

EFFET DE L'ASSOCIATION DE *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* AVEC *Streptococcus thermophilus* SUR L'ACTIVITE ANTAGONISTE ENVERS *Escherichia coli* ENTEROPATHOGENE

Reçu le 14-11-2005– Accepté le 17-02-2007

Résumé

Pour une optimisation de la cinétique de croissance de *Bifidobacterium bifidum* et de son effet anti-bactérien, une souche de *Streptococcus thermophilus* lui est associée dans du lait adapté 1^{er} âge. Le rapport respectif d'association 7/1 en nombre de cellules semble favorable à la croissance de *B. bifidum*. L'effet antagoniste *in vitro* apparaît après 4 h de fermentation en présence de *B. bifidum* en culture mixte avec *S. thermophilus*. Le pourcentage d'inhibition d'*Escherichia coli* est de 90 %. Ce pourcentage de diminution du nombre d'*E. coli* n'est observé qu'après 8 h de fermentation en présence de *B. bifidum* seul. Une mortalité de 50 % est notée chez les souris ayant reçu *E. coli* seul (lot 1). L'effet antagoniste *in vivo* lors d'un traitement préventif est significativement plus important en présence des deux espèces associées (lot 3) que lorsque *B. bifidum* est donné seul (lot 2). Au niveau des lots 4 et 5 (traitement thérapeutique), on constate une diminution d'*E. coli* au terme du 2^{ème} jour après la prise du lait fermenté au *B. bifidum* en culture mixte (lot 5) avec un taux de diminution de 89,52 %. Or cet effet n'est observé qu'après le 5^{ème} jour de la prise du lait fermenté au *B. bifidum* seul (lot 4).

Mots clés: *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Escherichia*, fermentation, association.

Abstract

The optimization of the acidifying power as well as the growth kinetics of *Bifidobacterium bifidum*, a strain of *Streptococcus thermophilus* has been associated with it in milk adapted for first age. The antagonistic effect *in vitro* appears after 4 hours of fermentation, in the presence of *B. bifidum* in a mixed culture with *S. thermophilus*. The inhibition percentage of *Escherichia coli* is 90 %. A decrease of *E. coli* number is observed after eight hours of fermentation in the presence *B. bifidum* alone. A great mortality of 50 % is noticed in the mice which have been given only *E. coli* (set 1). The antagonistic effect *in vivo* during prophylactic treatment is significantly more important in the presence of two associated species (set 3) than in the case *B. bifidum* is given alone (set 2). In sets 4 and 5 (therapeutically treatment), a 89.5 % decrease in *E. coli* in faeces has been noticed during the 2nd day after a dose of fermented milk by *B. bifidum* in a mixed culture (set 5); but this effect is observed after the fifth when *B. bifidum* is given alone (set 4). The counts bacterial in the intestinal flora after the dissection of the mice show that *B. bifidum* and *S. thermophilus* are situated in the guts of the mice.

Key words: *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Escherichia*, fermentation, association.

ملخص

من اجل تحسين نمو *Bifidobacterium bifidum* وفعالها المضاد، سلالة *thermophilus* S وضعت في زراعة مختلطة معها في حليب الرضيع (السن الأول) نسبة 1/7 (S/B) تعتبر احسن نسبة من اجل نمو *B. bifidum* - الفعل المضاد يظهر بعد 4 ساعات من لتخمير اللبني بوجود *B. bifidum* في زراعة مختلطة. ان النسبة المؤوية للفعل المضاد *Echerichia* تقدر ب 90%. نفس لنسبة نتحصل عليها بعد 8 ساعات حينما تكون في زراعة منفردة. ان الفاران تموت ب 50% في الفوج الأول عندما تاخذ حليب مزروع ب *E.coli*. الفعل المضاد *In vivo* اثناء الكيفية تكون احسن لما السلالة *B. bifidum* تكون في زراعة مختلطة (فوج 2 و 3). في فوج 4 و 5 (الكيفية العلاجية) لوحظ ان نسبة *E.coli* تنقص ب 89% ابتداء من اليوم الثاني من العلاج لما يكون الحليب مخترا ب *Bifidum.B* في زراعة مختلطة (فوج 5) بينما هذه نسبة النقص لوحظت بعد اليوم الخامس لما تكون *Bifidum.B* في زراعة منفردة (فوج 4)

الكلمات المفتاحية: زراعة مختلطة، مخمر، *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Escherichia*

A. DOUMANDJI

Département Agronomie.
Faculté Agro-Bio-
Vétérinaire. Université
Saâd DAHLEB. Blida.
ALGERIE.

