

# UNIVERSITE SAAD DAHLAB-BLIDA

Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires

Département des Sciences Agronomiques

## MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Nutrition et Transformation des Aliments

ETUDE DE L'EFFET DU PROBIOTIQUE *PEDIOCOCCUS*  
*ACIDILACTICI* (MA18/5M) SEUL ET EN ASSOCIATION AVEC UN  
EXTRAIT DE LA PLANTE *YUCCA SCHIDIGERA* (YUQUINA XO) EN  
ELEVAGE DE POULET DE CHAIR

Par

**BENAMIROUCHE karima**

Jury :

BOUTEKRABT Ammar	Professeur, US.D. Blida	Président
BADIS Abdelmalek	Professeur, US.D. Blida	Promoteur
GUETARNI Djamel	Professeur, US.D. Blida	Co-Promoteur
BENHADJA Lynda	Maître de conférences A, US.D. Blida	Examinatrice
DOUMANDJI Amel	Maître de conférences A, US.D. Blida	Examinatrice

Décembre 2012

## RESUME

L'objectif du présent travail consiste en l'évaluation de l'effet du probiotique *Pediococcus acidilactici* seul ou en association avec l'extrait naturel de *Yucca schidigera* en élevage de poulet de chair.

Dans la première partie de l'étude, nous avons d'abord étudié les interactions *in vitro* entre *P. acidilactici* et certaines souches pathogènes de la flore digestive du poulet de chair par les méthodes de diffusion dans l'agar et de dilution ; puis suivi l'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries du tube digestif d'animaux recevant un aliment supplémenté de probiotique *P. acidilactici* à raison de  $10^9$  UFC/kg pendant une période de 58 jours. Les résultats obtenus ont révélé que *P. acidilactici* a la capacité d'inhiber la croissance des souches d'entérobactéries (*Escherichia coli*) et des souches pathogènes (*Staphylococcus aureus*); et que la supplémentation de *P. acidilactici* à l'aliment a permis l'apparition de l'effet barrière à partir de J<sub>19</sub> ; date de début de la stabilisation de la flore lactique à un niveau relativement important et de la diminution des Entérobactéries d'autre part

Dans la deuxième partie de l'étude, nous avons évalué l'effet combiné de *P. acidilactici* avec l'extrait de *Yucca schidigera* sur les performances zootechniques et l'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries du tube digestif d'animaux recevant un aliment additionné de l'extrait de *Yucca schidigera* à raison de 0,5 g/kg et de probiotique *P. acidilactici* à raison de  $10^9$  UFC/kg durant une période de 52 jours, ainsi que l'effet de l'extrait brut de *Yucca schidigera* sur la croissance *P. acidilactici* et de quelques souches pathogènes de la flore digestive du poulet. Les résultats obtenus ont montré que la faible mortalité enregistrée et l'absence de signes pathognomoniques de coccidiose chez le lot expérimental sont révélatrices de

l'efficacité de l'anticoccidien à base de *Yucca schidigera* instauré préventivement ; la supplémentation de l'aliment avec l'association de *P. acidilactici* et de l'extrait de *Yucca schidigera* faisait retarder l'apparition de l'effet barrière à J<sub>29</sub>. Enfin, l'extrait brut de *Yucca schidigera* a une action inhibitrice sur la croissance de *P. acidilactici* et de *Streptococcus sp.* par rapport aux souches d'Entérobactéries testées qui sont pratiquement résistantes.

Sur la base des résultats obtenus, nous pouvons dire que le probiotique *P. acidilactici* utilisé seul ou en association avec l'extrait de *Yucca schidigera* agit favorablement sur l'équilibre intestinal de la flore digestive des poulets, qui se répercute sur les performances zootechniques (poids et taux de mortalité) et l'état sanitaire des poulets. Cette situation permettrait la préservation de la qualité des viandes de poulets et par conséquent la santé du consommateur.

**Mots clés** : *Pediococcus acidilactici*, Probiotique, *Yucca schidigera*, Poulet de chair, Flore lactique, Entérobactéries.

## ABSTRACT

The aim of the present work is the assessment of the effect of the probiotic *Pediococcus acidilactici* alone or in combination with the natural extract of *Yucca schidigera* in broiler breeding.

In the first part of the study, we first examined the interactions *in vitro* between *P. acidilactici* and some pathogenic strains of the digestive flora of the broiler by agar diffusion and dilution methods; then followed the evolution of lactic flora and enteric bacteria of the digestive tract of animals receiving a supplemented food of probiotic *P. acidilactici* at a rate of  $10^9$  CFU/kg for a period of 58 days. The results revealed that the *P. acidilactici* has the ability to inhibit the development of strains of *Enterobacteria* (*Escherichia coli*) and pathogenic strains (*Staphylococcus aureus*), on the one hand; and that supplementation of *P. acidilactici* food allowed the barrier effect from J<sub>19</sub>; start date for the stabilization of the lactic flora at a relatively high level and the decline of *Enterobacteria*, on the other hand.

In the second part of the study, we assessed the combined effect of the extract of *Yucca schidigera* with *P. acidilactici* on the zootechnical performance and followed the evolution of digestive flora of animals receiving a food supplemented with extract of *Yucca schidigera* at 0.5 g/kg and of probiotics *P. acidilactici* at a rate of  $10^9$  CFU/kg during a period of 52 days, and the effect of the crude extract of *Yucca schidigera* on growth of *P. acidilactici* and some pathogenic strains of the digestive flora of chicken. The results showed that the low recorded mortality and the lack of pathognomonic signs of coccidiosis in the experimental lot are indicative of the effectiveness of the established preventively anticoccidien *Yucca schidigera*-based; supplementation of the food with the combination of *P. acidilactici* and *Yucca*

*schidigera* extract was delay the onset of the barrier effect to J<sub>29</sub>. Finally, the crude extract of *Yucca schidigera* has an inhibitory action of *P. acidilactici* and *Streptococcus sp.* growth against, tested *Enterobacteria* strains which are virtually resistant.

On the basis of the obtained results, we can say that the probiotic *P. acidilactici* used alone or in association with *Yucca schidigera* extract acts favorably on the intestinal balance of the digestive flora of chickens, affecting the performance (weight and mortality) and the health status of chickens. This situation would allow the preservation of the quality of the meat of chicken and therefore the health of the consumer.

**Key words:** *Pediococcus acidilactici*, probiotic, *Yucca schidigera*, broiler, lactic flora, *Entérobacteria*.

## ملخص

الهدف من هذا العمل هو تقييم أثر المساعد الحيوي ببيدوكوكس أسيدبلاكتسي بمفرده أو بالاشتراك مع المستخلص الطبيعي ليوكا ستيدجيرا في تربية دجاج اللحم.

في الجزء الأول من هذه الدراسة، درسنا التفاعلات بين ب. أسيدبلاكتسي وبعض السلالات الضارة للجهاز الهضمي للدجاج ثم تتبع نمو البكتيريا اللبنية و انتيروبكتيري للجهاز الهضمي لحيوانات تلقت علفا مضافا اليه المساعد الحيوي ب. أسيدبلاكتسي بتركيز  $10^9$  في الكيلوغرام لمدة 58 يوم. النتائج المحصلة عليها كشفت بان ب. أسيدبلاكتسي لديه القدرة على إعاقه سلالات أنتيروبكتيري (ا.كولي) و السلالات الضارة (س.اوغيس) هذا من ناحية و بان اضافة ب. أسيدبلاكتسي إلى العلف أدى إلى ظهور الفعل المضاد ابتداء من اليوم 19 تاريخ بدء استقرار البكتيريا اللبنية على مستوى عال نسبيا و انخفاض انتيروبكتيري من ناحية أخرى.

في الجزء الثاني من الدراسة، قمنا بتقييم التأثير المشترك ل ب. أسيدبلاكتسي مع مستخلص يوكا على نتائج فعالية الإنتاج و نمو البكتيريا اللبنية و انتيروبكتيري للجهاز الهضمي لحيوانات تلقت علفا مضافا اليه المساعد الحيوي ب. أسيدبلاكتسي بتركيز  $10^9$  في الكيلوغرام و مستخلص يوكا ستيدجيرا بتركيز 0,5 غرام في الكيلوغرام خلال فترة 52 يوم، و تأثير المستخلص الخام ل يوكا ستيدجيرا على ب. أسيدبلاكتسي و بعض السلالات الهضمية الضارة. النتائج المحصل عليها اظهرت بان انخفاض معدل الوفيات المسجلة دلالة على فعالية الدواء و بان اضافة ب. أسيدبلاكتسي و يوكا ستيدجيرا أدى الى تأخير الفعل المضاد إلى اليوم التاسع و العشرون هذا من ناحية و بان المستخلص الخام ليوكا ستيدجيرا له فعل مضاد على ب. أسيدبلاكتسي و سثربتكوكيس مقارنة مع سلالات انتيروبكتيري المقاومة تقريبا.

وفقا للنتائج المحصل عليها يمكننا ان نقول بان ب. أسيدبلاكتسي وحدها أو بالاشتراك مع مستخلص يوكا له دور ايجابي في توازن بكتيريا الجهاز الهضمي للدجاج و التأثير على نتائج فعالية الإنتاج (الوفيات, الوزن) و الحالة الصحية للدجاج و بذلك الحفاظ على نوعية لحوم الدجاج و صحة المستهلك.

**الكلمات المفتاحية:** ببيدوكوكس أسيدبلاكتسي، المساعد الحيوي، ليوكا ستيدجيرا، دجاج اللحم، البكتيريا اللبنية انتيروبكتيري

## REMERCIEMENTS

*Louange à Dieu, le Tout-puisant de m'avoir donné la santé, le courage et la patience pour pouvoir finaliser ce travail.*

*Je tiens à exprimer tout à d'abord ma profonde gratitude à Monsieur **Badis A.M** pour son encadrement, ses orientations scientifiques, et ses judicieux conseils permettant d'aboutir à la production de ce mémoire. Veuillez accepter Monsieur mes plus vifs remerciements.*

*Mes remerciements s'adressent spécialement au Professeur Monsieur **Guetarni D**, pour m'avoir permis de réaliser ce travail de mémoire au sein de son laboratoire. Grâce à sa disponibilité quotidienne à notre égard et à son dévouement sans faille malgré ses multiples obligations, ce travail a pu voir son aboutissement. Ses qualités humaines et scientifiques resteront pour moi le vrai exemple d'enseignant, chercheur et promoteur.*

*Merci infiniment Monsieur, pour tout le temps que vous avez dédié à mon travail.*

*Mes sincères remerciements s'adressent ensuite aux membres du jury, le président Monsieur le Professeur **Boutekrabt A.**, Madame **Boutekrabt L.** ainsi que Madame **Doumandji A.** pour avoir accepté de consacrer leur temps pour juger ce travail. Qu'ils veuillent bien trouver ici le témoignage de ma respectueuse gratitude.*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur **Boutemi** Maître de conférences au département de chimie industrielle de l'Université de Blida pour son aide précieuse et ses conseils scientifiques qui ont fait progresser ce travail.*

*Je remercie sincèrement Madame **Kechih** de laboratoire régional vétérinaire de Draa Ben Khedda pour son aide dans la réalisation pratique de ce travail grâce à sa fourniture de souches bactériennes.*

*Je tiens également à remercier Monsieur **Benkfrouf** responsable du laboratoire de production de milieux de culture IDEAL LABO (Blida) pour son aide cruciale dans la réalisation de ce travail grâce à sa fourniture de milieux de culture gracieusement.*

*Je tiens aussi à remercier toute l'équipe du laboratoire pour leur accueil chaleureux, leur aide, leur disponibilité, et surtout leur bonne humeur : **Baaziz Ammi D., Nacira, Hazil N., Dalila, Sahrawi N. et Dachicha A.** Ce fut très agréable de travailler en votre compagnie.  
Merci*

*Je voudrais également remercier mon oncle **Sadak** et sa femme pour son aide cruciale dans la réalisation de ce mémoire. Merci infiniment.*

*Deux grands mercis spéciaux pour deux êtres spéciaux :*

*Pour toi **Hichem**, pour tout ce que tu m'as apporté. Pour ton aide inestimable, ton soutien sans faille, ta compréhension et tes encouragements lors de la réalisation de ce travail. Je vous souhaite bon courage pour ton future professionnel et personnel. Merci infiniment mon très cher frère.*

*Merci pour tout ce que tu m'as apporté. Merci pour ta présence dans les bons et les mauvais moments que j'étais passée, pour tes conseils avisés, ton aide si généreuse et bien d'autres choses encore. Je vous souhaite bon courage pour ton future professionnel et personnel mon cher oncle **Abderahmane**.*

*Je remercie très chaleureusement mes amies, **Fadhila** et **Souhila** pour les moments de joies, de gaietés et aussi de stress, tout restant des souvenirs heureux pour moi.*

*Mes remerciements vont également à mes amies et collègues : **Wahiba**, **Kahina**, **Amel**, **Rawia**, **Imane**, **Zahra**, **Ahlem**, **Fatma**, je les remercie pour l'ambiance et l'amitié que j'ai trouvée auprès d'eux.*

*Merci pour ma famille, pour leur soutien et leur patience tout au long de ce travail de Magistère, merci mes très chers parents.*

*Enfin, ma profonde sympathie s'adresse à toute et tous qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

## DEDICACES

*À mes chers parents*

*À ceux qui m'ont tout a donné.*

*Qu'ils trouvent dans ce mémoire le témoignage de mon infinie reconnaissance et de mon amour.*

*Grâce à vous que j'ai envie d'aller plus loin, que Dieu vous donne bonne santé et longue vie.*

*À mes chers frères et sœurs*

*Qui m'ont entouré toujours de tout leur amour, leur soutien et leur affection.*

*Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon profond amour.*

*À mes oncles et tantes.*

*À mes cousins 'et cousines.*

*À toutes mes amis.*

*À mes collègues de promotion.*

*À tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.*

*À toutes les personnes que je connais et qui me sont chères.*

*À la mémoire de ma tante « Malika »*

## TABLES DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION.....	17
CHAPITRE 1 : LA MICROFLORE DIGESTIVE DES VOLAILLES.....	19
1.1. Rappel sur la microflore digestive du poulet.....	19
1.2. Rôle potentiels de la microflore.....	22
1.3. Les principaux facteurs influençant le microbiote intestinal.....	26
1.4. Pathologie digestive de poulet d'origine parasitaire : La coccidiose.....	28
1.5. Les antibiotiques : modulateurs de flore digestive.....	28
1.6. Contrôle de la microflore.....	29
CHAPITRE 2 : LES PROBIOTIQUES EN PRODUCTION AVIAIRE.....	31
2.1. Définition et développement.....	31
2.2. Propriétés et critères de sélection des probiotiques.....	32
2.3. Microorganismes probiotique et bactéries lactiques.....	33
2.4. Mécanismes d'action.....	35
2.5. Les probiotiques en production aviaires.....	38
CHAPITRE 3 : LES BACTERIES LACTIQUES.....	42
3.1. Généralités sur les bactéries lactiques.....	42
3.2. <i>Pediococcus acidilactici</i> .....	43

3.3. Propriétés antibactériennes des bactéries lactiques.....	47
CHAPITRE 4 : LES INTERACTIONS BACTERIENNES.....	50
4.1. Classification des interactions.....	50
4.2. Les interactions microbiennes dans le tube digestif.....	54
4.3. Les moyens d'études des interactions.....	55
CHAPITRE 5 : L'EXTRAIT NATUREL DE <i>Yucca schidigera</i> .....	59
5.1. Présentation de la plante.....	59
5.2. Les substances bioactives de yucca.....	61
5.3. Etude pharmacologique.....	62
CHAPITRE 6 : ETUDE DE L'EFFET DU PROBIOTIQUE <i>Pediococcus acidilactici</i> SUR LA FLORE DIGESTIVE DU POULET DE CHAIR.....	66
6.1. Matériel et méthodes.....	67
6.1.1. Matériel.....	67
6.1.2. Méthodes.....	70
6.1.2.1. Caractérisation de la souche du probiotique <i>Pediococcus acidilactici</i> (MA 18/5M) de commerce et souches pathogènes isolées dans le tube digestif du poulet de chair.....	70
6.1.2.2. Evaluation des performances zootechniques et suivi de l'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif de poulets de chair.....	71
6.1.2.3. Etude des interactions entre <i>P. acidilactici</i> et certaines souches pathogènes.....	77
6.2. Résultats et discussions.....	87
6.2.1. Caractérisation des souches.....	87
6.2.2. Evaluation des performances zootechniques et suivi de l'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif des poulets de chair.....	89

6.2.3. Étude des interactions entre <i>P. acidilactici</i> et certaines bactéries pathogènes.....	100
CHAPITRE 7 : ETUDE DE L'EFFET COMBINE DE <i>Yucca schidigera</i> (ANTICOCCIDIEN A BASE DE PLANTE NATURELLE) AVEC <i>Pediococcus acidilactici</i> SUR LES PERFORMANCES ZOOTECHNIQUES ET LA FLORE DIGESTIVE DU POULET DE CHAIR.....	118
7.1. Matériel et méthodes.....	119
7.1.1. Matériel.....	119
7.1.2. Méthodes.....	122
7.1.2.1. Evaluation des performances zootechniques (mortalité) et suivi de l'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif des poulets de chair.....	122
7.1.2.2. Evaluation de l'effet de l'extrait brut de l'anticoccidien <i>Yucca schidigera</i> sur la croissance <i>P.acidilactici</i> et de quelques souches pathogènes.....	123
7.2. Résultats et discussions.....	126
7.2.2. Evaluation des performances zootechniques (mortalité) et suivi de l'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif des poulets de chair.....	126
7.2.3. Evaluation de l'effet de l'extrait brut de l'anticoccidien <i>Yucca schidigera</i> sur la croissance <i>P.acidilactici</i> et de quelques souches pathogènes.....	132
CONCLUSION.....	139
LISTE DES ABREVIATIONS	
APPENDICES	
REFFERENCES	

## LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX

<b>Figure 1.1 :</b> Evolution de la composition de la flore digestive iléale du poulet en fonction de l'âge déterminée par dénombrements bactériens.....	21
<b>Figure 1.2 :</b> Possibilités de contrôle de la flore digestive et de ses effets.....	30
<b>Figure 3.1:</b> Arbre phylogénétique en méthode neighbor-joining, sur la base des séquences ribosomiques de l'ADN 16S positionnant l'espèce <i>P. acidilactici</i> parmi différentes espèces de bactéries lactiques.....	45
<b>Figure 3.2 :</b> Le mode d'action de Bactocell® (Anonyme1).....	46
<b>Figure 4.1 :</b> Représentation schématique de la classification de Fredrickson (1977)	
<b>Figure 4.2 :</b> Méthode d'étude des interactions bactériennes.....	55
<b>Figure 5.1:</b> <i>Yucca schidigera</i> : plante et fleur.....	60
<b>Figure 6.1 :</b> Plan d'échantillonnage des prélèvements (P/H : prélèvement hebdomadaire, P/2J: prélèvement chaque deux jour) .....	71
<b>Figure 6.2:</b> Ouverture de la carcasse.....	73
<b>Figure 6.3:</b> Protocole expérimental suivi pour la recherche et le dénombrement de la flore lactique et des Entérobactéries.....	76
<b>Figure 6.4:</b> Logigramme pour la culture pure.....	80
<b>Figure 6.5:</b> Logigramme pour la culture mixte.....	82
<b>Figure 6.6:</b> Logigramme du dénombrement des cellules viables.....	84
<b>Figure 6.7:</b> Protocole expérimental pour la détermination des substances responsables de l'interaction bactérienne.....	86
<b>Figure 6.8:</b> Culture de <i>Pediococcus acidilactici</i> sur milieu MRS (photo originale)...	87
<b>Figure 6.9:</b> Observation microscopique de frottis bactérien (x100) (photo originale).....	88

<b>Figure 6.10 :</b> Courbe d'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif du poulet de chair durant la période d'élevage.....	91
<b>Figure 6.11:</b> Colonies de bactéries lactiques sur gélose MRS (photo originale).....	92
<b>Figure 6.12:</b> Observation microscopique de frottis bactérien des différents types de colonies de bactéries lactiques (x100) (photo originale).....	94
<b>Figure 6.13:</b> Signes pathognomoniques d'une coccidiose caecale.....	96
<b>Figure 6.14:</b> Intestins enflés et congestionnés, signes révélateurs d'entérite d'origine inconnue.....	98
<b>Figure 6.15:</b> Présence de sang macéré au niveau des intestins et des caecas (J <sub>48</sub> ), signes pathognomoniques d'une coccidiose caecale.....	98
<b>Figure 6.16:</b> Illustration de l'interaction sur milieu solide entre la souche <i>P. acidilactici</i> et les souches intestinales.....	101
<b>Figure 6.17:</b> Courbes d'évolution de la croissance <i>P. acidilactici</i> en cultures pure et mixte exprimée en Log UFC/ml.....	103
<b>Figure 6.18:</b> Courbes d'évolution du pH lors de la croissance de <i>P. acidilactici</i> en cultures pure et mixte.....	104
<b>Figure 6.19 :</b> Courbes de croissance d' <i>E. coli</i> en culture pure et mixte exprimée en Log UFC/ml.....	106
<b>Figure 6.20:</b> Culture pure d' <i>E. coli</i> (a) et mixte avec <i>P. acidilactici</i> (b) sur gélose Mac Conkey après 8h d'incubation (photo originale).....	107
<b>Figure 6.21:</b> Courbes d'évolution du pH lors de la croissance d' <i>E. coli</i> en cultures pure et mixte.....	107
<b>Figure 6.22:</b> Courbes de croissance de <i>S. aureus</i> en culture pure et mixte exprimée en Log UFC/ml.....	109
<b>Figure 6.23:</b> Culture pure de <i>S. aureus</i> (a) et mixte avec <i>P. acidilactici</i> (b) sur gélose Chapman après 8h d'incubation (photo originale).....	110

<b>Figure 6.24:</b> Courbes de l'évolution de pH lors de la croissance de <i>S. aureus</i> en cultures pure et mixte.....	110
<b>Figure 6.25:</b> Illustration de l'effet inhibiteur de l'extrait de <i>P. acidilactici</i> après traitement thermique sur les souches intestinales.....	115
<b>Figure 7.1:</b> Dispositif d'extraction.....	121
<b>Figure 7.2:</b> Lésions observées à l'autopsie des cas de mortalité du lot témoin.....	127
<b>Figure 7.3:</b> Courbe d'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif des sujets des lots "témoin" et "expérimental" durant la période d'élevage.....	130
<b>Figure 7.4:</b> Courbes de croissance de <i>P. acidilactici</i> sur milieu MRS seul ou additionné de l'extrait brut de <i>Yucca schidigera</i> (786mg/ml) à raison de 2%.....	133
<b>Figure 7.5:</b> Courbes d'évolution des valeurs de pH pour la cinétique de croissance de <i>P. acidilactici</i> sur milieu MRS seul ou enrichi avec l'extrait brut de <i>Yucca schidigera</i> .....	134
<b>Figure 7.6 :</b> Illustration de l'activité inhibitrice de l'extrait brut de <i>Yucca schidigera</i> (à la concentration de 393mg/ml) vis-à-vis <i>Streptococcus sp</i> (b) et <i>Staphylococcus aureus</i> (a).....	136
<b>Tableau 1.1 :</b> Evolution de la composition de la flore digestive intestinale du poulet en fonction de l'âge déterminée par clonage et séquençage.....	22
<b>Tableau 2.1 :</b> Liste des probiotiques utilisés en alimentation animal.....	34
<b>Tableau 4.1 :</b> Classification des interactions en fonction de la matrice des effets. D'après Odum (1953).....	51
<b>Tableau 4.2:</b> Exemple d'interactions microbiennes au sein de l'écosystème digestif des animaux .....	55
<b>Tableau 6.1 :</b> Les différents milieux de cultures utilisées pendant l'expérimentation .....	68
<b>Tableau 6.2 :</b> Les équipements de laboratoire utilisés durant l'expérimentation.....	69

<b>Tableau 6.3:</b> Résultats de dénombrement de la flore lactiques et des Entérobactéries dans le tube digestif du poulet de chair durant la période d'élevage.....	90
<b>Tableau 6.4:</b> Spectre d'activité de <i>P. acidilactici</i> MA18/5M vis à vis des souches intestinales quantifié par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour des disques (mm).....	100
<b>Tableau 6.5 :</b> Résultats de dénombrement (exprimés en Log UFC/ml) et valeurs de pH obtenus pour la cinétique de croissance (à 72 h) de <i>P. acidilactici</i> en culture pure et en culture mixte avec <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> .....	102
<b>Tableau 6.6:</b> Résultats de dénombrement (exprimés en Log UFC/ml) et valeurs de pH obtenus pour la cinétique de croissance (à 72 h) d' <i>E. coli</i> en culture et en culture mixte avec <i>P. acidilactici</i> .....	105
<b>Tableau 6.7 :</b> Résultats de dénombrement (exprimés en Log UFC/ml) et valeurs de pH obtenus pour la cinétique de croissance (à 72 h) <i>S. aureus</i> en culture pure et en culture mixte avec <i>P. acidilactici</i> .....	108
<b>Tableau 6.8:</b> Effet de l'extrait brut de <i>P. acidilactici</i> chauffé à 120 °C pendant 30 min vis-à-vis des souches testées.....	115
<b>Tableau 7.1:</b> Taux de mortalité enregistrés dans les deux lots durant la période d'élevage.....	127
<b>Tableau 7.2:</b> Résultats de dénombrement de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif des sujets de la mise en place.....	127
<b>Tableau 7.3:</b> Résultats de dénombrement de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif des sujets des lots "témoin" et "expérimental" durant la période d'élevage.....	128
<b>Tableau 7.4 :</b> Résultats de dénombrement (exprimés en Log UFC/ml) et valeurs de pH obtenus pour la cinétique de croissance (à 24 h) de <i>P. acidilactici</i> sur milieu MRS seul ou additionné de l'extrait brut de <i>Yucca schidigera</i> .....	132
<b>Tableau 7.5 :</b> Diamètre de la zone d'inhibition autour des disques (mm) de différentes concentrations l'extrait brut de <i>Yucca schidigera</i> vis-à-vis les souches intestinales étudiées.....	136

## INTRODUCTION

L'aviculture en Algérie a connu une expansion et un développement spectaculaire à travers les différents plans de développement du MDRA. Ce qui a permis une augmentation de la production de viande blanche de 186 250 tonnes en 1989 à 277 383 tonnes en 2010 [1] dont le but est d'améliorer la ration alimentaire moyenne par son enrichissement en protéines d'origine animale. L'accroissement de la production est dû à une maîtrise de la conduite des élevages, à une meilleure optimisation nutritionnelle des régimes alimentaires et l'utilisation des facteurs de croissance qui sont surtout des antibiotiques.

Les antibiotiques en tant que facteurs de croissance comptent parmi les additifs les plus utilisés pour améliorer l'indice de consommation et la vitesse de croissance et augmenter par conséquent la productivité et la rentabilité des élevages. Cependant, ils ont favorisé l'apparition de résidus d'antibiotiques dans la chaîne alimentaires ou l'antibio-résistances en santé humaine; à titre d'exemple une partie des *Salmonella* multi-résistantes retrouvée chez l'homme est d'origine animale [2], et des réactions allergiques chez le consommateur, ainsi que des échecs de traitements aux antibiotiques chez l'homme [3].

Toutefois, suite à l'interdiction de l'usage des antibiotiques en tant que facteurs de croissance depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2006 par l'Union Européen et dans un souci de maintenir un niveau satisfaisant de production, plusieurs ingrédients

additionnels à la ration alimentaire améliorent la résistance aux maladies et participent par leurs propriétés et leurs molécules bioactives à l'état de santé général des animaux, ont été entreprises récemment comme alternative à l'utilisation des antibiotiques, dont les enzymes, les acides organiques, les extraits des plantes naturelles, les probiotiques et les prébiotiques [4].

Les probiotiques se définissent comme un supplément alimentaire de microbes vivants qui a un effet bénéfique sur l'animal hôte. Ils sont présentés comme de futurs ingrédients capables de contrôler le portage et la dissémination d'agents pathogènes et zoonotiques. De nombreux travaux ont montré que plus de l'efficacité zootechnique [5 ; 6], les probiotiques ont des effets bénéfiques sur la santé des volailles [7 ; 8 ; 9]. Nos récents travaux [10] ont montré que l'utilisation de *Pediococcus acidilactici* (Bactocell, souche MA 18/5M) permet certes une amélioration des performances zootechniques mais son efficacité demeure limitée à cause du problème de la coccidiose, pathologie majeure et récurrente dans nos élevages.

En Algérie, les moyens de lutte contre la coccidiose se résument à l'usage d'anticoccidiens chimiques dans l'aliment et l'eau de boisson. La prophylaxie médicale demeure absente au niveau des élevages de poulet de chair. Les extraits de « *Yucca schidigera* » ou certains de leurs métabolites, possèdent diverses activités biologiques ; antioxydant, anti-inflammatoire, antimicrobienne et antiparasitaire pouvant intervenir dans le maintien de la santé de l'animal.

L'objectif de la présente étude portant sur l'intérêt d'une supplémentation alimentaire de probiotique *Pediococcus acidilactici* seul et en association avec l'anticoccidien à base de l'extrait naturel de "*Yucca schidigera*" dans nos conditions locales d'élevage de poulet de chair vise à l'évaluation des performances zootechniques et du suivi de l'évolution de la flore digestive.

## CHAPITRE 1

### LA MICROFLORE DIGESTIVE DES VOLAILLES

#### 1.1. Rappel sur la microflore digestive du poulet

A l'exception des animaux axéniques, nés par césarienne et maintenus dans une enceinte stérile après la naissance, tous les animaux hébergent dans leur tube digestif une microflore complexe, qui est spécifique pour chaque espèce [11]. Chez le poulet environ une quarantaine de genres ont été identifiées, et représentées chacun par trois espèces ou davantage. Au totale ce sont plus de 200 types différents qui ont été trouvés par les méthodes classiques [12 ; 13]. Ainsi, selon les données de la microbiologie moléculaire, 640 espèces différentes et 140 genres bactériens différents ont été rapporté par Apajalahti et *al.* (2004) [14].

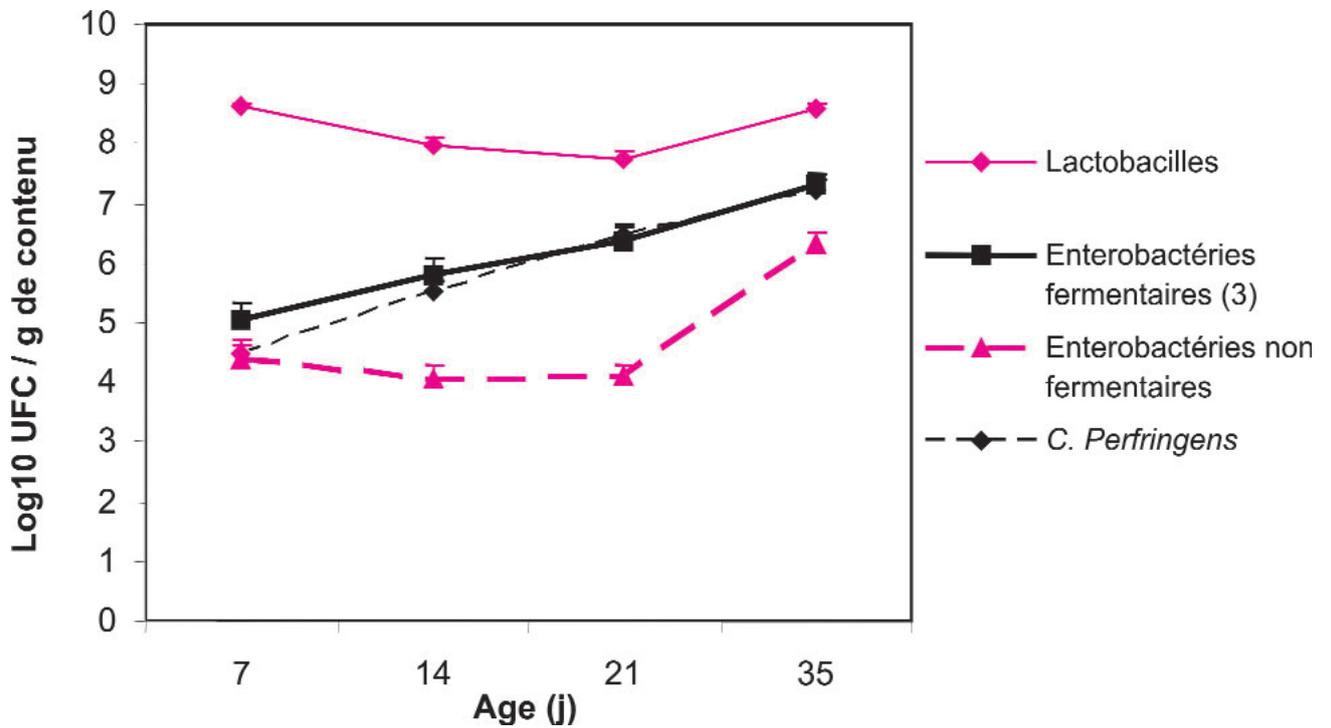
A l'éclosion, le tube digestif est stérile. La flore qui va s'installer dépend de l'environnement de l'œuf au moment de l'éclosion qui définit l'ordre dans lequel les animaux sont exposés aux micro-organismes et de leur aptitude à coloniser l'intestin [13].

- **Aspect quantitatif** : La flore augmente rapidement après l'éclosion. Ainsi dès le premier jour, l'iléon et les caeca hébergent  $10^8$  et  $10^{10}$  germes par gramme de contenu digestif [14]. Leur nombre atteint  $10^9$  et  $10^{11}$  bactéries par grammes à 3 jours et reste relativement stable jusqu'à l'âge de 30 jours.
- **Aspect qualitatif** : Les coliformes, les streptocoques et les clostridies colonisent rapidement l'intestin, dès le premier jour, alors que les lactobacilles ne sont pas

trouvés avant trois jours et les bactéroïdes pas avant cinq jours. La colonisation par les lactobacilles est retardée dans les milieux propres [13]. Ainsi, dans l'iléon, on observe avec l'âge différentes espèces de lactobacilles et une augmentation transitoire [15 ; 16]. Selon Gong et *al.* [17]; l'analyse de la flore associée à la muqueuse par la méthode de T-RFLP montre que celle-ci est dominée dans les caeca par des espèces moléculaires proches des *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Fusobacterium prausnitzii*, et *Escherichia coli*. Ainsi, Les lactobacilles dominant dans la partie supérieure du tube digestif et présentent leur plus grande diversité dans le jabot. *Lactobacillus aviarus* et *L. salivarius* sont les espèces les plus abondantes.

Toutefois, la flore intestinale varie longitudinalement tout le long du tube digestif, mais aussi transversalement entre lumière et muqueuse intestinale ; La flore luminale dépend des nutriments disponibles, de la vitesse de transit et de la présence ou non de substances antimicrobiennes [18]. La flore mucosale dépend de l'expression par l'hôte de sites d'adhésion spécifiques sur les membranes des entérocytes, de la vitesse de production du mucus, de la production d'anticorps (Ig) sécrétoires, et de l'extrusion de matériel cellulaire de la membrane [13].

