

FEUILLES D'ARBRES FRUITIERS : ALIMENT DE SAUVEGARDE POUR LES PETITS RUMINANTS

M. Houmani*, D.N. Benali*, A. Chermiti**

* Université de Blida - Faculté des sciences agro - vétérinaires et biologiques

B.P. 270, Route de Soumaa 09100 Blida (Algérie).

** Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie

Rue Hédi Karray, Ariana 2049, Tunisie.

RÉSUMÉ

La composition chimique varie avec les feuilles étudiées de 8,1 à 13,1 pour les matières azotées totales (MAT), de 8,4 à 14,6% pour les matières minérales, de 4,1 à 8,0% pour les matières grasses et de 2489 à 3639 kcal/kg MS pour l'énergie brute. Les teneurs en cellulose brute (CB) sont plus élevées avec les feuilles de poirier et d'olivier (16,3 et 16,7%) qu'avec celles du pêcher et d'abricotier (12,8 et 13,6%). Exprimées en quantité de MS par kg de poids métabolique, les feuilles de pêcher sont les plus ingérées (56g) suivies par celles d'abricotier (54,5g), d'olivier (48,5g) et de poirier (41,7g). La digestibilité de la matière organique est comparable entre les feuilles de pêcher et de poirier (65,8 et 66,8%) et identiques entre celles d'abricotier et d'olivier (63,8%). La digestibilité des MAT varie de 50,8 (olivier) à 68,9% (pêcher) avec les feuilles étudiées. La digestibilité de la CB est comparable entre les feuilles de pêcher et de poirier (61,1 et 61,8%) et inférieure à celle de la paille avec les feuilles d'olivier et d'abricotier (47,1 et 50,8 contre 54,3%). A l'exception des feuilles d'olivier, les valeurs énergétiques (0,60 à 0,67 UFL/kg MS ; 0,54 à 0,61 UFV/kg MS) sont plus élevées que celles de la paille (0,51 UFL et 0,40 UFV/kg MS). Les valeurs azotées sont 2,5 à 6 fois pour les PDIN et 11,6 à 22,9 fois pour les PDIE plus élevées selon les feuilles que celles de la paille (20,8g PDIN et 49,9g PDIE/kg MS). Les brebis en fin de gestation nourries avec la paille et les feuilles de pêcher ou d'abricotier gagnent un peu de poids vif (1,7 à 2,2 kg en 60 jours) et donnent naissance à des agneaux pesant 3,6 à 3,8 kg en moyenne.

Mots Clés : Feuilles d'arbres fruitiers, composition chimique, valeur alimentaire, brebis, Algérie.

SUMMARY

Sheets of fruit trees, a food of safeguard for the small ruminants We determine the chemical composition, digestibility and let us estimate the values energetics and nitrogeni green sheets of apricot tree, to fish, pear tree and olive-tree. We realize then, a test with 3 batches of ewe at the end of the gestation fed with rations of straw and sheets of apricot tree, straw and sheets to fish and of straw and concentrate. The chemical composition varies with the studied sheets from 8,1 to 13,1 for the total nitrogen matters, from 8,4 to 14,6% for the mineral matters, from 4,1 to 8,0% for the fat content (MG) and from 2489 to 3639 kcal/kg MS for crude energy. The contents crude fiber (CB) are higher with the sheets of pear tree and olive-tree (16,3 and 16,7%) that with those of fishing and apricot tree (12,8 and 13,6%). Expressed in quantity of MS per metabolic kg of weight, the sheets to fish are introduced (56g) followed by those of apricot tree (54,5g), olive-tree (48,5g) and pear tree (41,7g). The digestibility of the organic matter is comparable between the sheets to fish and of pear tree (65,8 and 66,8%) and identical between those of apricot tree and olive-tree (63,8%). The digestibility of the total nitrogen matters varies from 50,8 (olive-tree) to 68,9% (to fish) with the studied sheets. The digestibility of the CB is comparable between the sheets to fish and of pear tree (61,1 and 61,8%) and lower than that of the straw with the sheets of olive-tree and apricot tree (47,1 and 50,8 against 54,3%). With the exception of the sheets of olive-tree, energy values (0,60 to 0,67 UFL/kg DM ; 0,54 to 0,61 UFV/kg ms) are higher than those of the straw (0,51 UFL and 0,40 UFV/kg DM). The nitrogen values are 2,5 to 6 times for the PDIN and 11,6 to 22,9 times for the higher PDIE according to sheets' than those of the straw (20,8g PDIN and 49,9g PDIE/kg DM). The ewes nourished with the straw and the sheets to fish or of apricot tree gain a little live weight (1,7 to 2,2 kg in 60 days) and on average give rise to lambs weighing 3,6 to 3,8 kg.

Key Words : Sheets of fruit trees, chemical composition, feeding value, ewes, Algeria.

INTRODUCTION

En Afrique du Nord, la saison estivale est une longue période de sécheresse (juin à octobre) durant laquelle les pacages et parcours se dessèchent. Lorsque les plantes vertes ont disparu, les animaux se nourrissent de chaumes de céréales et d'herbes spontanées desséchées, caractérisés par une faible valeur alimentaire. Les pluies d'automne presque toujours tardives, reculent la pousse de l'herbe et accentuent la spéculation sur les fourrages secs (foin et paille). Les animaux utilisent alors, leurs réserves corporelles ; leurs performances zootechniques diminuent et leur sensibilité aux maladies augmente. Dans ce contexte, des arbres fruitiers après récolte des fruits et aoûtement, offrent une masse foliaire verte susceptible d'être utilisée dans l'alimentation de sauvegarde des petits ruminants. L'on peut citer l'abricotier, le figuier, le pêcher, le poirier et l'olivier. Pour les feuilles d'olivier, il existe des travaux (MAYONNE *et al.*, 1950 ; SANSOUCY, 1984 ; MARTILLOTTI, 1983 ; ZOIPOULOS, 1983 ; NEFZAOU, 1991). A notre connaissance, il n'existe pas d'étude sur les feuilles des autres espèces fruitières portant sur leur composition chimique, leur digestibilité et sur leur utilisation dans l'alimentation animale. C'est l'objet de notre étude.

Présentation de l'expérimentation

1. Récolte des feuilles d'arbres fruitiers

Il s'agit de feuilles d'abricotier, de pêcher et de poirier récoltées manuellement après lignification des jeunes pousses (octobre à décembre) correspondant à un ralentissement de la circulation de la sève (Aoûtment). Les feuilles d'olivier ont été récoltées lors du ramassage des olives (décembre et janvier) à partir des branches coupées. Les vergers ayant servi à la récolte des feuilles sont situés au piémont de l'Atlas Blidéen ; ces vergers n'ont subi aucun traitement phytosanitaire et n'ont reçu aucune fertilisation chimique.

2. Détermination de la composition chimique des feuilles

Les teneurs en matières sèches (MS), matières minérales (MM) pour obtenir la matière organique (MO) et matières azotées totales (MAT) ont été déterminées avec des feuilles vertes selon les méthodes de l'AOAC (1975). L'énergie brute a été déterminée par une combustion complète de l'échantillon, réalisée dans un calorimètre adiabatique de type "Adiabat 350". Tous les dosages ont été effectués en 4 répétitions.

3. Mesure de la digestibilité *in vivo* des feuilles

La digestibilité *in vivo* des feuilles a été mesurée sur 10 moutons âgés de 3 à 4 ans, non castrés de race locale Ouled Djellal, répartis en 2 lots de poids vifs comparables ($48,3 \pm 1,5$ et $48,7 \pm 1,8$ kg). Chaque lot de 5 moutons est placé dans des cages à métabolisme, au cours de 2 périodes successives de 21 jours séparées par une période de transition de 7 jours. Le premier lot a reçu successivement, les feuilles de pêcher et d'abricotier alors que le second lot a reçu successivement les feuilles de poirier et d'olivier. Les 2 lots recevaient de la paille de blé dur (300g/j/tête) et disposaient de blocs de minéraux à lécher et d'eau en permanence. Les feuilles ont été distribuées à volonté, en deux repas par jour (10h et 15h). La paille a été offerte en 1 seul repas par jour (8h). Les refus de feuilles et de paille ainsi que les fèces ont été ramassés, pesés, séchés et cumulés par mouton, quotidiennement durant les 10 derniers jours de chaque période de mesure, pour être analysés. Au début de chaque période, les animaux ont reçu une injection intramusculaire de 5 ml d'une solution de vitamines A, D3, E. La digestibilité *in vivo* de la paille, offerte à volonté en 2 repas par jour (9h et 15h), a été mesurée sur 5 moutons de la même race et dans les mêmes conditions que pour les feuilles d'arbres fruitiers.