La microflore bifide a été particulièrement étudiée pour son pouvoir de protection contre les diarrhées et les diverses affections [1]. En effet, les bifidobactéries ont un effet antagoniste vis à vis des germes pathogènes [2]. Plusieurs chercheurs ont montré qu'en administrant des lyophilisats de *Bifidobacterium bifidum* à des enfants présentant des infections entériques à *Escherichia coli* entéropathogène, il était possible d'éliminer le germe pathogène dans 60 % des cas. Ce taux atteint 80 % quand on ajoute du lactose aux bifidobactéries [3]. L'utilisation du terme probiotique remonte à 1965 et fait référence à toute substance ou organisme qui contribue à l'équilibre dans l'intestin. Plus récemment, les probiotiques ont été définis comme des organismes vivants qui, après ingestion par voie *per os* en certaines quantités, exercent des effets bénéfiques pour la santé. Les bifidobactéries, hôtes naturels des intestins de l'homme ont des propriétés nutritionnelles et thérapeutiques aujourd'hui reconnues. En Algérie, les préparations lactées aux bifidobactéries destinées aux nourrissons ne sont pas encore disponibles. La mise au point d'un lait fermenté aux bifidobactéries destiné aux jeunes nourrissons pallierait à cette carence. Ce lait fermenté serait proposé en particulier en cas de diarrhées déjà établies (traitement thérapeutique), ou en prévention de celles-ci (traitement préventif) chez les nourrissons recevant un allaitement artificiel.

Cette étude est consacrée à la mise en application *in vivo* des effets antagonistes des bifidobactéries associées (dans du lait 1^{er} âge, Guigoz 1) à *Streptococcus thermophilus*, envers *Escherichia coli* entéropathogène, sur des souris holoxéniques. Dans cette étude, deux parties sont menées conjointement: l'une mettant l'accent sur l'optimisation de l'effet thérapeutique des bifidobactéries lors de diarrhées à *E. coli*, l'autre sur leur effet préventif. Cette optimisation est obtenue par l'association du *S. thermophilus* (considéré comme agent réducteur) à *B. bifidum* (anaérobie strict).

1. MATERIEL ET METHODES

Les bifidobactéries proviennent des selles fraîches des nourrissons sains de 3 mois. L'échantillonnage est effectué au niveau de la pouponnière de l'hôpital Frantz Fanon de Béjaïa (ex Bougie, Algérie).

Les selles sont prélevées stérilement à partir de la couche jetable. L'isolement des bifidobactéries est réalisé en profondeur sur MRS cystéiné à 37°C. Après 48 h d'incubation, les colonies sont sélectionnées selon leur aspect morphologique (observées grâce à une loupe binoculaire) ainsi que sur la base de leur mobilité, de leur forme, de leur état frais et de la coloration de Gram [4]. Les colonies des bifidobactéries sont repiquées sur le bouillon MRS cystéiné, à pH 6,4 additionné de 15 µg/ ml d'acide nalidixique. Puis les tubes sont incubés en anaérobiose (en ajoutant de l'huile de paraffine stérile à la surface du tube) pendant 24 h à 37 °C. La pureté des souches est contrôlée par la coloration de Gram, test de la catalase, test physiologique et test biochimique de la galerie API 20A. Après quoi les souches seront repiquées sur MRS cystéiné à pH 6,4.

La souche de *Streptococcus thermophilus* est isolée à partir du lait de vache de la région de Béjaïa. Le milieu M17 est utilisé pour la culture de cette espèce.

Il faut rappeler que l'effet d'association de *S. thermophilus* a été observé dans le yaourt avec *L. bulgaricus* [5]. En effet, dans le cas cité les productions d'acide lactique et d'acétaldéhyde sont plus importantes en culture mixte qu'en culture pure. *S. thermophilus* possède une faible activité protéolytique alors qu'il nécessite des peptides et des acides aminés pour sa croissance. Et comme le lait n'en contient pas suffisamment les protéases issues de *L. bulgaricus* dégradent donc les caséines fournissant ainsi ces facteurs de croissance à *S. thermophilus*. Celui-ci, à son tour fournit à *L. bulgaricus* de l'acide formique, le CO₂ et l'acide pyruvique. Un effet analogue pourrait être mis à profit pour la croissance des bifidobactéries dans des laits artificiels.

La souche de *Escherichia coli* est isolée à partir des selles d'un nourrisson diarrhéique de la pouponnière de l'hôpital Frantz Fanon de Béjaïa.

Un gramme de selles est prélevé d'une manière stérile à partir de la couche. Des dilutions décimales (10⁻¹ à 10⁻⁶) sont réalisées dans une solution d'eau physiologique. Après homogénéisation de la dilution à l'aide d'un vibreur vortex, 1 ml de la dernière dilution est ensemencé en profondeur dans la gélose au désoxycholate à 1‰. Les boîtes de Pétri sont mises à l'étuve à 44 °C./ 24 h. Après incubation, des

colonies bien sélectionnées sont observées à l'état frais et après coloration de Gram.