La flore, aussi bien intestinale que caecale, se diversifie avec l'âge [15; 16], la figure 1.1 et le tableau 1.1 illustrent l'évolution des principaux groupes bactériens de la flore digestive du poulet en fonction de l'âge.



UFC : Unité Formant Colonie.

(1) Poulets de chair (mâle) à croissance rapide élevés au sol en conditions expérimentales (parquet), consommant un régime composé de blé, soja, pois, farine de poisson et graisse végétale, sans antibiotique.

(2) Nombre d'individus : 16, 10, 8 et 6 à 7, 14, 21 et 35 j respectivement.

(3) Fermentation du lactose.

Figure 1.1 : Evolution de la composition de la flore digestive iléale du poulet en fonction de l'âge déterminée par dénombrements bactériens [19].

Tableau 1.1 : Evolution de la composition de la flore digestive intestinale du poulet en fonction de l'âge déterminée par clonage et séquençage [16].

Segment digestif	Groupe	Classe	%de chaque classe à un âge donné					
			3	7	14	21	28	49
Intestin (jéjunum + iléon)	Gram +, bas G+C%	<i>Lactobacillaceae</i>	61.1	63.3	36.7	65.8	86.3	69.8
		<i>Clostridiaceae</i>	16.9	1.1	6.9	14.9	6.4	19.2
		<i>Bacillaceae</i>						4.0
		<i>Staphylococcaceae</i>	2.1			2.6		
		<i>Streptococcaceae</i>	2.1	17.8	16.7	2.6	0.9	
		<i>Enterococcaceae</i>	3.2	15.6	12.8	2.6	2.7	2.0
	Gram +, fort G+C%	<i>Fusobacteriaceae</i> <i>Bifidobacteriaceae</i>		1.1		4.4		
	Gram -, Protéobactéries		13.7					
	Gram -	<i>Bacteroidaceae</i>				2.6	1.0	
Caeca	Gram +, bas G+C%	<i>Lactobacillaceae</i>	25.7	4.3	9.9	1.0	0.9	7.2
		<i>Clostridiaceae</i>	51.4	85	73	56.6	56.1	74.2
		<i>Bacillaceae</i>			2.7	4.0	1.8	
		<i>Streptococcaceae</i>	2.9					1.0
		<i>Enterococcaceae</i>	1.9	2.2	0.9			2.0
	Gram+, fort G+C%	<i>Fusobacteriaceae</i>		2.2	9.0	27.3	35.1	7.2
		Gram-, Protéobactéries		15.2	2.2	9.9	27.3	35.1
	Gram-	<i>Flavobacteriaceae</i> <i>Bacteroidaceae</i>	1.0 1.0	5.4	3.6	10.1	5.3	5.2
	Bactéries inconnues		1.0	1.1		1.0	0.9	3.1

## 1.2. Rôle potentiels de la microflore

L'utilisation de modèles animaux axéniques ou gnotoxéniques (animaux axéniques inoculés avec des souches bactériennes connues) a permis de réaliser des progrès considérables dans l'étude des fonctions de la flore du tube digestif [20]. Le microbiote intestinal a une barrière spécifique multifactorielle, et assure de multiples fonctions bénéfiques pour l'hôte [21 ; 22 ; 23 ; 24] :

- Fonction trophique et changement de la structure de la muqueuse intestinale ;
- La maturation et stimulation du système immunitaire ;

- Fonction barrière contre l'implantation des bactéries pathogènes, tel l'amélioration de la résistance de l'oiseau aux bactéries entéropathogéniques, comme *C. perfringens*.

### **1.2.1. Dégradation et fermentation des composés alimentaires**

Les populations microbiennes peuvent affecter les fonctions digestives et la physiologie de l'épithélium intestinal par leur activité métabolique [25]. Chez l'oiseau, Les micro-organismes du tube digestif auraient un effet positif en libérant des nutriments absorbables par l'hôte au niveau de l'intestin et des caeca, ces derniers possédant aussi des capacités de transport des glucides et des acides aminés [26]. Cependant, d'après Claude [11] la digestion bactérienne chez les oiseaux n'apporte qu'une quantité négligeable de nutriments énergétiques ou azotés dans la majorité des cas. Pour cette raison elle a longtemps été considérée comme un phénomène sans intérêt nutritionnel, voire nuisible.

Parmi les glucides, on distingue ceux que l'oiseau peut digérer (amidon, dextrines, oligosaccharides et monosaccharides) et ceux qu'il ne peut pas utiliser, tels que les polysaccharides non amylacés (cellulose, hémicellulose, substances pectiques) [13]. L'amidon est en partie transformé en acide lactique dans le jabot des oiseaux. On y retrouve des quantités significatives de l'acide D et L lactique lorsqu'on donne du glucose à l'animal conventionnel. Chez l'axénique, on trouve de petites quantités d'acide L-lactique en même temps que des oligosaccharides provenant de la digestion salivaire d'amidon [12].

A l'exception de l'hoatzin, les microorganismes ont un rôle limité dans la dégradation des protéines alimentaires chez les oiseaux [27]. Cependant il existe une activité uréolytique au niveau du cæcum, vérifiée par le pH élevé régnant à ce niveau du tractus digestif, ainsi que par la présence d'ammoniaque et d'urée, consiste à dégrader l'acide urique avec une réutilisation des produits obtenus [28].

Chez le jeune poulet de moins de trois semaines, la flore diminue la digestibilité apparente fécale des lipides d'origine végétale de 2 points et celles des graisses animales de 10 points [29]. Cela provient en partie de l'excrétion endogène de lipides cellulaires liée à la desquamation des cellules de l'épithélium intestinal ainsi qu'à la présence de la biomasse bactérienne. Mais cette réduction de digestibilité provient surtout de la modification de certaines espèces bactériennes en particulier les lactobacilles [30]. Ainsi, comme chez les mammifères, la flore digestive des oiseaux modifie largement les sels biliaires : déconjugaison, désulfatation et déhydroxylation. En outre, elle participe à la saturation des acides gras polyinsaturés par hydrogénation [12].

Outre ces effets nutritionnels, La microflore a un impact sur la nutrition minérale et vitaminique. Elle diminue l'absorption du manganèse, mais elle est sans effet sur d'autres oligoéléments tels que le cuivre, le zinc et le fer. Toutefois ce dernier est mieux absorbé sous forme ferreux que ferrique [31]. En revanche, de par sa production d'AGV, elle facilite l'absorption des minéraux comme le sodium au niveau des caeca et du colon [32]. Les bactéries intestinales synthétisent des vitamines, mais seul l'acide folique serait disponible pour l'animal [33].

### **1.2.2. Effets sur l'anatomie et le métabolisme de la muqueuse digestive**

Grâce à ces interactions avec les cellules épithéliales, la microflore autochtone modifie la structure et l'activité du tube digestif. Chez les animaux axéniques, la *lamina propria* de l'épithélium est fine peu développé et pratiquement dépourvue de lymphocytes; le temps de renouvellement des cellules épithéliales est deux fois plus lent, le temps de transit est également ralenti [27], avec une diminution de la taille des plaques de Peyer [11].

Par ailleurs, Le microbiote intestinal joue un rôle important dans l'angiogenèse intestinale ; Les réseaux de vaisseaux sanguins des villosités intestinales de souris adultes axéniques et conventionnelles ont été comparés, montrant que ce réseau est deux fois moins dense chez des souris axéniques en raison d'un développement

stoppé prématurément chez ces dernières [34]. En effet, la microflore entraîne une augmentation de la production de mucines [35] ainsi qu'une modification des proportions des différents types de glycoprotéines qui les constituent [36].

### **1.2.3. Stimulation de l'immunité intestinale**

L'un des rôles potentiels exercé par la flore digestive est la stimulation du système immunitaire de l'hôte. D'une part, elle est une source d'antigène capable de déclencher la réponse immunitaire spécifique systématique et locale [37]. D'autre part, elle influence le nombre, la distribution et le degré d'activation des populations cellulaires du système immunitaire intestinal (SII) [19] dont les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques, la *lamina Propria* et l'épithélium des villosités [38 ; 39].

Les bactéries autochtones stimulent la mise en place de l'immunité cellulaire, la paroi intestinale est plus épaisse et chez le jeune le tissu lymphoïde (plaques de Peyer) et les précurseurs de l'immunité cellulaire (lymphocytes B, IgA, lymphocytes T, macrophages, cytokines pro-inflammatoires) subissent une stimulation antigénique [27]. En effet certaines bactéries stimulent l'immunité non spécifique en activant la fonction des macrophages (phagocytose, synthèse de cytokines) [16].

### **1.2.4. Rôle antimicrobien**

Le concept d'effet barrière (ou résistance à la colonisation) a été bien développé par Ducluzeau et Raibaud [40]. Il repose sur le fait que la flore autochtone implantée durablement dans le tube digestif s'oppose à l'implantation des bactéries exogènes. La flore autochtone exerce un effet bactériostatique vis-à-vis d'espèces allochtones, qui sont ensuite éliminées à la vitesse du transit digestif [20]. La barrière est dite «permissive» lorsqu'elle autorise un portage «sain»; elle est «drastique» lorsque le microorganisme est totalement éliminé [11 ; 27].

Les mécanismes à la base de cet effet barrière sont variés. D'après [13] :

- La flore naturelle du jabot, en particulier les lactobacilles, diminue le pH de cet organe autour de 4.5 conduisant à un effet bactéricide limitant la croissance

des bactéries néfastes. La flore produit aussi des acides gras volatils, dont le type et la quantité dépendent de la nature des bactéries et des substrats disponibles. Dans le jabot, on trouve principalement de l'acide lactique, et dans les caeca, principalement de l'acide acétique, en moins grande quantité de l'acide propionique et butyrique, et des traces d'autres acides. Ces acides gras organiques ont un effet bactéricide

- L'effet barrière peut être dû à la production de substances antimicrobiennes par la flore autochtone. Ces composants peuvent soit inhiber soit tuer les pathogènes. Ainsi, les lactobacilles homofermentaires (dont *Lactobacillus acidophilus*) produisent différents types de bactériocines qui ont un large spectre d'activité, ainsi que du peroxyde d'hydrogène.
- La flore bénéfique peut aussi intervenir par l'utilisation compétitive de nutriments essentiels ou en modifiant des récepteurs utilisés par les bactéries ou leurs toxines empêchant ainsi leur développement dans le tube digestif.

### **1.3. Les principaux facteurs influençant le microbiote intestinal**

La composition et les fonctions de la microflore du tractus gastro-intestinal peuvent être influencées par des facteurs endogènes et exogènes. Parmi les facteurs endogènes, on retrouve le pH ou le potentiel d'oxydoréduction, les interactions microbiennes, la muqueuse épithéliale intestinale, le péristaltisme, les sécrétions acides et la production de mucus [41]. Les principaux facteurs exogènes incluent les changements des conditions physiologiques de l'hôte (âge, état de santé, etc.), la composition du régime alimentaire et les circonstances environnementales (contamination par les pathogènes, antibiothérapie, chimiothérapie, climat, stress, hygiène ...) [42].

#### **1.3.1. Souche, sexe, individu**

La flore digestive semble différer selon la souche et le sexe des animaux. Chaque individu présente une communauté bactérienne digestive qui lui est propre [43].

### **1.3.2. Environnement**

Selon le milieu d'élevage, la microflore est différente. Des populations plus fortes sont observées chez des animaux élevés au sol (sur litière propre ou contaminée) par rapport à des animaux élevés en cages individuelles [44]. L'augmentation de la densité d'élevage ou les stress thermiques semblent globalement augmenter les bactéries néfastes au détriment des bactéries bénéfiques [45]. La présence de parasites intestinaux comme les coccidies, entraînant la dégradation de la muqueuse intestinale donc la production de nouveaux substrats pour la microflore, conduit à une modification de celle-ci [46].

### **1.3.3. Composition et structure des aliments**

La flore digestive dépend directement de l'alimentation puisque cette dernière est à l'origine du type de substrat disponible pour la croissance des microorganismes. Elle peut être modifiée par le type de céréales, en particulier la présence de polysaccharides non amyliques hydrosolubles, ou par leur mode hydrosolubles, ou par leur mode de présentation. Ainsi, Mathlouti et *al.* [47] ont observé une augmentation des populations bactériennes anaérobies facultatives, dont les lactobacilles et les coliformes, avec un régime à base de blé et d'orge au lieu de maïs. La consommation d'un régime contenant du blé sous forme de graines entières par rapport à du blé broyé entraîne une modification de la flore [48 ; 11 ; 49].

La granulation de l'aliment, entraîne d'après Engberg et *al.* [49] une augmentation des coliformes et des entérocoques dans l'iléon, ainsi qu'une baisse de *Clostridium perfringens* et des lactobacilles en fin de tube digestif (caeca et rectum). De même, l'origine des matières grasses [15] ou des protéines [50] peut modifier la flore. Les minéraux et les vitamines peuvent avoir un effet sur la flore. Ainsi, Orban et *al.* [51] ont observé une augmentation des bifidobactéries avec un apport doublé en oligo-minéraux et vitamines (1 % au lieu de 0,5 %). De même, Xia et *al.* [52] ont montré une réduction des populations de clostridies et de coliformes dans l'intestin et les caeca de poulets recevant un supplément de cuivre associé à de la montmorillonite, la supplémentation de cuivre seul étant sans effet. Ces facteurs

sont responsables des différences de flore observées entre des élevages dont les conditions de gestion varient [19].

#### **1.4. Pathologie digestive de poulet d'origine parasitaire : La coccidiose**

La flore installée dans le tube digestif des animaux peut être fortement perturbée et des espèces exogènes indésirables peuvent alors émerger et conduire à des troubles digestifs [53]. Ces troubles peuvent avoir des origines différentes, infectieuse (virale, bactérienne ou parasitaire) ou non infectieuse (métabolique). La coccidiose aviaire est l'une des pathologies gastro-intestinales d'origine parasitaire, due à la présence et à la multiplication de diverses coccidies du genre *Eimeria* dans les cellules épithéliales de l'intestin [54]. Elle se manifeste par une entérite hémorragique d'évolution aiguë et mortelle, ou par une forme subclinique [55].

Les coccidioses se caractérisent par une réduction de la consommation, de gain de poids, une modification de l'emplument, une diminution de la coloration des carcasses, des diarrhées qui peuvent être sanguinolentes. Cette pathologie, largement associée à la destruction de l'épithélium intestinal, est responsable d'une diminution de l'absorption des nutriments dans le cas des coccidies affectant l'intestin grêle ou provoque des hémorragies qui peuvent être mortelles dans le cas d'infections sévères par *Eimeria necatrix* ou l'espèce caecale *E. tenella* [56].

#### **1.5. Les antibiotiques : modulateurs de flore digestive**

L'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance dans les élevages avicoles a été largement répandue depuis des décennies selon deux grands usages [57 ; 58 ; 59 ; 60 ; 61 ; 1]:

- Les antibiotiques ont tout d'abord une utilisation thérapeutique visant à l'éradication d'une infection présente (but curatif) ou à la prévention d'une infection possible, à l'occasion d'un transport, d'une vaccination ou d'un stress (but prophylactique) ;
- Un usage zootechnique c'est-à-dire comme facteurs de croissance sous forme d'additifs alimentaires. En effet, l'apport d'antibiotique augmente la

vitesse de croissance des animaux, de quelques pour-cent (gain moyen quotidien (GMQ) s'améliore en moyenne de +3 à +7 %), améliore l'efficacité alimentaire (l'indice de consommation (IC)) diminue de quelques pour-cent (-2 à -9 %) [58].

Cependant, des risques potentiels liés à l'usage des antibiotiques, peuvent se classer en trois catégories: toxicité direct, problèmes de résidus d'antibiotiques dans la chaîne alimentaire où risques de déclenchement d'allergies chez le consommateur, émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques chez l'animal et l'homme [11 ; 62 ; 63 ; 64]. Pour remédier à ce problème, la Commission Européenne a finalement interdit l'usage des antibiotiques comme facteurs de croissance en productions animales à partir du 1<sup>er</sup> janvier 2006 [64].

### **1.6. Contrôle de la microflore (Figure 1.2)**

Depuis l'interdiction des facteurs de croissance et dans un souci du maintien du niveau de productivité de la filière avicole, plusieurs équipes de recherche se concentrent à trouver des solutions aussi bien au niveau de la gestion sanitaire et hygiénique des élevages, qu'au niveau de l'alimentation. Ainsi, nombre de substances, possibles substitutifs des antibiotiques, ont été testés au cours des années 1990 et début 2000, sont d'origine variée mais interviennent pour la plupart au niveau digestif. La figure 1.2 illustre les possibilités de contrôle de la flore digestive.

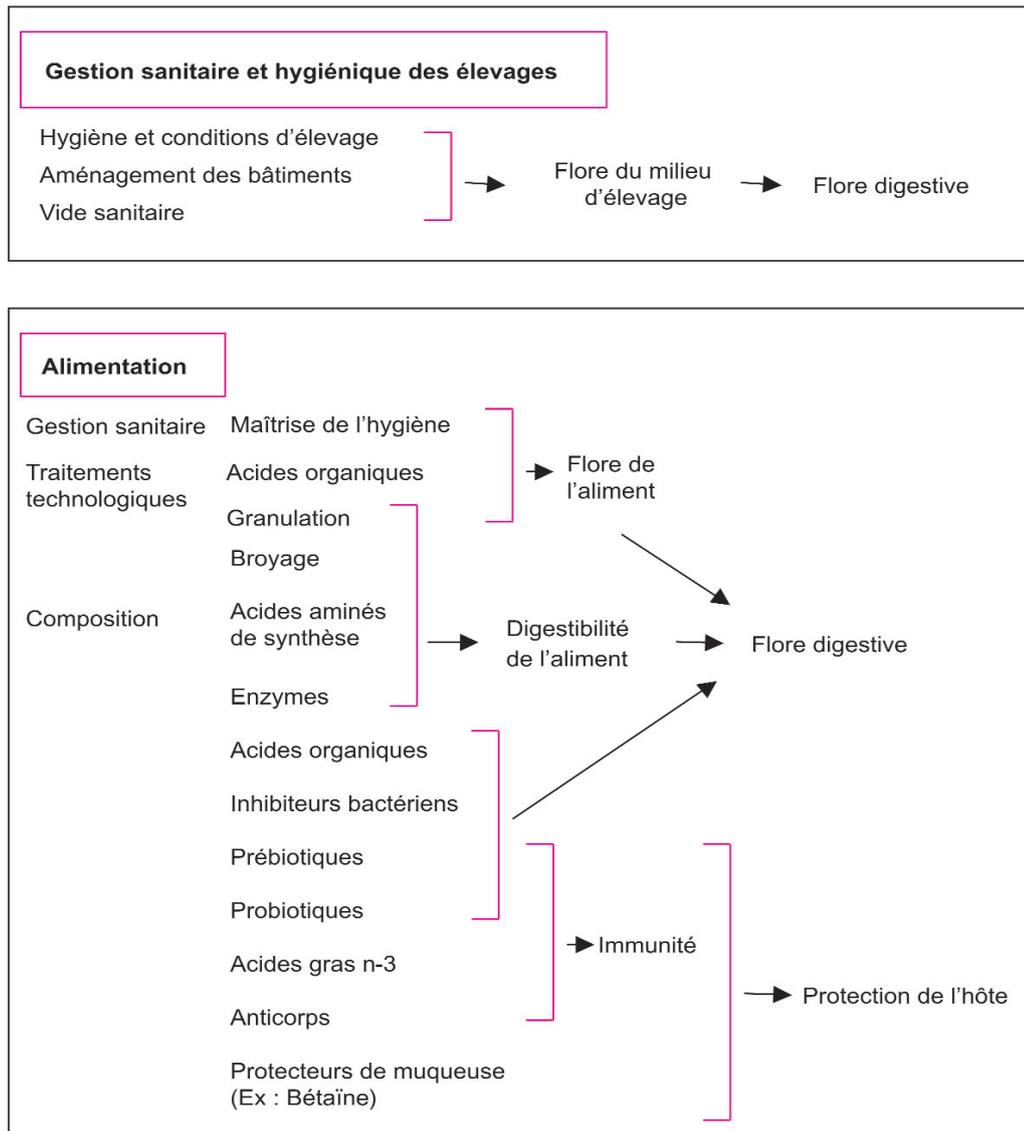


Figure 1.2 : Possibilités de contrôle de la flore digestive et de ses effets [19].

## CHAPITRE 2

### LES PROBIOTIQUES EN PRODUCTION AVIAIRE

#### 2.1. Définition et développement

L'idée d'administrer des microorganismes nommés probiotiques afin de moduler la flore endogène est ancienne. Elie Metchnikoff qui obtint le prix Nobel en 1908 avait pour théorie que la longévité des paysans bulgares était directement liée à leur consommation de laits fermentés [41 ; 65].

Le terme «probiotique» vient de deux mots grecs « pros » et « bios » qui signifient littéralement «pour la vie» en opposition au terme « antibiotique » (littéralement « contre la vie ») [66 ; 67 ; 68]. Cependant, le terme probiotique a été introduit en 1965 par Lilly et Stillwell pour décrire une substance produite par un microorganisme afin de stimuler la croissance d'un autre microorganisme [69]. Plus tard, Fuller les définis comme étant : un microorganisme vivant sous forme de supplément alimentaire qui affecte de façon bénéfique l'hôte animal en modifiant l'équilibre de la microflore intestinale [70 ; 71].

Selon la définition actuellement adoptée donnée par l'Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation (FAO) et l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS), les « probiotiques » sont des microorganismes vivants qui administrés en quantités adéquates sont bénéfiques pour la santé de l'hôte [72].

## **2.2. Propriétés et critères de sélection des probiotiques**

Les principales caractéristiques pour qu'un organisme soit considéré en tant que candidat probiotique sont [73 ; 74 ; 69 ; 75 ; 76 ; 77]:

- Etre non toxique et non pathogène ;
- Etre identifié ;
- Survivre, coloniser leur hôte et avoir un métabolisme actif, qui implique :
  - Résistance à la bile gastrique
  - Persistance dans le tractus gastro-intestinal
  - Adhérence à l'épithélium ou au mucus intestinal
- Production des substances antimicrobiennes ;
- Antagonisme vers les bactéries pathogènes ;
- Stimulation du système immunitaire ;
- Génétiquement stable ;
- Survivre aux différents procédés technologiques de production industrielle.

Néanmoins, certains de ces critères sont remis en question, comme le caractère vivant et les propriétés d'adhérence [78]. La plupart des notions de probiotiques, soulignent que les micro-organismes devraient être viables et atteindre leur site d'action vivants [69]. Toutefois, des études récentes, ont clairement démontré que même les souches non viables de probiotiques sont capables d'exercer certains effets positifs sur la santé entre autres la stimulation de certaines fonctions immunitaires [79], l'inhibition de l'adhésion et de l'invasion de certains pathogènes [69]. Par ailleurs, la survie des bactéries probiotiques *in vitro* est influencée par la présence de métabolites tels que l'acide lactique, l'acide acétique, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines [80]. Par conséquent, La non-survie n'implique pas nécessairement l'absence d'effets bénéfiques [81].

### **2.3. Microorganismes probiotique et bactéries lactiques**

Au vu des connaissances récentes, de nombreuses espèces microbiennes ont été utilisées en tant qu'agents probiotiques chez les volailles, Ces micro-organismes appartiennent aux bactéries du genre : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* et aux levures comme : *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. [82 ; 75 ; 83 ; 84 ; 77]. Le tableau 2.1 ci-après représente la liste des probiotique utilisés en alimentation animale.

Tableau 2.1 : Liste des probiotiques utilisés en alimentation animale [77]

Genres	Espèces	Genres	Espèces
<b>Bifidobacterium</b>	<i>Bf. animalis subsp. animalis</i> ( <i>Bf. animalis</i> ) <i>Bf. lactis subsp. lactis</i> ( <i>Bf.lactis</i> ) <i>Bf.longum subsp. Longum</i> ( <i>Bf.longum</i> ) <i>Bf. pseudolongum subsp. pseudolongum</i> ( <i>Bf.pseudolongum</i> ) <i>Bf.thermophilum</i>	<b>Lactococcus</b>	<i>L. lactis subsp. cremoris</i> ( <i>Streptococcus cremoris</i> ) <i>L. lactis subsp. Lactis</i>
		<b>Streptococcus</b>	<i>S. infantarius</i> <i>S. salivarius subsp. salivarius</i> <i>S. thermophilus</i> ( <i>S. salivarius subsp. thermophilus</i> )
<b>Enterococcus</b>	<i>E. faecalis</i> ( <i>Streptococcus faecalis</i> ) <i>E. faecium</i> ( <i>Streptococcus faecium</i> )	<b>Leuconostoc</b>	<i>L. citreum</i> <i>L. lactis</i> <i>L. mesenteroides</i>
<b>Lactobacillus</b>	<i>La. acidophilus</i> <i>La. amylovorus</i> <i>La. brevis</i> <i>La. casei subsp. casei</i> ( <i>La. casei</i> ) <i>La. crispatus</i> <i>La. farmicinis</i> <i>La. amylovorus</i> <i>La. brevis</i> <i>La. casei subsp. casei</i> ( <i>La. casei</i> ) <i>La. crispatus</i> <i>La. farmicinis</i> <i>La. fermentum</i> <i>La. murinus</i> <i>La. plantarum subsp. plantarum</i> ( <i>La. plantarum</i> ) <i>La. reuteri</i> <i>La. rhamnosus</i> <i>La. salivarius</i> <i>La. amylovorus</i> ( <i>La. sobrius</i> )	<b>Pediococcus</b>	<i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus subsp. Pentosaceous</i>
		<b>Propionibacterium</b>	<i>P. freudenreichii</i>
		<b>Bacillus</b>	<i>B. cereus</i> ( <i>B. cereus var. toyoi</i> ) <i>B. licheniformis</i> <i>B. subtilis</i>
		<b>Saccharomyces</b>	<i>S. cerevisiae</i> ( <i>S. boulardii</i> ) <i>S. pastorianus</i> ( <i>S. carlsbergensis</i> )
		<b>Kluyveromyces</b>	<i>K. fragilis</i> <i>K. marxianus</i>
		<b>Aspergillus</b>	<i>A. orizae</i> <i>A. niger</i>

## **2.4. Mécanismes d'action**

Les mécanismes par lesquels les probiotiques exercent leurs effets bénéfiques sur l'hôte sont en grande partie inconnus [85]. En général, ils agiraient d'une part de manière directe sur la santé et sur la physiologie de l'animal ou d'autre part de façon indirecte par la modification de l'écosystème digestif ou par l'optimisation de la réponse immunitaire face aux agressions [86].

En effet, l'action des probiotiques serait influencée par de multiples interactions entre les éléments constitutifs de la biocénose et par les interactions entre la biocénose et le biotope ou l'hôte. D'après Salminen et *al.* [87] on distingue des interactions:

- *cellules bactériennes et épithélium* (Adhérence à cellules épithéliales de la muqueuse, stimulation de la sécrétion du mucus, production des molécules défensives) ;
- *bactéries et système immunitaire* (Stimulation du système immunitaire);
- *bactéries - bactéries* (Exclusion et inhibition des microbes pathogènes par prévention d'adhérence, sécrétion des substances antimicrobiennes, compétition vis-à-vis les nutriments).

### **2.4.1. Modulation du système immunitaire**

De nombreuses études chez l'animal ont montré que l'administration orale de certaines souches probiotiques pouvait moduler la barrière et les mécanismes immunitaires aux niveaux muqueux et systémiques [73]. Elles pouvaient introduire des réponses spécifiques et non spécifiques [88]. En effet, les cellules intestinales sont capables de détecter la présence de bactéries *via* les récepteurs membranaires TRL et NOD et d'y répondre en modifiant la transcription de certains de leurs composants et activités [89]. Ainsi, l'effet immunomodulateur des probiotiques pourrait réaliser par leur métabolites, et pourrait même exécuter avec les bactéries probiotiques mortes ou des dérivés des composants comme les peptidoglycanes [90].

D'après Ahmad, [85] l'amélioration du système immunitaire par les probiotiques chez les poulets peut être de trois manières différentes :

**(a)** Stimulation d'activité phagocytaire des macrophages; Chez des souris nourries avec *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) et *Bifidobacterium lactis* (HN019) à  $10^9$  UFC/jour, une augmentation de la fonction phagocytaire dans le sang périphérique est devenue significative après 10 jours d'alimentation, et a été maintenue à un niveau semblable pendant toute la période d'alimentation [91] ;

**(b)** Augmentation de la production des anticorps protecteurs IgG et IgM et de l'interleukine; une activation du système immunitaire spécifique (immunité humorale) a été démontré en réponse contre l'infection; soit par *Eimeria acervulina*, *E. tenella* chez des poulets de chair traités avec deux probiotiques *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces boulardii* [92], soit par *Eimeria maxima* chez des poulets de chair traités par *Bacillus*-based [93].

**(c)** Augmentation de la production des anticorps sécrétoires, notamment des IgA; à une étude menée chez des poulets de chair traités avec *Lb.*-based probiotic, des effets remarquables sur l'immunité locale démontrés par (1) une diminution des taux d'invasion intestinale et du développement d'oocytes d'*Eimeria acervulina* (EA), (2) des taux supérieurs de sécrétion d'IL-2 et diminution de la production d'oocytes d'EA [94]. Un traitement par *B. lactis* ou *L. rhamnosus* suivi d'un challenge avec une souche d'*E. coli* entérohemorragique se traduit chez la souris par une augmentation d'IgA [95].

#### **2.4.2. Production des facteurs «antimicrobiens»**

L'effet antagoniste des bactéries probiotiques contre les germes indésirables, est particulièrement accrue par la production des substances antimicrobiennes. C'est probablement le mode d'action le plus fréquemment suggéré dans la littérature. Des études *in vitro* ont montré l'inhibition des microorganismes pathogènes par l'intermédiaire des substances de faible poids moléculaire tel les acides gras à chaîne courte (exemple : acide lactique), le peroxyde d'hydrogène. En outre, des bactériocines de faible poids moléculaire et bactériocines à poids moléculaire élevé (classe III) sont produites par des lactobacilles [90].

L'acide lactique et acétique sont les principaux acides organiques produits pendant la croissance des probiotiques, leur diminution du pH gastro-intestinal traduit un effet bactéricide ou bactériostatique [96]. Sur la base des données moléculaire, des substances telles l'acide lactique ayant une action inhibitrice vers les bactéries pathogènes Gram négative [97 ; 98]. Ainsi, quelques souches de *Lactobacillus* empêchent la croissance de *Salmonella enterica* seulement par la production de l'acide lactique [99].

Les bactéries probiotiques peuvent produire des acides de bile par déconjugaison des sels biliaires, ayant un pouvoir antimicrobien plus fort comparée aux sels de bile synthétisés par l'hôte [90].

#### **2.4.3. Compétition vis-à-vis les nutriments et les sites d'adhésion**

L'efficacité des bactéries probiotiques contre les pathogènes peut être également liée à l'existence d'une compétition entre microorganismes, qu'elle soit nutritionnelle [70] ou pour les sites d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales [69].

Aujourd'hui la capacité des souches à adhérer aux cellules épithéliales et à la muqueuse gastro-intestinale est un des importantes propriétés des bactéries probiotiques [100], bloquant de ce fait l'adhérence des microbes pathogènes. L'effet antiadhésif pourrait être le résultat de la concurrence entre probiotique et le microorganisme pathogène pour le même récepteur, d'autres modes d'anti-adhérence exprimés par les probiotiques ont pu être la dégradation des récepteurs d'hydrate de carbone [98] par les protéines sécrétées, l'établissement des biofilms, la production des analogues de récepteur et l'induction des bio-surfactants [90].

Un phénomène d'exclusion compétition a été mis en évidence entre *Lactobacillus johnsonii* (F19785) et *Clostridium perfringens* chez des poulets âgés d'un jour ou de 3 semaines [22]. Plusieurs souches de lactobacilles ou de bifidobactéries peuvent concurrencer les bactéries pathogènes, incluant *Bacteroides vulgatus*, *Clostridium histolyticum*, *C. difficile*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* [101] et *E.coli enterotoxinogène* [102 ;

101] pour l'attachement aux cellules épithéliales intestinales, et peuvent les déplacer même si ces microbes pathogènes sont attachés aux cellules épithéliales intestinales avant le traitement probiotiques.

#### **2.4.4. Neutralisation des produits toxiques**

Les probiotiques provoqueraient une atténuation du catabolisme intra-digestif et une orientation de la microflore intestinale pour réduire l'absorption des substances toxiques telles que: l'ammoniac, les amines, et diminuer les biotransformations des sels biliaries et des acides gras en produits toxiques et auraient aussi la capacité de produire des métabolismes susceptibles de neutraliser *in situ* certaines toxines bactériennes [103 ; 104].

L'efficacité des probiotiques pour la désintoxication biologique des mycotoxines chez les poulets est prouvée dans des conditions *in vitro* [105], et *in vivo* [106].

#### **2.4.5. Amélioration de la digestibilité de la ration alimentaire**

La production d'enzymes par les souches probiotiques serait une des possibilités pour favoriser la digestibilité de la ration alimentaire, ainsi certaines bactéries probiotiques excrètent la  $\beta$ -galactosidase souvent déficiente dans le tractus digestif de l'hôte ce qui facilite la digestion du lactose. Chez le poulet, l'utilisation des probiotiques permet d'augmenter la vitesse d'amylolyse et la production d'acide lactique [28].

### **2.5. Les probiotiques en production aviaire**

L'utilisation des probiotiques dans l'alimentation des volailles a commencé depuis 30 ans. Elle est liée au développement du concept « Exclusion compétitive » par Nurmi et Rantala en 1973 [107]. Leur utilisation a été encouragée (1) par le Comité Swann en 1969 qui recommandait de restreindre l'usage des antibiotiques en alimentation animale à la seule fin thérapeutique (leur utilisation « facteurs de croissance » étant associée à l'augmentation des résistances bactérienne) ; (2) par

la nécessité de faire face aux conséquences d'une production animale toujours plus intense et stressante pour les animaux (économie d'échelle, augmentation de la taille des élevages, concentration des animaux,...) [108].

En alimentation animale, les probiotiques sont définis comme des préparations de bactéries ou de levures vivantes introduites dans les aliments, en vue d'améliorer les performances zootechniques ou l'état sanitaire [62] voire du bien être des animaux, établi par la réduction de la fréquence des diarrhées ou de la mortalité durant certaines phases critiques d'élevage: stress alimentaire (changement de régimes alimentaires...), stress sanitaires (densité des animaux...) [85].

### **2.5.1. Effet sur la production aviaire**

Les effets zootechniques des probiotiques chez les monogastriques s'apparentent étroitement à ceux des antibiotiques : augmentation du gain moyen quotidien de 1 à 3% en général, associé à une diminution analogue de l'indice de consommation, amélioration de l'état sanitaire, diminution des diarrhées non spécifiques, diminution de l'émission d'ammoniac par les litières chez les volailles [11].