4. Calcul des valeurs énergétiques et azotées des feuilles

La digestibilité réelle (dr) et la dégradabilité théorique (DT) des feuilles et de la paille n'ont pu être déterminées ; nous adoptons les valeurs données dans INRA (1988), soit 0,75 pour la dr et 0,73 pour la DT pour les feuilles et 0,70 pour la dr et 0,60 pour la DT pour la paille, et utilisons le système d'évaluation INRA (1988).

5. Essai avec des brebis gestantes nourries avec des feuilles d'arbres fruitiers

Trente (30) brebis ont été choisies en fonction du poids vif parmi 42 en fin de gestation (2 derniers mois), de race locale "Ouled Djellal". Identifiées à l'aide de boucles d'oreille, les brebis choisies ont été réparties en 3 lots de 10 animaux chacun et de poids vifs moyens comparables (lot 1 : $39,9 \pm 0,7$ kg, lot 2 : $39,5 \pm 0,5$ kg et lot 3 : $40,2 \pm 1,7$ kg). Les animaux du lot 1 ont reçu de la paille de blé dur à volonté et un concentré ovin en quantité limitée (435 g/j/tête) composé de 54,5% d'orge, 21,0% de gros son, 18,8% de tourteau de soja, 1,8% de complément minéral vitaminé, 2,5% de calcaire et 1,4% de sel). Les lots 2 et 3 ont reçu respectivement des feuilles d'abricotier et de pêcher à volonté (10% de refus) et de la paille de blé dur offerte en quantité limitée (500g/j/tête). Les brebis ont été pesées individuellement après mise - bas et délivrance. Les agneaux ont été pesés individuellement à la naissance.

6. Calculs statistiques

L'analyse de variance est effectuée par le test de Fischer et la comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Composition chimique des feuilles d'arbres fruitiers

Les feuilles d'arbres fruitiers sont caractérisées par des teneurs en constituants chimiques intéressantes ; leurs teneurs en matières azotées totales (MAT) varient entre 8,1% (poirier) et 13,1% (olivier) soit 3 à 4 fois plus élevées que celle de la paille. Leurs teneurs en matières minérales (MM) varient entre 8,4 et 14,6% respectivement observées avec les feuilles de poirier et d'abricotier. Ces feuilles sont également plus pourvues en matières grasses (MG) que la paille avec des teneurs variant de 4,1% (poirier) à 8,0% (abricotier) contre seulement 1,5% pour la paille. Avec des teneurs variant entre 12,8 et 16,7%, elles sont beaucoup moins riches en cellulose brute (CB) que la paille avec 42,7% (Tableau I). Les résultats obtenus avec les feuilles d'olivier confirment ceux rapportés par SANSOUCY (1984), ZOIPOULOS (1983) et NEFZAOUI (1991) pour lesquels les feuilles vertes d'olivier renferment 9 à 13% de MAT, 7 à 8% de MG, 13 à 18% de CB et 6 à 9% de MM. Les feuilles d'olivier dans notre cas, ont une teneur en MAT légèrement plus élevée que celle des feuilles de *Fraxinus excelsior* L. avec 12,3% mais beaucoup moins élevée que celle des feuilles d'*Acacia cyanophylla* L. avec 18,5% (CIHEAM, 1990). La teneur en CB des feuilles d'olivier est comparable à celle de *Fraxinus excelsior* L. (20%) et de l'*Acacia cyanophylla* L. (19,6%). Quant aux feuilles des autres espèces, leurs teneurs en constituants chimiques sont inférieures de 4 à 10 points pour les MAT et 4 à 7 points pour la CB comparées aux teneurs respectives des feuilles de *Fraxinus excelsior* L. et de l'*Acacia cyanophylla* L.

2. Ingestibilité et digestibilité des feuilles d'arbres fruitiers

Les quantités de feuilles ingérées sont significativement différentes, maximale avec le pêcher (56,0 g MS/kg PM) et minimale avec le poirier (41,7 g MS/kg PM) (Tableau II). Ces différences dans l'ingestion sont dues à la teneur en azote des feuilles à l'exception de celles de l'olivier

lesquelles malgré une teneur en azote supérieure à celle des feuilles de pêcher, sont ingérées en quantité inférieure en raison vraisemblablement de leur amertume ou encore à leur teneur élevée en lignine de 18 à 20% (NEFZAOU, 1991). Toutes les feuilles sont ingérées en quantités plus élevées de 14,6 à 53,8% que la paille de blé. La digestibilité de la matière organique (DMO) des feuilles est plus élevée avec le poirier et le pêcher avec des valeurs comparables (65,8 et 66,8%) suivie par celle de l'olivier et de l'abricotier avec des valeurs respectivement inférieures de 2 et 3 points (Tableau II). La DMO des feuilles est supérieure à celle de la paille de 17,4 à 18,4 points et du foin de vesce - avoine de 5,5 à 8,5 points) mais inférieure à celle du même foin traité à l'urée de 3 à 6 points selon l'espèce considérée (HOUMANI, 1998).

La digestibilité des matières azotées totales (dMAT) est significativement différente entre les feuilles étudiées. La dMAT la plus élevée, est notée avec les feuilles de pêcher (68,9%) et la plus faible avec les feuilles d'olivier (50,8%) (Tableau II). A l'exception des feuilles d'olivier, la dMAT augmente avec la teneur en azote des feuilles (Tableau I). Les teneurs en lignine élevée (18 à 20%) et en azote soluble faible (8 à 14%) des feuilles d'olivier selon NEFZAOU, (1991) serait la raison la plus vraisemblable à celle faible dMAT. En effet, l'azote fixé sur les parois ligneuses échappe à l'action des micro-organismes du rumen et se retrouve dans les fèces ; ce qui semble être confirmé par la faible digestibilité de la cellulose brute des feuilles d'olivier avec seulement 47,7%. La dMAT des feuilles est supérieure à celle du foin de vesce - avoine avec 43,4% (HOUMANI, 1998). Comparée à la dMAT du même foin traité à l'urée avec 64,5%, la dMAT des feuilles est supérieure de 4,4 points pour le pêcher, comparable pour l'abricotier (63,8 contre 64,5%) et inférieure pour le poirier de 11,7 points et de l'olivier de 13,7 points (HOUMANI, 1998).

Les meilleures digestibilités de la cellulose brute (dCB) sont observées avec les feuilles de pêcher (61,1%) et de poirier (61,8%). Les dCB des feuilles d'olivier (47,7%) et d'abricotier (50,8%) sont inférieures à celle de la paille de blé (54,3%) (Tableau II). Pour la dCB des feuilles d'olivier, la présence d'une forte proportion de lignine (NEFZAOU, 1991) serait à l'origine de cette faible dCB. Comparée à celle du foin de vesce-avoine avec 60,5% (HOUMANI, 1998), la dCB des feuilles est similaire avec le poirier ou le pêcher et inférieure avec l'olivier et l'abricotier.

3. Estimation des valeurs énergétiques et azotées des feuilles d'arbres fruitiers

Valeur énergétique

Les feuilles de pêcher, de poirier et d'abricotier se caractérisent par des valeurs énergétiques plus élevées de 0,09 à 0,16 UFL et 0,14 à 0,21 UFV/kg MS comparées à celles de la paille de blé (Tableau III) et, intermédiaires entre celles d'un foin de vesce-avoine de qualité moyenne avec 0,53 UFV et 0,62 UFL/kg MS et du même foin traité à l'urée avec 0,73 UFV et 0,79 UFL/kg MS (HOUMANI, 1998). Les feuilles d'olivier sont légèrement moins énergétiques que la paille de blé (Tableau III).

Valeur azotée

Les protéines digestibles dans l'intestin d'origine alimentaire (PDIA) des feuilles sont près de 2 à 3 fois plus élevées que celle de la paille (18,2 à 29,4 contre 10,3 g/kg MS). Les feuilles d'olivier en sont plus riches alors que celles du poirier en renferment moins que le reste des feuilles étudiées (Tableau III).

Les protéines digestibles dans l'intestin grâce à l'azote disponible (PDIN) dans les feuilles sont près de 2,5 à 6 fois plus élevées que chez la paille (Tableau III). La meilleure valeur est notée avec les feuilles de pêcher (123,1 g/kg MS) et la plus faible avec les feuilles de poirier (50,9 g/kg MS).

Les protéines digestibles dans l'intestin grâce à l'énergie disponible (PDIE) sont plus élevées que les PDIN dans la paille de 29,1 g/kg MS, dans les feuilles de poirier de 18,2 g/kg MS et d'abricotier de 1,9 g/kg MS. Par contre, les PDIE sont inférieures aux PDIN dans les feuilles de pêcher de 53,6 g/kg MS et de l'olivier de 9,5 g/kg MS (Tableau III).

Il apparaît donc que les feuilles d'abricotier et de poirier sont légèrement à franchement déficitaires en azote. Par contre, les feuilles d'olivier et de pêcher sont franchement déficitaires en énergie.