Le repiquage de ces colonies a été fait sur bouillon nutritif et puis incubation à 44 °C./ 24 h. La pureté des souches sera contrôlée par des observations macroscopiques et microscopiques, coloration de Gram, test de la catalase, test physiologique et test biochimique sont réalisées avant de procéder à un dernier repiquage sur gélose au désoxycholate à 1‰.

Le lait adapté 1^{er} âge est utilisé comme milieu de culture pour le suivi de l'antagonisme *in vitro* et *in vivo* de *B. bifidum* seul et en culture mixte avec *S. thermophilus* envers *E. coli* entéropathogène. Ce lait infantile est préparé stérilement en diluant 60 g de poudre de lait dans 400 ml d'eau distillée stérile.

L'intégration des bifidobactéries à la microflore intestinale ne s'effectue que si l'inoculum initial de *B. bifidum* est de 10⁸ à 10⁹ germes/ ml [6].

1.1. Antagonisme *in vitro*

La souche d'*E. coli* entéropathogène O111: B₄ isolée et identifiée précédemment est utilisée comme souche cible. Cette dernière est repiquée sur gélose désoxycholate, puis incubée à 37°C./24 h en aérobie. Après incubation deux colonies sont reprises dans 9 ml de bouillon nutritif et incubées à 37°C./ 18h.

Une souche de *B. bifidum* est repiquée sur gélose MRS lactosé puis incubée à 37°C./ 24 h en anaérobiose. Deux colonies sont alors reprises dans 9 ml de MRS lactosé incubées à 37°C./ 18 h. *S. thermophilus* est repiquée sur gélose M 17, puis incubées à 42°C./ 24 h en aérobie. Deux colonies sont alors reprises dans 9 ml de lait pour enfants et incubées à 37°C./ 18 h.

A partir des trois *inocula* standards, on ensemence des tubes de lait de 8 ml avec une association de 0,5 ml de *B. bifidum* (soit 4. 10⁸ *B. bifidum* / ml) + 0,5 ml de *S. thermophilus* (soit 6. 10⁷ *S. thermophilus* / ml) et 1 ml d'*E. coli* (soit 10⁸ *E. coli* / ml) . L'ensemble est incubé à 37 °C./ 24 h en aérobie.

1.2. Antagonisme *in vivo*

Les résultats significatifs des effets antagonistes observés *in vitro* ont suscité une étude *in vivo* réalisée sur des souris holoxéniques. L'effet antagoniste *in vivo* de *B. bifidum* est étudié sur une souche d'*E. 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 des souris qui sont soumises à différents traitements comportant les 3 espèces bactériennes seules ou associées afin de suivre leur évolution au niveau des selles. La 3^{ème} partie consiste en la dissection des souris afin d'observer l'installation des trois espèces bactériennes ingérées par les souris. Pour cela nous avons prévu 5 lots de 6 souris chacun et 1 lot de 6 souris témoins soit 36 au total. Ces souris appartiennent à la race « wistar », âgées de deux mois et pesant 14 grammes chacune (Fig. 1).

Lot témoin : Les selles sont prélevées avant administration de *B. bifidum*, *S. thermophilus* et *E. coli*.

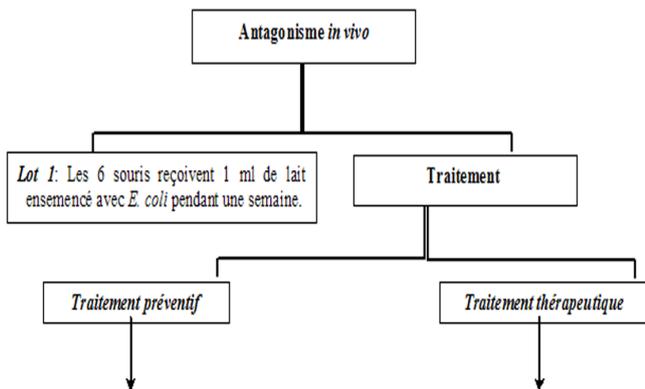
Lot 1 : Les 6 souris reçoivent 1 ml de laitensemencé avec 10^8 / ml d'*E. coli* pendant une semaine.

Lot 2 : On administre aux 6 souris 1 ml de lait fermenté avec 10^8 / ml de *B. bifidum* pendant une semaine puis 1 ml de laitensemencé avec 10^8 / ml d'*E. coli* durant la 2^{ème} semaine.