La supplémentation des probiotiques dans la ration alimentaire des poulets à pour but d'améliorer le gain quotidien de poids, indice de consommation et le taux de mortalité [109 ; 83 ; 110 ; 111 ; 112 ; 113 ; 114].

Néanmoins, des résultats contradictoires ont été rapportés par d'autres chercheurs [115 ; 116 ; 117]. La souche choisie, sa dose et la méthode de préparation, plus l'état des animaux ont pu être partiellement responsables de telles anomalies [113]. Dans l'ensemble, l'amélioration des paramètres zootechniques, est plus faible et inconstante qu'avec les antibiotiques [11].

Chez les poulets, l'utilisation de probiotiques à base de bactéries lactiques notamment *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus* en

supplémentation à l'alimentation où à l'eau permettait une amélioration significative du poids [84].

Pour Vittorio et *al.* [5] l'utilisation du probiotique *Pediococcus acidilactici* chez le poulet a un effet positif sur la croissance des femelles que des mâles ; le gain de poids quotidien moyen (GMQ) de l'ensemble des poulets recevant des probiotiques était significativement supérieur à celui des témoins à 35 jours d'âge, l'indice de consommation (IC) à 35 jours a été réduit pour l'ensemble des poulets ayant reçu *P. acidilactici*, que le taux de mortalité est demeuré identique entre les groupes. De plus, dans une étude récente où *Pediococcus acidilactici* a été administré à des poussins masculins pendant six semaines, les résultats ont prouvé que le poids vif (PV) a augmenté une fois comparé à ceux de groupe témoin [112].

### **2.5.2. Effet sanitaire**

L'intérêt principal des probiotiques réside sans doute dans leur effet stabilisant sur la flore digestive et l'amélioration de l'état de santé des animaux d'élevage qui est susceptible d'en découler [11]. Par ailleurs, les maladies entériques constituent un problème majeur en aviculture en raison de la perte de productivité, de l'augmentation de la mortalité et la contamination des produits avicoles destiné à la consommation humaine [75].

Plusieurs études démontrent que les probiotiques peuvent affecter différentes populations bactériennes présentes dans le tube digestif des poulets. En utilisant le probiotique *Pediococcus acidilactici*, le nombre des bactéries pathogènes est diminué d'une façon remarquable (en général 63% pour *Escherichia. coli* et 89% pour *Staphylococcus. aureus*) en comparaison avec celle observée chez les poulets témoins [118]. Ainsi, une diminution significative des comptes des coliformes a enregistré dans les contenus de l'iléon en comparaison avec le témoin [112]. Cependant, l'ajout de *Pediococcus acidilactici* dans l'aliment a significativement augmenté le nombre total de lactobacilles au niveau de la flore duodénale par rapport aux témoins, à 10, 28 et 49 jours d'âge [111]. De plus, d'après les résultats rapportés par Vittorio et *al.* [5], La population cécale de lactobacilles est augmentée par l'addition de *Pediococcus acidilactici* dans l'alimentation, tandis que l'évolution du

contenu cécal en coliformes trouvée significativement réduite au cours du temps par rapport au témoin sans probiotique.

Dans une autre étude, l'administration de probiotique *L. acidophilus* ou d'un mélange des souches de *lactobacillus* à des poussins d'un jour a permis d'augmenter le poids avec une diminution significative des comptes des coliformes au niveau du caecum après 10 à 20 d'alimentation, et un accroissement du taux des acides gras volatiles et une diminution du pH intestinal, de plus l'addition des cultures de *lactobacillus* dans les régimes n'a pas augmenté de manière significative la population de lactobacilles dans l'iléum et le caecum des poulets, sauf 30 jours après alimentation [119].

### **2.5.3. Effet sur la qualité des produits**

La supplémentation des probiotiques dans la ration alimentaire des poulets de chair améliore la qualité microbiologique et la qualité organoleptique de la viande [120]. Certains probiotiques augmentent la teneur en protéines de la viande et diminuent sa teneur en lipides dont le cholestérol [121 ; 122]. L'étude de Zhang et *al.* (2005) a rapporté que la tendreté de la viande pourrait être améliorée par la levure *saccharomyces cerevisiae* entière ou seulement par son extrait.

Par ailleurs, la surface de l'œuf, ainsi que son contenu sont modifiés par les changements de microflore intestinale liés à l'utilisation d'antibiotiques ou de probiotiques. Certains probiotiques augmentent l'épaisseur de la coquille (à poids d'œuf identique), sa teneur en calcium, ainsi que sa résistance [124 ; 125]. La teneur en cholestérol du jaune d'œuf est réduite par l'utilisation de certains probiotiques [124].

Sur la base de ces effets biologiques, les probiotiques sont considérés aujourd'hui comme des moyens d'optimiser la nutrition et la santé de l'animal.

## CHAPITRE 3

### LES BACTERIES LACTIQUES

#### 3.1. Généralités sur les bactéries lactiques

Habituellement, ils sont décrits en tant que micro-organismes Gram positifs, exempt de cytochromes, anaérobies mais aérotolestants, résistantes à l'acide, et ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique comme produit principal [125]. En outre, ils sont des coques, des bacilles ou des coccobacilles non sporulés ayant une teneur en guanine et cytosine (G+C) de leur ADN inférieure à 50% [126].

Selon Stiles et Holzapfel, [125] et Holzapfel, [127] les bactéries lactiques regroupent les genres suivants : *Aerococcus*, *Alliococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. La relation phylogénétique entre les différents genres est basée sur la comparaison des séquences d'ARN ribosomal 16S.

Sur la base des caractéristiques de fermentation, les bactéries lactiques sont subdivisées en deux groupes; homo-fermentaires comprenant *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* et quelques lactobacilles, leurs produits du catabolisme du glucose par voie Embden–Meyerhof–Parnas est principalement de l'acide lactique (lactate). Au contraire, les bactéries hétéro-fermentatives en plus de l'acide lactique produisent de l'acide acétique, de l'éthanol, du dioxyde de carbone, les genres de ce groupe incluent *Leuconostoc*, *Weissella* et quelques autres lactobacilles [96].

Les bactéries lactiques sont apparues il y a 3 milliards d'années avant les cyanobactéries photosynthétiques [128]. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale, vaginale et de la cavité buccale humaine ou animale [126 ; 129 ; 130]. Elles sont pour la plupart mésophiles; certaines sont psychrotolérantes ou thermo-tolérantes. Elles se développent majoritairement à des pH compris entre 4 et 6,5 et certaines sont encore actives à pH 9,6 ou à pH 3,2. Elles ont des tolérances très variables vis-à-vis du sel.

### **3.2. *Pediococcus acidilactici***

Les Pédiocoques appartiennent au groupe des bactéries lactiques et selon Bergey [131] peuvent être classés phylogénétiquement de la façon suivante :

- Règne: *Bacteria*
- Embranchement: *Firmicutes*
- Classe: *Bacilli*
- Ordre: *Lactobacillales*
- Famille: *Lactobacillaceae*
- Genre: *Pediococcus*

Du point de vue phénotypique, ce genre est plus proche des genres *Lactobacillus* que des autres bactéries lactiques (Figure 3.1).

D'une façon général, les *pediococcus* sont des bactéries lactiques homofermentaires, produisant à partir d'hexoses de l'acide lactique DL ou L(+) selon les espèces [132 ; 133]. L'espèce *acidilactici* ne produisant que le type L(+) [134]. Ainsi, Leurs cellules sont sphériques, jamais allongées, rarement isolées et ne forment jamais de chaînes ; elles se divisent alternativement sur deux plans perpendiculaires, ce qui détermine la formation de tétrades [133].

Toutes les espèces sont mésophiles; se développent bien à 30°C, et leurs températures optimales de croissance sont comprises entre 25°C et 40°C. Toutefois l'espèce *acidilactici* persiste à des températures allant de 45 à 50°C [134]. Leur

croissance est dépendante de la présence de sucres fermentables, de facteurs de croissance (vitamines : acide nicotinique, biotine, acide pantothenique) et d'acides aminés, et le plus souvent incapables d'utiliser le lactose [135], ce qui les empêche d'acidifier et de coaguler le lait. Cependant, certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sel très élevées, comme *P.halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl [135].

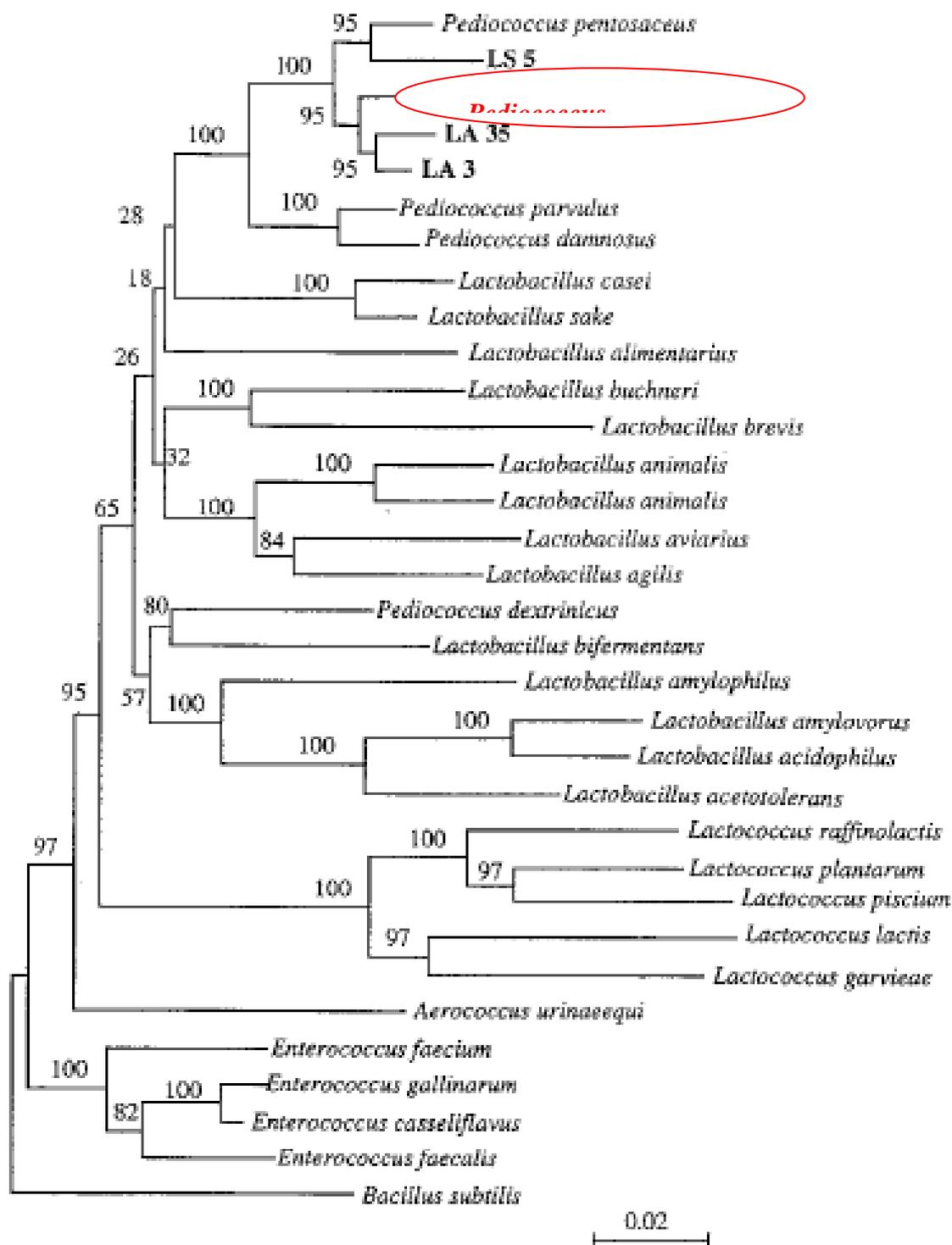


Figure 3.1: Arbre phylogénétique en méthode neighbor-joining, sur la base des séquences ribosomiques de l'ADN 16S positionnant l'espèce *P. acidilactici* parmi différentes espèces de bactéries lactiques [136].

Dans la présente étude, le ferment lactique *Pediococcus acidilactici* MA18/5M enregistré et autorisé par l'Union Européenne comme additif zootechnique pour poulets de chair (E1712) sous le nom commercial Bactocell®, a été utilisé. Il a été sélectionné à partir de la collection interne de la société Lallemand pour ses propriétés spécifiques [137]:

- Production massive et exclusive d'acide lactique L+.
- Stimulation d'une flore lactique positive dans le tube digestif.
- Développement possible à différents niveaux de pH, de températures et de pression osmotiques.
- Robustesse et stabilité.

Le mode d'action de cette souche est présenté dans la figure ci-dessous.

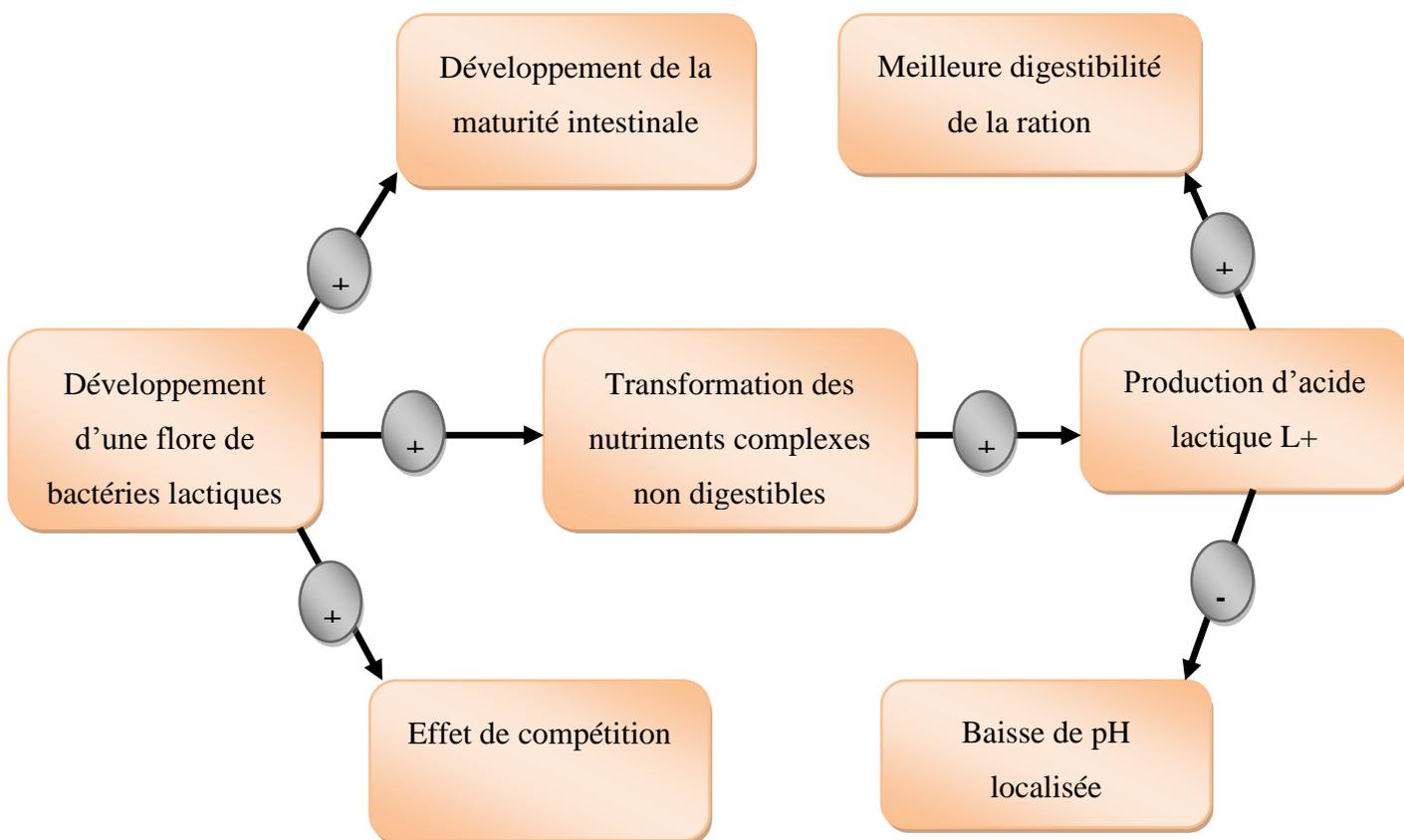


Figure 3.2 : Le mode d'action de Bactocell® [137]

### **3.3. Propriétés antibactériennes des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont connues pour leur aptitude à produire des composés antibactériens leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes [138]. Parmi ces substances : les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl et les bactériocines [69 ; 129].

#### **3.3.1. Le pH et les acides organiques**

Grâce à sa production d'acides organiques, les bactéries lactiques diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe. Outre la diminution du pH du milieu, l'effet antagoniste des acides organiques résulte de l'action de leur forme non dissociée. En effet, sous cette forme, l'acide lactique et l'acide acétique traversent passivement la membrane cytoplasmique et, pour de fortes concentrations d'acides, le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel, que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire est annulé [97 ; 139 ; 140] ; A bas pH, une grande quantité d'acide lactique est contenue dans sa forme non dissociée et est toxique pour beaucoup de bactéries, levures et champignons. Hsiao *et al.* [141] ont montré qu'une concentration en acide acétique de 0,105 g l<sup>-1</sup> inhibe la croissance de *Bacillus subtilis* à un pH de 5,3 alors qu'il faut une concentration de 27,5 g l<sup>-1</sup> pour inhiber *Lactobacillus plantarum* et une concentration de 1,6 g l<sup>-1</sup> pour inhiber *Escherichia coli* dans les mêmes conditions. *Listeria monocytogenes* est inhibé par de l'acide lactique à 9,0 g l<sup>-1</sup> et un pH de 3,7 tandis qu'il l'est à un pH de 3,4 par l'acide chlorhydrique à la même concentration [142]. De plus, les stéréo-isomères d'acide lactique diffèrent aussi dans l'activité antimicrobienne ; l'acide L(+) lactique est plus inhibiteur que l'isomère D (-) [143].

### **3.3.2. Production des bactériocines**

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens sécrétés par les bactéries et leur synthèse s'effectue par voie ribosomique et sont douées d'une activité bactéricide ou bactériostatique [138]. Leur spectre d'activité peut être plus ou moins large, quelque fois limité aux espèces proches phylogénétiquement des bactéries productrices [144]. Ces dernières sont protégées contre la où les bactériocines qu'elles produisent par la synthèse d'une protéine dite d'immunité [129]. On distingue quatre classes de bactériocines [145 ; 146]:

- **La classe I** avec des bactériocines de type Lantibiotiques qui sont de petits peptides (<5kDa), contenant des acides aminés inhabituels obtenus par modification post-traductionnelle dont la plus caractéristique est la lanthionine.
- **La classe II** est formé de petits peptides (<10kDa), thermostables, qui ne contient pas d'acides aminés modifiés et qui présentent comme unique modification post-traductionnelle possible des ponts disulfure.
- **La classe III** crée pour rassembler les bactériocines de taille supérieure à 10 kDa, elles sont thermolabiles.
- **La classe IV** peptides antimicrobiens de structure cyclique.

Par ailleurs, la production de ces composés antimicrobiens a semblé être stimulée par la présence des microbes pathogènes comme moyen de défense [147]. La souche *pediococcus acidilactici* produit une bactériocine nommée pédiocine PA-1 de la classe II pouvant réprimer la croissance de bactéries pathogènes telles : *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* [148 ; 149 ; 150, 151, 152], en créant des pores sur la membrane cytoplasmique des cellules cibles [153].

### **3.3.3. Production d'autres métabolites**

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase typique contenant un noyau hème pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents micro-organismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires [154]. Certaines bactéries lactiques peuvent néanmoins se protéger contre le peroxyde

d'hydrogène qu'elles produisent par la synthèse de catalase hexamérique ou tétramérique contenant du manganèse et qui sont parfois décrites comme étant des pseudocatalases [155].

Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) formé pendant la fermentation hétérolactique crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies, son accumulation dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité [156].

Le diacétyle synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp. et *Pediococcus* sp. a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram-négatif et les bactéries Gram-positif non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles [157].

## CHAPITRE 4

### LES INTERACTIONS BACTERIENNES

#### **4.1. Classification des interactions**

L'interaction est une action réciproque qui s'exerce entre espèces vivantes et leur biotope ou entre elles (dans ce dernier cas on parle d'interactions biotiques) [158]. Les effets des interactions bactériennes ont été caractérisés par leurs effets apparents (approche phénoménologique) et en fonction du mécanisme biologique impliqué (approche mécaniste).

##### **4.1.1. Classification phénoménologique**

Dans la classification d'Odum [159], les interactions sont répertoriées en fonction de leur effet bénéfique (stimulation de croissance) ou défavorable (inhibition de croissance, voire mort cellulaire) sur chacune des populations impliquées (tableau 4.1).

Tableau 4.1 : Classification des interactions en fonction de la matrice des effets.  
D'après Odum [159].

	Effet de A sur B		
	bénéfique	neutre	défavorable
Effet de B sur A bénéfique	mutualisme ou protocoopération <sup>a</sup>	commensalisme	prédation ou parasitisme <sup>b</sup>
Effet de B sur A neutre	commensalisme	neutralisme	amensalisme
Effet de B sur A défavorable	prédation ou parasitisme	amensalisme	compétition

(a) Le mutualisme diffère de la protocoopération par son caractère obligatoire.

(b) La prédation diffère du parasitisme par son caractère destructeur.

#### 4.1.2. Classification mécaniste

Une classification en fonction du mécanisme biologique impliqué a été proposée par Fredrickson [160]. Il a distingué des interactions directes et des interactions indirectes (Figure 4.1)

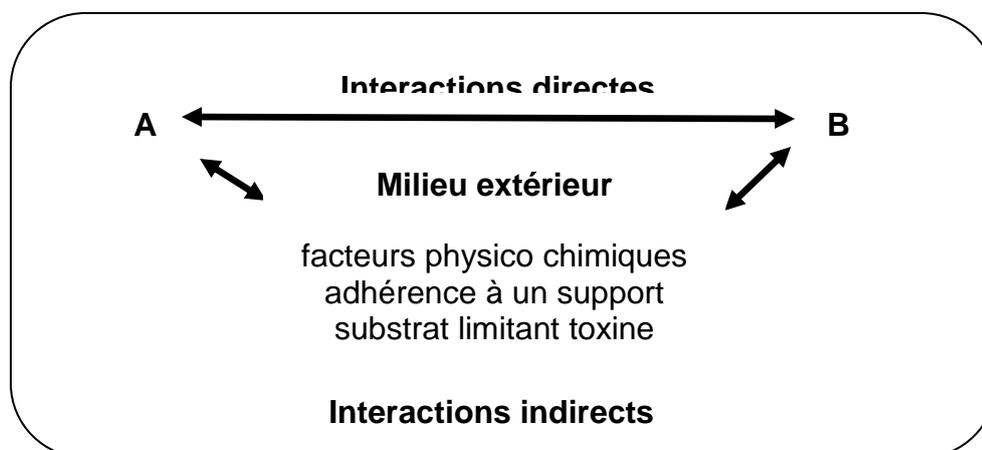


Figure 4.1. Représentation schématique de la classification de Fredrickson [160].

### **4.1.2.1. Les interactions directes**

Les interactions directes impliquent obligatoirement un contact physique entre les individus et comprennent la prédation, le parasitisme et l'inhibition par contact direct entre les cellules ou « cell-cell contact mechanism ».

#### **4.1.1.1. La prédation**

Elle correspond à une interaction bénéfique au prédateur et mauvaise pour la proie. Le prédateur exploite sa proie [161]. Dans le rumen, les protozoaires ciliés et les bactéries ont principalement une interaction de type prédateur-proie.

#### **4.1.1.2. Parasitisme**

Un parasite est un organisme qui vit sur ou dans un autre organisme (l'hôte) et de l'une ou de l'autre façon, à ses dépens. Dans presque tout les cas, un parasite tir sa nourriture de son hôte. Celui-ci peut en souffrir à des degrés variables cela peut aller d'un léger désagrément jusqu'à la mort [162]. Les bactériophages des bactéries lactiques sont un exemple connu de parasitisme. Lors de la fermentation, les phages peuvent subitement conduire à la lyse des souches dominantes, causant ainsi une altération du produit fermenté mais aussi des importantes pertes économiques pour les industriels [163].

#### **4.1.1.3. Inhibition par contact direct entre les cellules ou « cell-cell contact mechanism »**

Dans ce type d'interaction, une population de micro-organismes est inhibée par une autre et ceci par contact direct entre les cellules des deux populations lors

de leur culture mixte. L'inhibition dans ce cas ne résulte ni d'une limitation en nutriments ni de la présence de métabolites extracellulaires inhibiteurs mais plutôt d'un contact direct avec les cellules de la population inhibitrice qui doit présenter une concentration élevée de cellules viables [164].

#### **4.1.2.2. Les interactions indirectes**

Pour une interaction indirecte, l'effet de A sur B se décompose en une modification du milieu extérieur par A et l'effet de cette modification sur B. Le milieu extérieur peut être impliqué selon des mécanismes très divers: modification d'un paramètre physico-chimique, compétition pour l'adhérence à un support [165] ou production/ élimination d'une substance. Ces interactions comprennent le neutralisme, le mutualisme, le commensalisme, l'amensalisme et la compétition.

##### **4.1.2.1. Mutualisme**

On distingue deux phénomènes : le mutualisme (symbiose) et le synergisme (proto coopération) durant lesquels chaque micro-organisme est stimulé par la présence de l'autre. Dans le mutualisme, la présence de chaque micro-organisme est indispensable pour la survie de l'autre alors que dans la proto-coopération l'interaction n'est pas nécessaire à la survie des populations mais la présence des deux micro-organismes ensemble entraîne une amélioration de leur développement [164]. C'est le cas de l'association bactérienne composée par *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) et *Lactobacillus delbruekii bulgaricus* (*L. bulgaricus*) impliqués dans l'écosystème yaourt [166].

##### **4.1.2.2. Neutralisme**

Aucun changement dans la croissance des populations n'a lieu ; la présence d'une population n'affecte pas l'autre. Ceci définit en fait l'absence d'interaction. Ce type de relation n'est possible que si aucun des substrats n'est limitant ou si les espèces ont des besoins nutritionnels totalement différents [164].

#### **4.1.2.3. Commensalisme**

Une des populations profite de la présence de l'autre. Cela peut avoir lieu si une des populations produit une substance nécessaire pour la croissance de l'autre ou si elle consomme une substance inhibitrice de la croissance de l'autre [164].

#### **4.1.2.4. Compétition**

Dans le cas de la compétition, les deux populations se développent sur le même substrat et consomment toutes les deux un ou plusieurs nutriments communs nécessaires à leur croissance ce qui aura un effet négatif sur leur vitesse de croissance et celle dont la vitesse de croissance est la plus affectée sera la plus désavantagée [164].

#### **4.1.2.5. Amensalisme**

Une des populations produit une substance ayant un effet négatif sur la croissance de l'autre. Cette situation est semblable à la compétition par interférence, exceptée que dans l'amensalisme une des populations n'est pas affectée par l'interaction [164]. C'est le cas par exemple de la production d'acide lactique et l'abaissement du pH initial du lait, conséquences de la fermentation du lactose par la flore lactique, contribuant à l'inhibition de certains micro-organismes potentiellement dangereux pour le consommateur (flore pathogène) ou le produit (flore d'altération) [167]. C'est également le cas de la production de molécules inhibitrices telles les bactériocines et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **4.2. Les interactions microbiennes dans le tube digestif**

Tout au long de l'évolution, les différents microorganismes qui colonisent le biotope intestinal donné ont tissé entre elles un réseau complexe d'interactions qui leur permet de cohabiter dans le tractus gastro-intestinal [27] qui sont par conséquent les principaux responsables du maintien et de la régulation de l'écosystème hôte-flore bactérienne de son tractus gastro-intestinal. Ces interactions peuvent être des forces antagonistes ou synergiques ; Certaines bactéries forment

une barrière qui s'oppose à l'établissement dans l'intestin de bactéries d'autres espèces, ou de souches différentes de la même espèce. Néanmoins, l'établissement de souches anaérobies strictes très sensibles à l'oxygène (EOS) dans le tractus gastrointestinal d'animaux gnotoxéniques n'est possible que si d'autres souches résistantes à l'oxygène s'établissent au préalable et amènent le potentiel d'oxydo-réduction de l'intestin à un niveau compatible avec l'établissement des souches EOS [40]. L'effet des principales interactions existant dans l'écosystème digestif positif ou négatif pour les partenaires est rapporté dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2: Exemple d'interactions microbiennes au sein de l'écosystème digestif des animaux [168].

<b>Types d'interaction</b>	<b>Définition</b>
Mutualisme	Les deux partenaires en tirent profit.
Synergisme	Les deux partenaires en tirent profit.
Antagonisme	Un ou les deux partenaires (s) en souffre (nt).
Compétition	Dépendance des deux espèces pour un nutriment induisant une limitation mutuelle.
Amensalisme	Suppression d'une espèce par un agent toxique produit par une autre espèce.
Prédation	Ingestion d'une espèce par une autre espèce.
Parasitisme	Dérivation de nutriments des cellules d'une espèce a profit d'une espèce.

### **4.3. Les moyens d'études des interactions**

#### **4.3.1. En milieu gélosé**

L'utilisation des milieux solides permet de faciliter la distinction entre les populations mises en jeu. D'un point de vue pratique, cette méthode consiste à appliquer une population sur la boîte, en tapis à la surface, ou, bien directement dans

la gélose, puis d'appliquer l'autre composante sur la boîte (figure 4.2). Cette méthode est basée sur le même principe que les antibiogrammes. Les interactions peuvent être estimées par l'évaluation de la zone d'inhibition qui entoure chaque application de la seconde population. Cependant, cette analyse ne peut être envisagée que pour une description du phénomène. Il est quasiment impossible de pouvoir déterminer la nature exacte de l'interaction. Cela élude également tout critère cinétique. Finalement, dans la plupart des cas les résultats ainsi obtenus sont difficilement reproductibles [169].

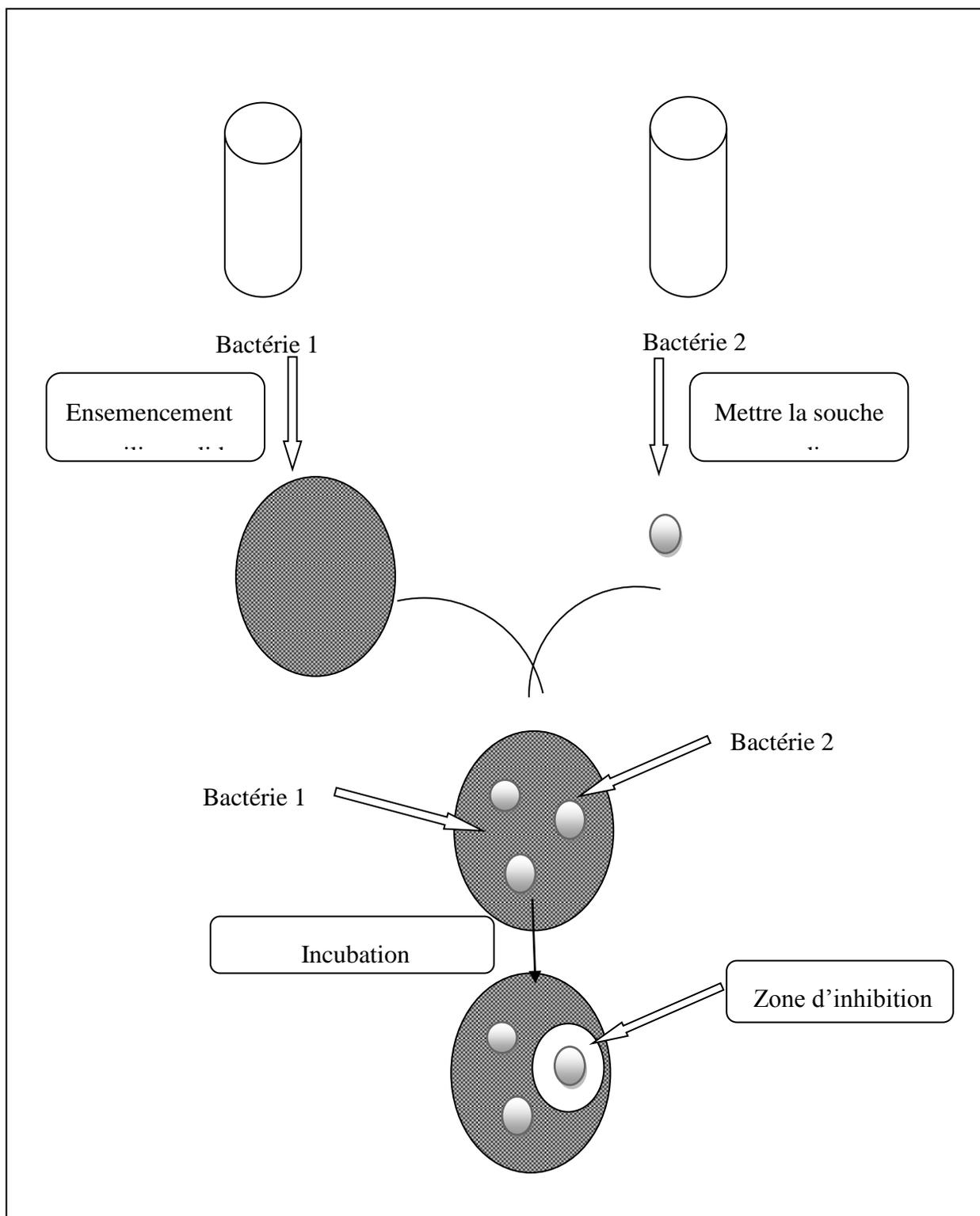


Figure 4.2 : Méthode d'étude des interactions bactériennes

## **4.3.2. En milieu liquide**

### **4.3.1.1. Les croissances séquentielles**

Les croissances séquentielles ont pour avantage de ne faire intervenir qu'une composante en même temps. Il s'agit d'étudier l'impact de la croissance préalable d'une composante sur celle de la seconde introduite après la première [164].

### **4.3.1.1. Culture mixte ou co-culture**

Au laboratoire de Génie chimique, les fermentations mixtes ou co-cultures, sont réalisées dans un bioréacteur à membrane qui repose sur le principe suivant: deux micro-organismes différents sont confinés dans deux compartiments séparés par une membrane à fibres creuses mais évoluent dans le même milieu de culture grâce à une circulation alternative de ce milieu d'un compartiment à l'autre. De cette manière, les souches se développent isolées l'une de l'autre, mais toutes les interactions indirectes ayant lieu par l'intermédiaire de métabolites extracellulaires, se produisent comme si les souches étaient quasiment dans le même réservoir. Ainsi un prélèvement distinct de chaque souche devient possible et l'analyse de chaque population participant à l'interaction sera identique à celle d'une culture pure qui est relativement simple [164].