4 - Résultats obtenus avec des brebis gestantes

Ingestion des feuilles d'arbres fruitiers

La paille offerte à volonté a été ingérée à raison de 37,7 g MS/kg PM. Le concentré (C) limité à 41,7% de la ration n'a pas eu d'effet dépressif sur l'ingestion de la paille comparée à la même paille offerte seule et à volonté aux moutons adultes (36,4 g MS/kg PM) (Tableau II). La distribution des feuilles à volonté a par contre, entraîné une moins bonne ingestion de la paille offerte en quantité limitée avec moins 33,1% avec les feuilles de pêcher et 38,7% avec les feuilles d'abricotier. Les feuilles de pêcher plus riches en MAT que celles de l'abricotier (11,5 contre 9,5%), ont permis d'augmenter la proportion de paille ingérée de 5,6 points.

Les feuilles d'abricotier ont été ingérées en quantité plus élevée que les feuilles de pêcher (62,5,5 contre 47,9 g MS/kg PM). Le meilleur équilibre en PDIE (61,5g/kg MS) et PDIN (59,6g/kg MS) a vraisemblablement favorisé l'ingestion des feuilles d'abricotier contrairement aux feuilles de pêcher (69,5 g PDIE contre 123,1 g PDIN/kg MS). Cependant, l'excès en PDIN apporté avec les feuilles de pêcher s'est traduit par une ingestion de paille plus élevée mais limitée par une distribution de paille peu généreuse.

Variation de poids vif et consommation de protéines

Il est intéressant de noter que les brebis n'ont pas perdu de poids vif avec les rations renfermant les feuilles d'abricotier ou de pêcher et, ont même gagné un peu de poids vif. Les brebis ayant reçu les rations P+C et P+Fpe ont eu un gain identique avec 28,3 g/j, légèrement plus bas que celui des brebis nourries avec la ration P+Fab avec 36,7 g/j (Tableau IV).

Les agneaux nés des brebis nourries avec la ration P+Fab ont un poids vif moyen à la naissance supérieur à celui des agneaux nés des brebis alimentées avec la ration P+C (3,8 contre 3,4 kg) mais comparable à celui des agneaux nés des brebis ayant reçu la ration P+Fpe (3,6 kg) (Tableau IV).

Pour des résultats comparables (gain de poids vif des brebis, poids vif des agneaux à la naissance), les brebis nourries avec la ration P+Fab ingèrent 15,3% plus de matière sèche que les brebis alimentées avec la ration P+Fpe. Ceci s'expliquerait par la valeur alimentaire des feuilles d'abricotier plus faible que celle des feuilles de pêcher. Ainsi pour satisfaire leurs besoins alimentaires, les brebis recevant la ration P+Fab ingèrent plus de feuilles, soit 76,3% de la ration, que les brebis ayant reçu la ration P+Fpe avec seulement 65,5% de la ration ingérée. L'autre explication serait la digestibilité des constituants organiques, plus élevée avec les feuilles de pêcher qu'avec celles de l'abricotier d'où il s'ensuit un meilleur apport nutritif pour les brebis nourries avec la ration P+Fpe. La différence de poids vif notée avec les agneaux serait due à un développement du squelette plus important avec ceux issus de brebis ayant reçu la ration P+Fab qu'avec ceux issus de brebis nourries avec la ration P+C (taille des agneaux non mesurée et éléments minéraux non dosés), les feuilles d'abricotier étant plus riches en cendres que le concentré.

Les rations ainsi distribuées ont toutes permis de couvrir les besoins nutritifs des brebis en fin de gestation (Tableau IV) ; des écarts sont notés entre les apports en PDIN et PDIE des rations, 66,1 g PDIN en excès avec la ration P+Fpe et, 11,8 et 13,0 g PDIE en excès avec les rations P+C et P+Fab respectivement. Les brebis nourries avec la ration P+Fpe ont consommé une quantité de PDIN plus élevée (soit une différence de 0,78 g PDIN par kg de poids vif) que les brebis ayant reçu les rations P+C et P+Fab. Ceci est dû à la richesse en azote des feuilles de pêcher d'où une bonne partie de cet azote serait éliminée dans les urines en raison du déséquilibre entre PDIN et PDIE de la ration. Le bilan azoté aurait certainement permis de le préciser.

CONCLUSION

Les feuilles des arbres fruitiers étudiées se caractérisent par une bonne valeur alimentaire et permettent d'appréciables performances zootechniques avec des brebis en fin de gestation. Elles constituent de ce fait, un intéressant complément pour la paille de blé mais également pour le foin de vesce-avoine de faible valeur nutritive. Disponibles en abondance en automne, saison durant laquelle la spéculation sur les fourrages secs (paille et foin) est rude, les feuilles d'arbres fruitiers sont une véritable ressource fourragère locale, durable et moins sensible au déficit pluviométrique. Les 2/3 des exploitations agricoles algériennes sont de type familial, élèvent moins de 10 animaux et pratiquent la polyculture; la récolte des feuilles peut rentabiliser une main-d'œuvre familiale sous-utilisée en automne.

Références bibliographiques

AOAC. 1975. *Official methods of analysis*, 12th ed. Washington DC.

CIHEAM. 1990. Tableaux de la valeur alimentaire pour les ruminants des fourrages et sous-produits d'origine méditerranéenne. *Options méditerranéennes Série B : Etudes et Recherches* n° 4.

HOUMANI M., 1998. Amélioration de la valeur alimentaire du foin de vesce-avoine par le traitement à l'urée. *Fourrages* 154 : 239-248.

INRA. 1988. *Alimentation des bovins, ovins et caprins*, éd. INRA, Route de Saint-Cyr, F-78000, Versailles, 476p.

MARTILLOTTI F., 1983. Use of olive by-products in animal feeding in Italy. *Réunion du Comité Technique "Valorisation des sous-produits de l'olivier"*, Madrid, Nov. 1983 : 48-58.

MAYONNE B., SBLENDORIO A., CECI GINESTRELLI D., 1950. Ricerche sulla composizione chimica, sulla digeribilità e sul valore nutritivo delle foglie di olivo (*Olea europea* L.) verdi, essiccate, insilate. *Ann. Istituta Sperimentale per la Zootechnia* Roma. 4 : 1-19.

NEFZAOU A., 1991. Valorisation des sous-produits de l'olivier. *Options méditerranéennes (Fourrages et sous-produits méditerranéens) Série A : Séminaires méditerranéens* n° 16 : 101-108.

SANSOUCY R., 1984. Utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale dans le bassin méditerranéen. Division de la production et santé animales, *Etude FAO - Rome*, n° 43.

ZOÏPOULOS P.E., 1983 : Production et utilisation des sous-produits de l'olivier comme aliment pour le bétail en Grèce. *Réunion du Comité Technique "Valorisation des sous-produits de l'olivier"* Madrid, Nov. 1983 : 59-64.

Tableau I : Composition chimique des feuilles d'arbres fruitiers.

Aliments	MS (%)	En % de MS					MGKcal/kgMS
		MO	MAT	CB	MM	MG	
Paille de blé	91,1±0,4 ^c	94,0±0,7 ^c	3,3±0,3 ^c	42,7±0,9 ^c	6,0±0,7 ^c	1,5 ± 0,7 ^c	4340 ± 19,4 ^a
Feuilles d'abricotier	48,3±0,9 ^c	84,3±0,2 ^d	9,5±0,2 ^c	12,8±0,9 ^b	14,6±0,2 ^d	8,0 ± 0,1 ^a	3383 ± 16,5 ^d
Feuilles de pêcher	51,6±1,6 ^b	87,6±0,7 ^c	11,5±0,3 ^b	13,6±0,3 ^b	12,5±0,7 ^c	7,6 ± 0,4 ^a	3639 ± 17,9 ^b
Feuilles de poirier	61,9±1,1 ^a	91,3±0,5 ^a	8,1±0,3 ^d	16,3±0,4 ^a	8,4±0,5 ^a	4,1 ± 0,2 ^b	3586 ± 17,1 ^c
Feuilles d'olivier	50,3±0,9 ^b	90,7±0,2 ^b	13,1±0,2 ^a	16,7±0,4 ^a	9,3±0,2 ^b	7,7 ± 0,3 ^a	2489 ± 17,8 ^f
Concentré	87,2±1,2 ^f	89,3±0,2 ^f	17,1±1,0 ^f	4,9±0,7 ^f	10,3±0,2 ^f	3,8 ± 0,3 ^b	4175 ± 21,7 ⁱ

MS : matière sèche ; MO : matière organique ; MAT : matières azotées totales ; CB : cellulose brute ; MM : matières minérales ; MG : matières grasses ;

EB : énergie brute. Sur une même colonne, les valeurs portant un même indice sont comparables au seuil de 5%.

Tableau II : Ingestibilité et digestibilité des feuilles d'arbres fruitiers.