Lot 3 : Les 6 souris reçoivent 1 ml de lait fermenté avec 10^8 / ml de *B. bifidum* en culture mixte avec 10^7 / ml de *S. thermophilus* pendant une semaine. Puis on leur donne 1 ml de lait cultivé avec 10^8 / ml d'*E. coli* pendant la 2^{ème} semaine.

Lot 4 : Les 6 souris reçoivent 1 ml de laitensemencé avec 10^8 / ml d'*E. coli* pendant 48 h, puis 1 ml de lait fermenté avec 10^8 / ml de *B. bifidum* durant une semaine.

Lot 5 : On administre aux 6 souris 1 ml de laitensemencé avec 10^8 / ml d'*E. coli* pendant 48 h, puis 1 ml de lait fermenté avec 10^8 / ml de *B. bifidum* en culture mixte avec 10^7 / ml de *S. thermophilus* selon le rapport d'association retenu 7/1 en nombre de cellules dans l'étude *in vitro* durant une semaine.



Lot 2: On administre aux 6 souris 1 ml de lait fermenté avec *B. bifidum* pendant une semaine puis 1 ml de laitensemencé avec *E. coli* durant la 2^{ème} semaine.

Lot 3: Les 6 souris reçoivent 1 ml de lait fermenté avec *B. bifidum* en culture mixte avec *S. thermophilus* pendant une semaine. Puis on leur donne 1 ml de lait cultivé avec *E. coli* pendant la 2^{ème} semaine.

Lot 4: Les 6 souris reçoivent 1 ml de laitensemencé avec *E. coli* pendant 48 h, puis 1 ml de lait fermenté avec *B. bifidum* durant une semaine.

Lot 5: On administre aux 6 souris 1 ml de laitensemencé avec *E. coli* pendant 48 h, puis 1 ml de lait fermenté avec *B. bifidum* en culture mixte avec *S. thermophilus* durant une semaine.

Figure 1: Antagonisme *in vivo* de *B. bifidum* seul ou en association avec *S. thermophilus* envers *E. coli* entéropathogène lors d'un traitement préventif et thérapeutique.

2. RESULTATS

2.1. Effet antagoniste *in vitro*

L'effet antagoniste *in vitro* apparaît après 4 h de fermentation en présence de *B. bifidum* en culture mixte avec *S. thermophilus* (Fig. 2). Le nombre d'*E. coli* diminue de 90 %. Cette diminution n'est observée qu'après 8 h de fermentation en présence de *B. bifidum* seul (soit 4 h supplémentaires), d'où l'intérêt de mettre *B. bifidum* en association avec *S. thermophilus* pour l'optimisation de leurs effets antagonistes envers *E. coli* entéropathogène. Cependant une diminution d'un Log du nombre d'*E. coli* n'est observée qu'après 24 h de fermentation en présence de *S. thermophilus* seul.

L'effet inhibiteur des bifidobactéries sur le développement d'*E. coli* entéropathogène peut être expliqué de la manière suivante :

- L'acidification du milieu de culture se fait par la fermentation du lactose en acides acétique et lactique avec un rapport moléculaire 3/2. Or l'abaissement du pH inhibe la croissance des germes pathogènes tels que *E. coli* entéropathogène.

- La compétition 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 souches bactériennes [7; 8]

- Les bifidobactéries libèrent une substance inhibitrice de la croissance des germes pathogènes (bactériocine) à la fin de la phase exponentielle de la croissance (au delà de 6 h de fermentation) [9; 10; 11].

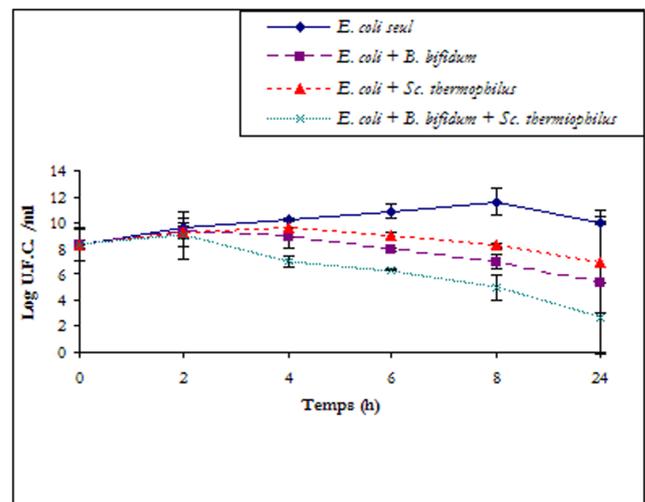


Figure 2: Cinétique de croissance d'*E. coli* en culture pure, en présence de *B. bifidum* seul et en culture mixte avec *S. thermophilus* sur lait adapté 1er âge.