## CHAPITRE 5

### L'EXTRAIT NATUREL DE *Yucca schidigera*

Habituellement, une large gamme de produits d'origine végétale est utilisée dans l'alimentation des volailles. Il s'agit principalement de plantes ou d'extraits de plantes, d'épices et d'huiles essentielles dont les principes actifs sont bénéfiques, agissant d'une manière générale au niveau de tube digestif. Parmi eux les extraits de *Yucca schidigera*.

#### **5.1. Présentation de la plante**

*Yucca schidigera* Roezl (appelée encore *Yucca Mohave* ou *Yucca Mojave*) est une plante arborescente, monocotylédone, appartenant au genre *Yucca* qui compte une quarantaine d'espèces, de la famille des Agaves (*Agavaceae*) [170].

C'est une plante à fleurs, qui mesure environ 5 m de hauteur (quelques spécimens exceptionnels ont atteint 9 m), persistante, munie d'un petit tronc vigoureux et presque lisse et dont les feuilles jaune-vert à bleu-vert, longues de 30 à 150 cm, larges à la base de 4 à 11 cm, épaisses, très rigides aux bords dentelés, et disposées en spirale en haut du tronc donnent à l'arbuste l'aspect d'une dense couronne de baïonnettes (figure 5.1) [171].

L'écorce est de couleur gris-brun couverte de feuilles brunes mortes près du sommet, et devient irrégulièrement rugueuse, écailleuse et striée plus on s'approche du sol. Les fleurs sont blanches, parfois teintées de pourpre à l'extrémité, en forme de cloche de 5 cm environ et regroupées en cluster bulbeux de 60 à 120 cm de haut au sommet de la tige. Les fruits verts puis rouge-brun

foncé à maturité en fin d'été, de forme allongée ont une chair comestible succulente [171].



Figure 5.1: *Yucca schidigera* : plante et fleur [172].

De la plante, c'est l'écorce qui représente la partie utilisée et riche en principes actifs. Une fois les feuilles enlevées, les troncs sont transportés à l'usine où ils sont débités en grumes (morceaux d'écorce fraîche et/ou copeaux de bois encore revêtus de l'écorce). Ces grumes peu ligneuses et ayant la consistance d'un matelas fibreux saturé de sève mousseuse sont déchiquetées et macérées. Le yucca issu de la macération peut subir deux procédés différents [173 ; 171]:

- pressé mécaniquement, pour en extraire un jus mousseux ensuite concentré par évaporation thermique pour obtenir des *extraits de yucca*, qui parfois subiront un séchage supplémentaire sur support inerte et deviendront des *extraits secs*.
- ou directement séché et broyé finement pour obtenir une *poudre de yucca*.

Ces deux produits ne sont pas équivalents. Une partie des substances actives du yucca (une part importante des polyphénols) semble manquer à l'extrait, contrairement à la poudre qui contiendrait, elle, 100% des substances phytochimiques de la plante. Les propriétés de la poudre sont donc plus complètes que celles de l'extrait [174].

Ces produits sont tous deux disponibles sur le marché. Ils ont obtenu de la Food and Drug Administration Américaine (FDA) le label *GRAS* qui signifie *Generally Recognized As Safe*, qui les autorise à être utilisés chez l'Homme dans des boissons gazeuses ("root beer" par exemple) ainsi que dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires et de l'alimentation des animaux [170].

## **5.2. Les substances bioactives de yucca**

Les composants d'activité biologique de yucca sont : les saponines et les composés phénoliques.

### **5.2.1. Les saponines**

Les saponines sont des glycosides à poids moléculaire élevé, regroupant un ensemble complexe et chimiquement très diversifié de molécules triterpéniques ou stéroïdes. Elles se composent d'une fraction aglycone hydrophobe (un noyau stéroïdique ou triterpénique) liée à une chaîne mono ou polysaccharidique hydrophile [175]. Les combinaisons possibles entre la structure de l'aglycone, les groupes fonctionnels qui lui sont liés ainsi que le nombre, la nature et la zone d'attachement des chaînes latérales, entraînent la constitution d'un groupe de composés très divers. Cette complexité structurale des saponines résulte en un certain nombre de propriétés physiques, chimiques et biologiques diversifiées [176].

Les saponines stéroïdiennes se trouvent principalement dans les monocotylédones, c'est le cas de *Yucca schidigera*. Les saponines triterpéniques sont majoritairement présentes dans les dicotylédones (légumineuses, thé...) [174]. Dans une étude réalisée sur de la poudre de *Yucca schidigera*, Oleszek et *al.* [177] isolent et identifient 8 saponines stéroïdiennes dont 5 de structure connue spirostanol [sarsapogénine (66%), gloriogénine (24%), markogénine (3.5%)] et 3 nouvelles de structure furostanol inédite, bidesmosidiques, représentant seulement 6.8 % des saponines totales isolées.

### **5.2.2. Les composées phénoliques**

D'autres constituants physiologiquement actifs de la plante *Yucca schidigera* ont été identifiés : les polyphénols. qui sont présents exclusivement dans l'écorce de *Yucca* pas à l'intérieur [177].

En 2001, Oleszek et *al.* [179]. isolent et identifient cinq d'entre eux. Il s'agit de:

- 2 stilbènes : - le trans-3, 4', 5-trihydroxystilbène, appelé Resvératrol - le trans-3, 3', 5, 5'-tétrahydroxybutyl-4'*methoxy*stilbène, (appelé dérivé *méthoxy* du Resvératrol)
- 3 nouveaux composés : les yuccaols A, B et C. molécules complexes dont les *spiro*-structures sont inhabituelles car rarement retrouvées dans le règne végétal.

La famille est complétée par la yuccaone A [180], puis les yuccaols D et E et le larixinol [170].

### **5.3. Etude pharmacologique**

#### **5.3.1. Les saponines**

Les saponines de *Yucca schidigera* sont responsables de multiples propriétés biologiques et pharmacologiques. Elles sont surtout utilisées comme additif alimentaire dans les productions animales.

##### **5.3.1.1. Effet sur la croissance des animaux**

Les saponines de *Yucca schidigera* ont montré une amélioration de la croissance et de l'efficacité alimentaire chez les volailles [181 ; 182]. Néanmoins, des résultats contradictoires ont été rapportés par d'autres chercheurs [183].

##### **5.3.1.2. Activité antiparasitaire**

Les saponines présentent une activité anti-protozoaire [175 ; 184 ; 185 ; 176]. Une application a été envisagée dans la lutte contre la giardiose, causée par un protozoaire pathogène intestinal commun des humains et des animaux : *Giardia lamblia*, également connu sous le nom de *Giardia duodenalis*. *G. lamblia* [186 ; 178]. En 2001, Mac Allister et *al.* indiquent que la poudre de *Yucca* a réduit *in vitro* la présence des trophozoïtes (inhibition de l'adhérence), au même titre que le métronidazole. Ainsi, une activité anticoccidien a été démontrée *in vivo* chez des calves recevant 15g de la poudre de *Yucca* par jour [187].

##### **5.3.1.3. Activité antibactérienne**

Les saponines peuvent avoir une activité antimicrobienne [188]. Dans le rumen les saponines de *Yucca* peut se lier à NH<sub>4</sub> I orsque les taux sont élevés et le libérer lorsque son taux est faible, régulant ainsi l'approvisionnement nutritif pour la synthèse des protéines des populations microbiennes spécifiques: bénéfique pour les bactéries amylolytiques (ruminants nourris à base de grains de haute valeur alimentaire), négatif sur les populations cellulolytiques et les champignons intraruminaux. Cela pourrait être utilisé pour orienter les populations

microbiennes intraruminales désirées [189]. L'activité anti-levure décrite pourrait contribuer à une meilleure conservation des produits alimentaires [190].

#### **5.3.1.4. Autres effets**

L'introduction dans l'alimentation d'espèces non ruminantes (porc, volaille, lapin) des produits à base de yucca à hauteur de 100-150 ppm (parties par million) réduit nettement la concentration d'ammoniac dans le lieu de vie des animaux et dans leurs excréments. Cette action biologique pourrait aussi être liée à une fraction de composés non extractibles au butanol, alors que les saponines le sont [191]. De plus, les saponines ont la capacité de moduler la fermentation ruminale ; ils sont capables de diminuer le méthane produit lors de la fermentation grâce à l'inhibition des protozoaires ciliés qui sont en symbiose avec les archaebactéries méthanogènes [192].

#### **5.3.2. Les poly-phénols**

Les composés phénoliques présents dans *Yucca schidigera* sont à l'origine d'une large gamme d'activités biologiques dont les plus étudiés sont l'activité antioxydant et anti-inflammatoire.

##### **5.3.2.1. Effet antioxydant**

*Yucca schidigera* montre des propriétés anti-oxydantes notables [193]. Cependant, l'activité est attribuée plus précisément aux composants phénoliques. Après identification précise des molécules phénoliques présentes dans *Yucca*, Piacente et *al.* [170] analysent la fraction phénolique, afin d'évaluer son activité antioxydante en mesurant sa capacité de capture des radicaux libres, qui sont des éléments d'oxydation nocifs pour la cellule, selon deux protocoles différents. Dans les deux cas l'activité très significative des composés phénoliques de *Yucca schidigera* est démontrée, par comparaison avec le Trolox (antioxydant de synthèse) et la Vitamine E.

### **5.3.2.2. Effet anti-inflammatoire**

Les propriétés anti-inflammatoires de *Yucca schidigera* ont été démontrées dans plusieurs études, particulièrement *in vitro*. Une étude a été réalisée en 2008 à partir d'une fraction riche en composés phénoliques issus de *Yucca schidigera* sur les enzymes clefs du métabolisme de l'arachidonate. Elle a démontré que les composés phénoliques purs ainsi que la fraction de produit testé sont capables d'inhiber non sélectivement les cyclo-oxygénases COX-1 et COX 2 [194].

Marzocco et *al.* [195] testent *in vitro* la capacité des yuccaols A, B et C issus de l'écorce de *Yucca schidigera* à réduire la production de NO et/ou à inhiber l'expression de la protéine iNOS, pour des doses de 0.01 à 100 microM. Finalement, ils ont conclu que : le yuccaol A n'a inhibé significativement que la libération de NO, et ce à la plus haute dose utilisée (100 microM) ; Le yuccaol B n'a montré aucune action sur ces paramètres ; Le yuccaol C réduirait l'expression de la protéine iNOS via le facteur de transcription NF-kB. Les propriétés anti-inflammatoires de *Yucca schidigera* peuvent être liées à la présence du resvératrol mais aussi du yuccaol C.

## CHAPITRE 6

### ETUDE DE L'EFFET DU PROBIOTIQUE *Pediococcus acidilactici* SUR LA FLORE DIGESTIVE DES POULETS DE CHAIR

Le présent travail est une continuité de l'étude réalisée dans le cadre d'un mémoire de magister [10] portant sur l'utilisation des probiotiques (*P. acidilactici*) comme alternative aux antibiotiques dans nos conditions d'élevage. Les résultats obtenus lors de cette étude ont montré que la supplémentation de l'aliment en probiotiques a amélioré significativement le gain de poids se traduisant par un indice de consommation meilleur ainsi qu'un taux de mortalité nettement amélioré après la troisième semaine. Pour ce qui est de son impact sur la flore digestive, les analyses microbiologiques ont révélé l'absence totale de salmonelles et de staphylocoques et une réduction des coliformes à partir du 23<sup>ème</sup> jour.

Pour trouver des explications à cette hypothèse, nous avons lancé la présente étude qui se propose d'étudier l'effet du probiotique *Pediococcus acidilactici* sur la flore digestive du poulet de chair par:

1. L'évaluation des performances zootechniques (traités dans le cadre d'un PFE en sciences vétérinaires par Khoubai et Merrouki, 2010 [196]) et le suivi de l'évolution de la flore digestive désirable (flore lactique) et indésirable (Entérobactéries) des poulets de chair.

2. L'étude des interactions entre le probiotique (*P. acidilactici*) et certaines souches de bactéries opportunistes isolées à partir du tube digestif du poulet.

### **Période et lieu de l'étude**

Notre expérimentation s'est déroulée durant la période de juin 2010 à Novembre 2011 dans le laboratoire de post graduation de biologie (Pr GUETARNI) de l'université Saad DAHLEB de Blida.

### **6.1. Matériel et méthodes**

#### **6.1.1. Matériel**

##### **6.1.1.1. Matériel biologique**

**Pour l'étude *in vivo***, mille sept cent soixante trois (1763) poussins d'un jour d'espèce *Gallus gallus domesticus*, appartenant à la souche de type chair Hubbard F15 d'un poids homogène (48,3g), ont été mis en place, fin janvier 2010 pour une durée de 58 jours, dans un bâtiment de type traditionnel sis à Boufarik (W de Blida), cloisonné de façon à offrir deux aires de vie de 180 m<sup>2</sup> chacune.

L'aliment utilisé, de type farineux (sa composition est donnée en appendice B), a été produit spécialement pour notre expérimentation sur la base d'une formulation tenant compte des trois phases d'élevage (démarrage, croissance et finition), il a été supplémenté de lyophilisat de *Pediococcus acidilactici* MA 18/5M (Bactocell, France) à raison de 100 ppm et ne comportait pas d'antibiotiques ni d'anticoccidiens. L'eau de boisson distribuée aux animaux provenait d'un puits régulièrement traité.

Les sujets des deux lots ont été vaccinés contre la maladie de Newcastle UNI L CEVA® à J<sub>6</sub> et rappel avec NEW L CEVA® à J<sub>19</sub> et aussi contre la maladie de Gumboro IBD L CEVA® à J<sub>15</sub>.

**Pour l'étude *in vitro***, nous avons utilisé :

- La souche de probiotique *Pediococcus acidilactici* MA18/5M sous la forme de poudre hydrodispersible, commercialisée sous la désignation (Bactocell®) produite par la Société Lallemand.
- Les souches *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* et *Streptococcus sp.*, isolées à partir du tube digestif de poulet, fournies par le laboratoire régional vétérinaire (Draa Ben Khedda).

#### **6.1.1.2. Milieux de culture et réactifs**

Tous les milieux utilisés dans le présent travail ont été produits et fournis gracieusement par le laboratoire de production de milieux de culture IDEAL LABO (Blida). Ils sont rapportés dans le tableau 6.1 et leur composition est donnée en appendice C.

Tableau 6.1 : Les différents milieux de cultures utilisés pendant l'expérimentation

Milieu de culture	Utilisation
Gélose MRS	Dénombrement de la flore lactique Culture de <i>Pediococcus acidilactici</i>
Bouillon MRS	Culture de <i>Pediococcus acidilactici</i>
Gélose VRBG	Dénombrement des Entérobactéries
Gélose Mac-Conkey	Culture et dénombrement d' <i>Escherichia</i>
Gélose Chapman	Culture et dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i>
Gélose Hektoen	Culture de <i>Salmonella sp.</i>
Gélose au sang	Culture de <i>Streptococcus sp.</i>
Bouillon nutritif	Le pré-enrichissement
Gélose Muller-Hinton	Test d'inhibition
Bouillon Muller-Hinton	Test d'inhibition

Les réactifs utilisés sont :

- Violet de gentiane, lugol et fuchsine pour la coloration de Gram.
- Solution d'eau oxygénée pour le test de la catalase.
- Papier Watman imbibé de réactif oxydase pour le test d'oxydase.

### **6.1.1.3. Les équipements de laboratoire**

Les différents équipements utilisés durant l'expérimentation sont rapportés dans le tableau 6.2.

Tableau 6.2 : Les équipements de laboratoire utilisés durant l'expérimentation

<b>Verrerie</b>	<b>Appareillages</b>	<b>Autres matériel</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubes à essai secs stériles</li> <li>• Pipettes Pasteur</li> <li>• Pipettes graduées stériles (1ml, 5ml et 10ml)</li> <li>• Flacons stériles</li> <li>• Béchers stériles</li> <li>• Heerlen Meyer</li> <li>• Lames</li> <li>• Lamelles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Balance</li> <li>• Autoclave</li> <li>• Broyeur Stomatcher</li> <li>• Etuve à 37 °C</li> <li>• Vortex</li> <li>• Microscope optique</li> <li>• Agitateur</li> <li>• Centrifugeuse</li> <li>• Plaque chauffante</li> <li>• Micropipette (1000µl et 50 µl)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bain marie</li> <li>• Portoirs</li> <li>• Bec bunsen</li> <li>• Boîtes de Pétri</li> <li>• Sachets de type « Stomatcher400 »</li> <li>• Lames de bistouri</li> <li>• Jarre</li> <li>• Eppendorf</li> </ul>

## **6.1.2. Méthodes**

### **6.1.2.1. Caractérisation de la souche du probiotique *Pediococcus acidilactici* (MA 18/5M) de commerce et souches pathogènes isolées dans le tube digestif du poulet de chair**

#### **➤ *Pediococcus acidilactici* (MA 18/5M)**

Un aliquote de la poudre du probiotique *P. acidilactici* MA18/5M a été revivifié par repiquage en tube de 7ml de bouillon MRS et incubation à 37 °C pendant 48h. La suspension a été utilisée pour ensemercer par étalement des boîtes de Pétri contenant en préalable le milieu gélosé MRS, lesquelles ont été incubées en anaérobiose à 37 °C pendant 48h.

La caractérisation moléculaire de la souche *P. acidilactici* (MA18/5M) revivifiée a été faite dans le laboratoire des microorganismes et biomolécules (Sfax, Tunisie).

#### **➤ Souches pathogènes**

Les souches pathogènes ont été revivifiées par repiquage dans un bouillon de culture ordinaire et incubation à 37 °C pendant 24h. Après vérification de la pureté des isolats sur leur milieu spécifique; (Mac-conkey pour *Escherichia coli*, Hektoen pour *Salmonella sp.*, Chapman pour *Staphylococcus aureus* et gélose au sang pour

*Streptococcus sp.*), l'identification a été réalisée par un examen morphologique et une étude biochimique.

### **6.1.2.2. Evaluation des performances zootechniques et suivi de l'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif des poulets de chair**

#### **6.1.2.2.1. Paramètres zootechniques et impact lésionnel**

Le poids vif, l'indice de consommation et le taux de mortalité du présent essai, traités dans le cadre d'un PFE en sciences vétérinaires [196], ont été déterminés à la fin de chaque phase d'élevage (J<sub>10</sub>, J<sub>42</sub> et J<sub>58</sub>). Les cas de mortalité des trois premiers jours n'ont pas été pris en considération à cause du stress dû au transport.

Une autopsie a été systématiquement effectuée sur les cas de mortalité.

#### **6.1.2.2.2. Suivi de l'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries**

##### **6.1.2.2.2.1. Procédure d'échantillonnage**

Afin de suivre l'évolution de la flore digestive désirable des poulets de chair (flore lactique) et indésirable (Entérobactéries), nous avons arrêté le protocole d'échantillonnage, rapporté dans la figure 6.1.

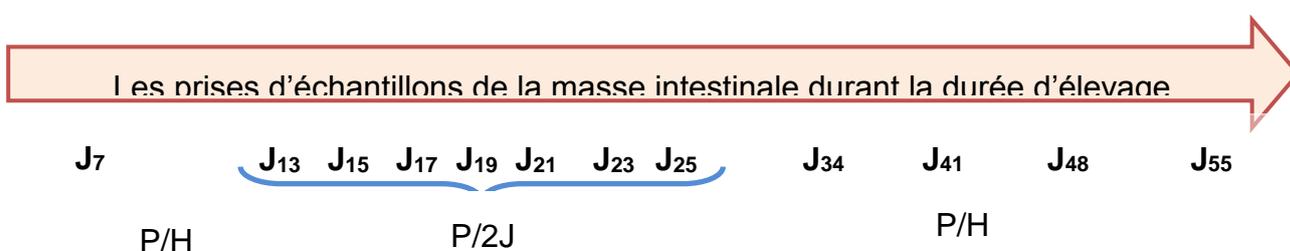


Figure 6.1 : Plan d'échantillonnage des prélèvements (P/H : prélèvement hebdomadaire, P/2J: prélèvement chaque deux jour).

Nous avons adopté le prélèvement :

- hebdomadaire, durant la période de J<sub>7</sub> à la fin d'élevage, pour suivre l'évolution des flores (flore lactique et les Entérobactéries).
- tous les deux jours, durant la période J<sub>13</sub> - J<sub>25</sub> en vue de mettre en évidence le jour d'installation d'une flore lactique importante.

#### **6.1.2.2.2. Prélèvements de masse intestinale**

Pour avoir un prélèvement supérieur à 25g, nous avons mélangé aseptiquement les masses intestinales de :

- 3 poussins sacrifiés durant la période J<sub>7</sub> – J<sub>13</sub>.
- 2 poussins sacrifiés durant la période J<sub>15</sub> – J<sub>55</sub>.

Après sacrifice de l'animal par luxation de l'articulation atloïdo-occipital et en vue d'assurer une asepsie superficielle de la région à inciser, nous avons humecté le plumage et la peau avec une solution aqueuse contenant de l'eau de javel. Puis, on pratique une incision cutanée médiane au sommet du bréchet sur la paroi abdominale, sans la perforer. Cette incision médiane est complétée par des incisions (du côté droit et gauche) de la peau des plis de l'aîne. Le revêtement cutané est alors séparé avec étirement en avant (figure 6.2).

La mise à nu des organes thoraco- abdominaux s'est effectuée par pratique d'une boutonnière à l'aide des ciseaux, à la pointe du bréchet, incision de part et d'autre du bréchet puis section des muscles pectoraux et des côtes au niveau du cartilage de jonction, des os coracoïdes et claviculaires.



Figure 6.2: Ouverture de la carcasse

L'œsophage, sectionné en arrière du pharynx est disséqué postérieurement jusqu'au pro-ventricule. La masse digestive est progressivement réclinée vers l'arrière, après quoi on sectionne le tube digestif entre le jabot et le pro-ventricule et au niveau du cloaque. Toute cette masse intestinale est mise dans un sac stérile de congélation.

#### **6.1.2.2.3. Préparation des échantillons**

Vingt cinq (25) grammes de masse intestinale ont été introduit aseptiquement dans un sachet stérile de type « Stomacher 400 » contenant au préalable 225 ml de diluant soit le TSE (Tryptone Sel Eau). Le tout est homogénéisé à l'aide d'un appareil Stomacher® pendant 8 min. Après homogénéisation, on obtient à la fin une solution mère à partir de laquelle est réalisée une série de dilutions décimales ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , ...  $10^{-8}$ ) dans des tubes contenant 9 ml de TSE. Ces dilutions serviront à la recherche de la flore lactique et les Entérobactéries.

#### **6.1.2.2.4. Recherche et dénombrement des Entérobactéries**

Un (01) ml de chaque dilution est déposé aseptiquement dans une boîte de Pétri stérile, puis environ 15 ml de milieu de culture gélosé VRBG en surfusion (40 à 45 °C) sont additionnés. Homogénéiser les boîtes ainsiensemencées par de lents mouvements de rotation horizontale. Après solidification de la gélose les boîtes sont incubées à l'étuve à une température de 37 °C pendant 24 h.

Après la période d'incubation, les colonies qui apparaissent dans les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies par boîte sont comptées par observation à l'œil nu ou sous la loupe. Le dénombrement est réalisé selon la formule suivante :

$$N = \frac{\Sigma c}{1,1 \times d} \times V \quad (1)$$

Où : **N** : concentration en cellules viables (UFC/ml), **Σ c** : somme des colonies comptées sur les deux boîtes successives ; **d** : taux de dilution correspondant à la première dilution ; **V** : volume de la suspensionensemencée.

#### **6.1.2.2.5. Recherche et dénombrement de la flore lactique**

Une quantité de 0,1 ml de chaque dilution est aseptiquement déposé à la surface d'une boîte de Pétri contenant une gélose MRS puis soigneusement étalé. Après 48 heures d'incubation à 37°C en anaérobiose, les boîtes contenant un nombre de colonies caractéristiques compris entre 30 et 300, sont retenues pour le

dénombrement des bactéries lactiques. Le dénombrement est réalisé selon la formule (1) présenté précédemment.

La figure ci-après résume les principales étapes suivis pour la recherche et le dénombrement de la flore lactique et des Entérobactéries dans la masse intestinale des poulets de chair.

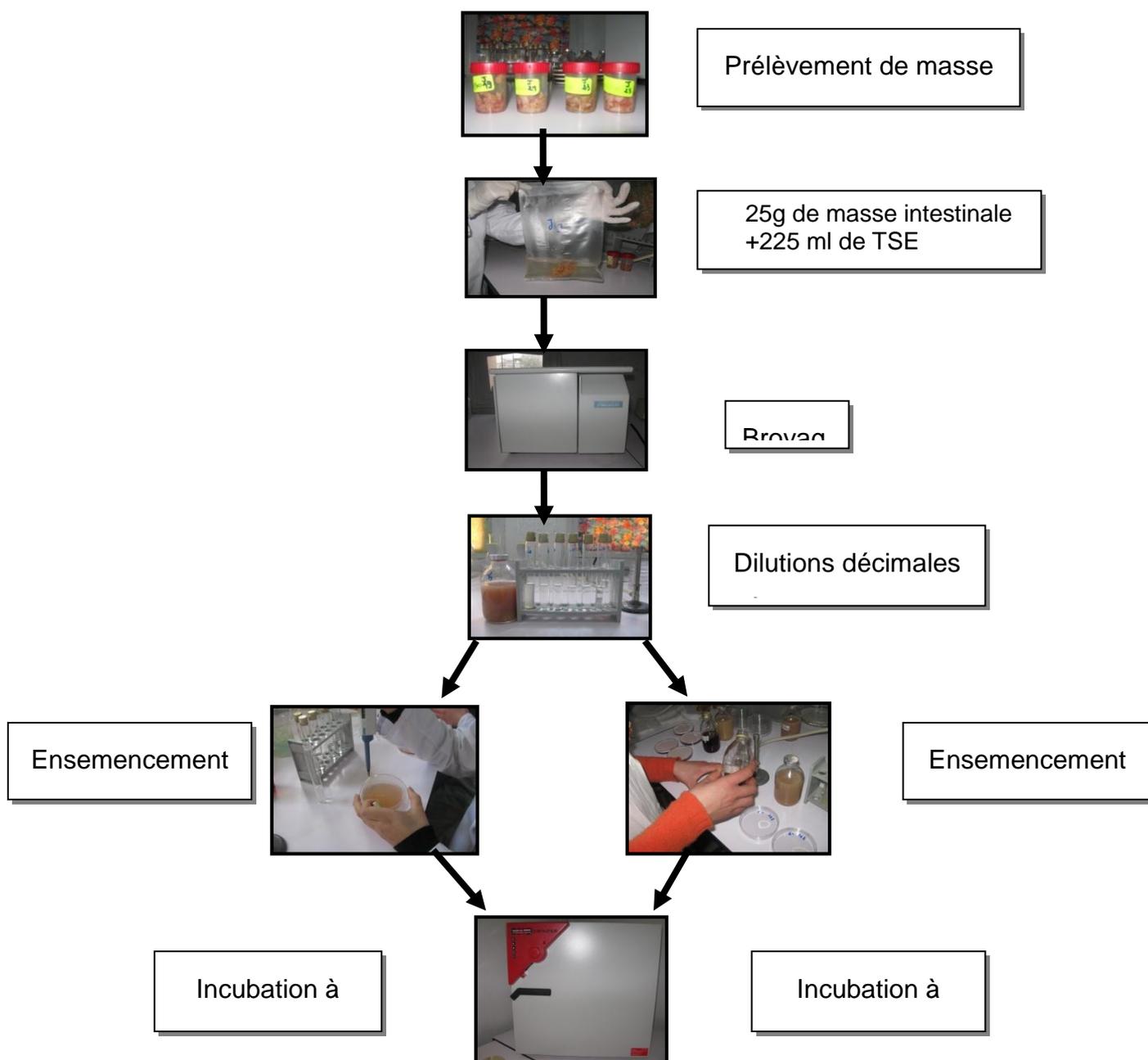


Figure 6.3: Protocole expérimental suivi pour la recherche et le dénombrement et de la flore lactique et des Entérobactéries.

### **6.1.2.3. Etude des interactions entre *P. acidilactici* et certaines souches pathogènes**

#### **6.1.2.3.1. Préparation des *inocula***

##### ➤ ***P. acidilactici***

La souche *P. acidilactici* est repiquée sur gélose MRS et incubée à 37 °C pendant 24 h. Deux à trois colonies sont prélevées etensemencées dans 10ml de bouillon MRS puis incubé à 37 °C pendant 18h (culture en phase exponentielle de croissance).

##### ➤ **Les souches pathogènes**

Les souches pathogènes sont repiquées sur les milieux sélectifs (Mac-conkey pour *E. coli*, Hektoen pour *Salmonella sp.*, Chapman pour *S. aureus* et gélose au sang pour *Streptococcus sp.*) et incubées à 37 °C pendant 24 h. Deux à trois colonies sont prélevées à partir de chacun milieu etensemencées dans le bouillon Mueller Hinton et incubées à 37 °C pendant 18 à 24h.

#### **6.1.2.3.2. En milieu solide**

Nous avons utilisé la méthode de Salvadogo et *al.* [197] ou méthode des disques.

##### ➤ **Ensemencement (méthode d'écouvillonnage)**

L'ensemencement a été fait selon les étapes suivantes :

- Tremper l'écouvillon dans la suspension et l'essorer sur les bords.

- Ensemencer la boîte en frottant délicatement l'écouvillon sur la gélose et en tournant plusieurs fois la boîte de façon à croiser les stries.

➤ **Application des disques**

Les disques d'un diamètre de 9 mm imbibés par la souche bactérienne cible (*P. acidilactici*) sont déposés à la surface de la gélose en respectant une distance minimale de 30mm entre deux disques.

Nous avons utilisé des disques imprégnés de bouillon MRS stérile comme témoin.

➤ **Incubation**

Les boîtes sont placées dans l'étuve à la température de 37 °C pendant 24h.

➤ **Lecture**

La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques. L'apparition de zones claires d'un diamètre égal ou supérieur à 2mm sont considérées comme inhibition positive [198].

#### **6.1.2.3.3. En milieu liquide**

La croissance de *P. acidilactici* (probiotique), d'*Escherichia coli* (Enterobactéries) et de *Staphylococcus aureus* (souche pathogène) a été suivie en culture pure et mixte sur milieu Mueller Hinton en tube (figures 6.4 et 6.5) selon la méthode de Haines et Harmon modifiée [199].

La cinétique de croissance (0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 48h, et 72h) a été évaluée par dénombrement des cellules viables sur milieu gélosé et le pH du milieu cultivé a été mesuré aux mêmes intervalles.

➤ **Culture pure**

Trois séries de huit tubes (8 tubes/série) contenant 9ml de bouillon Muller Hinton chacun sontensemencés à raison 1ml par tube par les inocula préalablement préparés (figure 6.4).

- 1<sup>ère</sup> série : *Pediococcus. acidilactici*.
- 2<sup>ème</sup> série : *Escherichia coli*.
- 3<sup>ème</sup> série : *Staphylococcus aureus*.

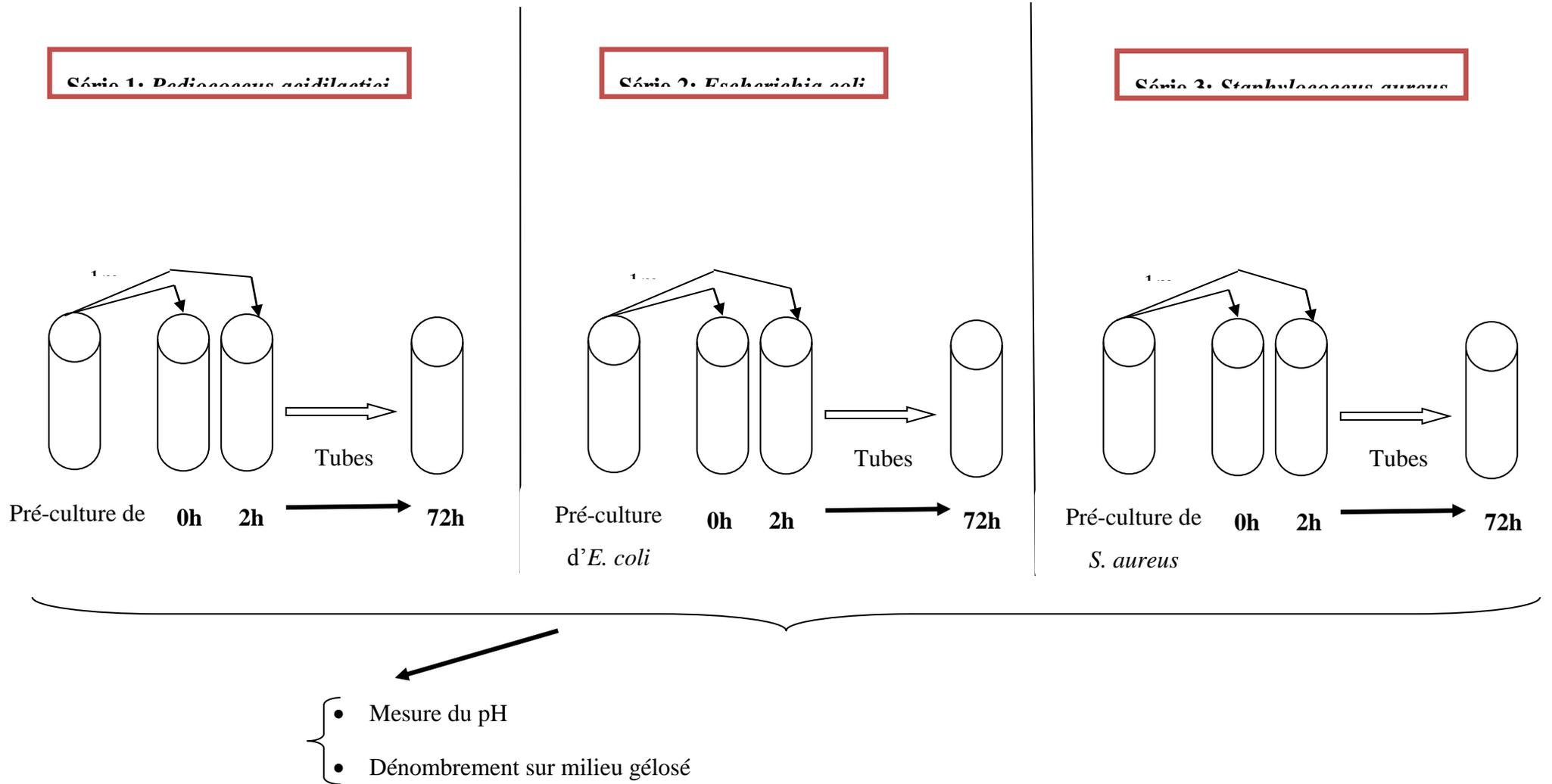


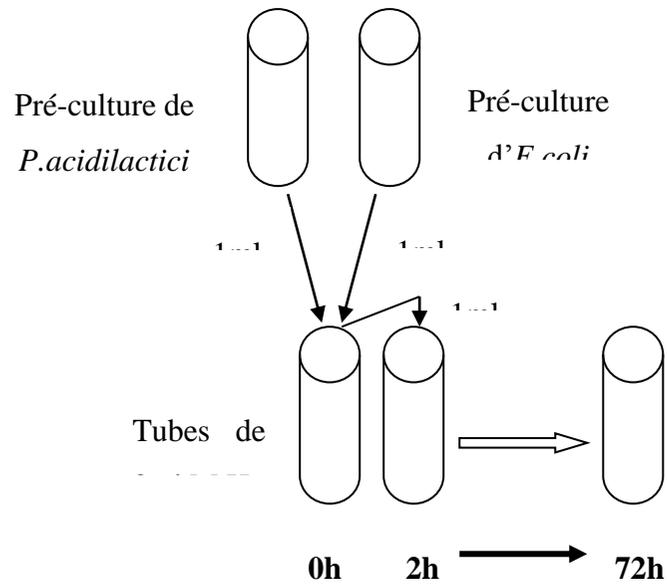
Figure 6.4: Logigramme pour la culture pure

➤ **Culture mixte**

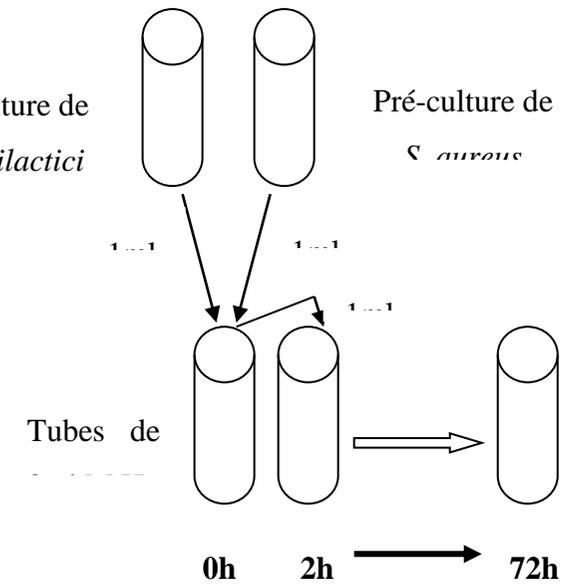
Deux séries de huit tubes (8 tubes/série) contenant 8ml de bouillon Muller Hinton chacun sont ensemencés simultanément par (figure 6.5) :

- 1ml de *Pediococcus acidilactici* et 1ml d'*Escherichia coli* par tube pour la première série ;
- 1ml de *Pediococcus acidilactici* et 1ml de *Staphylococcus aureus* par tube pour la deuxième série.