	Paille de blé	Feuilles vertes			
		Abricotier	Pêcher	Poirier	Olivier
Ingestibilité (g MS/kg PM)	36,4 ± 0,9 ^f	54,5 ± 0,9 ^b	56,0 ± 0,5 ^a	41,7 ± 0,6 ^d	48,5 ± 0,7 ^c
Digestibilité (%)					
dMO	48,4 ± 1,2 ^c	63,8 ± 1,3 ^b	65,8 ± 1,5 ^a	66,8 ± 0,8 ^a	63,8 ± 0,5 ^b
dMAT	9,9 ± 0,7 ^f	63,8 ± 0,9 ^b	68,9 ± 0,4 ^a	52,7 ± 0,9 ^c	50,8 ± 0,9 ^d
dCB	54,3 ± 1,6 ^b	50,8 ± 0,8 ^c	61,1 ± 1,2 ^a	61,8 ± 0,7 ^a	47,7 ± 0,7 ^d

PM : poids métabolique ; dMO : digestibilité de la matière organique ; dMAT : digestibilité des matières azotées totales ; dCB : digestibilité de la cellulose brute. Sur une même ligne, les valeurs portant un même indice sont comparables au seuil de 5%.

Tableau III : Valeurs énergétique et azotée des feuilles d'arbres fruitiers.

Aliments	Par kg de MS		g/kg de MS		
	Valeurs énergétiques		Valeurs azotées		
	UFL	UFV	PDIA	PDIN	PDIE
Paille de blé	0,51	0,40	10,3	20,8	49,9
Feuilles d'abricotier	0,60	0,54	21,3	59,6	61,5
Feuilles de pêcher	0,67	0,61	25,8	123,1	69,5
Feuilles de poirier	0,66	0,61	18,2	50,9	69,1
Feuilles d'olivier	0,44	0,39	29,4	82,3	72,8
Concentré (*)	1,00	0,98	56,4	127,8	114,2

MS : matière sèche ; UFL : unité fourragère lait ; UFV : unité fourragère viande ; PDIA : protéines alimentaires d'origine alimentaire ; PDIN : protéines digestibles dans l'intestin grâce à l'azote disponible ; PDIE : protéines digestibles dans l'intestin grâce à l'énergie disponible ; Concentré (*) : valeurs calculées à partir des tables INRA (1988).

Tableau IV : Résultats obtenus avec les brebis gestantes.

Régime alimentaire	P + C	P + Fab	P + Fpe
PV initial (kg)	39,9 ± 0,7 ^a	39,5 ± 0,6 ^a	40,2 ± 0,9 ^a
PV final après agnelage (kg)	41,6 ± 0,3 ^a	41,7 ± 0,4 ^a	41,9 ± 0,7 ^a
Variation de PV (kg)	1,7	2,2	1,7
PV avant agnelage (PV final + PV agneau + annexes)	44,6 ± 0,4 ^a	44,9 ± 0,5 ^a	45,2 ± 0,7 ^a
Quantité de matière sèche ingérée			
Paille (g MS/kg PM)	37,7 ± 1,7 ^a	23,8 ± 1,5 ^c	25,2 ± 0,9 ^b
Feuilles (g MS/kg PM)		62,5 ± 3,2 ^a	47,9 ± 2,6 ^b
(% du total ingéré)		72,4	65,5
Concentré (g MS/kg PM)	26,9		
(% du total ingéré)	41,7		
Apports alimentaires de la ration ingérée			
g PDIN	68,23	67,95	104,20
g PDIE	80,00	81,00	74,10
UFL	0,74	0,79	0,73
Apports alimentaires recommandés (INRA,1988)			
UFL	0,65	0,65	0,66
g PDI	67,79	67,94	68,09
Protéines digestibles (g/kg PV brebis pleine/j)			
PDIN	1,53	1,51	2,31
PDIE	1,79	1,80	1,64
Poids vif des agneaux à la naissance (kg)	3,4 ± 0,2 ^b	3,8 ± 0,4 ^a	3,6 ± 0,3 ^{ab}

P+C : paille + concentré ; P+Fab : paille + feuilles d'abricotier ; P+Fpe : paille + feuilles de pêcher ; MS : matière sèche ; PM : poids métabolique ; PV : poids vif ; PDIN : protéines digestibles dans l'intestin grâce à l'azote disponible ; PDIE : protéines digestibles dans l'intestin grâce à l'énergie disponible. Sur une même ligne, les valeurs portant un même indice sont comparables au seuil de 5%.

ACTIVITE ANTIMICROBIENNE *IN VITRO* ET *IN VIVO* DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* ENVERS *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATHOGENE

101

Instituteur National de la Recherche Agronomique d'Algérie

A. DOUMANDJI (1), L. NECHE (1)

(1) - Université Saâd DAHLAB, Faculté des sciences agro-vétérinaires, département des sciences agronomiques, route de Soumaâ, B.P. 270 - 9000 Blida, Algérie.

E-mail : corino147@yahoo.fr.

RÉSUMÉ

Les bactéries lactiques jouent un rôle important dans la bio-conservation des aliments fermentés et dans la biothérapie des troubles digestifs. Ce rôle est dû à la production de différents composés antimicrobiens, notamment des bactériocines qui sont des substances extracellulaires de nature protéique. Une souche probiotique soit *Lactobacillus acidophilus* a été utilisée dans cette optique pour l'inhibition de la croissance de l'espèce *Escherichia coli* entéropathogène, agent causal de la diarrhée infantile. Des études *in vitro* et *in vivo* ont permis d'étudier et de confirmer l'effet antagoniste de cette espèce lactique à l'égard d'*Escherichia coli*. D'après nos résultats, *Lactobacillus acidophilus* est douée d'une activité bactériocinogène. L'activité antimicrobienne est décelée dans les surnageants brut actif de culture. Lorsque l'espèce pathogène se retrouve en présence de *Lactobacillus acidophilus*, une diminution du nombre d'*Escherichia coli* est noté à raison de un Log après 1 heure et 20 min d'incubation. Le nombre diminue de $1,8 \cdot 10^7$ à $2 \cdot 10^6$ UFC/mL, Ce qui est très intéressant lors d'un traitement thérapeutique anti-diarrhéique. Les résultats des effets antagonistes *in vitro* observés sont confirmés par la mise en application d'étude *in vivo* sur des souris holoxéniques. Cette étude montre que l'administration du lait écrémé reconstitué fermenté avec *Lactobacillus acidophilus* influence sur l'équilibre de la flore intestinale des souris par la réduction du nombre de la souche pathogène.

Mots Clés : *Lactobacillus acidophilus*, bactériocine, *Escherichia coli*, effet antagoniste, *in vivo*, *in vitro*.

SUMMARY

The lactic acid bacteria play a paramount role in the bio-conservation of fermented food and the bio-therapy digestive disorders. This role is with the production of the various antimicrobial compounds, among those, the bacteriocines which are of the extracellular substances of nature proteinic. A probiotic stock is *Lactobacillus acidophilus* was used in this optics for the inhibition of the growth of the species *Escherichia coli* enteropathogene causal agent of infantile diarrhoea. *In vitro* studies and *in vivo* made it possible to study and confirm the antagonistic effect of this lactic species with regard to *Escherichia coli*. According to our results, *Lactobacillus acidophilus* is endowed with a bacteriocinogene activity. The antimicrobial activity is detected in the supernatants gross active of culture. When the pathogenic species is found in the presence of *Lactobacillus acidophilus*, a reduction in the number of *Escherichia coli* is noted at a rate of a Log after 1 a.m. and 20 min of incubation. The number falls by $1,8 \cdot 10^7$ to $2 \cdot 10^6$ UFC/mL, which is very interesting at the time of an anti-diarrheal therapeutic treatment. The results of the antagonistic effects observed *in vitro* are confirmed by the implementation of study *in vivo* on haloxenic mice. This study shows that the administration of skimmed milk reconstituted fermented with *Lactobacillus acidophilus* influence on the balance of the intestinal flora of the mice by the reduction of the number of the pathogenic strain.

Key Words : *Lactobacillus acidophilus*, bacteriocine, *Escherichia coli*, antagonistic effect, *in vivo*, *in vitro*.

تلعب البكتيريا اللبنية دورا هاما في الحفظ الحي و البيولوجي للاغذية الخمائرية و العلاج الحي البيولوجي أيضا للقلبات المعدية المؤدية للإسهال. هذا الدور يعود إلى إنتاج مضادات بكتيرية مختلفة من بينها نذكر البكتيريوسينات و التي هي عبارة عن مواد ذات طبيعة بروتينية مفروزة خارج الخلية. سلالة تالقية و لتكن لاكتوبسيليس اسيدوفيليس قد عزلت و استعملناها في هذا السياق من اجل عرقلة إبطال نمو البكتيريا اشيريشيا كولي المسبب الرئيسي لإسهال الأطفال.