2.2. Effet antagoniste *in vivo*

2.2.1. Etude de la flore autochtone des souris

L'analyse bactériologique des selles des souris avant toute expérimentation ne révèle aucune présence de *Bifidobacterium*, de *S. thermop* et d'*E. coli*.

D'après l'analyse bactériologique des selles des souris du lot 1, nous avons noté une augmentation du nombre du Log des U.F.C./ ml de 8,79 à 9,60 soit un accroissement de

84,5 %. Si l'on compare les résultats obtenus au niveau des lots 2 et 3 (Fig. 3 et 4), grâce à un traitement préventif, on constate que le taux de diminution d'*E. coli* est plus important en présence de *B. bifidum* en culture mixte avec *S. thermophilus* que lorsque *B. bifidum* est seul. En effet, le pourcentage de diminution d'*E. coli* au niveau du lot 3 est de 93,4 % par conséquent plus important qu'au niveau du lot 2 (66,83 %). L'effet antagoniste est significativement plus important en présence des deux espèces associées. On constate une diminution du nombre d'*E. coli* au terme du 2^{ème} jour après la prise du lait fermenté au *B. bifidum* en culture mixte (lot 5) avec un pourcentage de diminution de 89,52 %. Or cet effet est observé après le 5^{ème} jour de la prise du lait fermenté au *B. bifidum* seul (lot 4).

Ces résultats sont confirmés grâce à l'analyse de la variance (statistica) au seuil de 1 % appliquée à l'évolution des comptes fécaux d'*E. coli* au niveau des cinq lots. Cette analyse montre qu'il y a une différence hautement significative entre *B. bifidum* en culture associée que lorsqu'elle est culture seule.

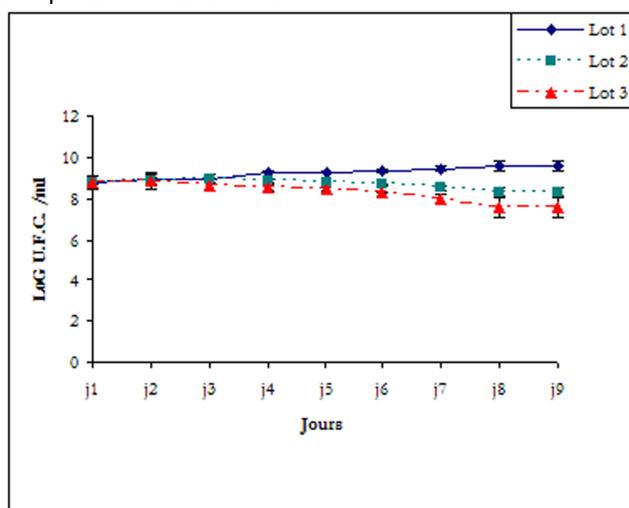


Figure 3: Evolution des comptes fécaux d'*E. coli* au niveau des lots 1, 2 et 3.

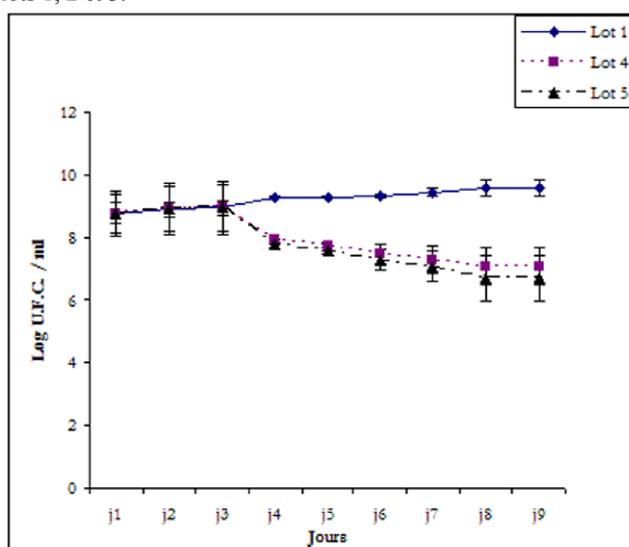


Figure 4: Evolution des comptes fécaux d'*E. coli* au niveau des lots 1, 4 et 5

2.2.2. Etude de la flore intestinale après dissection des souris

Après arrêt du traitement, les souris sont disséquées afin d'étudier la flore intestinale en dénombrant les bactéries vivantes dans l'intestin (Tab. 1 et Fig. 5).