**Série 1 : *Pediococcus acidilactici* + *Escherichia coli***



**Série 2 : *Pediococcus acidilactici* + *Staphylococcus aureus***



- Mesure du pH
- Dénombrement sur milieu gélosé

Figure 6.5: Logigramme pour la culture mixte

➤ **Mesure du pH**

Le pH du milieu de culture est mesuré au moyen d'un pH mètre à temps réguliers : 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 48h et 72h.

➤ **Dénombrement**

Une série de dilutions décimales ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , ...  $10^{-8}$ ) dans des tubes contenant 9 ml de TSE est préparée pour chaque culture (pure et mixte).

Seules les trois dernières dilutions sontensemencées à raison de 0,1ml de chaque dilution sur des boîtes de Pétri contenant au préalable le milieu spécifique pour chaque souche :

- Gélose MRS pour *P. acidilactici*.
- Gélose Mac-conkey pour *Escherichia coli*.
- Gélose de Chapman pour *Staphylococcus aureus*.

Après 24h à 48h d'incubation à 37 °C, les colonies sont dénombrées (Figure 6.6). La concentration en cellules viables est donnée selon la formule (1).

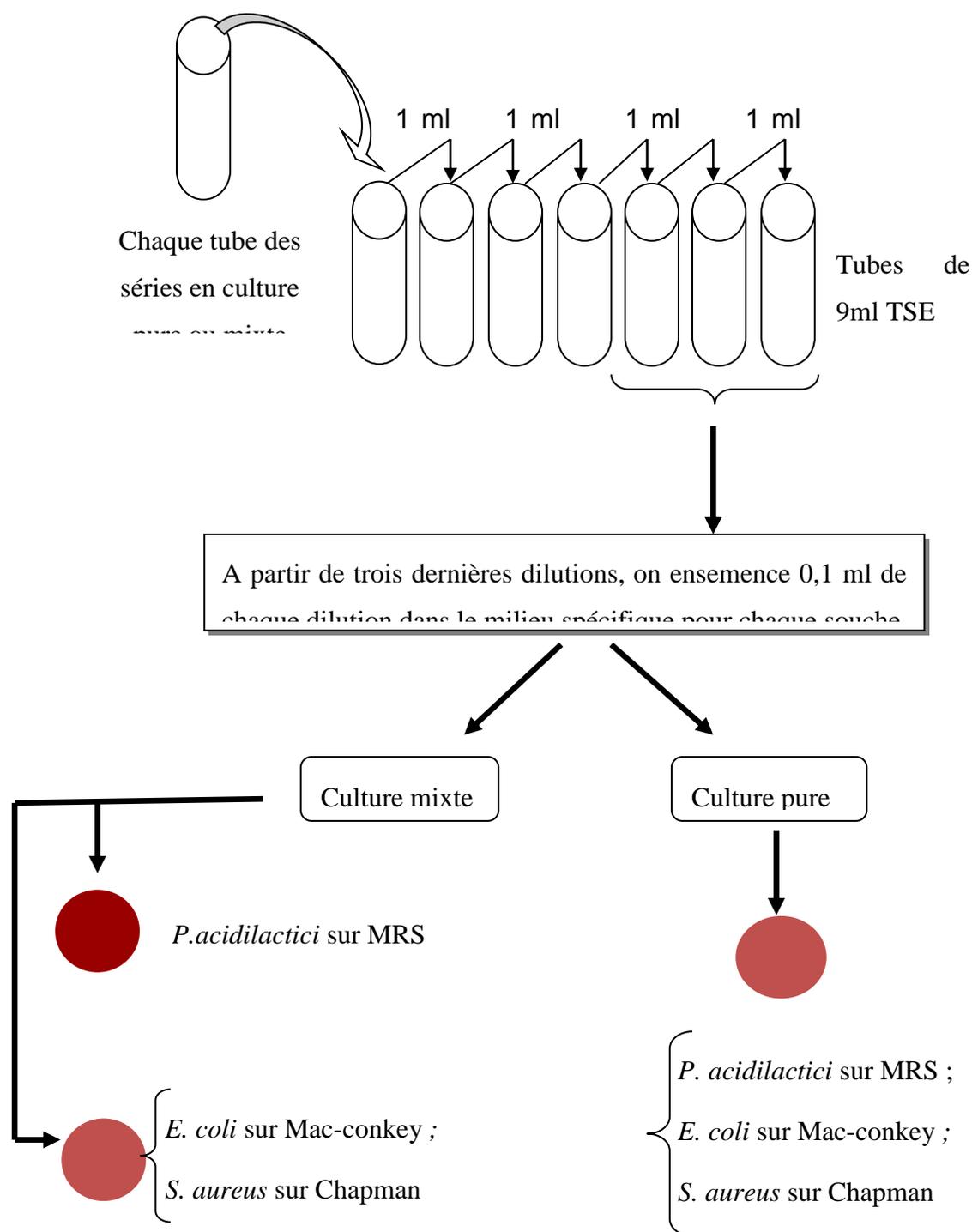


Figure 6.6: Logigramme du dénombrement des cellules viables.

#### **6.1.2.3.4. Caractérisation des substances responsable d'interactions**

Sur la base de notre synthèse bibliographique, les bactéries lactiques ont la capacité de synthétiser des métabolites antimicrobiens, particulièrement l'acide lactique (abaissement du pH) et les bactériocines. Nous avons utilisé la méthode de Skytta *et al.* [200] pour la préparation de l'extrait brut de *P. acidilactici*.

Nous avonsensemencé un bouillon MRS (50 ml) par une préculture de 24h à raison de 10% et mis à incuber pendant 48h à 37 °C. Une centrifugation de la culture obtenue est réalisée à 3000 rpm pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant obtenu est ensuite filtré stérilement au moyen d'un dispositif Millipore (diamètre du filtre : 0,45µm) (figure 6.7).

Une aliquote de 15 ml de l'extrait brut ainsi obtenu est traitée par :

- chauffage à 120 °C pendant 30 min, pour éliminer les protéines thermosensibles et permet la mise en évidence de l'effet de l'acide lactique.
- une solution de soude (NaOH, 3M) jusqu'à obtention d'un pH de 6,5, pour éliminer l'effet d'acide lactique et permet la mise en évidence de l'effet des bactériocines.
- la pepsine et l' $\alpha$ -chymotrypsine (des enzymes protéolytiques) pour la mise en évidence de l'effet des bactériocines.

L'effet inhibiteur de l'un ou de l'autre métabolite antimicrobien est testé vis-à-vis des souches indicatrices par la méthode de Salvadogo *et al.* (2004).

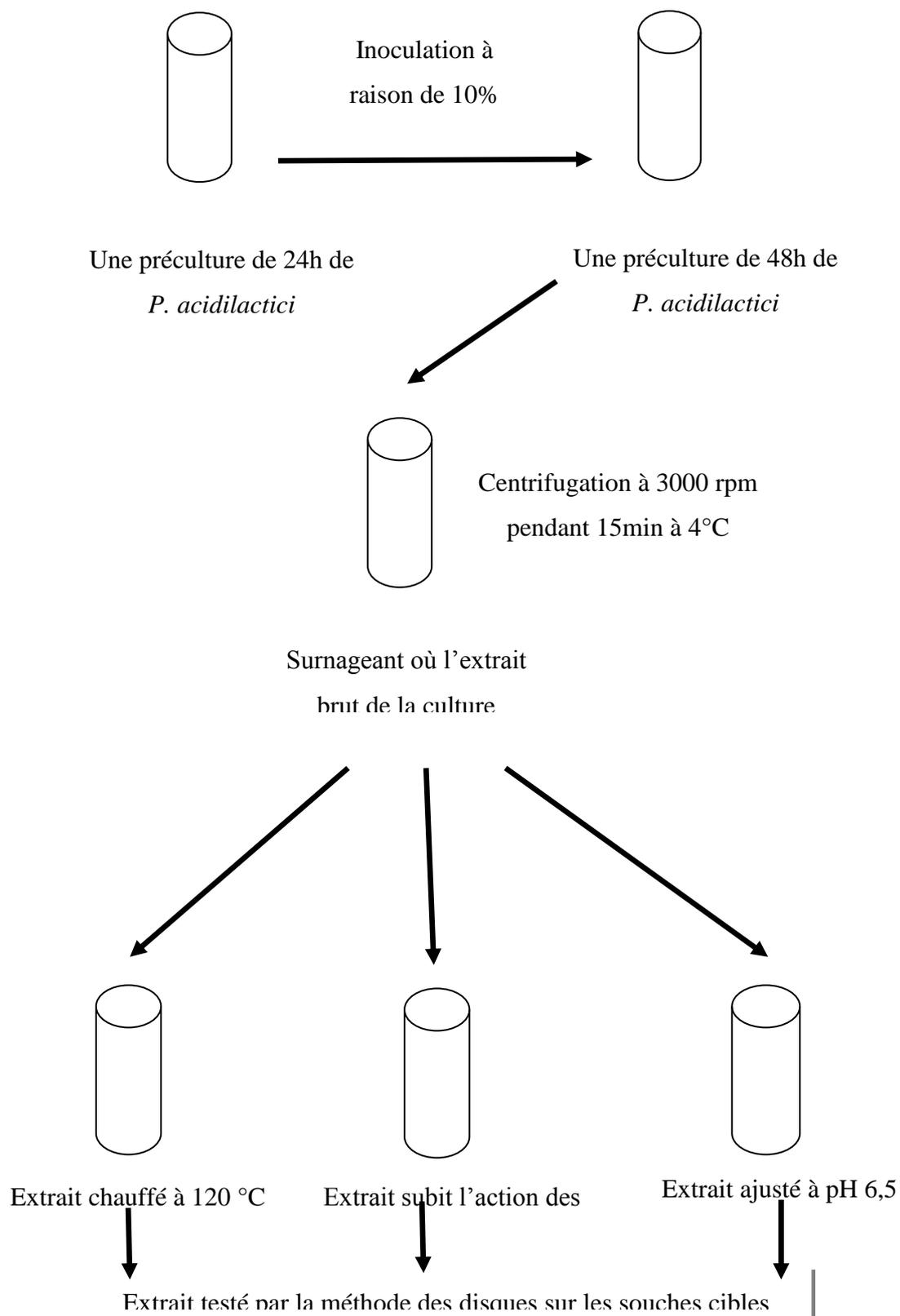


Figure 6.7: Protocole expérimental pour la détermination des substances responsables de l'interaction bactérienne

## 6.2. Résultats et discussions

### 6.2.1. Caractérisation des souches

- **Souche de *Pediococcus acidilactici* MA18/5M**

La mise en culture de la souche lactique *Pediococcus acidilactici* MA18/5M a révélé une culture pure, en l'occurrence, un seul type de colonie de forme ronde mesurant environ 1 à 1,5 mm de couleur blanchâtre, à crème (figure 6.8)

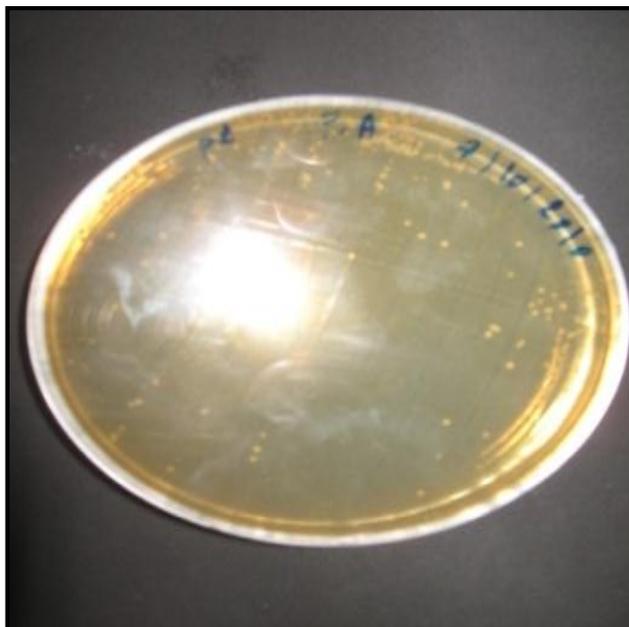


Figure 6.8: Culture de *Pediococcus acidilactici* sur milieu MRS (photo originale).

L'examen microscopique des frottis bactériens, après coloration de Gram a indiqué la présence de coques réunis en paire, tétrades et parfois en amas (figure 6.9).

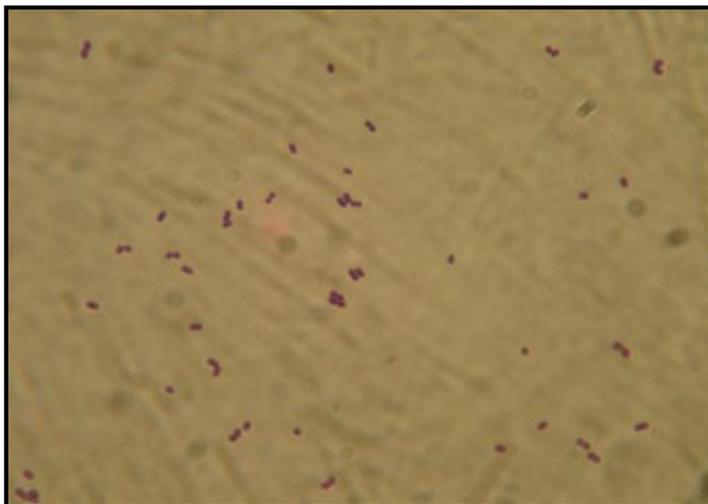


Figure 6.9: Observation microscopique de frottis bactérien (x100) (photo originale).

Nous confirmons donc que la souche *Pediococcus acidilactici* MA18/5M est pure et viable.

Le résultat de la caractérisation moléculaire basée sur le séquençage du gène d'ADN codant de l'ADNr 16S a confirmé l'appartenance de la souche *Pediococcus acidilactici* MA18/5M à l'espèce *Pediococcus acidilactici*

- **Souches pathogènes**

La mise en culture des souches pathogènes utilisées a révélé des cultures pures et viables. Leur caractérisation biochimique a confirmé leur identification.

## **6.2.2. Evaluation des performances zootechniques et du suivi de l'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif des poulets de chair**

### **6.2.2.1. Performances zootechniques**

Les résultats des performances zootechniques ont montré que la supplémentation du probiotique permettait l'obtention d'un meilleur indice de consommation et un gain de poids similaire avec un taux de mortalité plus élevé par rapport aux antibiotiques. La mortalité enregistrée (8,08%) pourrait s'expliquer par les deux épisodes pathologiques de coccidiose survenus en cours d'élevage où un traitement d'urgence à l'aide d'un anticoccidien Toltrazuril (Baycox) compatible avec la flore lactique a été administré à J<sub>30</sub> et J<sub>48</sub> d'élevage.

### **6.2.2.2. Suivi de l'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif des poulets de chair**

Les résultats de dénombrement de la flore lactique et des Entérobactéries dans les prélèvements de masse intestinale sont rapportés dans le tableau 6.3 et la figure 6.10.

Tableau 6.3: Résultats de dénombrement de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif du poulet de chair durant la période d'élevage.

Période d'élevage (jours)	Flore lactique		Entérobactéries	
	UFC/ml	Log UFC/ml	UFC/ml	Log UFC/ml
7	17,9 x 10 <sup>3</sup>	4,25	34,5 x 10 <sup>3</sup>	4,55
13	1,9 x 10 <sup>3</sup>	3,28	10 <sup>3</sup>	3
15	0,06 x 10 <sup>3</sup>	1,77	74,5 x 10 <sup>3</sup>	4,87
17	1,6 x 10 <sup>3</sup>	3,2	545	2,74
19	216,4 x 10 <sup>6</sup>	8,33	195,5 x 10 <sup>3</sup>	5,29
21	229,1 x 10 <sup>6</sup>	8,36	3,5 x 10 <sup>3</sup>	3,54
23	105 x 10 <sup>6</sup>	8,02	136 x 10 <sup>3</sup>	2,13
25	9,9 x 10 <sup>6</sup>	7,00	145	2,16
34	130,9 x 10 <sup>6</sup>	8,11	-	0
41	727,3 x 10 <sup>6</sup>	8,86	-	0
48	16 x 10 <sup>3</sup>	5,80	51,8 x 10 <sup>3</sup>	4,71
55	0,75 x 10 <sup>3</sup>	2,87	145	2,16

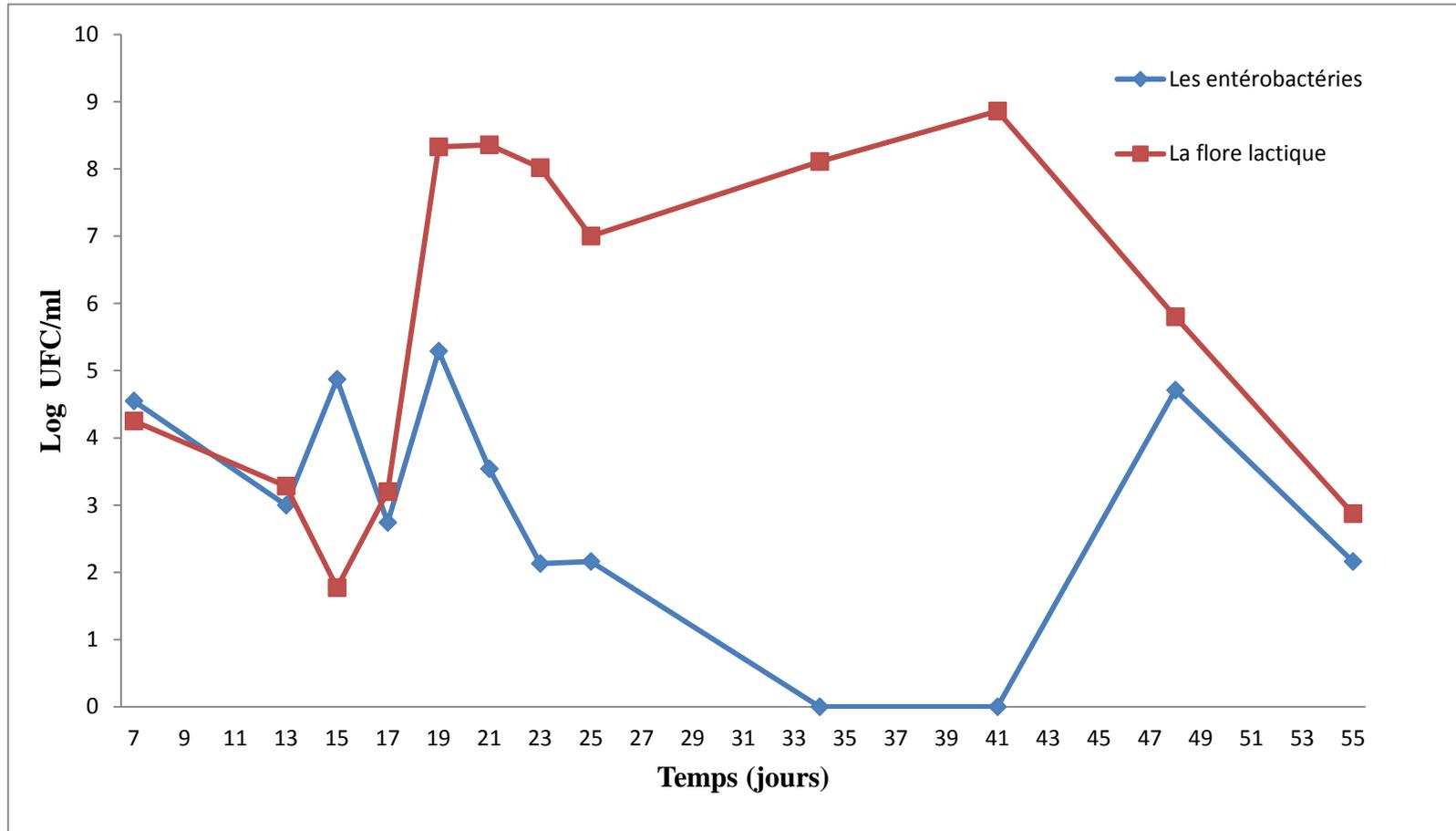


Figure 6.10 : Courbe d'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif du poulet de chair durant la période d'élevage

### 6.2.2.2.1. Flore lactique

Pour le dénombrement des bactéries lactiques, nous avons été confrontés à la difficulté de distinguer les différentes colonies isolées sur gélose MRS (figure 6.11). En effet, nous avons noté la présence de colonies typiques de bactéries lactiques qui diffèrent par la couleur, la forme et la taille mais dont le nombre (type de colonie) évolue tout au long du plan d'échantillonnage (J<sub>7</sub> à J<sub>55</sub>), c'est-à-dire : trois types de colonies à J<sub>7</sub> ; quatre types de colonies à J<sub>13</sub> et trois types de colonies à J<sub>15</sub> avec une prédominance des types rapportées ci-dessous :

- Colonies rondes bombées, mesurant 1,5 à 2 mm de diamètre, de couleur blanche ;
- Colonies blanchâtres à crème de petite taille (environ 1mm) ;
- Colonies circulaires plates, grisâtres mesurant environ 0,8 à 2 mm ;

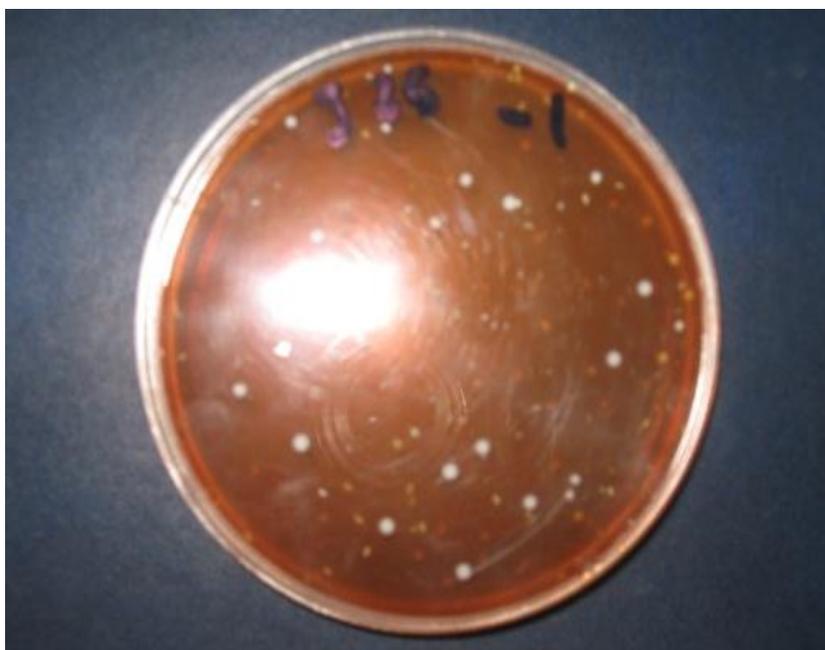


Figure 6.11: Colonies de bactéries lactiques sur gélose MRS (photo originale).

A l'examen microscopique des frottis réalisés à partir des colonies isolées, nous avons été confronté à la situation où :

- Les grandes colonies blanches ont donné :
  - soit des bâtonnets courts, ovalaires et légèrement courbés aux extrémités, isolés ou réunis en chaînettes de 2 à 6 cellules à J<sub>7</sub> et J<sub>13</sub> (figure 6.12, a);
  - soit des coques réunies en tétrade ou en amas à J<sub>13</sub> et J<sub>15</sub> (figure 6.12, b);
- Les petites colonies blanches ont donné :
  - soit des coques isolées ou réunies en chaînettes à J<sub>7</sub> (figure 6.12, c);
  - soit des coques regroupées en paire, tétrade et en amas à J<sub>15</sub> (figure 6.12, d);

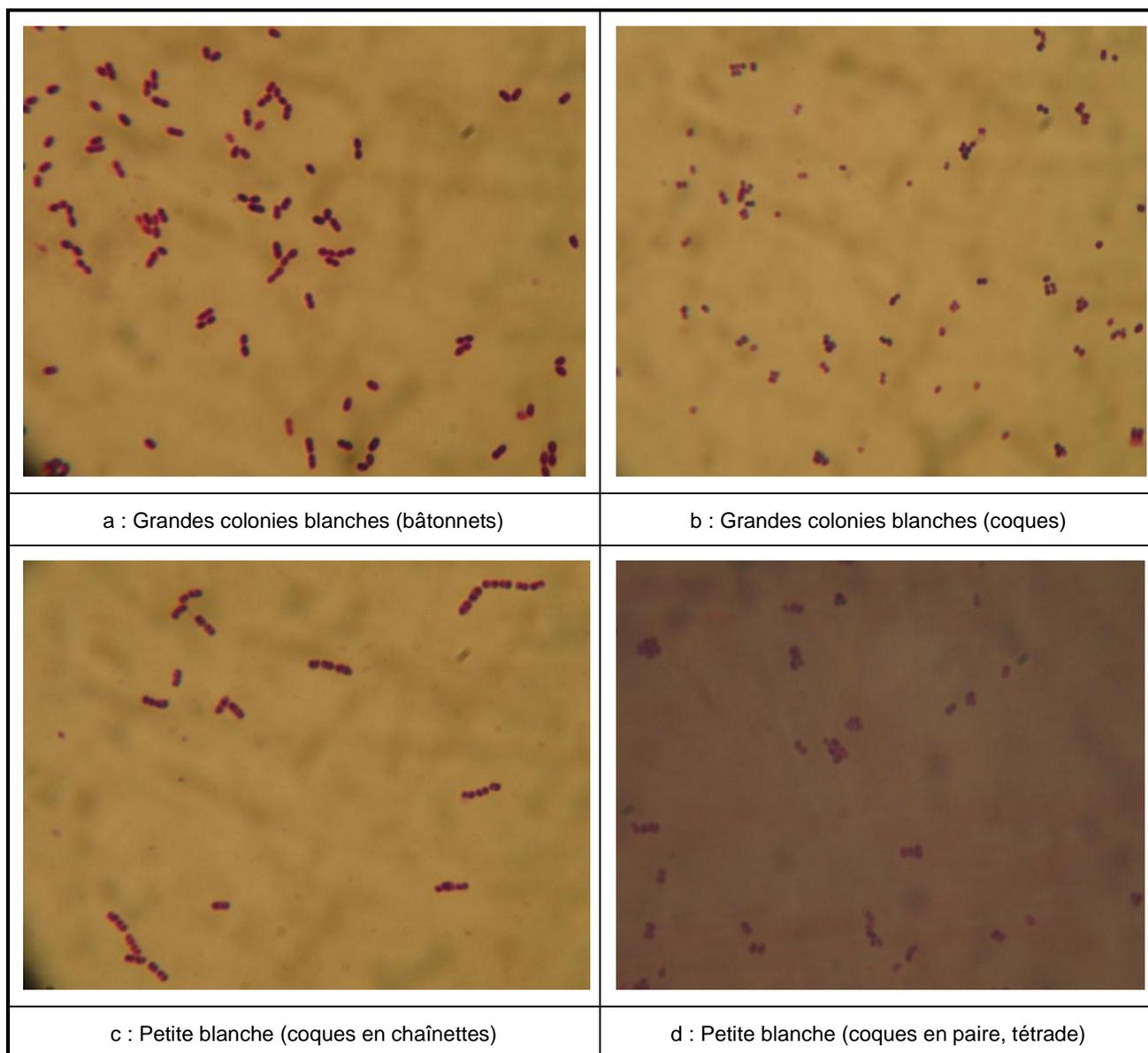


Figure 6.12: Observation microscopique de frottis bactérien des différents types de colonies de bactéries lactiques (x100) (photo originale).

Sur la base de ce qui précède, c'est-à-dire des observations macroscopique et microscopique des différents types de colonies de bactéries lactiques isolées, nous avons été contraint d'adopter la démarche qui repose sur le comptage de l'ensemble des colonies apparaissant sur le milieu MRS comme flore lactique.

Les résultats du dénombrement de la flore lactique, rapportés dans le tableau 6.8 et présentés graphiquement dans la figure 6.10, révèlent la présence de la flore lactique dans la masse intestinale des sujets sacrifiés dès le premier prélèvement (J7).

A J<sub>15</sub>, elle commence à évoluer positivement pour atteindre une population plus ou moins stable dès J<sub>19</sub>. Cette situation pourrait s'expliquer par la quantité d'aliment ingéré qui est en étroite relation avec le poids du sujet. En effet, le poids moyen par sujet évolue de 44g à J<sub>1</sub>, 124g à J<sub>7</sub>, 317g à J<sub>14</sub> pour doubler (624g) à J<sub>21</sub> et atteindre le poids de 1007g à la fin de la phase de croissance (d'après les paramètres zootechniques enregistrés, Khoubai et Merrouki [196]). L'effet stimulant de *P.acidilactici* sur la croissance des bactéries lactiques peut être expliqué par l'interaction positive entre les deux, celle-ci peut avoir pour origine soit la diminution du pH gastro-intestinal; soit la production des métabolites. Par ailleurs, les travaux de Temim *et al.* [111] ont rapporté que la supplémentation de l'aliment des poulets avec la même souche que nous avons utilisée dès le premier jour d'élevage favorisait l'accroissement et l'installation des lactobacilles. En effet, Mountzouris *et al.*, [84 ; 201] ont montré que le mélange de *P. acidilactici* avec d'autres bactéries lactiques telles que: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus* faisait accroître la population des Lactobacilles dans l'iléon et les caeca.

La période J<sub>21</sub> – J<sub>42</sub> se caractérise par une stabilité de la population de la flore lactique à l'exception de J<sub>25</sub> pour lequel nous avons noté une légère chute qui pourrait s'expliquer par l'apparition à J<sub>30</sub> du premier épisode de coccidiose, parasitose aviaire majeure bien connue dans nos élevages, confirmé par les observations à l'autopsie des cadavres de cette période (figure 6.13).



Figure 6.13: Signes pathognomoniques d'une coccidiose caecale [196].

L'usage de l'anticoccidien Toltrazuril (Baycox) dès l'apparition de la maladie à J<sub>30</sub>, n'a pas inhibé la croissance de la flore lactique. Par conséquent, nous pouvons donc renforcer l'idée que l'anticoccidien Toltrazuril est compatible avec la flore lactique.

L'évolution négative de la flore lactique observée entre J<sub>42</sub> et J<sub>58</sub> (fin d'élevage) pourrait s'expliquer par l'arrêt volontaire de la supplémentation du probiotique à l'alimentation et le statut immunitaire.

#### **6.2.2.2.2. Les Entérobactéries**

Les résultats du dénombrement des Entérobactéries, rapportés dans le tableau 6.8 et présentés graphiquement dans la figure 6.10, ont révélé :

- Leur présence, durant la période J<sub>7</sub> - J<sub>19</sub>, avec une fluctuation des charges. Ceci pourrait s'expliquer par les conditions d'élevage de type traditionnel et le statut immunitaire du poussin qui n'est pas encore mature.

- Leur baisse de croissance, à partir de J<sub>19</sub> jusqu'à leur disparition totale entre J<sub>34</sub> et J<sub>41</sub>. La situation observée relative à la baisse progressive de la population des Entérobactéries accompagnée de la stabilisation de la flore lactique à des seuils relativement importants est due probablement à l'effet barrière exercé par les bactéries lactiques expliqué par plusieurs mécanismes :
  - La production de métabolites dont les bactériocines et l'acide lactique rendant le milieu intestinal favorable à la croissance des bactéries lactiques et en revanche défavorable à la croissance des bactéries nuisibles et pathogènes [75]. De plus, la souche *P. acidilactici* est capable de produire de hauts niveaux d'acide lactique
  - La compétition entre la flore de barrière où d'exclusion (la flore lactique) et les Entérobactéries pour les sites d'adhésion à l'épithélium digestif permettant la translocation. Les travaux de Lessard et *al.* [202], sur un modèle monogastrique (porcelet), ont montré que l'association de *Pediococcus acidilactici* avec *Saccharomyces cerevisiae boulardii* limite la translocation d'*Escherichia coli* et favorise l'intégrité du tube digestif.
  - La compétition nutritionnelle entre la flore de barrière (la flore lactique) et les autres bactéries qui ont besoin de nutriments essentiels pour leur métabolisme [203].

Les travaux de Kralik et *al.* [204] ont montré une diminution d'environ 90% du nombre d'Entérobactéries, comparé au groupe témoin après 42 jours de supplémentation de l'eau de boisson en probiotique *Enterococcus faecium* M-74. De même, Idoui et *al.* [205] ont montré une diminution des Entérobactéries chez des poulets recevant le probiotique *Lactobacillus plantarum*.