دراسات مخبرية تم إجراؤها عن طريق زرع كل نوعي البكتيريا في الحليب منزوع الدسم المركب إضافة إلى تقنية الانتشار على اللاقار. تطبيق هذه الدراسات على الفئران سمح لنا بدراسة الفعل المضاد للبكتيريا اللبنية ضد الجرثومة الضارة اشيريشيا كولي.

كلمات مفتاحية : لاكتوباسيلوس اسيدوفيلوس. باكتيريوسين. اشيريشيا كولي. فعل مضاد. *in vivo, in vitro*

INTRODUCTION

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des siècles pour fermenter les aliments et ainsi, mieux les conserver. Réputées inoffensives pour l'homme, leur usage s'est largement répandu dans l'industrie alimentaire. Certaines souches ont même été envisagées pour le traitement de maladies humaines. En effet le développement de nouvelles technologies de biologie cellulaire ouvre une perspective d'utilisation de ces bactéries comme agents bio-thérapeutiques (HEYMAN et HEULEVIN, 2006, MOFREDJ *et al.*, 2007).

Les affections diarrhéiques sont globalement responsables d'un cinquième de la mortalité totale des enfants de moins de cinq ans, avec un nombre annuel de décès estimé à 2,2 millions. Une proportion significative de ces décès peut être liée à des épisodes de diarrhée persistante (définie comme une diarrhée persistante lorsqu'elle dure plus de 15 jours avec altération de la croissance). Il a été démontré que le cadre des diarrhées persistantes rassemblait des enfants chez lesquels la diarrhée était nettement plus sévère (BLACK *et al.*, 2003, BHUTTA 2006).

Escherichia coli entéropathogène est responsable de nombreuses diarrhées infantiles dans les pays en développement et a été à l'origine d'épidémies assez importantes dans les pays occidentaux dans les années 1950 et 1960, en particulier les sérotypes O111 et O55 (GOMEZ et CLEARY, 1994).

Ces dernières années plusieurs études ont été entreprises afin d'évaluer l'impact sur la santé de certaines composantes de l'alimentation à caractère non nutritionnel telles que les micronutriments, les prébiotiques et les probiotiques. La définition des probiotiques a connu des évolutions au cours du temps. Les probiotiques sont généralement définis en tant que micro-organismes vivants exerçant une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère en améliorant l'équilibre de la flore intestinale (FULLER, 1989). D'une manière générale, les probiotiques sont considérés comme des agents protecteurs vis-à-vis des risques d'apparitions de pathologies digestives. Parmi les effets les mieux documentés figurent l'effet antidiarrhéique dans le cadre d'une antibiothérapie (GILL, 2003), ou encore l'amélioration des troubles intestinaux associés à l'intolérance au lactose (PETTOELLO *et al.*, 1989).

La première étape de notre étude concerne l'isolement et l'identification d'une souche productrice de bactériocine (*Lactobacillus acidophilus*), souche isolée à partir d'un lben algérien, ainsi que l'isolement et l'identification d'une souche cible (*Escherichia coli* entéropathogène), souche isolée à partir des selles diarrhéiques de nourrisson. La seconde étape est orientée vers l'étude *in vitro* de l'activité antimicrobienne de la souche d'intérêt à l'égard d'*Escherichia coli* entéropathogène. La troisième étape est consacrée à la mise en application *in vivo* des effets antagonistes de *Lactobacillus acidophilus* envers

Escherichia coli entéropathogène, sur des souris holoxéniques. Le but est de démontrer l'effet thérapeutique de *Lactobacillus acidophilus* lors de diarrhées à *Escherichia coli*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Technique d'isolement de *Lactobacillus acidophilus*

Le lait doit répondre à un certain nombre de critères de qualités physico-chimiques et microbiennes (LAMBERT, 1988). Le lait doit être obtenu uniquement à partir d'animaux sains. *Lactobacillus acidophilus* est isolée à partir du lait caillé naturellement, fourni par une ferme de la région de Blida. A partir du lait de vache, des dilutions décimales jusqu'à 10^{-7} sont réalisées. A partir de la dernière dilution, des ensemencements sont effectués en profondeur sur milieu MRS ce qui favorise la croissance des lactobacilles. L'incubation des boîtes de Pétri est réalisée à une température de 37°C pendant 24 à 48 h.

2. Identification de la souche lactique

La souche lactique est identifiée selon les tests préconisés par LARPENT (1997). Des observations macroscopiques et microscopiques, des colorations de Gram, des tests de la catalase, des tests physiologiques et des tests biochimiques de la galerie API 20A sont réalisés.

3. Technique d'isolement d'*Escherichia coli* à partir des selles de nourrisson diarrhéique

La souche *Escherichia coli* provient des selles fraîches de nourrisson diarrhéique âgé d'un mois. L'échantillonnage est effectué au niveau de la pouponnière de l'hôpital Ben Boulaid de Blida.

Les selles sont prélevées stérilement à partir de la couche jetable. L'isolement d'*Escherichia coli* est réalisé en profondeur sur gélose au désoxycholate à 1‰ à 44°C. Après 48 h d'incuba-

tion, les colonies sont sélectionnées selon leur aspect morphologique ainsi que sur la base de leur mobilité, de leur forme, de leur état frais et de la coloration de Gram. Les colonies sont repiquées sur le bouillon nutritif puis incubées pendant 24 h à 44°C. La pureté de la souche est contrôlée par la coloration de Gram, le test de la catalase, les tests physiologiques et les tests biochimiques de la galerie API 20E. Par la suite la souche est repiquée sur bouillon nutritif.

Le lait écrémé est utilisé comme milieu de culture pour le suivi de l'antagonisme *in vitro* et *in vivo* de *Lactobacillus acidophilus* envers *Escherichia coli* entéropathogène. Ce lait est préparé en diluant 92 g de poudre de lait dans 1000 mL d'eau distillée stérile. Le lait écrémé reconstitué est distribué à raison de 9 ml dans des tubes à essais. Il sera stérilisé à 110°C pendant 10 minutes. Une fois le lait refroidi, il sera congelé à - 20°C en attendant son utilisation.

4. Activité antimicrobienne *in vitro* de *Lactobacillus acidophilus*

La souche d'*Escherichia coli* entéropathogène isolée et identifiée précédemment est utilisée comme souche cible. Cette dernière est repiquée sur gélose désoxycholate, puis incubée à 44°C/24 h en aérobose. Après incubation, une colonie est reprise dans 9 ml de lait écrémé et incubée à 44°C/18 h.

Une souche de *Lactobacillus acidophilus* est repiquée sur gélose MRS puis incubée à 37°C/24 h. Une colonie est alors reprise dans 9 ml de lait écrémé et incubée à 37°C/18 h en anaérobiose.

A partir des trois *inocula* standards, on ensemence des tubes de lait écrémé de 7 mL avec une association de 1 mL de *Lactobacillus acidophilus* (soit $1,63 \cdot 10^8$ UFC/mL) + 1 mL d'*Escherichia coli* (soit $1,50 \cdot 10^8$ UFC/mL). L'ensemble est incubé à 37°C/24 h en aérobose.

5. Activité antimicrobienne *in vitro* de *Lactobacillus acidophilus*

5.1. Préparation de la substance active antimicrobienne (Surnageant brut actif)

Une colonie de la souche d'intérêt (*Lactobacillus acidophilus*) est ensemencée dans 5 mL de bouillon MRS et étuvée à 37°C pendant 18 h. Une centrifugation est réalisée à 4000 tours/min pendant 20 min. Le surnageant et le culot sont récupérés stérilement pour la recherche de la substance inhibitrice. Le pH du surnageant est ajusté à une valeur de 6,8 avec une solution de NOH 1N.

5.2. Mise en évidence de l'activité inhibitrice de la bactériocine contre *Escherichia coli* par la méthode de diffusion des puits

L'activité antimicrobienne du surnageant brut actif ainsi que de l'extrait cellulaire est testée selon la méthode de la diffusion des puits. La souche cible utilisée est *Escherichia coli*. La gélose désoxycholate à 1‰ est ensemencée à raison de 1% avec la souche cible. 20 mL de cette gélose sont coulés dans des boîtes de Pétri. Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement sur cette surface. Ces puits seront remplis avec 100 µL du surnageant de culture ou d'extrait cellulaire. Ces boîtes de Pétri sont mises à une température de +4°C/4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne. Les cultures seront mises dans leur condition optimale de croissance. La lecture se fait par la mesure du diamètre en mm des zones d'inhibition formée autour des puits. On dit qu'une inhibition est positive si le diamètre est supérieur à 2 mm (THOMPSON *et al.*, 1996 ; KHEADR *et al.*, 2007).