Les résultats de la dissection des souris montrent qu'*E. coli* est présent en grand nombre (10^9 germes/ml) au niveau de l'intestin des souris n'ayant reçu qu'*E. coli* (lot 1). Cette espèce est absente dans l'intestin des souris ayant reçu du lait fermenté avec *B. bifidum* seul (lots 2 et 4) ou en culture mixte avec *S. thermophilus* (lots 3 et 5). *B. bifidum* et *S. thermophilus* sont installés au niveau de l'intestin des souris, ce qui conforte les hypothèses émises selon lesquelles *B. bifidum* aurait un rôle antagoniste envers l'implantation d'*E. coli* entéropathogène dans la flore intestinale.

L'effet inhibiteur de *S. thermophilus* sur le développement d'*E. coli* entéropathogène peut être expliqué de la manière suivante :

- *S. thermophilus* présente une activité homofermentaire en libérant exclusivement de l'acide lactique.
- *S. thermophilus* libère une substance (bactériocine) à la fin de la phase exponentielle de sa croissance qui inhibe le développement des germes pathogènes.

Tableau 1: Dénombrement d'*Escherichia coli*, de *Bifidobacterium bifidum* et de *Streptococcus thermophilus* dans l'intestin des différents lots de souris (Log U.F.C./ml)

| | <i>E. coli</i> | <i>B. bifidum</i> | <i>S. thermophilus</i> | Mortalité (souris) | % d' <i>E. coli</i> |
|--|----------------|-------------------|------------------------|--------------------|--------------------------|
| Lot 1 (<i>E. coli</i> seul) | 8,57 | / | / | 3 | 84 % d'accroissement |
| Lot 2 (<i>B. bifidum</i> / <i>E. coli</i>) | / | 9,51 | / | 0 | 66,3 % de diminution |
| Lot 3 (<i>B. bifidum</i> mixte/ <i>E. coli</i>) | / | 9,54 | / | 0 | 93,4 % de diminution |
| Lot 4 (<i>E. coli</i> / <i>B. bifidum</i>) | / | 9,58 | 8,93 | 0 | 85,53 % de diminution |
| Lot 5 (<i>E. coli</i> / <i>B. bifidum</i> mixte) | / | 9,59 | 8,95 | 0 | 89,52 % de diminution |
| Témoin | / | / | / | 0 | / |

/: Absence de bactéries dans l'intestin

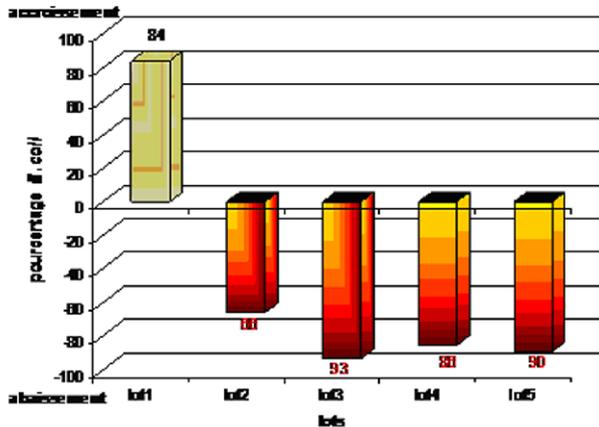


Figure 5: Pourcentage d'accroissement ou d'abaissement *E. coli* dans différents lots de souris

3. DISCUSSION

Plusieurs auteurs ont étudié l'implantation des bifidobactéries dans la muqueuse intestinale ainsi que leur rôle de correction des troubles intestinaux. L'administration du lait fermenté au *B. bifidum* associé à *Lactobacillus acidophilus* entraîne une diminution des comptes d'*E. coli* entéropathogène au niveau de l'intestin et favorise l'installation de la flore bifide [12; 13]. La seule méthode qui permet d'entreprendre une étude correcte des interactions bactériennes dans le tube digestif est celle qui utilise des animaux gnotoxéniques élevés en isolateurs [14].

On constate en effet que les bifidobactéries résistent bien au pH gastrique et aux conditions entériques compte tenu de leur installation au niveau de la muqueuse intestinale. En effet, les bifidobactéries restent toujours viables au niveau des selles [15]. Les bifidobactéries ont une fixation préférentielle sur la muqueuse intestinale [13]. Elles adhèrent plus facilement à la paroi que les autres espèces bactériennes. Les bifidobactéries représentent aussi un effet antimicrobien à l'égard de germes pathogènes tels que *Helicobacter pylori* [10].

Pour les souris du lot 1, recevant la souche *E. coli* pendant une semaine, la mortalité est observée après 7 jours de prise de lait. Cependant seules les souris ayant reçu du lait fermenté aux bifidobactéries ont survécu durant toute la période expérimentale, tout en assurant une diminution d'*E. coli* au profit des bifidobactéries. Les résultats de la présente étude sont comparables à ceux de plusieurs auteurs [16].