- Leur disparition, entre J<sub>34</sub> et J<sub>41</sub>, semble être conséquente au traitement anticoccidien (Totrazuril) administré.
- Leur réapparition à J<sub>41</sub> avec une croissance progressive jusqu'à J<sub>48</sub> qui est en relation avec l'apparition des lésions d'entérite d'origine inconnue (figure 6.14) ayant causé la mortalité de 12 sujets durant cette période. Cette situation semble s'expliquer par l'arrêt volontaire de supplémentation du probiotique *P. acidilactici* à l'aliment des poulets, de J<sub>40</sub> jusqu'à la fin de l'élevage,



Figure 6.14: Intestins enflés et congestionnés, signes révélateurs d'entérite d'origine inconnue [196].

- Leur baisse de croissance de J<sub>48</sub> jusqu'à la fin d'élevage qui pourrait s'expliquer par le deuxième épisode de coccidiose (figure 6.15).



Figure 6.15: Présence de sang macéré au niveau des intestins et des caecae (J<sub>48</sub>), signes pathognomoniques d'une coccidiose caecale [196].

Les résultats obtenus nous permettent de dire qu'un effet barrière exercé par la flore lactique vis à vis des Entérobactéries est mis en évidence à J<sub>19</sub> ; date de

début de la stabilisation de la flore lactique à un niveau relativement important, d'une part et de la diminution des Entérobactéries, d'autre part. Il est à noter que l'arrêt volontaire de supplémentation du probiotique *P. acidilactici* à l'aliment des poulets à J<sub>40</sub> est probablement à l'origine de l'inversion d'évolution de la flore lactique (diminution) et des Entérobactéries (augmentation). Ceci pourrait s'expliquer par l'effet transitoire du probiotique dans le tube digestif des poulets (ne persiste plus dès l'arrêt de son administration). Selon Ahmad [85] et Kabir [206], le probiotique ingéré (bactérie exogène) a un rôle dans le maintien de l'équilibre de la flore endogène, stimule la croissance des lactobacilles et en revanche réduit l'accroissement des germes pathogènes probablement par le phénomène d'«exclusion compétitive». L'interaction négative entre les deux populations étudiées a été rapportée par Yaman et al. [207] chez des oies domestiquées après 15 jours de supplémentation de l'aliment en probiotique « kéfir ».

Un gain de poids vif et un meilleur indice de consommation des poulets de chair (paramètres traités par Khoubai et Merrouki., 2010) ont été corrélés positivement avec l'apparition de l'effet barrière à partir de J<sub>19</sub>. De meilleurs paramètres zootechniques ont été observés chez les poulets traités par *Pediococcus acidilactici* à J<sub>14</sub> par Vittorio et al. [5] et à J<sub>23</sub> par Djezzar [10]. Par conséquent, nous pouvons dire qu'il y a une relation étroite entre cet effet barrière et l'amélioration des performances zootechniques.

En conclusion de cette partie de l'étude, il apparaît clairement que la supplémentation de *P. acidilactici* à l'aliment favorise le phénomène d'exclusion compétitive (effet barrière) ; crée un environnement favorable à la croissance des bactéries désirables (flore lactique) et par conséquent défavorable à la croissance des microorganismes indésirables (Entérobactéries).

### **6.2.3. Étude des interactions entre *P. acidilactici* et certaines bactéries pathogènes**

En vue d'augmenter la fiabilité de nos résultats et la mise en évidence des interactions entre *P. acidilactici* et certaines bactéries pathogènes, nous avons choisi deux types de culture :

- En milieu solide avec quatre souches (*E. coli*, *Salmonella sp.*, *S. aureus* et *Streptococcus sp.*).
- En milieu liquide avec deux souches (*E. coli* et *S. aureus*).

#### **6.2.3.1. Interactions en milieu solide**

Les résultats des interactions en milieu solide entre la souche *P. acidilactici* MA18/5M et les quatre souches intestinales étudiées sont représentés par le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques dans le tableau 6.4 et la figure 6.16 ci-dessous.

Tableau 6.4: Spectre d'activité de *P. acidilactici* MA18/5M vis à vis des souches intestinales quantifié par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour des disques (mm)

<b>Souches indicatrices testées</b>	<b>Diamètre de la zone d'inhibition autour des disques (mm)</b>
Témoin	0
<i>Escherichia coli</i>	3 ± 0,5
<i>Salmonella sp.</i>	4 ± 0,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 ± 0,5
<i>Streptococcus sp</i>	13 ± 1,0

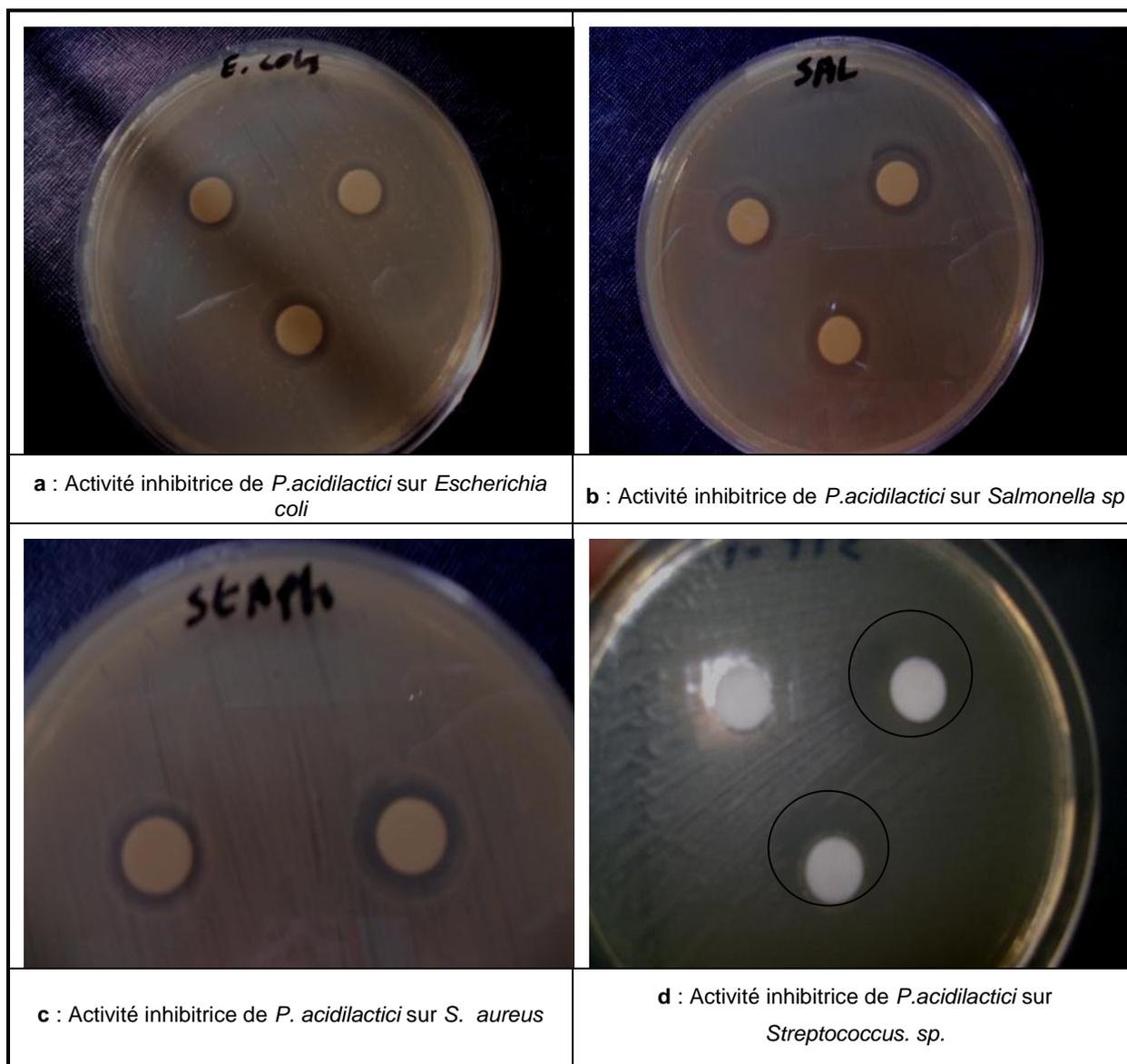


Figure 6.16: Illustration de l'interaction sur milieu solide entre la souche *P. acidilactici* et les souches intestinales

Les résultats montrent que la souche *P. acidilactici* inhibe la croissance bactérienne des souches testées avec des zones d'inhibitions variant de 3 à 13 mm. Nous avons constaté que les souches à Gram positive (*S. aureus* et *Streptococcus sp.*) sont plus sensibles à l'égard de la souche *P. acidilactici* par rapport aux souches testées à Gram négative (*E. coli* et *Salmonella sp.*).

### 6.2.3.2. Interactions en milieu liquide

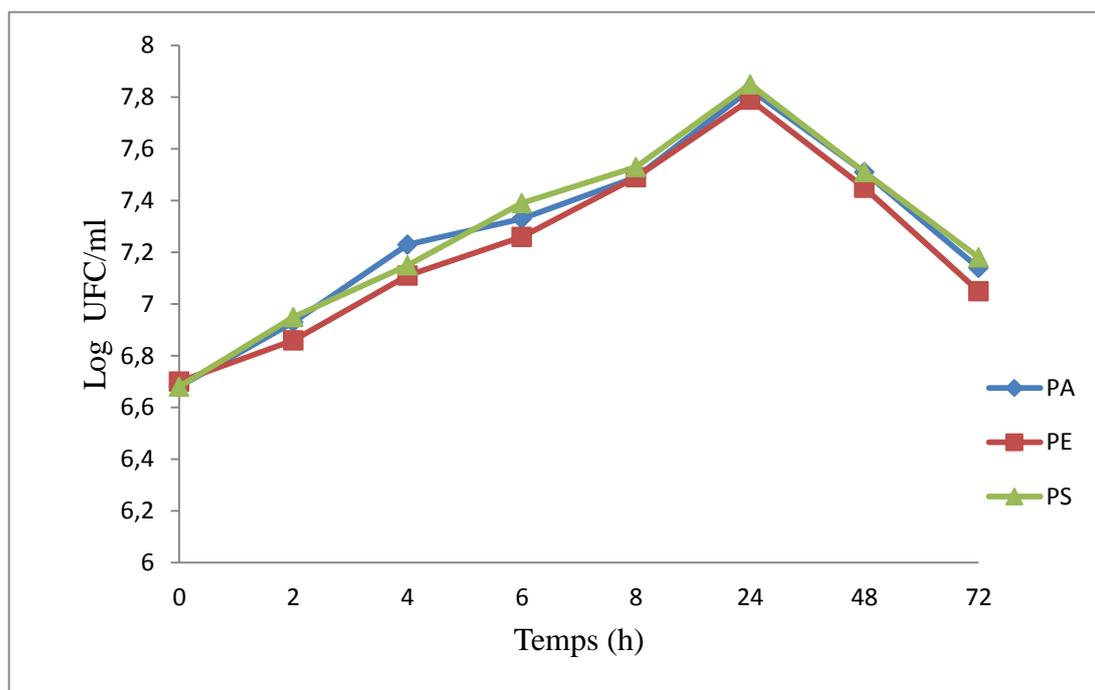
#### 6.2.3.2.1. Croissance de *Pediococcus acidilactici*

Les résultats de dénombrement (exprimés en Log UFC/ml) et valeurs de pH obtenus pour la cinétique de croissance (à 72 h) de *P. acidilactici* en culture pure et en culture mixte avec *E. coli* et *S. aureus* sont rapportés dans le tableau 6.6.

Tableau 6.5 : Résultats de dénombrement (exprimés en Log UFC/ml) et valeurs de pH obtenus pour la cinétique de croissance (à 72 h) de *P. acidilactici* en culture pure et en culture mixte avec *E. coli* et *S. aureus*.

Temps (h)	Culture pure ( <i>P. acidilactici</i> )		Culture mixte			
			( <i>P. acidilactici</i> + <i>E. coli</i> )		( <i>P. acidilactici</i> + <i>S.</i>	
	Log UFC/ml	pH	Log UFC/ml	pH	Log UFC/ml	pH
0	6,68	6,76	6,70	6,8	6,68	6,7
2	6,93	6,2	6,86	6,3	6,95	6,3
4	7,23	5,55	7,11	5,65	7,15	5,70
6	7,33	5,18	7,26	5,2	7,39	5,50
8	7,49	4,90	7,49	5,12	7,53	5,10
24	7,83	4,78	7,79	5,20	7,85	5,05
48	7,51	4,67	7,45	5,12	7,51	4,7
72	7,14	4,6	7,05	4,85	7,18	4,62

Les résultats de dénombrement (exprimés en Log UFC/ml) pour la cinétique de croissance (à 72 h) de *P. acidilactici* en culture pure et en culture mixte avec *E. coli* et *S. aureus* sont représentés graphiquement dans la figure ci-dessous.



PA: *P. acidilactici* en culture pure, PE: *P. acidilactici* en culture mixte avec *E. coli*, PS: *P. acidilactici* en culture mixte avec *S. aureus*.

Figure 6.17: Courbes d'évolution de la croissance *P. acidilactici* en cultures pure et mixte exprimée en Log UFC/ml.

Il en ressort que la croissance de *P. acidilactici* évolue de façon similaire dans les trois cultures [culture pure (PA) et cultures mixtes (avec *E. coli* et *S. aureus*)]. Nous avons noté que :

- la population bactérienne augmente pour atteindre son niveau maximal dès 24h d'incubation, puis diminue progressivement ;
- le temps de génération de *P. acidilactici* enregistré après 8h d'incubation est presque le même pour les différentes cultures ; soit : 178min en culture

pure, 182min en co-culture avec *E. coli* et 170min en co-culture avec *S. aureus*.

Les valeurs de pH obtenus lors de la cinétique de croissance de *P. acidilactici* en culture pure et mixte avec *E. coli* ou *S. aureus* sont présentées dans la figure 6.18.

P: *P. acidilactici* en culture pure, PE: *P. acidilactici* en culture mixte avec *E. coli*, PS: *P. acidilactici* en

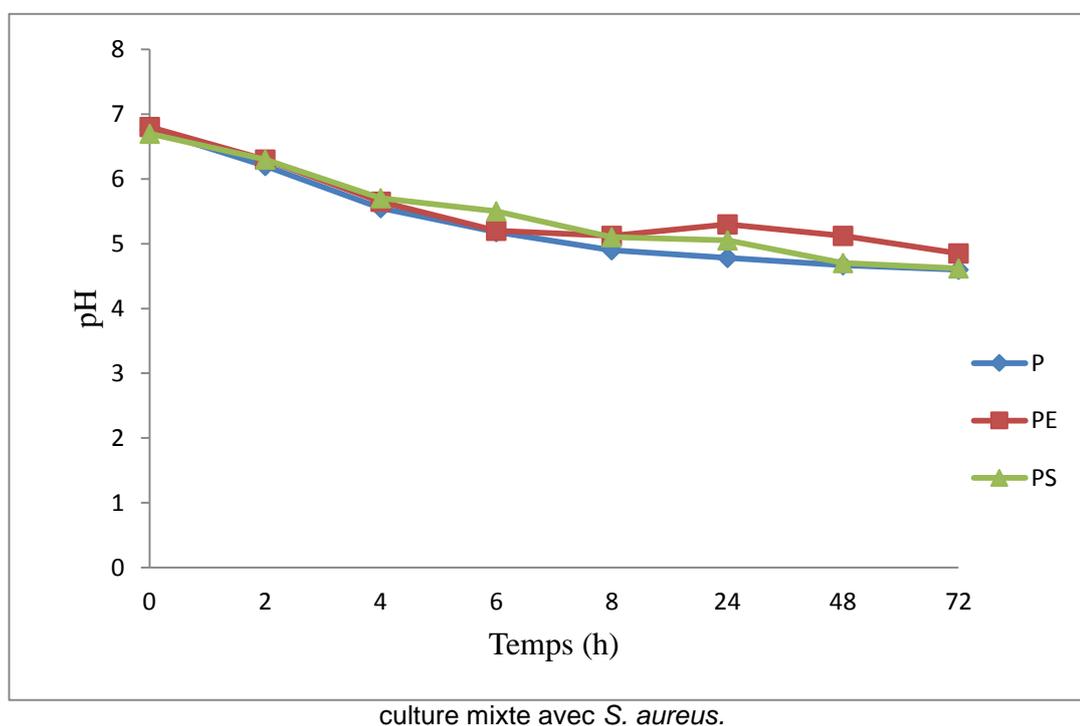


Figure 6.18: Courbes d'évolution du pH lors de la croissance de *P. acidilactici* en cultures pure et mixte.

Nous avons enregistré que le pH des cultures diminue progressivement avec le temps d'incubation quelle que soit la culture, à savoir :

- en culture pure, de 6,76 à 4,6 après 72h d'incubation ;

- en culture mixte, de 6,8 à 4,85 (en présence d'*E. coli*) et de 6,7 à 4,62 (en présence de *S. aureus*) après 72h d'incubation.

A la lumière de ce qui précède, nous pouvons dire que la co-culture avec *E. coli* et *S. aureus* n'affecte pas le déroulement de la croissance de *P. acidilactici* et par conséquent leur activité métabolique (évolution d'acidité).

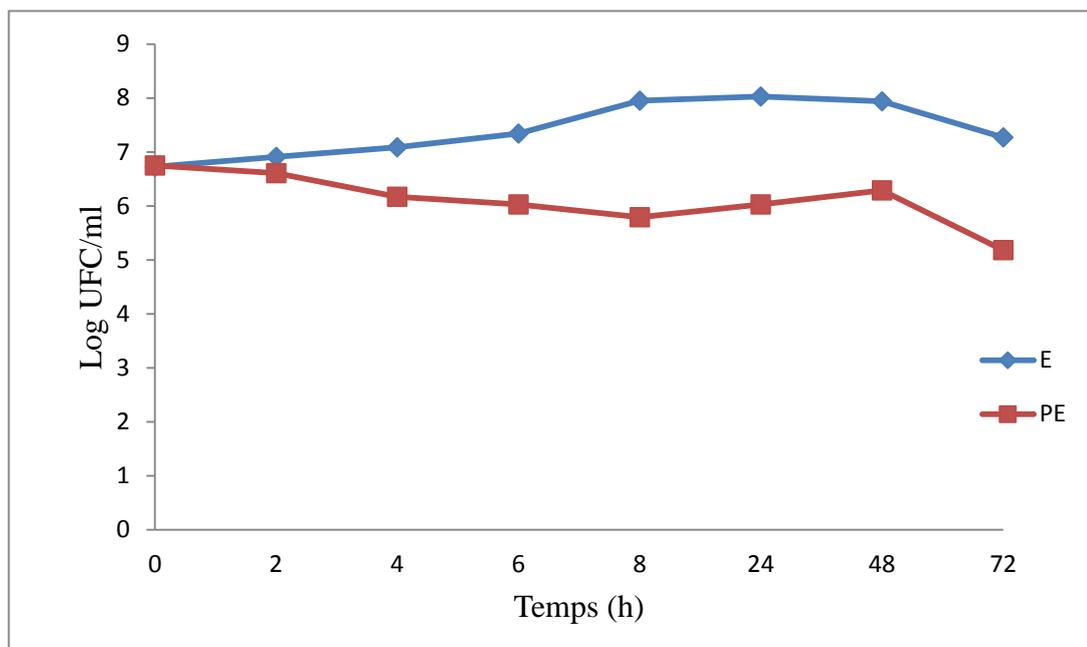
#### **6.2.3.2.2. Croissance d'*Escherichia coli***

Les résultats de dénombrement (exprimés en Log UFC/ml) et valeurs de pH obtenus pour la cinétique de croissance (à 72 h) d'*E. coli* en cultures pure et mixte (avec *P. acidilactici*) sont rapportés dans le tableau 6.6.

Tableau 6.6: Résultats de dénombrement (exprimés en Log UFC/ml) et valeurs de pH obtenus pour la cinétique de croissance (à 72 heures) d'*E. coli* en culture pure et en culture mixte avec *P. acidilactici*.

Temps	Culture pure ( <i>E. coli</i> )		Culture mixte ( <i>E. coli</i> + <i>P. acidilactici</i> )	
	Log UFC/ml	pH	Log UFC/ml	pH
<b>0</b>	6,73	7,13	6,75	6,8
<b>2</b>	6,91	7,05	6,61	6,3
<b>4</b>	7,09	6,78	6,17	5,65
<b>6</b>	7,34	6,70	6,03	5,20
<b>8</b>	7,95	6,65	5,79	5,12
<b>24</b>	8,03	6,60	6,03	5,20
<b>48</b>	7,94	6,64	6,29	5,12
<b>72</b>	7,27	7,25	5,18	4,85

Les courbes de croissance d'*E. coli* en culture pure et en culture mixte avec *P. acidilactici* sont présentées graphiquement dans la figure 6.19.



E : *E. coli* en culture pure, PE : *E. coli* en culture mixte avec *P. acidilactici*

Figure 6.19 : Courbes de croissance d'*E. coli* en culture pure et mixte exprimée en Log UFC/ml.

Il en ressort que la population d'*E. coli* évolue en fonction du temps dans les deux types de culture :

- En culture pure, elle augmente pour atteindre son niveau maximal de  $1,09 \times 10^8$  UFC/ml après 24h d'incubation, et diminue progressivement jusqu'à la fin d'incubation.
- En culture mixte, elle diminue jusqu'à atteindre son niveau minimal de  $6,3 \times 10^5$  UFC/ml après 8h d'incubation (Figure 6.20), puis augmente pour atteindre une valeur de  $1,9 \times 10^6$  UFC/ml à 48h d'incubation et diminue progressivement jusqu'à atteindre la valeur de  $1,5 \times 10^5$  UFC/ml après 72h d'incubation.

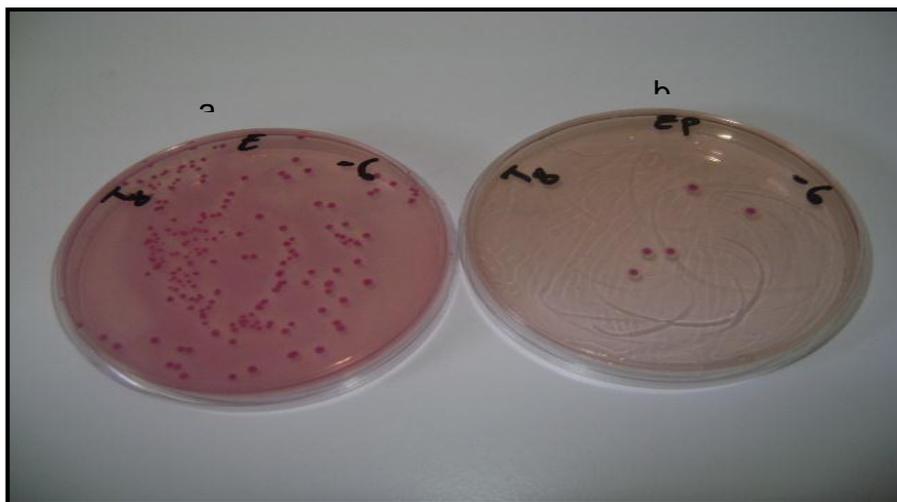
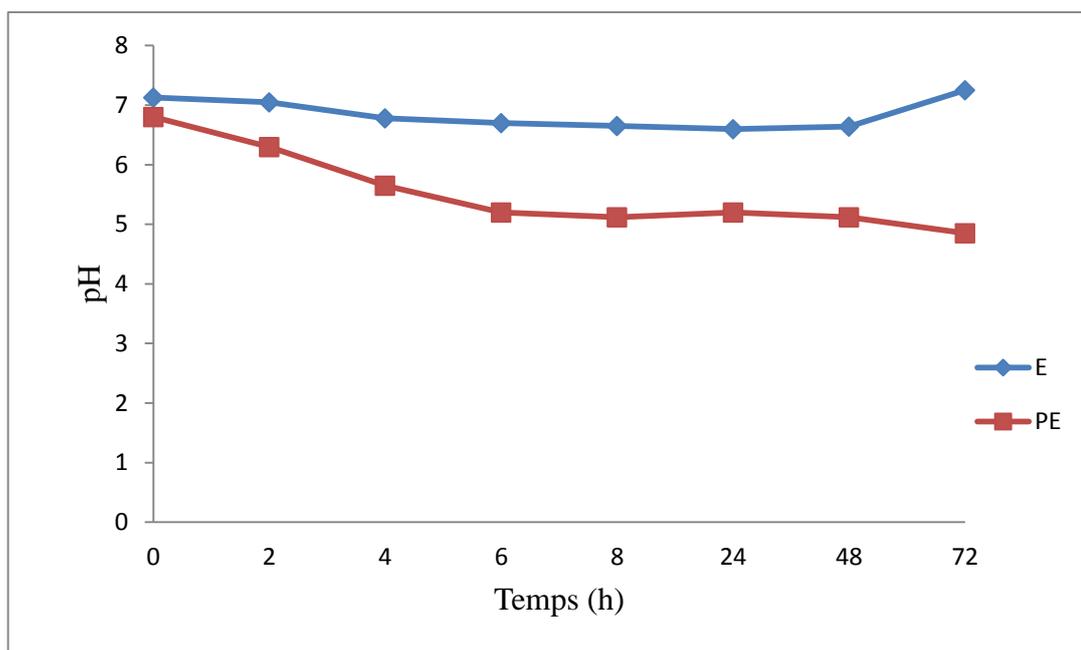


Figure 6.20: Culture pure d'*E. coli* (a) et mixte avec *P. acidilactici* (b) sur gélose Mac Conkey après 8h d'incubation (photo originale).

Les valeurs de pH obtenues lors de la croissance d'*E. coli* en cultures pure et mixte (avec *P. acidilactici*) sont représentés dans la figure 6.21.



**E** : *E. coli* en culture pure, **EP** : *E. coli* en culture mixte avec *P. acidilactici*.

Figure 6.21: Courbes d'évolution du pH lors de la croissance d'*E. coli* en cultures pure et mixte.

Il en ressort que le pH de la culture d'*E. coli* évolue négativement en fonction du temps d'incubation dans les deux cultures :

- En culture pure, le pH diminue de 7,13 à 6,60 après 48h d'incubation puis augmente pour atteindre la valeur de 7,30 après 72h d'incubation.
- En culture mixte, le pH diminue de 6,8 pour atteindre la valeur de 5,12 après 72h d'incubation.

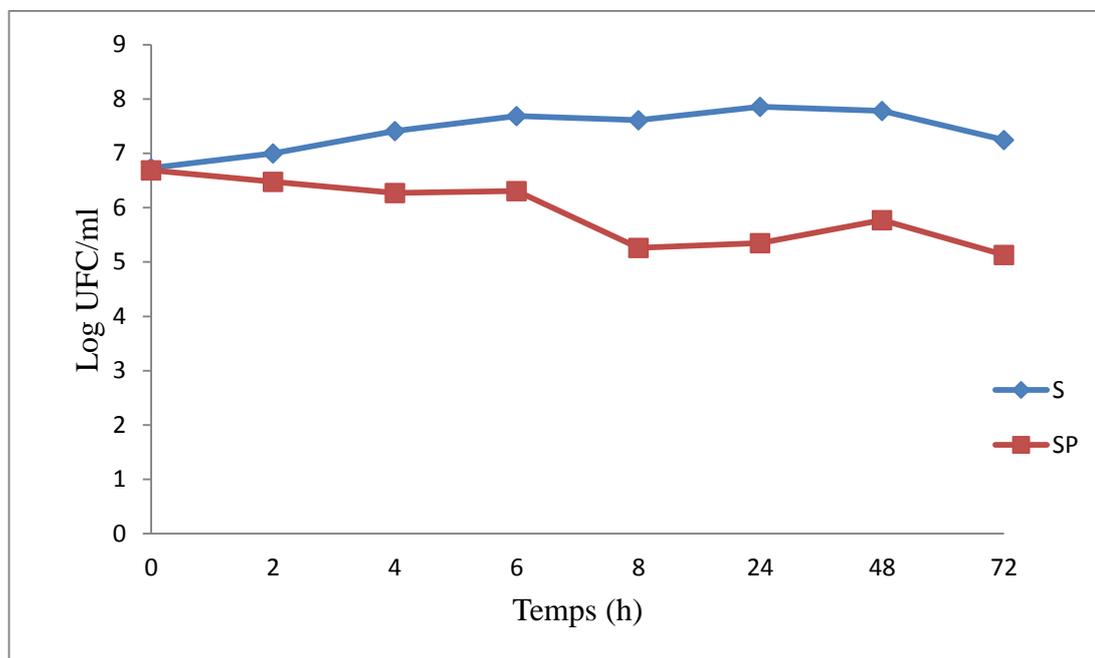
#### **6.2.3.2.3. Croissance de *Staphylococcus aureus***

Les résultats de dénombrement (exprimés en Log UFC/ml) et valeurs de pH obtenus pour la cinétique de croissance (à 72 h) de *S. aureus* en culture pure et en culture mixte avec *P. acidilactici* sont rapportés dans le tableau ci après.

Tableau 6.7 : Résultats de dénombrement (exprimés en Log UFC/ml) et valeurs de pH obtenus pour la cinétique de croissance (à 72 h) *S. aureus* en culture pure et en culture mixte avec *P. acidilactici*.

Temps	Culture pure ( <i>S.aureus</i> )		Culture mixte ( <i>S.aureus</i> + <i>P. acidilactici</i> )	
	Log UFC/ml	pH	Log UFC/ml	pH
<b>0</b>	6,73	7,13	6,69	6,7
<b>2</b>	7,00	7,04	6,48	6,3
<b>4</b>	7,41	6,91	6,27	5,48
<b>6</b>	7,69	6,77	6,31	5,5
<b>8</b>	7,61	6,85	5,26	5,1
<b>24</b>	7,86	6,75	5,35	5,05
<b>48</b>	7,78	6,60	5,77	4,7
<b>72</b>	7,25	7,30	5,13	4,62

Les courbes de croissance de *S. aureus* en culture pure et en culture mixte avec *P. acidilactici* sont présentées graphiquement dans la figure 6.22.



S : *S. aureus* en culture pure, SP : *S. aureus* en culture mixte avec *P. acidilactici*.

Figure 6.22: Courbes de croissance de *S. aureus* en culture pure et mixte exprimée en Log UFC/ml.

Il en ressort que la population de *S. aureus* évolue en fonction du temps dans les deux types de culture :

- En culture pure, elle augmente pour atteindre son niveau maximal de  $7,20 \times 10^7$  UFC/ml après 24h d'incubation, et diminue progressivement jusqu'à la fin d'incubation.
- En culture mixte, elle diminue jusqu'à atteindre une valeur de  $1,80 \times 10^5$  UFC/ml après 8h d'incubation (Figure 6.23), puis augmente pour atteindre une valeur de  $5,90 \times 10^5$  UFC/ml à 48h d'incubation et diminue progressivement jusqu'à atteindre la valeur de  $1,3 \times 10^5$  UFC/ml après 72h d'incubation.

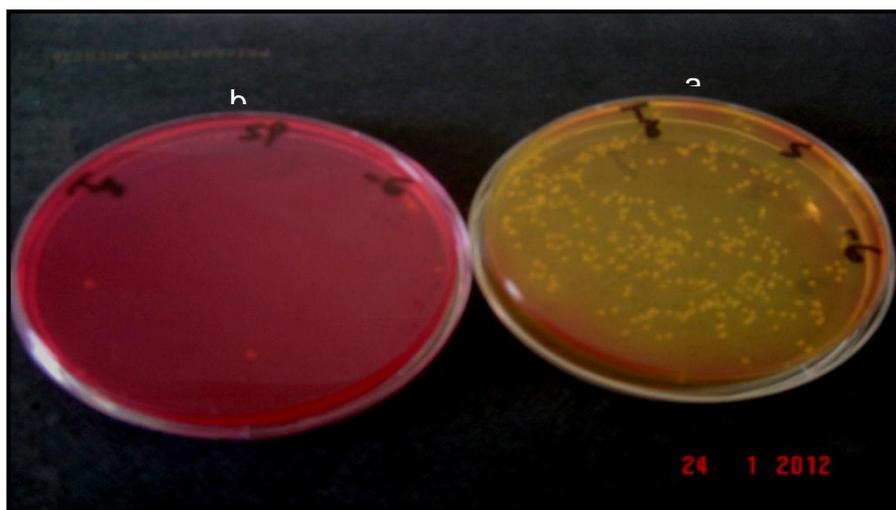
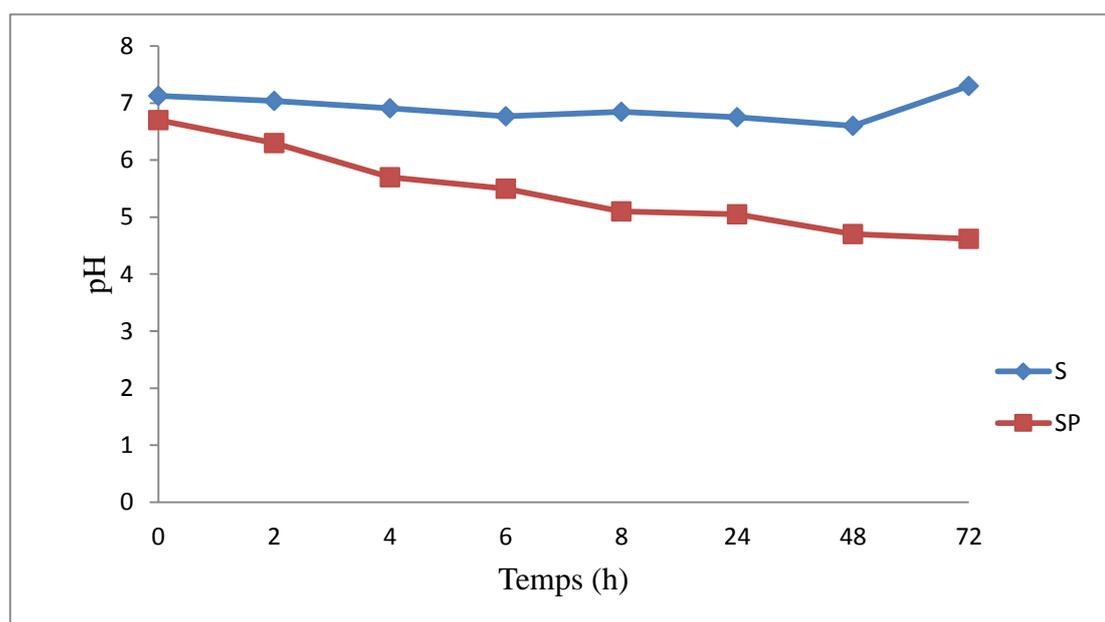


Figure 6.23: Culture pure de *S. aureus* (a) et mixte avec *P. acidilactici* (b) sur gélose Chapman après 8h d'incubation (photo originale).

Les valeurs de pH obtenues lors de la croissance de *S. aureus* en cultures pure et mixte (avec *P. acidilactici*) sont représentées dans la figure 6.24.



**S** : *S. aureus* en culture pure, **SP** : *S. aureus* en culture mixte avec *P. acidilactici*.

Figure 6.24: Courbes de l'évolution de pH lors de la croissance de *S. aureus* en cultures pure et mixte.