6. Activité antimicrobienne *in vivo* de *Escherichia acidophilus*

Les résultats significatifs des effets antagonistes observés *in vitro* vont susciter une étude *in vivo* réalisée sur des souris holoxéniques provenant

de l'institut Pasteur. L'effet antagoniste *in vivo* de *Lactobacillus acidophilus* est étudié sur une souche d'*Escherichia coli* entéropathogène selon le schéma suivant :

- La 1^{ère} partie consiste au préalable en l'étude de la flore intestinale de souris holoxéniques.
- La 2^{ème} partie concerne l'administration des deux espèces bactériennes (*Lactobacillus acidophilus* et *Escherichia coli*) aux souris afin de suivre l'évolution d'*Escherichia coli* dans les selles. Pour cela 3 lots de 5 souris soit 15 rongeurs au total sont prévus. Ces souris appartiennent à la race "wistar", âgées de deux mois et pesant 10 grammes chacune.

● **Lot 1 (témoin)** : Les selles sont prélevées avant administration de *Lactobacillus acidophilus* ou d'*Escherichia coli*.

● **Lot 2** : Les 5 souris recevront 1 mL de lait écrémé ensemencé avec *Escherichia coli* pendant 3 jours. L'évolution d'*Escherichia coli* au niveau des selles est suivi pendant une semaine.

● **Lot 3** : Les 5 souris recevront 1 mL de lait ensemencé avec *E. coli* pendant 48h. Puis à partir du 3^{ème} jour, 1 mL de lait fermenté avec *Lb. acidophilus* est administré aux souris durant 24 h. L'évolution d'*Escherichia coli* au niveau des selles est suivi durant une semaine.

7. Analyse microbiologique des selles

L'analyse microbiologique des selles des souris du lot 1 (le témoin) a pour but la recherche des germes suivants :

- Les coliformes totaux et fécaux.
- *Escherichia coli*.
- Les entérocoques (Streptocoque de groupe D).
- Les staphylocoques.
- Les salmonelles.
- *Clostridium* sulfito-réducteurs.
- Les germes aérobies totaux mésophiles (GATM).

- Les levures et moisissures.
- *Lactobacillus acidophilus*.

8. Évolution d'*Escherichia coli* dans les selles et leur dénombrement

Après administration d'*Escherichia coli* seul aux souris (lot 2) et d'*Escherichia coli* en présence de *Lactobacillus acidophilus* (lot 3) (traitement thérapeutique), les selles sont prélevées le lendemain de l'administration et durant toute la semaine. Un suivi de l'évolution du germe pathogène ainsi que leur dénombrement sera réalisé au niveau des selles. Ce suivi est réalisé de la manière suivante :

- ✓ 1g de selles est prélevé et dissout dans 9 mL d'eau physiologique (dilution 10^{-1}). A partir de cette dernière, 1 mL est mélangé à 9 mL d'eau physiologie (dilution 10^{-2}), ainsi de suite jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-7} .
- ✓ A partir des trois dernières dilutions (10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7}), 1 mL est cultivé en masse avec de la gélose au désoxycholate à 1% puis incubé à 44°C/24 à 48 h.
- ✓ Après incubation, un dénombrement d'*Escherichia coli* est réalisé (nombre des UFC/mL).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Etude de l'activité antagoniste *in vitro* de *Lactobacillus acidophilus* envers *Escherichia coli* entéropathogènes

1.1. Suivi d'*Escherichia coli* dans le lait écrémé en culture seule ou mixte

La figure 1 qui rapporte l'évolution d'*Escherichia coli* en culture seule ou en présence de *Lactobacillus acidophilus*. Le nombre d'*Escherichia coli* à T0 est de l'ordre de $2 \cdot 10^7$ germes/mL. Lorsque cette souche est en culture seule, elle représente une courbe de croissance qui suit une loi normale. Cette dernière est constituée d'une phase exponentielle, d'une phase stationnaire et d'une phase de déclin. En

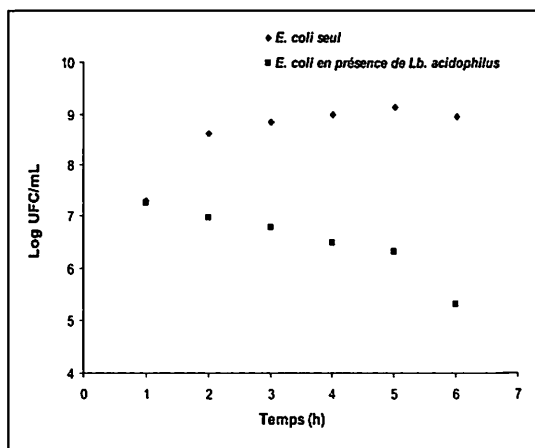


Figure 1 : Evolution d'*Escherichia coli* en culture seule ou en présence de *Lactobacillus acidophilus* VB dans lait écrémé.

effet, après 20 min d'étuvage (T2), le nombre d'*Escherichia coli* commence à accroître d'un Log soit de $2 \cdot 10^7$ jusqu'à $4,2 \cdot 10^8$ germes/mL jusqu'à $1,37 \cdot 10^9$ germes/mL à T8. Après 24 heures d'incubation, le nombre de cellules commence à diminuer considérablement soit de $1,37 \cdot 10^9$ jusqu'à $9 \cdot 10^8$ germes/mL. Cette diminution peut s'expliquer par l'âge de la bactérie, l'épuisement du milieu et surtout par l'accumulation des acides organiques élaborés par le germe pathogène.

Lorsque l'espèce pathogène se retrouve en présence de *Lactobacillus acidophilus*, une diminution du nombre d'*Escherichia coli* est noté à raison d'un log après 1 heure et 20 mn d'incubation. Le nombre diminue de $1,8 \cdot 10^7$ à $2 \cdot 10^6$ UFC/mL. Le nombre d'*Escherichia coli* continue à diminuer jusqu'à atteindre $2 \cdot 10^5$ UFC/mL après 24h d'étuvage.

L'effet antagoniste *in vitro* de *Lactobacillus acidophilus* envers *Escherichia coli* entéropathogène est clairement apparu après 80 min d'incubation, ce qui est très intéressant lors d'un traitement thérapeutique anti-diarrhéique chez les jeunes enfants et chez les adultes.

1.2. Détection de l'effet antagoniste par la méthode de diffusion des puits

L'effet antagoniste du composé actif issu de *Lactobacillus acidophilus* envers *Escherichia coli* est détecté par la méthode de diffusion des puits. Les diamètres d'inhibition sont consignés dans le tableau I.

Tableau I : Activité antagoniste de *Lactobacillus acidophilus* à l'égard d'EPEC.

Germe cible	Diamètre de la zone d'inhibition du surnageant brut actif (SBA) (en mm)		
	SBA 1	SBA 2	SBA 3
<i>Escherichia coli</i>	12	14	15

SBA : surnageant brut actif

Le composé actif issu de *Lactobacillus acidophilus* inhibe la croissance du germe cible testé (*Escherichia coli*). Il en ressort que l'espèce *Lactobacillus acidophilus* possède une activité inhibitrice. Cette dernière est décelée dans les surnageants de culture qui sont en conclusion extraites dans le milieu extracellulaire. Le composé actif extracellulaire présente un fort pouvoir antimicrobien (Figure 2).

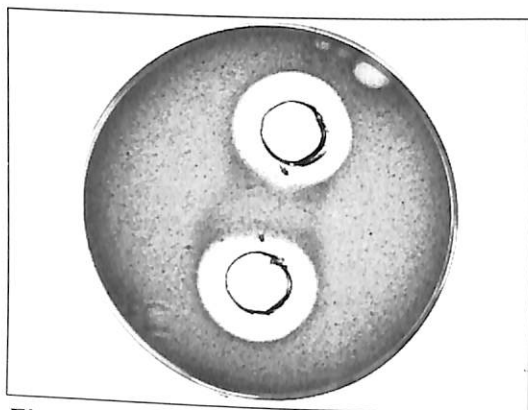


Figure 2 : Activité antimicrobienne de *Lactobacillus acidophilus* vis-à-vis d'*Escherichia coli* par la méthode de la diffusion des puits.

Lactobacillus acidophilus possède un spectre d'action étroit contre la souche d'*Escherichia coli* vu leur diamètre d'inhibition. L'étude de bactériocines produites par *Lactobacillus acidophilus* à l'égard d'*Escherichia coli* entéropathogènes pourrait aboutir à leur utilisation dans le domaine thérapeutique contre les infections gastro-intestinales.

2. Etude de l'activité antagoniste *in vivo* de *Lactobacillus acidophilus* envers *Escherichia coli* entéropathogène

2.1. Détermination de la flore intestinale des souris

Les résultats de l'analyse bactériologique des selles de souris montrent que la flore intestinale des souris est principalement composée de germes aérobies mésophiles totaux, de levures et de moisissures. On note l'absence totale de coliformes fécaux. L'analyse bactériologique des selles des souris avant toute expérimentation ne révèle aucune présence de *Lactobacillus acidophilus* ou d'*Escherichia coli* (Tableau II).

Tableau II : Résultats de l'analyse bactériologique des selles de souris du lot 1 (témoin).