Les bifidobactéries résistent à l'environnement gastro-intestinal et gardent leur vitalité dans l'extrémité postérieure du tube digestif [10; 17]. L'effet antagoniste des bifidobactéries peut être combiné à celui des autres bactéries anaérobies des genres *Clostridium*, *Fusobacterium* et *Veillonella* [18]. On parle ainsi de phénomène de synergie [19; 20].

Les bifidobactéries sont influencées par les sécrétions physiologiques de l'estomac et de l'intestin lors du transit

[3; 21; 22; 23]. Cette fraction est influencée par la présence de la bile. Elle présente 24 % de la totalité des bifidobactéries ingérées, alors que dans l'estomac elle représente 67 % [2; 24; 25, 26].

CONCLUSION

L'optimisation des effets antagonistes *in vitro* est obtenue en présence des deux espèces associées (*B. bifidum* + *S. thermophilus*). Concernant l'étude *in vivo* l'analyse de l'évolution des comptes fécaux d'*E. coli* dans les selles des souris montre qu'il y a une augmentation des U.F.C./ ml de 84,50 % avec une mortalité de 3 souris après le 7^{ème} jour (lot 1). L'effet préventif est étudié au niveau des lots 2 et 3. L'effet antagoniste de *B. bifidum* envers *E. coli* est observé par la diminution des comptes fécaux d'*E. coli*. On constate une diminution de 66,83 % d'*E. coli* en présence de *B. bifidum* seul et de 93,40 % en culture mixte avec *S. thermophilus*. L'effet antagoniste est significativement plus important en présence des deux espèces associées que lorsque *B. bifidum* est donné seul (la valeur de F observé est égale à 423,63 par conséquent supérieure à celle de F théorique soit 1,79).

Pour tenter d'expliquer ces résultats on peut émettre l'hypothèse que l'activité homofermentaire de *S. thermophilus* rend le milieu acide ce qui favorise la croissance de *B. bifidum*, souche acidophile et anaérobie stricte. Par contre le pH étant bas le milieu devient hostile pour la croissance d'*E. coli* entéropathogène. L'effet inhibiteur de *S. thermophilus* peut s'expliquer aussi par le fait que cette espèce libère une bactériocine inhibant le développement d'*E. coli*

Au niveau des lots 4 et 5, il s'agit d'un traitement thérapeutique. On constate une diminution du nombre d'*E. coli*/ au terme du 2^{ème} jour après la prise du lait fermenté au *B. bifidum* en culture mixte (lot 5) avec un pourcentage de diminution de 89,52 %. Cet effet n'est observé qu'après le 5^{ème} jour de la prise du lait fermenté au *B. bifidum* seul (lot 4). L'analyse de la variance au seuil de 1 % appliquée aux comptes fécaux d'*E. coli* au niveau des cinq lots montre qu'il y a une différence hautement significative entre *B. bifidum* en culture associée que lorsqu'elle est culture seule.

Les résultats des comptes de la flore intestinale après dissection des souris montrent que *E. coli* est présent en grand nombre (10^9 germes/ ml) au niveau de l'intestin des souris n'ayant reçu que *E. coli* (lot 1). Cette espèce est absente dans l'intestin des souris ayant reçu du lait fermenté avec *B. bifidum* seul (lots 2 et 4) ou en culture mixte (lots 3 et 5). *B. bifidum* et *S. thermophilus* sont installés au niveau de l'intestin des souris, jouant ainsi un rôle protecteur à l'égard de *E. coli* responsable des gastro-entérites infantiles particulièrement fréquentes en Algérie.

REFERENCES

- [1]- Akao T., Che Q.M., Kobashi K., Yang L., Hottari M.H. and Namba T., "Isolation of a human intestinal anaerobic *Bifidobacterium sp* strain SEN, capable of hydrolysing sennosides to sennidins". *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3, (1994), pp. 1041 – 1043.