Il en ressort que le pH de la culture de *S. aureus* évolue négativement en fonction du temps d'incubation dans les deux cultures :

- En culture pure, le pH diminue de 7,13 à 6,60 après 48h d'incubation puis augmente pour atteindre la valeur de 7,30 après 72h d'incubation.
- En culture mixte, le pH diminue de 6,70 pour atteindre la valeur de 4,62 après 72h d'incubation.

Sur la base des résultats obtenus, nous pouvons dire qu'il existe une inhibition (interaction négative) entre *P.acidilactici* et les souches pathogènes testées. Dans la classification d'Odum [159], cette interaction s'apparente à un amensalisme : c'est-à-dire que la co-culture avec *P .acidilactici* agit négativement sur la croissance d'*E. coli* et de *S. aureus*. Selon Frederickson [160], cette interaction négative peut s'expliquer par l'effet antagoniste des bactéries lactiques qui est dû principalement à :

1. la modification des conditions de culture et certainement au gradient de protons dû à la production d'acide lactique.
2. la production de molécules inhibitrices telle que les bactériocines, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
3. l'utilisation du même substrat par plusieurs souches en culture dans un même milieu, donc en compétition nutritionnelle.

En effet, il apparaît clairement qu'il existe une forte corrélation entre cette inhibition et la diminution du pH du milieu de culture (comparaison entre culture pure et mixte d'*E.coli* et *S. aureus*).

1. **La chute de pH de la culture** mixte, après huit heures d'incubation, de *P. acidilactici* avec *E. coli* et *S. aureus* à 5,12 et 5,1, respectivement ; a induit des taux d'inhibition de la croissance de 27,2% et 31% respectivement. De nombreux travaux ont rapporté un effet inhibiteur des pédiocoques et des bactéries lactiques sur la croissance de :

- *E. coli* par réduction du pH et production de métabolites antimicrobiens [208 ; 209 ; 210 ; 211]. Kang et Fung [209] ont montré qu'il existe une inhibition de la croissance d'*E. coli* O157:H7 en milieu liquide en présence de *P. acidilactici*. Ce phénomène est accentué lorsque le

milieu est enrichi en  $MnSO_4$  et Oxyrase, substances sans effet sur *E. coli* O157:H7 mais stimulant la croissance de *P. acidilactici*.

- *S. aureus* par acidité du milieu (pH < 5) [212 ; 199 ; 213]. En effet, Haines et Harmon [199] ont montré un effet inhibiteur de *P. acidilactici* et *L. lactis* A. sur la croissance de *S. aureus* par production d'acide lactique et de compétition nutritionnelle. De même, Charlier, *et al.* [214]; Kaban et Kaya [215] et Sameshima *et al.*, [216] ont montré que l'addition de *P. acidilactici* et/ou de bactéries lactiques (*Lb. curvatus*, *Lb. sakei*, *Lb. Rhamnosus* et *Lb. paracasei*) en tant que levain dans les produits de salaison permet d'inhiber la croissance de *S. aureus* et la production de toxines grâce à l'acidification du milieu. Selon Alomar *et al.* [217], l'inhibition de la croissance de *S. aureus* par *L. lactis* et *E. faecalis* peut être partiellement attribuée à la diminution du pH en-dessous de 6.0. En effet, dans les co-cultures avec *P. acidilactici* et *L. lactis*, la compétition pour des vitamines telles que la biotine, la niacine ou la nicotinamide, et le glucose, est impliquée dans le mécanisme d'inhibition de *S. aureus* [199; 213 ; 218].

2. **La reprise de la croissance d'*E. coli* et de *S. aureus***, après 8h d'incubation, malgré l'acidité du milieu ne pourrait s'expliquer que par la présence d'autres substances inhibitrices, telles que les bactériocines. Selon Piard *et al.* [219], la production des bactériocines par les bactéries lactiques commence dès le début de la phase exponentielle de croissance et atteint son niveau maximum au début de la phase stationnaire. Dans la présente étude, nous avons remarqué que l'inhibition d'*E. coli* et *S. aureus* atteint son niveau maximum dès 8h d'incubation (figure 6.19 et figure 6.22), période où la souche *P. acidilactici* est en pleine phase exponentielle de croissance (figure 6.11). La baisse de croissance de *P. acidilactici* dès 24h d'incubation entraîne donc une diminution de la synthèse des bactériocines. Par conséquent, la reprise de croissance d'*E. coli* et *S. aureus* pourrait s'expliquer par la diminution de la croissance de *P. acidilactici* et donc la dégradation enzymatique des bactériocines et surtout les substrats azotés après l'autolyse de *P. acidilactici* comme rapporté par Biswas *et al.* [220] et Nieto-Lozano *et al.* [221]. En effet, les travaux de Richard [222] ont montré un effet anti-Listéria de la pédiocine AcH produite par une souche de *P. acidilactici*, cependant

après 7h d'incubation il a enregistré une reprise de croissance de *Listeria monocytogenes*. De même, Doumandji *et al.* [223] ont enregistré une reprise de la croissance de la même souche après 6 jours de leur culture à 4 °C et 15 °C en présence du surnageant brut de *Bifidobacterium infantis* TCM03. De plus, Achemchem *et al.* ont [224] rapporté une diminution de l'activité anti-Listéria d'*Enterococcus faecium* après 24h d'incubation et ont expliqué cette situation par la fixation de la bactériocine à l'organisme producteur.

En conclusion, nous pouvons dire que la souche *P. acidilactici* est douée d'une activité inhibitrice étroite vis à vis des souches testées.

### **6.2.3.3. Caractérisation des substances responsables d'interactions**

Les résultats relatifs à la mise en évidence des substances inhibitrices seront présentés selon une démarche qui repose sur deux étapes permettant la caractérisation de l'effet de l'acide lactique et de celui des bactériocines.

- **Première étape : effet de l'acide lactique.**

Les zones d'inhibition obtenues avec l'extrait brut de *P. acidilactici* neutralisé à 6,8 vis-à-vis des souches testées sont de 0,5 mm, 0 mm ; 1 mm et 2,5 mm de diamètre, respectivement pour *E.coli*, *Salmonella sp.*, *S. aureus* et *Streptococcus sp.*

Les faibles zones d'inhibitions obtenues (culture en milieu solide) ainsi que la chute de pH enregistrée (culture en milieu liquide), suggèrent une forte corrélation entre l'inhibition des souches testées et l'acidité du milieu. Selon Bourgeois et Larpent [134], les pédiocoques produisent de l'acide lactique DL ou L(+) selon les espèces et *P. acidilactici* ne produit que le type L(+). De plus, les stéréo-isomères d'acide lactique différent dans l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques ;

l'acide L(+) lactique est plus inhibiteur que l'isomère D (-) [143]. En outre, la forme non dissociée d'acide lactique qui est prédominante à pH acide est généralement plus toxique pour les cellules microbiennes que la forme dissociée ; elle peut traverser passivement la membrane cellulaire et acidifier le cytoplasme par libération du proton, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions de l'espèce cible [225]. Par conséquent, l'acide lactique est l'une des substances responsables de l'effet inhibiteur de *P. acidilactici*.

Toutefois, la présence de faibles zones d'inhibition n'exclue pas l'effet des bactériocines.

- **Deuxième étape : Effet des bactériocines.**

L'absence totale de zones d'inhibition a été enregistrée avec l'extrait brut de *P. acidilactici* traité aux enzymes protéolytiques vis-à-vis des souches testées.

Les zones d'inhibition obtenues avec l'extrait brut de *P. acidilactici* traité thermiquement varient de 4 à 7 mm de diamètre vis-à-vis des souches testées (tableau 6.8 et figure 6.25).

Tableau 6.8: Effet de l'extrait brut de *P. acidilactici* chauffé à 120 °C pendant 30 min vis-à-vis des souches testées.

<b>Souches indicatrices testées</b>	<b>Diamètre de la zone d'inhibition (mm)</b>
<i>Escherichia coli</i>	4
<i>Salmonella sp.</i>	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	7±0,5
<i>Streptococcus sp</i>	6±0,5

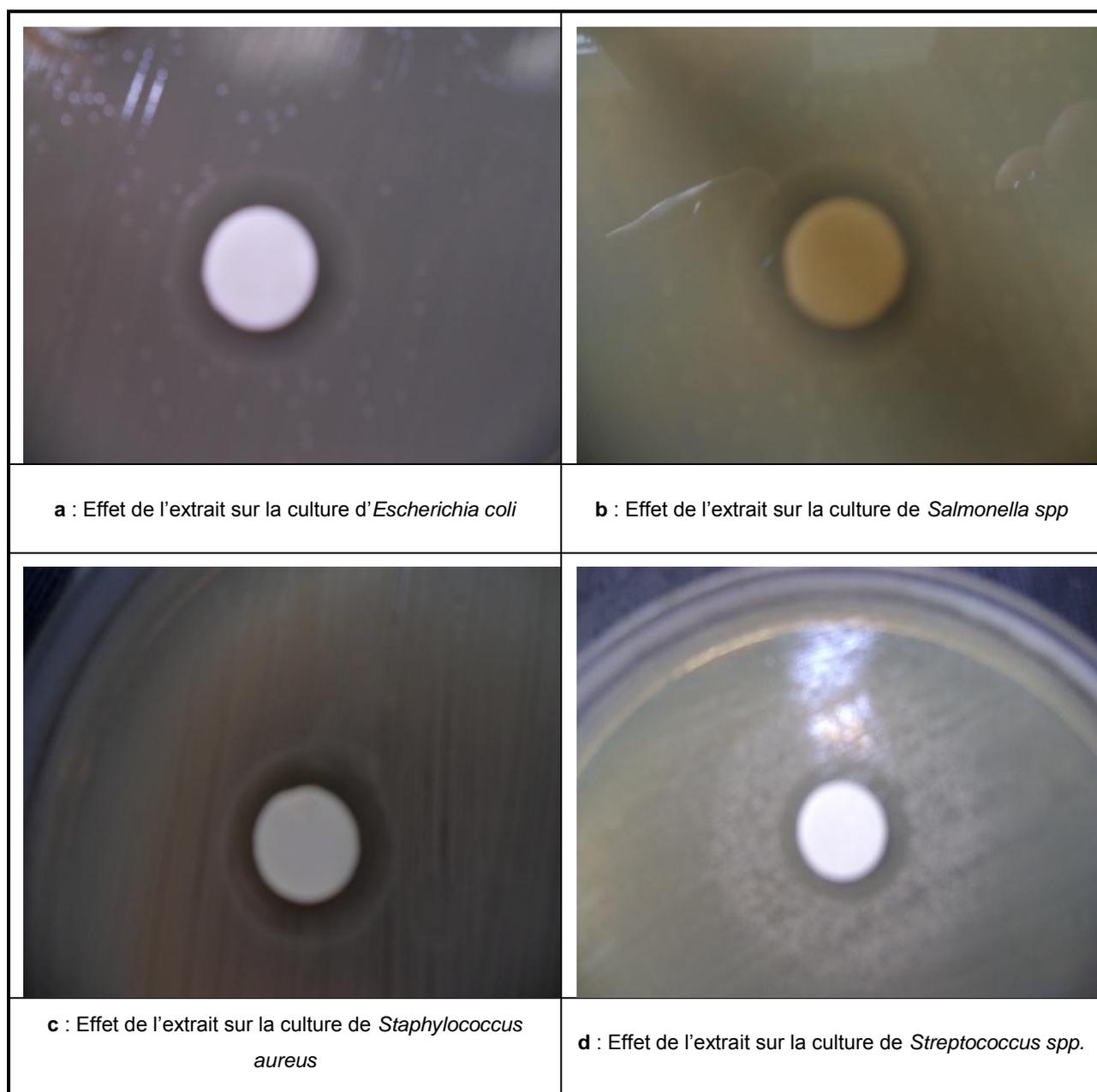


Figure 6.25: Illustration de l'effet inhibiteur de l'extrait de *P. acidilactici* après traitement thermique sur les souches intestinales

L'action des enzymes protéolytiques suggère que les substances impliquées dans l'activité inhibitrice de *P. acidilactici* sont des composés protéiques ou peptidiques. Les travaux de Daeschel et Klaenhamer [226] et Bhunia *et al.* [227] ont

rapporté une inactivation des bactériocines des pédiocoques en présence d'enzymes protéolytiques. Tandis que la résistance à la chaleur est un caractère commun à plusieurs bactériocines produites par les bactéries lactiques : nisine [228], pediocin AcH [227], pediocin PA-1 [229] et pediocin SJ-1 [230]. Par conséquent, les bactériocines et l'acide seraient les substances responsables de l'effet inhibiteur de *P. acidilactici*. En effet, les travaux de :

- Nieto-Lozano *et al.* [221], ont montré qu'il y avait un effet inhibiteur du surnageant d'une culture de *P. acidilactici* vis-à-vis de *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*.
- Gurira et Buys, [231], ont signalé un effet anti-Listéria d'une souche de *P. acidilactici*.

Toutefois, l'absence ou la faible inhibition enregistrée avec l'extrait brut de *P. acidilactici*, neutralisé indique que les bactériocines sont sensibles où inactives à un pH neutre. En effet, les travaux de Gi-Seong *et al.* [232], ont montré *in vitro* que l'utilisation des bactériocines produites par *Pediococcus acidilactici* K10 n'empêche pas la croissance d'*E. coli* O157:H7 ; mais l'utilisation combinée avec des acides organiques tels que l'acide lactique, acétique et succinique a un effet inverse. De plus, les observations de Bhunia *et al.* [227] indiquent que la pédiocine AcH produite par *Pediococcus acidilactici* F gardait et même renforçait son activité dans le lait acide.

Sur la base de ces observations, nous pouvons dire que l'acide lactique pourrait agir en synergie avec les bactériocines dont l'activité antimicrobienne dépend du pH. Selon Alakomi *et al.*, [97], cet effet synergique pourrait s'expliquer par le fait que les acides organiques perturbent la membrane externe de la souche cible et les bactériocines peuvent ainsi s'attaquer à la cellule microbienne.

A ce stade de l'étude, il apparaît que la souche probiotique *P. acidilactici* a la capacité d'inhiber le développement des souches d'entérobactéries (*E. coli*) et des souches pathogènes (*S. aureus*) isolées de tube digestif du poulet de chair. La production d'acide lactique (chute du pH) et la production de bactériocines sont à l'origine de cet effet antibactérien.

## CHAPITRE 7

### ETUDE DE L'EFFET COMBINÉ DE *Yucca schidigera* (ANTICOCCIDIEN A BASE DE PLANTE NATURELLE) AVEC *Pediococcus acidilactici* SUR LES PERFORMANCES ZOOTECHNIQUES ET LA FLORE DIGESTIVE DES POULETS DE CHAIR.

Les résultats obtenus dans la première partie de l'étude ont montré que la supplémentation en probiotiques à l'aliment améliorait les performances zootechniques mais ne prémunissait pas les animaux contre la coccidiose. Pour ce qui est de son impact sur la flore digestive, nos prélèvements ont montré qu'un effet barrière exercé par la flore lactique vis à vis des Entérobactéries est mis en évidence à J<sub>19</sub> ; date de début de la stabilisation de la flore lactique à un niveau relativement important, d'une part et de la diminution des Entérobactéries, d'autre part.

Pour cela, nous avons lancé la présente étude qui se propose d'étudier l'effet combiné du probiotique *Pediococcus acidilactici* et de l'anticoccidien à base de plante naturelle *Yucca schidigera* en élevage de poulet de chair par :

1. L'évaluation des performances zootechniques (mortalité) et le suivi de l'évolution de la flore digestive désirable (flore lactique) et indésirable (Entérobactéries) des poulets de chair (étude *in vivo*).

2. L'influence de l'extrait brut de *Yucca schidigera* sur la croissance du probiotique *Pediococcus acidilactici* et de quelques souches pathogènes isolées à partir du tube digestif du poulet de chair (étude *in vitro*).

## **Période et lieu de l'étude**

Notre expérimentation s'est déroulée durant la période de janvier 2012 à avril 2012 dans le laboratoire de post graduation de biologie (Pr GUETARNI) de l'université Saad DAHLEB de Blida.

## **7.1. Matériel et méthodes**

### **7.1.1. Matériel**

**Pour l'étude *in vivo***, nous avons utilisé trois mille cinq cent (3500) poussins d'un jour d'espèce *Gallus gallus domesticus*, appartenant à la souche Hubbard F15, de sexes mélangés, d'un poids homogène (48,3g), provenant d'un même couvoir ont été pesés et divisés en trois (3) lots [deux lots destinés au présent essai (n=250 chacun) et le troisième à caractère commercial (n=3000)]. Les animaux ont été mis en place le 2 mars pour une durée de 52 jours, dans un bâtiment de type traditionnel sis à Chaiba (W de Tipaza), cloisonné de façon à offrir trois aires de vie (deux de 25m<sup>2</sup> chacune et une troisième de 350m<sup>2</sup>), subissant les mêmes conditions d'ambiance.

L'aliment utilisé, de type farineux, a été produit spécialement pour notre expérimentation sur la base d'une formulation tenant compte les trois phases d'élevage (démarrage, croissance et finition). L'eau de boisson distribuée aux animaux provenait d'un puits régulièrement traité.

Les animaux du premier lot, identifié comme "lot témoin" recevaient l'aliment exempt de tout additif mais une eau additionnée d'antibiotiques, traitements les plus

fréquemment administrés sur le terrain Algérien. Les animaux du deuxième lot, identifié comme "lot expérimental" recevaient une eau de boisson exempte de tout additif et un même aliment additionné de l'extrait de *Yucca schidigera* à raison de 0,5 g/kg ainsi que du lyophilisat de *Pediococcus acidilactici* MA 18/5M (Bactocell®, France) à raison de 100 ppm (concentration de  $10^9$  UFC/g) durant toute la durée d'élevage.

Les sujets des deux lots ont été vaccinés contre la maladie de Newcastle UNI L CEVA® à J<sub>6</sub> et rappel avec NEW L CEVA® à J<sub>19</sub> et aussi contre la maladie de Gumboro IBD L CEVA® à J<sub>15</sub>.

**Pour l'étude *in vitro***, nous avons utilisé :

- Un anticoccidien à base de la plante naturelle *Yucca schidigera* sous forme d'une poudre « Yuquina » produite par la société NORFEED Europe ;
- Le probiotique *Pediococcus acidilactici* MA18/5M et *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* et *Streptococcus sp* ; souches pathogènes isolées à partir du tube digestif du poulet de chair, les mêmes que celles utilisées dans la première partie de l'étude, chapitre 2).

En plus des milieux de culture, des réactifs et des équipements de laboratoire cités dans la première partie expérimentale (chapitre 6) de l'étude, nous avons utilisé pour l'extraction du principe actif de l'anticoccidien de l'extrait de « *Yucca schidigera* », le méthanol comme solvant et le dispositif Soxhlet et rota-vapor (figure 7.1).

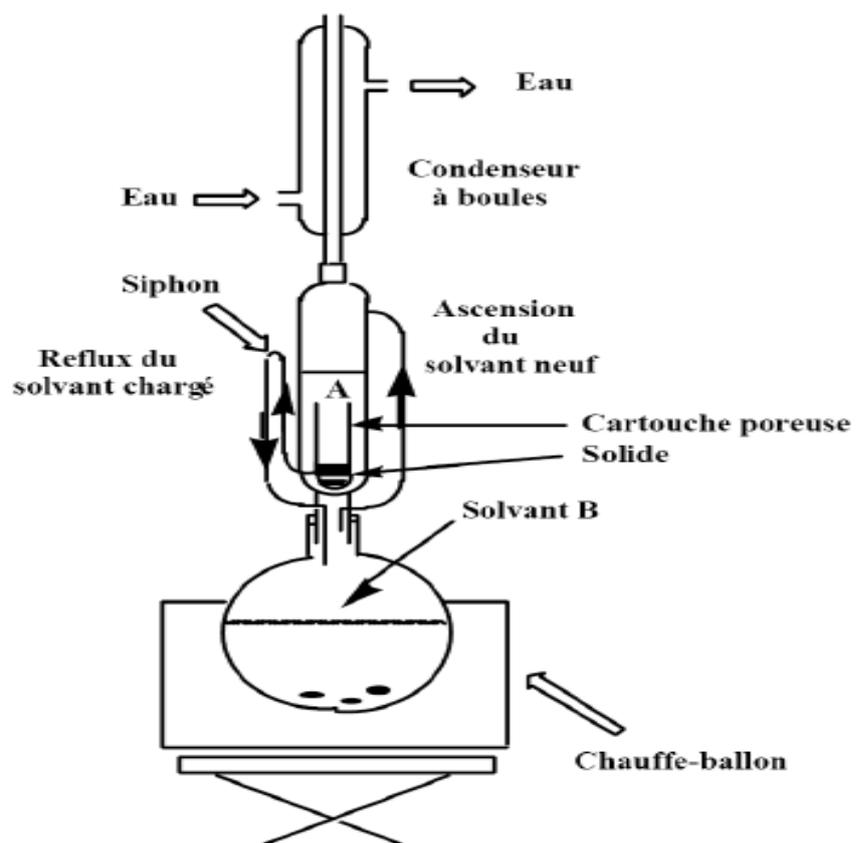


Figure 7.1: Dispositif d'extraction [233].

## **7.1.2. Méthodes**

### **7.1.2.1. Evaluation des performances zootechniques (mortalité) et suivi de l'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif des poulets de chair.**

#### **7.1.2.1.1. Enregistrement des cas de mortalité et autopsie**

Les taux de mortalité par phase d'élevage et global ont été déterminé par dénombrement des cadavres quotidiennement. Nous n'avons pas pris en considération les cas de mortalité enregistrés lors des trois premiers jours à cause du stress dû au transport.

Une autopsie a été systématiquement effectuée sur les cas de mortalité.

#### **7.1.2.1.2. Suivi de l'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif des poulets de chair.**

##### **7.1.2.1.2.1. Procédure d'échantillonnage**

Afin de suivre l'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries, nous avons réalisé un prélèvement :

- au moment de la mise en place des animaux (**J<sub>1</sub>**) pour vérifier le niveau de contamination de tube digestif de poussin.
- tous les deux jours, dès le début d'élevage jusqu'à **J<sub>26</sub>** pour la mise en évidence du jour d'installation d'une flore lactique importante.
- hebdomadaire, à partir **J<sub>26</sub>** pour suivre l'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries.

#### **7.1.2.1.2.2. Prélèvements de masse intestinale**

Les prélèvements de masse intestinale ont réalisés comme décrits dans la première partie expérimentale de l'étude (chapitre 6).

#### **7.1.2.1.2.3. Préparation des échantillons**

Toute la masse intestinale retenue est introduite aseptiquement dans un sachet stérile de type « Stomacher 400 » contenant au préalable 50ml de diluant soit le TSE. Le tout est homogénéisé à l'aide d'un appareil Stomacher® pendant 8 min. Après homogénéisation, on obtient une solution à partir de laquelle nous avons introduit 1ml dans 9ml TSE considéré comme solution mère, une série de dilutions décimales ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , ...  $10^{-7}$ ) est alors été réalisée dans des tubes contenant 9 ml de TSE. Ces dilutions serviront à la recherche et le dénombrement de la flore lactique et les Entérobactéries selon le protocole décrit dans la première partie expérimentale de l'étude.

#### **7.1.2.2. Evaluation de l'effet de l'extrait brut de l'anticoccidien *Yucca schidigera* sur la croissance *P.acidilactici* et de quelques souches pathogènes**

##### **7.1.2.2.1. Préparation de l'extrait brut**

Les substances bioactives présentes dans la poudre de « *Yucca schidigera* » sont extraites par le méthanol selon la méthode de Coinu *et al.* [234] :

- Dans un siphon de 250 ml d'un montage Soxhlet, introduire la cartouche qui comporte 10 à 30 g de poudre de *Yucca schidigera* (figure 7.1);

- Introduire 300ml de méthanol à 70% (v/v) dans un ballon de 500ml et le chauffer à température de 60 °C pour une durée de six heures afin d'extraire le maximum de son principe actif ;
- L'extrait obtenu est évaporé sous vide à température de 60 °C puis repris dans l'eau distillée selon le rendement (par exemple pour une matière sèche de 1g on ajoute 1 à 2 ml d'eau distillé).

#### **7.1.2.2. Evaluation de l'effet de l'extrait brut de *Yucca schidigera* sur la croissance de *P. acidilactici***

La croissance de *P. acidilactici* a été suivie sur milieu MRS additionné de l'extrait brut de *Yucca schidigera* préalablement préparé à raison de 2%. La cinétique de croissance (0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h) a été évaluée par dénombrement des cellules viables sur milieu gélosé soit MRS et le pH du milieu cultivé a été mesuré aux mêmes intervalles. Deux paramètres ont été utilisés pour décrire la cinétique de croissance : le temps de génération (G) et le taux de croissance ( $\mu$ ).

$$\mathbf{G = T. \text{Log } 2 / (\text{Log } N_F - \text{Log } N_I) \text{ (min) et } \mu = 1/G \text{ (h}^{-1}\text{)}}$$

**Log  $N_F$**  : logarithme du nombre des UFC obtenu au temps final ; **Log  $N_I$**  : logarithme du nombre des UFC obtenu au temps initial

Nous avons testé l'action de différentes concentrations de l'extrait brut de *Yucca schidigera* sur le développement de *P. acidilactici* par la méthode des disques pour arrêter sa concentration d'utilisation à 786mg/ml.

### **7.1.2.2.3. Evaluation de l'effet de l'extrait brut de *Yucca schidigera* sur la croissance des souches pathogènes**

Nous avons utilisé la méthode de diffusion pour tester l'effet inhibiteur de l'extrait de *Yucca schidigera* vis-à-vis les souches cibles (*E. Coli*, *S. aureus*, *Salmonella sp.* et *Streptococcus sp*)(chapitre 6).

## 7.2. Résultats et discussion

### 7.2.2. Evaluation des performances zootechniques (mortalité) et suivi de l'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif des poulets de chair.

#### 7.2.2.1. Le taux de mortalité

Les taux de mortalité par phase d'élevage, calculés sur la base des mortalités enregistrées quotidiennement sont rapportés dans le tableau 7.1.

Tableau 7.1: Taux de mortalité enregistrés dans les deux lots durant la période d'élevage.

Période		Lot témoin	Lot expérimental
<b>Démarrage</b>	<b>J<sub>4</sub> – J<sub>28</sub></b>	<b>10,1%</b>	4,5%
<b>Croissance</b>	<b>J<sub>29</sub> – J<sub>42</sub></b>	2,5%	<b>0,8%</b>
<b>Finition</b>	<b>J<sub>43</sub>- J<sub>55</sub></b>	2,9%	1,3%
<b>Global</b>	<b>J<sub>4</sub> – J<sub>55</sub></b>	<b>14,7%</b>	<b>6,5%</b>

Nous avons enregistré un taux de mortalité important dans le lot témoin (14,7%) par rapport au lot expérimental (6,5%). La situation relative à l'importante mortalité observée chez le lot témoin semble être conséquente à l'apparition de la coccidiose à J<sub>18</sub> (10,1% : période de démarrage) ; confirmée par l'observation de signes pathognomoniques d'une coccidiose caecale observées à l'autopsie des cadavres (figure 7.2); ce qui nous a contraint à l'instauration de traitement à base de sulfamides. La faible mortalité (4,5%) enregistrée chez le lot expérimental trouve son explication dans l'efficacité de l'anticoccidien à base de l'extrait naturel de *Yucca schidigera*, instauré préventivement. Il est à noter que le plus faible taux de mortalité (0,8%) a été enregistré chez le lot expérimental durant la période de croissance.

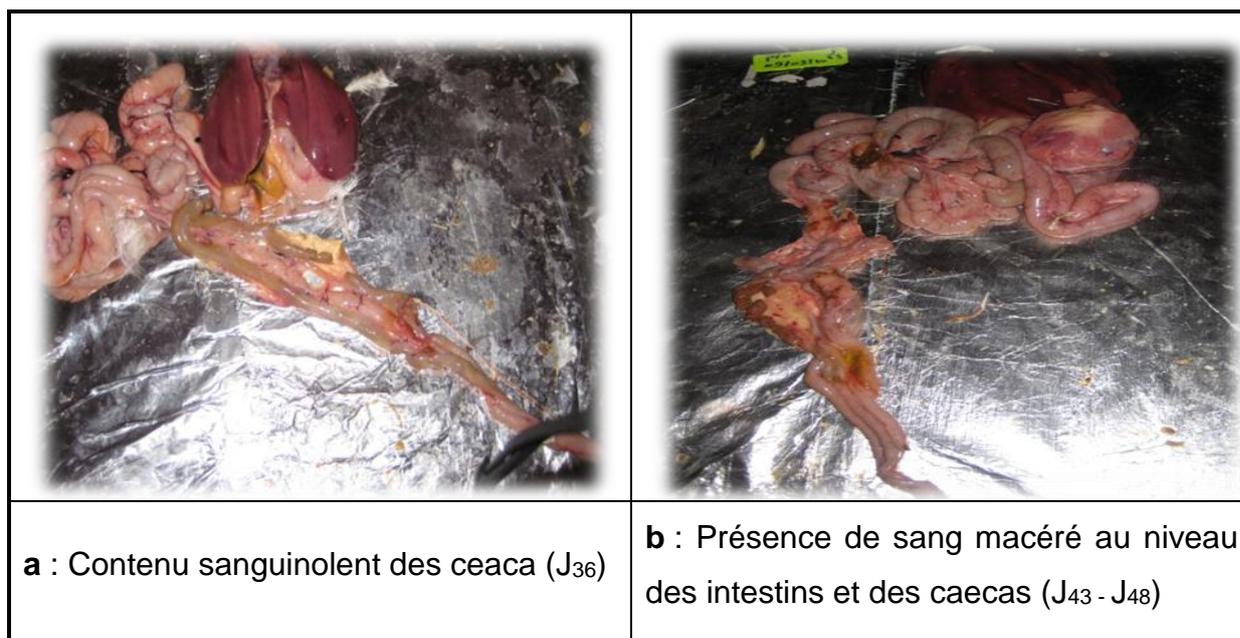


Figure 7.2: Lésions observées à l'autopsie des cas de mortalité du lot témoin

#### **7.2.2.2. Suivi de l'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif des poulets de chair.**

Les résultats de dénombrement de la flore lactique et des Entérobactéries obtenus dans les prélèvements de masse intestinale des sujets à leur mise en place (avant abreuvement et alimentation) sont rapportés dans le tableau 7.2.

Tableau 7.2: Résultats de dénombrement de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif des sujets de la mise en place.

Flore lactique		Entérobactéries	
UFC/ml	Log UFC/ml	UFC/ml	Log UFC/ml
2,70.10 <sup>5</sup>	5,43	9,45.10 <sup>5</sup>	5,97

Les résultats obtenus ont révélé la présence de la flore lactique et des Entérobactéries à des charges relativement importantes (2,70.10<sup>5</sup>UFC/ml et 9,45.10<sup>5</sup> UFC/ml, respectivement). Cette situation ne peut trouver d'explication que par la

contamination des couvoirs et des moyens de transport et de conditionnement utilisés.

Les résultats de dénombrement de la flore lactique et des Entérobactéries obtenus dans les prélèvements de masse intestinale des sujets des lots "témoin" et "expérimental" sont rapportés dans le tableau 7.3 et la figure 7.3 ci-après

Tableau 7.3: Résultats de dénombrement de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif des sujets des lots "témoin" et "expérimental" durant la période d'élevage.

Période d'élevage (jours)	Lot témoin				Lot expérimental			
	Flore lactique		Entérobactéries		Flore lactique		Entérobactéries	
	UFC/ml	Log UFC/ml	UFC/ml	Log UFC/ml	UFC/ml	Log UFC/ml	UFC/ml	Log UFC/ml
3	$5,63.10^4$	4,75	$8,81.10^6$	6,94	$1,55.10^5$	5,19	$1,63.10^7$	7,21
5	$2,18.10^5$	5,33	$4,54.10^4$	4,65	$1,50.10^4$	4,17	$2,41.10^5$	5,38
7	$1,07.10^5$	5,03	$1,5.10^6$	6,17	$5,45.10^3$	3,73	$1,81.10^4$	4,25
9	$2,07.10^4$	4,31	$1,30.10^6$	6,11	$1,36.10^4$	4,13	$5,72.10^5$	5,75
11	$1,44.10^5$	5,16	$6,63.10^6$	6,82	$1,45.10^4$	4,16	$2,36.10^5$	5,37
13	$2,54.10^7$	7,40	$5,9.10^5$	5,77	$1,5.10^4$	4,18	$8,18.10^5$	5,91
15	$1,00.10^4$	4,00	$5,27.10^4$	4,72	$2,81.10^4$	4,44	$1,8.10^6$	6,25
17	$5,45.10^4$	4,73	$4,90.10^3$	3,69	$7,18.10^4$	4,85	$5,45.10^5$	5,73
19	$1,36.10^4$	4,13	$6.10^4$	4,77	$7,27.10^4$	4,86	$2,27.10^5$	5,35
21	$1,81.10^4$	4,25	$8,81.10^4$	4,94	$1,63.10^5$	5,21	$10^6$	6,00
26	$2,55.10^4$	4,40	$2,5.10^5$	5,40	$1,75.10^5$	5,24	$9,09.10^5$	5,95
34	$1,5.10^4$	4,13	$1,5.10^5$	6,17	$2,62.10^4$	4,41	$6,4.10^2$	2,8
41	$2,7.10^3$	3,43	$5,4.10^2$	2,73	$3,4.10^6$	6,53	$4,5.10^2$	2,65
50	$1,40.10^3$	3,15	$2,72.10^2$	2,43	$3,31.10^3$	3,52	absence	/

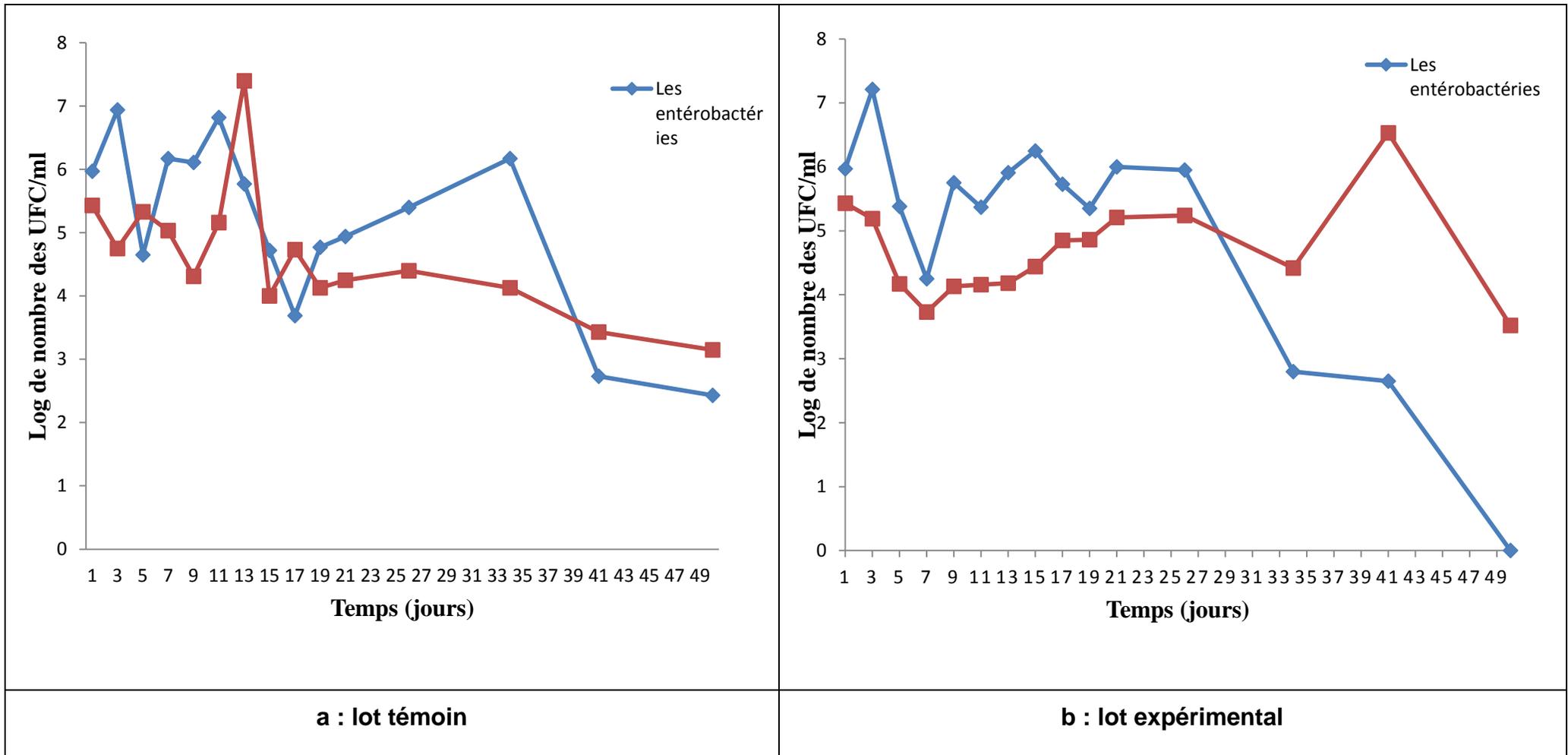


Figure 7.3: Courbe d'évolution de la flore lactique et des Entérobactéries dans le tube digestif des sujets des lots "témoin" et "expérimental" durant la période d'élevage.

