vt	39	103,22		

Tableau VI: Analyse de la variance des résultats des comptes fécaux *d'E. coli* au 1^{er} jour de traitement

Source de variation	ddl	SCE	CM	F _{obs}
Vf	1	0,01	0,01	0,052
Vr	6	1,14	0,19	
Vt	7	1,15		

Tableau VII: Analyse de la variance des résultats des comptes fécaux *d'E. coli* au 2^{ème} jour de traitement

Source de variation	ddl	SCE	CM	F _{obs}
Vf	1	3,06	3,06	24,28
Vr	6	0,76	0,126	
Vt	7	3,82		

Tableau VIII: Analyse de la variance des résultats des comptes fécaux *d'E. coli* au 3^{ème} jour de traitement

Source de variation	ddl	SCE	CM	F _{obs}
Vf	1	21,77	21,77	131,14
Vr	6	0,997	0,166	
Vt	7	22,7767		

Tableau IX: Analyse de la variance des résultats des comptes fécaux *d'E. coli* au 4^{ème} jour de traitement

Source de variation	ddl	SCE	CM	F _{obs}
Vf	1	54,78	54,78	913
Vr	6	0,36	0,06	
Vt	7	55,14		

Tableau X: Analyse de la variance des résultats des comptes fécaux *d'E. coli* au 5^{ème} jour de traitement

Source de variation	ddl	SCE	CM	F _{obs}
Vf	1	88,97	88,97	1744,5
Vr	6	0,31	0,051	
Vt	7	89,021		

Tableau XI: Analyse de la variance des résultats des comptes fécaux *d'E. coli* au 6^{ème} jour de traitement

Source de variation	ddl	SCE	CM	F _{obs}
Vf	1	119,28	119,28	568
Vr	6	1,3	0,21	
Vt	7	120,58		

Tableau XII: Analyse de la variance des résultats des comptes fécaux *d'E. coli* au 7^{ème} jour de traitement

Source de variation	ddl	SCE	CM	F _{obs}
Vf	1	133,97	133,97	637,95
Vr	6	1,28	0,21	
Vt	7	135,25		

Tableau XIII : Analyse de la variance des résultats de l'antagonisme de *Lb. paracasei* envers *E. coli* dans le lait 50/50

Source de variation	ddl	SCE	CM	F _{obs}
Vf	2	118,39	59,19	164,4
Vr	20	6,47	0,36	
Vt	18	124,86		

Tableau XIV : Comparaison par le test de Student des résultats (log UFC/ml) de l'étude de l'antagonisme en milieu liquide entre les combinaisons 2 et 3

	Combinaison 2	Combinaison 3	t _{obs}	t _{the}
0h	6	6	0,980	2,179
6h	6,16	6,26		
12h	6,32	5,9		
15h	5,83	5,12		
18h	5,03	4,98		
21h	4,97	4,76		
24h	4,57	4,46		

Annexe 3 : Composition des milieux de culture**Tableau I : Milieu MRS**

Ingrédients	Quantités (g/l)
Peptone	10
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Glucose	20
Tween 80	1 ml
Phosphate dipotassique	2
Acétate de sodium	5
Citrate triammoniaque	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
Na₂CO₃	0,2
CaCl₂	0,1
Eau distillée qsp	1000 ml
pH 6.5	
Autoclaver à 120°C pendant 15 min.	

Pour milieu gélosé, ajouter 15g/l d'Agar

Tableau II : Bouillon nutritif

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

Tableau III: PCA (Plate Count Agar)

Ingrédients	Quantités (g/l)
Peptone	5
Extrait de levure	2,5
Glucose	1
Agar	15
pH 7,2	
Autoclaver à 120°C/15mn	

Pour le milieu soft, ajouter 8g d'agar/l.

Tableau IV: VRBG: (Gélose Glucosée Biliée au Crystal Violet et au Rouge neutre)

Ingredients	Quantités (g/l)
Peptone	5
Extrait de levure	1,5
Sels biliaires	10
Glucose	5
NaCl	30
Rouge neuter	2
Crystal violet	12
agar	7
pH 7,4	

Stériliser par ébullition pendant 15mn, ne pas autoclaver.

Tableau V : BCPL : Gélose Lactosée au Pourpre de Bromocrésol

Ingrédients	Quantités (g/l)
Peptone	5
Extrait de viande	3
Lactose	10
Poupre de bromocrésol	0,25
Gélose	15
Ph7	
Autoclaver à 120°C/20min	

Annexe 4 : Technique histologique

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

I. La circulation

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

I.1. Post-mordançage

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

I.2. Déshydratation

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

I.3. Eclaircissement

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

I.4. Imprégnation

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

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

II. Enrobage

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

III. La microtomie

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

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

IV. Etalement des coupes

Les tissus inclus dans la paraffine sont très comprimés pendant la coupe. L'étalement des coupes peut être effectué en utilisant une plaque chauffante (à 55°C) sur laquelle les lames sont déposées et recouvertes de liquide d'étalement. A la fin de l'opération, l'excès du liquide est absorbé avec un papier buvard. Les colles sont des substances

adhésives dont on induit les lames afin qu'elles y retiennent les coupes. Généralement, des solvants à base d'ovalbumine, de gélatine ou l'amidon sont utilisés.