Micro-organismes recherchés	Dilution		
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
Coliformes totaux	-	-	-
Coliformes fécaux (37°C.)	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (44°C.)	-	-	-
Streptocoques	-	-	-
Staphylocoques	-	-	-
<i>Clostridium</i> sulfito-réducteur	-	-	-
Salmonelles	-	-	-
Germes aérobies mésophiles totaux	+	+	+
Levures et moisissures	+	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-	-

2.2. Etude de l'activité antagoniste *in vivo* de *Lactobacillus acidophilus* envers *Escherichia coli* entéropathogènes sur des souris holoxéniques

Les résultats de l'effet antagoniste *in vivo* de *Lactobacillus acidophilus* envers *Escherichia coli* sur des souris holoxéniques sont représentés au niveau de la figure 3.

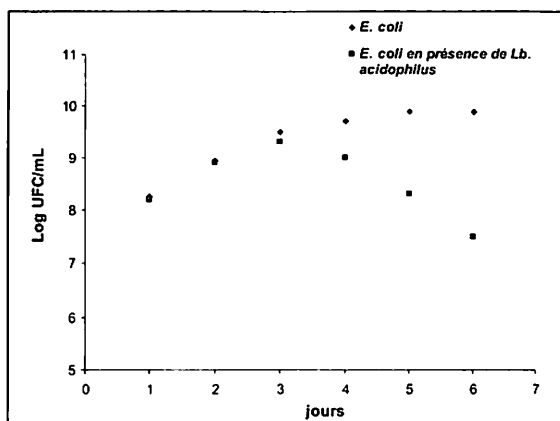


Figure 3 : Evolution des comptes d'*Escherichia coli* dans les selles de souris au niveau des lots 2 et 3.

Au niveau du lot 2 (souris recevant 1 mL de laitensemencé uniquement avec *Escherichia coli* entéropathogène pendant 3 jours), le nombre des comptes d'*Escherichia coli* va dans un sens croissant à partir du premier jour pour atteindre son maximum soit $8 \cdot 10^9$ au 5^{ème} jour. Il a été noté l'effondrement et la détérioration de l'état sanitaire des souris de ce lot. Une forte diarrhée a été notée.

Au niveau du lot 3 (souris recevant 1 mL de laitensemencé avec *Escherichia coli* pendant 48 h, puis 1 mL de lait fermenté avec *Lactobacillus acidophilus* durant 24 h.), le nombre des comptes d'*E. coli* augmente de $1,6 \cdot 10^8$ jusqu'à $2 \cdot 10^9$ UFC/mL à J3. Ce nombre commence à diminuer juste après l'administration de

Lactobacillus acidophilus soit de $2 \cdot 10^9$ à $3,17 \cdot 10^7$ UFC/mL à J6.

L'effet antagoniste *in vivo* de *Lactobacillus acidophilus* envers *Escherichia coli* peut être expliqué comme suit :

- La compétition entre *Escherichia coli* et *Lactobacillus acidophilus* vis-à-vis des sites de fixation sur l'épithélium intestinal. Les lactobacilles sont doués d'une capacité d'installation préférentielle sur l'épithélium intestinal et ils assurent aussi le relargage des souches pathogènes ingérées.
- les lactobacilles par voie homofermentaire produisent de l'acide lactique. Ce dernier abaisse le pH et exerce un effet bactériostatique sur les germes pathogènes dans le tube digestif des jeunes enfants et des adultes.
- La compétition entre *Escherichia coli* et *Lactobacillus acidophilus* vis-à-vis des nutriments essentiels pour le développement bactérien conduit à l'épuisement du milieu de culture et donc à la diminution de la croissance des germes.
- La production de bactériocine "molécules ou complexes protéiques" qui une fois sécrétés dans le milieu extracellulaire, inhibe la croissance des souches pathogènes,

Le spectre d'action de ces bactériocines est plutôt étroit contre *Escherichia coli* entéropathogènes (TAGG *et al.*, 1976, AMROUCHE, 2004).

Le spectre d'activité d'une bactériocine se définit comme étant la diversité des bactéries sensibles à l'action bactéricide ou bactériostatique du peptide. On a d'abord attribué aux bactériocines un spectre d'activité limité aux bactéries taxinomiquement proches de la bactérie productrice (TAGG *et al.*, 1976). D'après nos résultats *Lactobacillus acidophilus* possèdent un large spectre d'activité qui inclut des bactéries éloignées au point de vue phylogénétique (*Escherichia coli*).

En effet, d'après les travaux de YANG *et al.*, (1992), l'excrétion de substances inhibitrices est fondée sur le principe d'absorption et de désorption de ces substances. Les caractères endocellulaire et extracellulaire de ces substances sont fortement liés aux conditions de culture tels que le milieu de culture, le pH et la température.

Ainsi MURIANA et KLAENHAMMER (1987) et BAREFOOT *et al.*, (1994), ont observé que la souche *Lactobacillus acidophilus* est active envers *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Enterococcus*.

KANATANI *et al.*, (1992), ont observé que *Lactobacillus acidophilus* représentait une activité antimicrobienne à l'égard de *Listeria*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus* et *Propionibacterium*. D'autres auteurs ont étudié l'antagonisme *in vitro* de *Lactobacillus acidophilus* envers *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* et *Salmonella typhimurium* (COCONNIER *et al.*, 1998).

ZAMFIR *et al.*, (1999) ont décelé une activité antimicrobienne de l'acidophile 801 contre *Escherichia coli* et *Salmonella* 1467.

Le rôle de la microflore intestinale n'est pas encore bien connu. Mais elle semble avoir des fonctions nutritionnelles, métaboliques, immunologiques et protectrices (ROBERFROID *et al.*, 1995). En effet, par la fermentation de sucres (digestibles ou non), elle libère principalement: des gaz (CO₂), de l'acide lactique et des acides gras à courtes chaînes (acétate, butyrate et propionate) (MACFARLANE et MACFARLANE, 1997). Ces derniers, particulièrement le butyrate, sont absorbés au niveau du colon et sont utilisés comme source d'énergie par les cellules humaines (PRYDE *et al.*, 2002). Le butyrate stimule également la prolifération des cellules épithéliales et favorise l'absorption du Ca²⁺, Mg²⁺ et Fe²⁺ (DELZENNE et ROBERFROID, 1994).

La microflore joue aussi un rôle de protection contre les bactéries potentiellement pathogènes en empêchant leur translocation dans la circulation sanguine (effet barrière), en inhibant leur prolifération (production de bactériocines) et en empêchant leur implantation dans le tractus digestif (compétition pour les nutriments et les sites d'adhésion).

Quelques études ont montré que l'administration de certains probiotiques présentait un intérêt thérapeutique grâce à leur rôle de barrière vis à vis de bactéries pathogènes, notamment en prévention des diarrhées infectieuses. En revanche, leur action sur les douleurs intestinales restait hypothétique et leur mécanisme d'action peu connu (CROSS *et al.*, 2001).

DESREUMAUX (2001) a découvert que l'administration quotidienne orale de *Lactobacillus acidophilus* NCFM, chez la souris et le rat, permettait de diminuer le seuil de la douleur au niveau du côlon. L'administration de *Lactobacillus acidophilus* NCFM chez des patients atteints de troubles fonctionnels intestinaux, encore appelés syndrome de l'intestin irritable ou colopathie fonctionnelle, est en cours d'essai chez l'homme depuis quelques mois aux USA. Pour les patients présentant des pathologies plus lourdes, ou en situation post-opératoire nécessitant des traitements à base de morphine, l'utilisation de *Lactobacillus acidophilus* NCFM peut aussi être envisagée en co-administration. Cela permettrait ainsi de réduire les doses efficaces et donc les effets indésirables de cette classe de médicament. Modifier la flore intestinale avec des probiotiques représente donc un nouveau concept de prise en charge de la douleur et de l'inconfort intestinal dépourvu d'effets indésirables (DESREUMAUX, 2001, SZAJEWSKA *et al.*, 2007).

Plusieurs études cliniques contrôlées ont démontré que l'administration de certains probiotiques diminuait la durée des diarrhées infectieuses. Une méta-analyse récente a repris l'ensemble des essais contrôlés, randomisés et réalisés en double aveugle, dans lesquels un traitement avec des lactobacilles avait été donné au cours de diarrhées aiguës chez des enfants de moins de 3 ans (VAN NIEL *et al.*, 2002). Une autre méta-analyse (SZAJEWSKA et MRUKOWICZ, 2001, 2005) a abouti à des conclusions proches. Même si ces méta-analyses ont des limites, reconnues par leurs auteurs eux-mêmes, elles suggèrent fortement que l'administration de souches probiotiques de lactobacilles, améliore les symptômes cliniques de diarrhée aiguë chez les jeunes enfants. Une nouvelle étude clinique récente (non inclus dans les méta-analyses), réalisée avec un mélange d'une souche de *L. rhamnosus* et une souche de *L. reuteri*, montre aussi que la durée de la diarrhée tendait à être réduite dans le groupe d'enfants traités (6 à 36 mois), et que l'effet devenait hautement significatif lorsque le traitement était appliqué dès le début de la diarrhée (ROSENFELDT *et al.*, 2002). La durée de l'hospitalisation était diminuée de moitié dans le groupe traité. A la fin du traitement, l'antigène du *Rotavirus* était retrouvé chez 12% des patients traités et chez 46% des témoins.