- [2]- Bertazzoni Minelli E., Benini A. and Vicentini L., "Intestinal microflora in premenstrual syndrome and effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* administration". *Microecol. Ther.* 25, (1995), pp. 223 – 230.
- [3]- Kheadr E., Bernoussi N., Lacroix C. and Fliss I., "Comparison of the sensitivity of commercial strains and infant isolated of Bifidobacteria to antibiotics and bacteriocins", *Int. Dairy J.*, 14, (2004), pp. 1041-1053.
- [4]- Tamime A.Y., Marshall V.M.E. and Robinson R.K., "Microbiological and technological aspects of milk fermented by bifidobacteria". *J. Dairy Res.* 62, (1995), pp. 151 – 187.
- [5]- Zourari A. et Desmazeaud M.J., "Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées des yaourts artisanaux grecs-II Souche de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* en culture mixte avec *Streptococcus salivarius* susp *thermophilus*". *Lait*, 71, 4, (1992), pp. 463 – 482.
- [6]- Tanaka R. and Mutai M., "Improved medium for selective isolation and enumeration of *Bifidobacterium*". *Appl. Environ. Microbiol.* 40, (1980), pp. 866 – 869.
- [7]- Anand S.K., Srinivasan R.A. and Rao L.K., "Antibacterial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*" *J. Cult. Dairy Prod.* 19, (1985), pp. 6 – 8.
- [8]- Lee N.K. and Paik H.D., "Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jeot-gal", *Food Microbiol.*, (2001), 18, 1, pp. 17-24.
- [9]- Van Der Wal F.J., Luirink J. and Oudega B., "Bacteriocin release proteins: mode of action, structure and biotechnological application". *FEM Microbiol. Rev.*, 17, (1995), pp. 381 – 399.
- [10]- Collado M.C., González R., Hernández M., Ferrús M.A. and Sanz Y., "Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori*", *Int. J. Antimicrob. Agents*, (2005), pp. 385-391.
- [11]- Megrous J., Euloge P., Junelle A.M., Ballongue J. and Petidemange H., "Screening of *Bifidobacterium* strain for bacteriocin production". *Biotechnol. Lett.* 12, (1990), pp. 575 – 580.
- [12]- Duffy L.C., Zielezny M.A., Riepenhoff-Talty M., Dryja D., Griffiths E., Ruffin D., Barret H. and Ohra P.L., "Reduction of virus shedding by *Bifidobacterium bifidum* in experimentally induced MRV infection statistical application for ELISA", *Dig. Dis. Sci.*, 39, 11, (1994), pp. 2334-2340.
- [13]- Foster J.C., Glass M.D., Courtney P.D. and Ward L.A., "Effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability", *Food Microbiol.*, (2003), pp. 351-357.
- [14]- Luquet F.M. et De Roissart H., "Les bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologies". Ed. Loriga, Paris, 2, (1994), 614 p.
- [15]- Romond M.B., Haddou Z., Mielcareck C., and Romond C., "Bifidobacteria and human health: Regulatory effect of indigenous Bifidobacteria on *Escherichia coli* intestinal colonisation". *Anaerobe*, 3, (1997), pp. 131 – 136.
- [16]- Raibaud P. et Ducluzeau R., "Etude de la colonisation bactérienne du tractus gastro-intestinal à l'aide de modèles expérimentaux". *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 8, 2, (1989), pp. 361 – 373.
- [17]- Berrada N., Lemeland J.F., Laroch G., Thouvinot P. and Piaia M., "*Bifidobacterium* from fermented milks: Survival during gastric transit". *J. Dairy Sci.* 74, 2, (1991), pp. 409 – 413.
- [18]- Kaneko T., Mori H., Iwata M. and Meguro S., "Growth simulator for bifidobacteria produced by *Propionibacterium freudenreichii* and several intestinal bacteria". *J. Dairy Sci.* 77, (1994), pp. 393 – 404.
- [19]- Dubey U.K. and Mistry V.V., "Growth Characteristics of Bifidobacteria in infant formulas". *J. Dairy Sci.* 79, (1996), pp. 1146 – 1155.
- [20]- Leclerc D.A.A. et Mossel A., "Le tube digestif, l'eau et les aliments". Ed. Doin, Paris, (1993), pp. 36 – 188.
- [21]- Kruse H.P., Kleessen B. and Blaut M., "Effects of inulin of faecal Bifidobacteria in human subjects", *British J. Nutr.*, 82, (1999), pp. 375-382.
- [22]- Leahy S. C., Higgins D. G., Fitzgerald G. F. and Van Sinderen D., "A Review Getting better with bifidobacteria", *J. Appl. Microbiol.*, 98, (2005), pp. 1303-1315.
- [23]- Marteau P.H., Pochard P.H., Bouhnik Y. and Rambaud J.C., "Fate and effects of some transiting microorganisms in the human gastrointestinal tract". *World Rev. Nutr. Diet.* 74, (1993), pp. 1 – 21.
- [24]- Biavati B., Vescovo M., Torriani S. and Bottazzi V., "Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications", *Ann. of Microbiol.*, 50, (2000), pp. 117-131.
- [25]- Mitsuoka T., "Taxonomy and ecology of bifidobacteria". *Bifidobacteria Microflora.*, 3, 1, (1984), pp. 11 – 28.
- [26]- Christopher M.D., Padmanabha Reddy V. and Venkateswarlu K., "Impact of feeding probiotic yoghurt containing *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456 on growth performance in albino rats", *Tamilnadu J. Vet. Animal Sci.*, 2, 5, (2006), pp.154-157.