V. Coloration

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

V.1. Le déparaffinage

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

V.2. Hydratation

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

Les problèmes les plus fréquents rencontrés sont le décollement des coupes et l'enlèvement incomplet du xylène. A la fin du déparaffinage, la coupe paraît transparente, alors que l'imprégnation par l'éthanol la rend normalement opaque. On

voit vite si l'hydratation n'a pas été bien faite, car le tissu ne s'opacifie pas aux endroits où il reste du xylène.

V.3. Coloration proprement dite

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

V.4. Montage à Eukitt

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

Résumé

L'alicament mis au point dans cette étude a été préparé à partir d'un mélange de lait écrémé et de lactosérum dans un rapport de 50/50 (V/V). Ce mélange est fermenté par une souche probiotique de *Lactobacillus paracasei* antagoniste envers *Escherichia coli* enteropathogène (EPEC) responsable de diarrhées infantiles.

Les résultats des tests de spots et de puits montrent une bonne activité antibactérienne de la souche test qui s'est traduit par des zones d'inhibition de 17 et 14 mm de diamètre respectivement. L'étude de cet antagonisme dans le lait 50/50 montre une inhibition maximale avec 10^9 /ml de *Lb. paracasei*, tandis que la différence d'inhibition entre 10^9 /ml et 10^8 /ml de la souche probiotique n'est pas significative. C'est ainsi que le taux de 10^8 /ml de *Lb. paracasei* est choisi pour l'étude *in vivo*.

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des lapins d'un mois d'âge. Le traitement de la diarrhée (provoquée par l'administration de 10^7 /ml d'EPEC) par l'alicament préparé a donné de bons résultats. Une diminution très significative des comptes fécaux d'*E. coli* dans les selles et dans le contenu intestinal des lapins a été observée. Les coupes histologiques obtenues après la dissection des lapins ont montré une restauration de villosités intestinales et coliques chez les lapins traités par le probiotique en comparaison avec le témoin diarrhéique et le lapin ayant reçu que du lait 50/50 stérile. Ces résultats ouvrent des perspectives quant à l'emploi de lait écrémé enrichi à 50% de lactosérum fermenté au *Lb. paracasei* à 10^8 /ml à des fins thérapeutiques voire préventives dans la lutte anti-diarrhéique des jeunes nourrissons.

Mots clés : Probiotique, Lactosérum, Diarrhée, *Lb. paracasei*, EPEC, Alicament.

Abstract

In this study, an alicament was perpetrated by the milk 50/50 (skim milk/whey) fermentation by Probiotic *Lactobacillus paracasei*. The antibacterial activity of this strain against enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) was tested by spots and walls method and in a mixed culture. The results show clear zones of inhibition around the walls and a reduction of the number of EPEC in mixed culture mainly with 10^8 and 10^9 /ml of *Lb. paracasei*. The ratio of 10^8 /ml of *Lb. paracasei* has been taken for the *in vivo* study. This latter has been achieved on two shares of holoxenic rabbits followed by histological cuts to the levels of the spindly intestines and colons of different rabbits. The histological cuts put in evidence the probiotic effects of the milk formula 50/50 (whey/skim milk) fermented with *Lb. paracasei* used in the treatment of diarrhea. These effects are conjugated by the reduction of the number of *E. coli* in the stools of rabbits, and a restructuration of the intestinal villus in rabbits treated with *Lb. paracasei*, against high levels of *E. coli* and villus more reduced with characteristic aspect of the EPEC infection.

Key words: Probiotic, whey, Diarrhea, *Lb. paracasei*, EPEC, Alicament.

ملخص

في هذه الدراسة تم تخثير الحليب المنزوع الدسم (lait écrème) الممزوج بمصل الحليب (lactosérum) بمقدار

حجمي 50 /50 (alicament) وذلك باستعمال بكتيريا Probiotique من سلالة *Lactobacillus paracasei* النتائج المحصل عليها في المخبر تبين أن 3.10^8 /ml من *Lactobacillus paracasei* كافي لتحقيق درجة عالية التثبيط ضد EPEC المسؤولة عن حالات الاسهال لدى الرضع . التجارب التي أقيمت علي الأرناب أكدت أن الخليط المحضر المختبر بالبكتيريا السابقة قادر على شفاء الأرناب المعالجة بهذا المحضر مقارنة بالأرناب التي عولجت بالخليط المعقم. بعد التشريح أكدت الصور المأخوذة للمقاطع النسيجية أن الزغبات المعوية لدى الأرناب المعالجة بالمحضر المختبر قد تجددت مقارنة بالشاهد و الأرناب المعالجة بالخليط المعقم .

الكلمات المفتاحية: Alicament ،EPEC، *Lactobacillus paracasei*، الإسهال، Lactosérum ، Probiotique