CONCLUSION

Deux espèces ont fait l'objet de cette étude, une espèce lactique thermophile isolée à partir de lait de vache caillé, soit *Lactobacillus acidophilus*, et une espèce pathogène, *Escherichia coli* isolée à partir des selles de nourrissons diarrhéiques.

Lactobacillus acidophilus est douée d'une activité inhibitrice envers *Escherichia coli* entéro-pathogènes. Le nombre d'*Escherichia coli* a

diminué de $1,8 \cdot 10^7$ jusqu'à $2 \cdot 10^6$ UFC/mL. La moyenne de diamètre d'inhibition obtenue est de l'ordre de 13,66 mm.

Les résultats des effets antagonistes *in vitro* observés sont confirmés par la mise en application d'étude *in vivo* sur des souris holoxéniques. Cette étude montre que l'administration du lait écrémé reconstitué fermenté avec *Lactobacillus acidophilus* exerce une influence de manière significative sur l'équilibre de la flore intestinale des souris par la réduction du nombre de souches pathogènes d'*Escherichia coli*.

En effet, les mécanismes d'actions de cet effet de barrière intestinale sur la croissance de la souche test sont probablement les suivants :

- ✓ Production par *Lactobacillus acidophilus* de substance extracellulaire inhibitrice de la croissance du germe pathogène.
- ✓ Compétition vis-à-vis des nutriments indispensables à la croissance bactérienne.
- ✓ Action combinée des acides produits lesquels en acidifiant le milieu créent des conditions hostiles pour la croissance de la majorité des espèces pathogènes.

Ainsi les études *in vitro* et *in vitro* ont montré que la souche *Lactobacillus acidophilus* agit efficacement sur *Escherichia coli* principal micro-organisme incriminé dans les diarrhées infantiles. Ceci suggère l'idée de proposer des formulations de produits laitiers aux lactobacilles qui seraient principalement appliquées aux jeunes enfants ainsi qu'aux adultes soit à titre préventif ou alors éventuellement thérapeutique. Ce serait le but des nouveaux travaux de recherches qui résident dans la lutte et la biothérapie des infections bactériennes chez l'être humain.

Les résultats de cette présente étude sont prometteurs, mais d'autres études sont nécessaires pour démontrer les effets spécifiques de l'inges-

tion de *Lactobacillus acidophilus* chez l'homme. En perspectives, il serait intéressant d'étudier l'installation de la flore probiotique au niveau de la muqueuse intestinale, l'effet des sucs gastriques sur la viabilité des germes probiotiques et d'effectuer une étude comparative chez d'autres espèces tels que le rat et le lapin.

Références bibliographiques

- AMROUCHE L., 2004. Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par des streptocoques lactiques mésophiles (Lactocoques) isolés localement. Thèse Magister, I.N.A., El-Harrach, 109 p.
- BAREFOOT S.F., CHEN Y.R., HUGHES T.A., BODINE A.B., SHEARER M.Y., HUGHES M.D. 1994. Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 10 : 3522-3528.
- BHUTTA Z.A., 2006. Diarrhées persistantes dans les pays en développement. *Ann. Nestlé*, 64: 39 - 48.
- BLACK R.E., MORRIS S.S., BRYCE J., 2003. Where and why are 10 million children dying every year ? *Lancet*. 361 : 2226 - 2234.
- COCONNIER M.H., LIEVIN V., HEMERY E., SERVIN A.L., 1998. Antagonistic Activity against *Helicobacter* Infection *in vitro* and *in vivo* by the Human *Lactobacillus acidophilus* Strain LB. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 11, 4573-4580.
- CROSS M.L., STEVENSON L.M., GILL H.S. 2001. Anti-allergy property of fermented foods: An important immuno-regulatory mechanism of lactic acid bacteria. *Int. Immunopharmacol.*, 1 : 891 - 901.
- DELZENNE N.M., ROBERFROID M.B., 1994. Physiological effects of non digestible oligosaccharides. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 27, 1 : 1-6.
- DESREUMAUX P., 2001. Nouveaux traitements des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Gastroentérol. Clin. Biol.*, 25, 4 : 72 - 78.
- FULLER R., 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66: 365 - 378.
- GILL H.S., 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 17 : 755-573.
- GOMEZ H.F., CLEARY T.G., 1994. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea in children. *Sem. Pediatr. Infect. Dis.*, 5: 175 - 182.
- HEYMAN M., HEULEVIN E., 2006. Micro-organismes probiotiques et régulation immunologique : Le paradoxe, VI Symposium nutrition "Intervention nutritionnelles: de la prévention à la thérapie". *Nutr. Clin. Mét.*, 20: 85-94.
- KANATANI K., TAHARA T., YOSHIDA K., MIURA H., SAKAMOTO M., OSHIMURA M. 1992. Plasmid-associated bacteriocin production and immunity of *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, 4 : 648 - 651.
- KHEADR E., DABOUR N., LE LAY C., LACROIX C., FLISS I., 2007. Antibiotic susceptibility profile of Bifidobacteria as Affected by Oxygall, Acid, and Hydrogen Peroxide Stress. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 1 : 169 - 174.
- LAMBERT J.C., 1988. *Village milk processing. FAO Animal Production and Health Paper 69*. Food and Agriculture Organization for the United Nations (FAO). Rome, Italy, p 69.

- LARPENT J.P., 1997. *Technique de laboratoires, microbiologie alimentaire*, Ed. 2 techniques et documentations Lavoisier, Paris, 1073 p.
- MACFARLANE G.T., MACFARLANE S., 1997. Human colonic microbiota : ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.*, 222 : 3 - 9.
- MOFREDJ A., BAHLOUL H., CHANUT C., 2007. *Lactococcus lactis* : an opportunistic bacterium ? *Med. Mal. Infect.*, 37, 4: 200 - 207.
- MURIANA P.M., KLAENHAMMER T.R., 1987. Conjugal Transfer of Plasmid-Encoded Determinants for Bacteriocin Production and Immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 3: 553 - 560.
- PETTOELLO M.M., GUANDALINI S., ECUBA P., CORVINO C., 1989. Lactose malabsorption in children with symptomatic gardia lambia infection feasibility of yoghurt supplemenation. *J. Pediatr. Gastrenerol.*, 9: 295 - 300.
- PRYDE S.E., DUNCAN S.H., HOLD G.L., STEWART C.S., FLINT H.J., 2002. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol. Letters*, 217: 133-139.
- ROBERFROID M.B., BORNET F., BOULEY C., CUMMINGS J.H., 1995. Colonic microflora : nutrition and health. *Nutr. Rev.*, 53 : 127-130.
- ROSENFELDT V., MICHAELSEN K.F., JAKOBSEN M., LARSEN C.N., MOLLER P.L., PEDERSEN P., TVEDE M., WEYREHTER H., VALERIUS N.H., PAERREGAARD A., 2002. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in young children hospitalized with acute diarrhea. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 21, 5 : 411-416.
- SZAJEWSKA H., MRUKOWICZ J.Z., 2001. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in Infants and Children : A Systematic Review of Published Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trials. *J. Pediatric. Gastroenterol. Nutr.*, 33 : 17 - 25.
- SZAJEWSKA H., MRUKOWICZ J.Z., 2005. Use of Probiotics in Children with Acute Diarrhea. *Pediatric. Drugs*, 7, 2 : 111 - 122.
- SZAJEWSKA H., GIERUSZCZAK-BIALEK D., DYLAG M., 2007. Ondansetron for vomiting in acute gastroenteritis in children. Meta-analysis. *Aliment. Pharmacol. Therapeutics*, 25, 4 : 393 - 400.
- TAGG J.R., DAJANI A.S., WANNAMAKER L.W., 1976. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 40, 3 : 722 - 756.
- THOMPSON J.K., COLLINS M.A., MERCER W.D., 1996. Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ450. *J. Appl. Bacteriol.*, 80, 3 : 338 - 348.
- VAN NIEL C.W., FEUDTNER C., GARRISON M.M., CHRISTAKIS D.A., 2002. *Lactobacillus* therapy for adulte infectious diarrhea in Children : A Meta-analysis. *Pediatrics*, 109 : 678 - 684.
- YANG R., JOHNSON M.C., RAY B., 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 : 3355 - 3359.
- ZAMFIR M., CALLEWAERT R., CORNEA P.C., SAVU L., VATAFU I., DE VUYST L., 1999. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *J. Appl. Microbiol.*, 87 : 923 - 931.