Chez le lot témoin, nous avons observé une évolution « anarchique » de la flore lactique et des Entérobactéries, d'une part et une population importante des Entérobactéries à partir de J<sub>18</sub> malgré l'administration du traitement de la coccidiose à base d'antibactériens, en l'occurrence les Sulfamides, d'autre part. L'importante charge en Entérobactéries et mortalité enregistrée nous interpelle sur l'efficacité du traitement utilisé dans cet essai.

Chez le lot expérimental, nous avons observé une population des Enterobactéries assez importante entre J<sub>18</sub> et J<sub>26</sub> qui tend à diminuer jusqu'à disparition en fin d'élevage. Quant à la flore lactique, elle a augmenté lentement entre J<sub>7</sub> et J<sub>41</sub>. Ce constat est probablement dû à l'effet barrière qui apparaît tardivement (J<sub>29</sub>) par rapport à l'essai précédent (J<sub>19</sub>) et qui pourrait s'expliquer par :

- L'installation tardive d'une flore lactique importante.
- Les compétitions entre les différentes populations conséquentes à la forte contamination du tube digestif des poussins observée à J<sub>1</sub>, particulièrement les Entérobactéries.

Ce constat pourrait être dû à l'association du probiotique avec l'extrait de *Yucca schidigera*. Pour répondre à cette situation, nous nous proposons d'évaluer *in vitro* l'effet de l'extrait brut de *Yucca schidigera* sur la croissance de :

1. *P. acidilactici*.
2. certaines souches pathogènes.

### **7.2.3. Evaluation de l'effet de l'extrait brut de l'anticoccidien *Yucca schidigera* sur la croissance *P.acidilactici* et de quelques souches pathogènes**

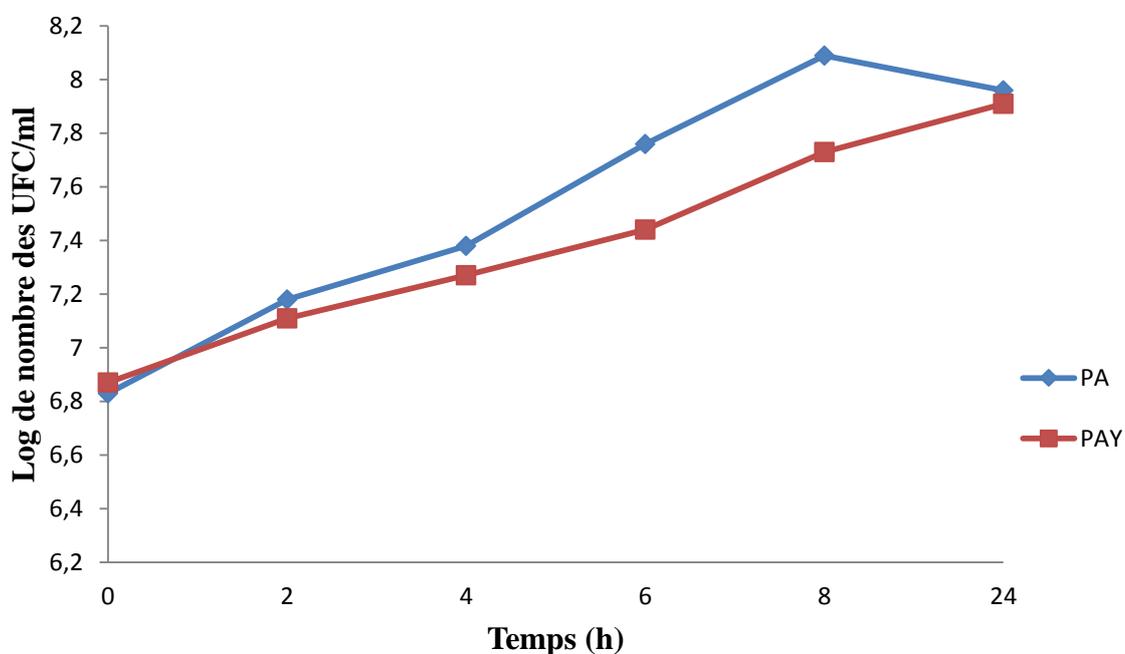
#### **7.2.3.1. Evaluation de l'effet de l'extrait brut de *Yucca schidigera* sur la croissance de *P. acidilactici***

Les résultats de dénombrement (exprimés en Log UFC/ml) et valeurs de pH obtenus pour la cinétique de croissance (à 24 h) de *P. acidilactici* sur milieu MRS seul ou additionné de l'extrait brut de *Yucca schidigera* (786mg/ml) à raison de 2% sont rapportés dans le tableau 7.4.

Tableau 7.4 : Résultats de dénombrement (exprimés en Log UFC/ml) et valeurs de pH obtenus pour la cinétique de croissance (à 24 h) de *P. acidilactici* sur milieu MRS seul ou additionné de l'extrait brut de *Yucca schidigera*.

Temps (h)	Milieu MRS seul		Milieu MRS enrichi avec l'extrait brut de <i>Yucca schidigera</i> à raison de 2%	
	Log UFC/ml	pH	Log UFC/ml	pH
0	6,83	6,1	6,87	6,22
2	7,18	5,72	7,11	6,05
4	7,38	5,35	7,27	5,73
6	7,76	5,01	7,44	5,45
8	8,09	4,74	7,73	5,10
24	7,96	4,20	7,91	4,65
Temps de génération	115mn		168mn	
Taux de croissance	0,52 division/h		0,35 division/h	

Les courbes de croissance de *P. acidilactici* sur milieu MRS seul ou additionné de l'extrait brut de *Yucca schidigera* sont présentées graphiquement dans la figure 7.4.



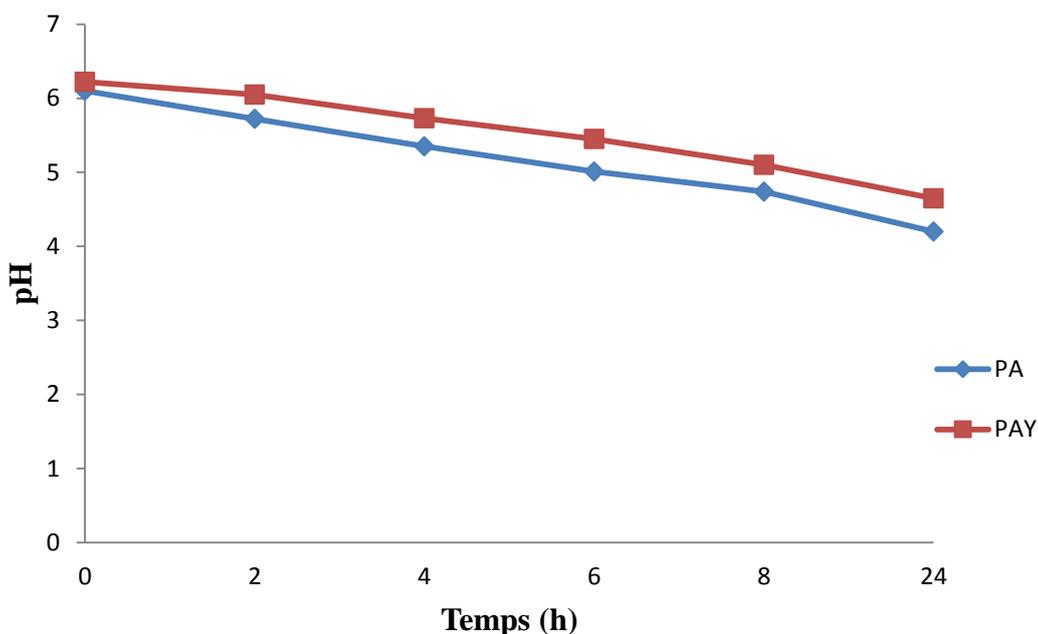
PA : *P. acidilactici* cultivé sur MRS seul, PAY : *P. acidilactici* cultivé sur MRS additionné de *Yucca schidigera*

Figure 7.4: Courbes de croissance de *P. acidilactici* sur milieu MRS seul ou additionné de l'extrait brut de *Yucca schidigera* (786mg/ml) à raison de 2%.

Les résultats montrent que la population de *P. acidilactici* évolue en fonction du temps dans les deux milieux de culture :

- Elle augmente de  $6,8 \cdot 10^6$  UFC/ml à  $1,2 \cdot 10^8$  UFC/ml après 8h d'incubation et tend à baisser jusqu'à la fin d'incubation sur milieu MRS seul.
- Elle est croissante tout au long de l'incubation et passe de  $7,45 \cdot 10^6$  UFC/ml jusqu'à  $8,3 \cdot 10^7$  UFC/ml en fin d'incubation sur milieu MRS additionné de l'extrait brut de *Yucca schidigera*.

Les résultats de l'évolution des valeurs de pH obtenus pour la cinétique de croissance (à 24 heures) de *P. acidilactici* sur milieu MRS seul ou enrichi avec l'extrait brut de *Yucca schidigera* à raison de 2% sont présentés graphiquement dans la figure 7.5.



PA : *P. acidilactici* cultivé sur MRS seul, PAY : *P. acidilactici* cultivé sur MRS additionné de *Yucca schidigera*

Figure 7.5: Courbes d'évolution des valeurs de pH pour la cinétique de croissance de *P. acidilactici* sur milieu MRS seul ou enrichi avec l'extrait brut de *Yucca schidigera*.

Le traitement des résultats a montré que :

- le taux de croissance de *P. acidilactici* obtenu pour les 6 premières heures d'incubation sur milieu MRS seul (0,52 division/h) est supérieur à celui obtenu sur milieu enrichi avec l'extrait brut de *Yucca schidigera* (0,35 division/h) et la quantité de biomasse obtenue sur milieu MRS seul (7,76 log UFC/ml) après 6 heures d'incubation est presque similaire de celle obtenue sur milieu MRS additionné de l'extrait brut de *Yucca schidigera* (7,73 log UFC/ml) après 8h d'incubation.

- L'addition au milieu MRS de l'extrait brut de *Yucca schidigera* à raison de 2% ne permet à *P. acidilactici* de faire baisser le pH du milieu à 5,10 qu'après 8h d'incubation alors qu'en milieu MRS seul, cette valeur (5,01) est obtenue après seulement 6 d'incubation. La production d'acide lactique est donc plus abondante sur milieu MRS seul qu'additionné de l'extrait brut de *Yucca schidigera*.

Par conséquent, nous pouvons dire que la culture en présence de l'extrait brut de *Yucca schidigera* accuse un ralentissement de croissance et un abaissement du pH équivalent à deux (2) heures ; c'est-à-dire que l'extrait brut de *Yucca schidigera* a une action ralentissant sur la croissance de *P. acidilactici*.

L'étude de Salem *et al.* [235] a montré que des métabolites secondaires extraits de la plante *Acacia saligna leaves* tels les polyphénols totaux et les saponines ayant des effets négatifs sur la croissance de *L. plantarum*, *E. faecium* isolées de tube digestif de moutons. Tandis, Grandhi [236] a signalé un effet simulant de l'extrait de *Yucca schidigera* sur la croissance des bifidobactéries.

#### **7.2.3.2. Evaluation de l'effet de l'extrait brut de *Yucca schidigera* sur la croissance de certaines souches pathogènes**

Les résultats de l'activité inhibitrice de différentes concentrations de l'extrait brut de *Yucca schidigera* vis-à-vis des souches intestinales étudiées sont représentés par le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques et rapportés dans le tableau 7.5 et la figure 7.6.

Tableau 7.5 : Diamètre de la zone d'inhibition autour des disques (mm) de différentes concentrations l'extrait brut de *Yucca schidigera* vis-à-vis les souches intestinales étudiées.

Souches indicatrices testées	Concentration de l'extrait brut de <i>Yucca schidigera</i> (mg/ml)				
	786	393	196	98	49
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0
<i>Salmonella sp.</i>	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	2	0	0	0
<i>Streptococcus sp</i>	20	19	18	15	14

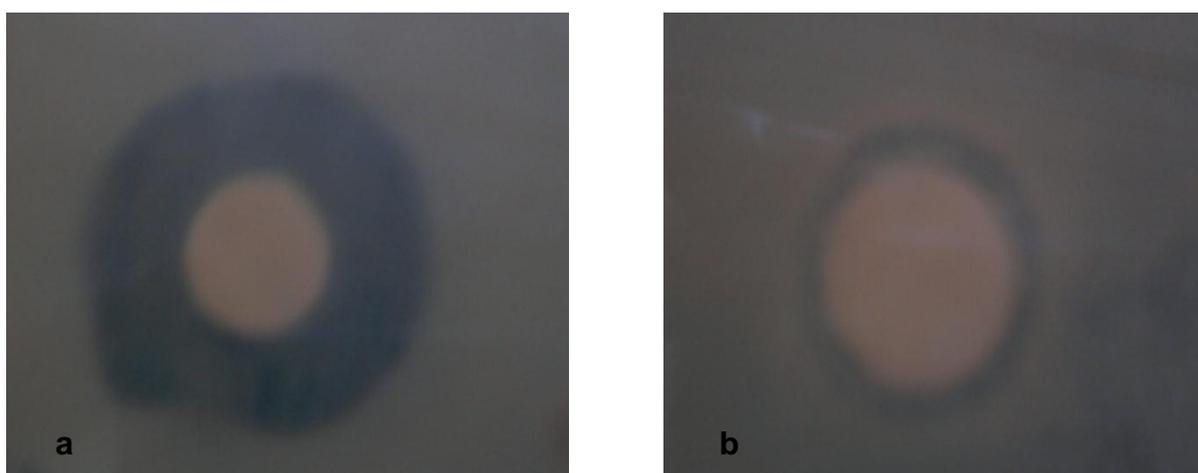


Figure 7.6 : Illustration de l'activité inhibitrice de l'extrait brut de *Yucca schidigera* (à la concentration de 393mg/ml) vis-à-vis *Streptococcus sp* (a) et *Staphylococcus aureus* (b).

Les zones d'inhibition obtenues montrent que les substances extraites présentent un effet antibactérien vis-à-vis des bactéries Gram positives testées seulement (*Staphylococcus aureus* et *Streptococcus sp*: 2 et 20 mm, respectivement).

L'action inhibitrice de *Yucca schidigera* et les propriétés antimicrobiennes de leurs substances bioactives, particulièrement les saponines a déjà été rapporté par

de nombreux auteurs [237 ; 238 ; 191]. La souche *Streptococcus sp.* s'est avérée la plus sensible à l'action de notre extrait, résultat qui est en accord avec ceux de Wang *et al.* [189] indiquant que les saponines stéroïdes de *Yucca schidigera* inhibent la croissance de *Streptococcus bovis* ainsi que d'autres bactéries du rumen (*Prevotella bryantii* et *Ruminobacter amylophilus*). En effet, Wallace *et al.* [175] ont rapporté un effet inhibiteur des saponines de *Yucca schidigera* vis-à-vis des microbes du rumen. Pour ce qui est de la résistance des bactéries Gram négatives testées enregistrée vis-à-vis de notre extrait, particulièrement pour *E. coli*, la même observation a été rapportée par Sen *et al.* [239] qui ont signalé que la croissance d'*E. coli* était stimulée en présence de saponines de *Yucca schidigera* jusqu'à une certaine concentration (1%) ; au delà de cette dernière la croissance est inhibée.

La variabilité de la sensibilité des souches testées vis à vis de l'extrait brut de *Yucca schidigera* pourrait s'expliquer par :

- La nature de la souche testée et sa densité : Les travaux de Wang *et al.* [189] ont montré que certains champignons (*Neocallimastix frontalis* et *Piromyces rhizinflata*) sont plus sensibles vis-à-vis l'extrait de *yucca schidigera* que les bactéries. Selon Wallace *et al.* [238], Grandhi [236], Killen *et al.* [188], Peris et Calafat [240] et Cheeke [173], les bactéries Gram positives sont les plus sensibles aux extraits de *Yucca schidigera* que les bactéries Gram négatives. Cependant, les travaux de Killen *et al.* [188], montrent que les saponines de *Yucca schidigera* peuvent empêcher la croissance microbienne à de basses densités cellulaires et n'ont aucun effet sur les populations microbiennes denses.
- La dose de l'extrait : Selon Sen *et al.* [239] il existe une forte corrélation entre la concentration des saponines et l'inhibition ou stimulation d'*E. coli*.
- La méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, à savoir la méthode de diffusion dans l'agar ou la méthode de dilution. D'après nos résultats, la deuxième méthode est avérée la meilleure. En effet, selon Hammer *et al.* [241], l'activité antimicrobienne des huiles de citronnelle et d'origan observée était deux fois plus élevée avec la méthode de dilution qu'avec la méthode de diffusion.

Le mode d'action de l'extrait de *Yucca schidigera* est attribué à l'action des saponines [188] qui provoquent une diminution de la tension de surface de la membrane des cellules microbiennes entre phase hydrophile et hydrophobe causant une fragilisation [242] et une perturbation de la membrane [237]; action semblable à celle des ionophores [173].

La faible mortalité enregistrée et l'absence de signes pathognomoniques de coccidiose sont révélatrices de l'efficacité de l'anticoccidien à base de *Yucca schidigera* instauré préventivement en élevage de poulet de chair dans les conditions actuelles du terrain algérien

Au vu des résultats obtenus dans les deux essais, l'effet barrière retardé (J<sub>29</sub> vs J<sub>19</sub>) ne peut être que la conséquence de l'association de *P. acidilactici* avec *Yucca schidigera*. Le ralentissement de croissance et l'abaissement du pH mis en évidence sur la culture *in vitro* sont révélateurs de l'action inhibitrice de l'extrait brut de *Yucca schidigera* sur la croissance de *P. acidilactici*.

Les travaux de Saunier *et al.* [243], portant sur des souris nourries avec une alimentation additionnée de l'extrait de *Yucca schidigera*, rapportent une légère altération de la flore lactique et une inhibition de la croissance des flores potentiellement pathogènes.

Cependant, les travaux de Wang et Kim [244] portant sur les poules pondeuses, ont montré que l'association de 120 mg/Kg d'extrait de *Yucca schidigera* avec 120 mg/Kg d'acide caprylique n'a eu aucun effet sur la croissance des lactobacilles mais a réduit la prolifération d'*E. coli*; cet effet semble s'expliquer par l'ajout de l'acide caprylique au régime, ce qui permet la réduction du pH gastro-intestinal qui est défavorable à la croissance des bactéries potentiellement pathogènes (*E. coli*). Une étude similaire menée par Czerwiński *et al.* [245] portant sur l'effet de l'association d'un probiotique et d'une levure *Saccharomyces cerevisiae* avec un extrait de *Yucca schidigera* sur la microflore digestive des poulets, a révélé que la croissance de la flore lactique (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* et *Enterococcus*) n'était pas affecté par ce régime. Ce qui nous autorisons à émettre

l'hypothèse que la dose de probiotique *P.acidilactici* utilisée en association avec l'extrait de *Yucca schidigera* est insuffisante pour l'installation d'une flore lactique importante et par conséquent d'un effet barrière.

## CONCLUSION

Le présent travail est une continuité de travaux réalisés dans le cadre de PFE et magister portant sur l'utilisation des substituts naturels des antibiotiques en élevages de poulets de chair en Algérie, particulièrement le probiotique *Pediococcus acidilactici* sur les performances zootechniques et l'extrait d'une plante naturelle « *Yucca schidigera* » comme mesure préventive de la coccidiose.

Les résultats obtenus dans la première partie ont montré que :

- La souche probiotique *P. acidilactici* a la capacité d'inhiber le développement des Entérobactéries et des souches pathogènes (*S. aureus*) isolées du tube digestif du poulet de chair. La production d'acide lactique (chute du pH) et la production de bactériocines sont l'origine de cet effet antibactérien.
- La supplémentation de *P. acidilactici* à l'aliment des poulets a favorisé le phénomène d'exclusion compétitive, à savoir l'effet barrière mis en évidence à J<sub>19</sub> ; date de début de la stabilisation de la flore lactique à un niveau relativement important accompagné de la diminution des Entérobactéries, d'une part ; l'amélioration de meilleures performances zootechniques (un gain de poids vif et un meilleur indice de consommation des poulets de chair), d'autre part. Il existe donc une relation étroite entre l'effet barrière et l'amélioration des performances zootechniques.
- Le probiotique *P. acidilactici* n'a eu aucun effet sur la coccidiose; parasitose récurrente en élevage des volailles en Algérie.

Les résultats de la deuxième partie ont révélé que :

- La faible mortalité enregistrée et l'absence de signes pathogénomiques de coccidiose chez le lot expérimental sont révélatrices de l'efficacité de l'anticoccidien à base de *Yucca schidigera* instauré préventivement en élevage des poulets.
- La supplémentation d'aliment des poulets avec l'association de *P. acidilactici* et de l'extrait de *Yucca schidigera* fait retarder l'apparition de l'effet barrière à J<sub>29</sub>.
- L'extrait brut de *Yucca schidigera* a une action inhibitrice sur la croissance et l'activité métabolique (abaissement du pH) de *P. acidilactici*, ainsi la souche *Streptococcus sp.* s'est avérée la plus sensible à l'action de cet extrait contrairement aux souches d'Entérobactéries qui sont pratiquement résistantes.

Cependant il est à noter que l'usage de l'anticoccidien Toltrazuril (Baycox) dès l'apparition de la coccidiose en élevage des poulets à J<sub>30</sub> au premier essai fait annuler la croissance des Entérobactéries et n'a eu aucun effet sur le développement de la flore lactique. Contrairement à ce que nous avons enregistré dans le deuxième essai ; l'usage d'un anticoccidien à base de sulfamides n'a eu aucun effet sur la croissance des Entérobactéries. Par conséquent, cette confirmation est intéressante pour le choix des traitements.

L'ensemble de ce travail de mémoire a permis de dire que le probiotique *P. acidilactici* utilisé seul ou en association avec l'extrait de *Yucca schidigera* agit favorablement sur l'équilibre intestinal de la flore digestive des poulets ; accroissement des populations désirables (flore lactique) et réduction de la prolifération des flores potentiellement pathogènes (Entérobactéries) probablement par le phénomène d'exclusion compétitive ou effet barrière qui se répercute sur l'état sanitaire et les performances zootechniques des poulets (poids et taux de mortalité). Ceci permettrait la préservation de la qualité des viandes de poulets et par conséquent la santé du consommateur.

## PERSPECTIVES

Les résultats obtenus lors de la présente étude ouvrent des nouvelles perspectives, à savoir:

- L'évaluation de la qualité nutritionnelle des viandes (cholestérol, triglycerides) et la qualité sensorielle auprès des consommateurs.
- L'évaluation des effets de probiotique *P. acidilactici* sur l'immunité de poulet.

**APPENDICE A**  
**LISTE DES ABREVIATIONS**

**ADN** : Acide déoxyribonucléique

**AFSSA** : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

**AGV**: acides gras volatiles

**ARN 16S** : Acide ribonucléique 16S

**ARN** : Acide ribonucléique

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

**FAO**: Food and Agriculture Organisation

**FDA**: Food and Drug Administration

**GMQ**: Gain moyen quotidien

**GRAS**: generally regarded as safe

**IC**: indice de consommation

**Ig** : Immunoglobuline

**IgA** : immunoglobuline A

**IgM** : immunoglobuline M

**IL** : Interleukine

***L*** : *Lactobacillus*

**Log** : Logarithmique (Logarithme décimal)

**MDRA** : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural

**MH** : Milieu Muller Hinton

**MRS**: Milieu de Man, Rogosa, Sharpe

**NaCl** : chlorure de sodium

**NaOH** : hydroxyde de sodium

**NH<sub>3</sub>** : AMMONIAQUE

**Nod** : Nucleotide oligomerization domain (domaine d'oligomérisation de nucléotide)

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

***P acidilactici*** : *Pediococcus acidilactici*

**P/2J** : prélèvement chaque deux jours

**P/H** : Prélèvement hebdomadaire

**PCR** : Polymerase chain reaction, Amplification par réaction en chaîne

**pH** : potentiel d'hydrogène

**ppm** : partie par million

**PV** : Poids vif

**RFLP** : Restriction fragment length polymorphism

***S. aureus*** : *Staphylococcus aureus*

**SII** : système immunitaire intestinal

**T** : température (°C)

**t** : temps (min ou h)

**TLR**: Toll-like receptor (récepteur Toll)

**tRFLP** : terminal RFLP

**TSE** : Triptone Sel Eau

**UFC** : Unité Formant Colonie

**VRBG** : Gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre

**APPENDICE B**  
**LES MILIEUX DE CULTURE**

L'aliment utilisé, de type farineux, a été produit spécialement pour notre expérimentation sur la base d'une formulation tenant compte des trois phases d'élevage (démarrage, croissance et finition) comme rapporté dans le tableau suivant :

<b>Composants %</b>	<b>Phase démarrage</b>	<b>Phase croissance</b>	<b>Phase finition</b>
<b>Mais</b>	64,2	66,2	69,2
<b>tourteaux de soja</b>	32	30	27
<b>phosphate bi-</b>	1,7	1,7	1,7
<b>Calcaire</b>	1	1	1
<b>CMV*</b>	1	1	1
<b>Sel de table</b>	0,1	0,1	0,1

## APPENDICE C

### LES MILIEUX DE CULTURE

- **Gélose MRS (Man Rogosa Sharp)**

<b>Composé</b>	<b>Quantité (g/L d'eau distillée)</b>
Peptone	10
Extrait de levure	4
Extrait de viande	8
Glucose	20
Hydrogénophosphate de potassium	2
Acétate de sodium	5
Citrate d'ammonium	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
Tween 80	1 (mL/L)
Agar	15

pH=6,2

- **Gélose M17**

<b>Composé</b>	<b>Quantité (g/L d'eau distillée)</b>
Peptone	10
Extrait de levure	4
Extrait de viande	8
Glucose	20
Hydrogénophosphate de potassium	2
Acétate de sodium	5
Citrate d'ammonium	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
Tween 80	1 (mL/L)
Agar	15

pH=7,2

- **Bouillon nutritif**

<b>Composé</b>	<b>Quantité (g/L d'eau distillée)</b>
Peptone	5g
Extrait de levure	2g
Extrait de viande	19
Chlorure de sodium	5g
Eau distillée	11

- **Gélose Mac Conkey**

<b>Composé</b>	<b>Quantité (g/L d'eau distillée)</b>
Peptone	20
Lactose	10
Sel biliaires	1,5
Cristal violet	0,001
Chlorure de sodium	5
Rouge neutre	0,05
Agar	15

pH = 7,4

- **Gélose Chapman**

<b>Composé</b>	<b>Quantité (g/L d'eau distillée)</b>
Peptone	10
Extrait de viande de bœuf	1
Mannitol	10
Rouge de phénol	0,025
Chlorure de sodium	75
Agar	15

pH = 7,4

- **Gélose Hektoen**

<b>Composé</b>	<b>Quantité (g/L d'eau distillée)</b>
Protéose-peptone	12
Extrait de levure	3
Lactose	12
Saccharose	12
Salicine	2
Citrate de fer ammoniacal	1,5
Sels biliaires	9
Fuchsine acide	0,1
Bleu de bromothymol	0,065
Chlorure de sodium	5
Thiosulfate de sodium	5
Agar	14

pH = 7,6

- **Gélose VRBG**

<b>Composé</b>	<b>Quantité (g/L d'eau distillée)</b>
Extrait de levure	3
Peptone	7
Chlorure de sodium	5
Sels biliaires	1,5
Glucose	10
Rouge neutre	0,03
Cristal violet	0,002
Agar	12

pH 7,4 ± 0,2

- **Gélose Mueller-Hinton**

<b>Composé</b>	<b>Quantité (g/L d'eau distillée)</b>
Peptone de caséine	300 ml
Infusion de viande bœuf	17,5
Amidon de maïs	1,5
Agar	17

pH = 7,4

- **Bouillon TSB**

<b>Composé</b>	<b>Quantité (g/L d'eau distillée)</b>
Peptone de caséine	17
Peptone de farine de soja	3
Glucose	2,5
Chlorure de sodium	5
Phosphate dipotassique	2,5

pH = 7,3±0,2

## APPENDICE D

### RESULTATS DU DENOMBREMENT DE *P.acidilactici*, *E.coli* et *S. aureus* LORS DE L'INTERACTION BACTERIENNE

**Tableau 1** : Nombre des UFC de *P. acidilactici* en culture pure sur milieu MH en fonction du temps (h).

Temps (h)	Nombre de colonies			Nombre des UFC/ml	Log du nombre des UFC/ml
	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
0	53	05	/	4,8 x 10 <sup>6</sup>	6,68
2	94	20	/	8,5 x 10 <sup>6</sup>	6,93
4	163	27	/	1,7 x 10 <sup>7</sup>	7,23
6	200	35	05	2,1 x 10 <sup>7</sup>	7,33
8	280	65	15	3,1 x 10 <sup>7</sup>	7,49
24	/	76	10	6,8 x 10 <sup>7</sup>	7,83
48	290	58	8	3,2 x 10 <sup>7</sup>	7,51
72	123	32	/	1,4 x 10 <sup>7</sup>	7,14

**Tableau 2:** Nombre des unités format colonie de *P. acidilactici* en culture mixte avec *S. aureus* sur milieu MH en fonction du temps (h).

Temps (h)	Nombre de colonies			Nombre des UFC/ml	Log du nombre des UFC/ml
	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
0	53	01	/	4,8 x 10 <sup>6</sup>	6,68
2	100	05	/	9,1 x 10 <sup>6</sup>	6,95
4	128	30	/	1,4 x 10 <sup>7</sup>	7,15
6	210	60	/	2,4 x 10 <sup>7</sup>	7,39
8	294	78	/	3,4 x 10 <sup>7</sup>	7,53
24	/	77	/	7 x 10 <sup>7</sup>	7,85
48	275	73	/	3,2 x 10 <sup>7</sup>	7,51
72	120	50	/	1,5 x 10 <sup>7</sup>	7,18

**Tableau 3:** Nombre des unités format colonie de *Pediococcus acidilactici* en culture mixte avec *E.coli* sur milieu MH en fonction du temps (h).

Temps (h)	Nombre de colonies			Nombre des UFC/ml	Log du nombre des UFC/ml
	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
0	55	06	/	5 x 10 <sup>6</sup>	6,70
2	80	18	/	7,2 x 10 <sup>6</sup>	6,86
4	114	30	/	1,3 x 10 <sup>7</sup>	7,11
6	168	32	/	1,8 x 10 <sup>7</sup>	7,26
8	285	55	/	3,1 x 10 <sup>7</sup>	7,49
24	/	69	/	6,3 x 10 <sup>7</sup>	7,79
48	267	49	/	2,9 x 10 <sup>7</sup>	7,45
72	90	34	/	1,1 x 10 <sup>7</sup>	7,05

**Tableau 4:** Nombre des UFC d'*E. coli* en culture pure sur milieu MH en fonction du temps (h).

Temps (h)	Nombre de colonies			Nombre des UFC/ml	Log du nombre des UFC/ml
	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
0	60	01	/	5,4 x 10 <sup>6</sup>	6,73
2	91	02	/	8,3 x 10 <sup>6</sup>	6,91
4	135	26	01	1,2 x 10 <sup>7</sup>	7,09
6	200	41	03	2,2 x 10 <sup>7</sup>	7,34
8	/	98	01	8,9 x 10 <sup>7</sup>	7,95
24	/	120	/	1,1 x 10 <sup>8</sup>	8,03
48	/	96	/	8,7 x 10 <sup>7</sup>	7,94
72	170	35	/	1,8 x 10 <sup>7</sup>	7,27

**Tableau 5:** Nombre des UFC d'*E. coli* en culture mixte avec *P.acidilactici* sur milieu MH en fonction du temps (h).

Temps (h)	Nombre de colonies			Nombre des UFC/ml	Log du nombre des UFC/ml
	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>		
0	/	64	01	6 x 10 <sup>6</sup>	6,75
2	/	45	03	4,1 x 10 <sup>6</sup>	6,61
4	165	10	/	1,5 x 10 <sup>6</sup>	6,17
6	120	06	/	1,1 x 10 <sup>6</sup>	6,03
8	69	05	/	6,2 x 10 <sup>5</sup>	5,79
24	100	18	/	1,1 x 10 <sup>6</sup>	6,03
48	190	25	/	1,9 x 10 <sup>6</sup>	6,29
72	10 <sup>-4</sup> 167	8		1,5 x 10 <sup>5</sup>	5,18

**Tableau 6:** Nombre des UFC de *S. aureus* en culture pure sur milieu MH en fonction du temps (h).

Temps (h)	Nombre de colonies			Nombre des UFC/ml	Log du nombre des UFC/ml
	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
<b>0</b>	60	/	/	6,6 x 10 <sup>6</sup>	6,73
<b>2</b>	95	16	02	1 x 10 <sup>7</sup>	7,00
<b>4</b>	267	17	10	2,6 x 10 <sup>7</sup>	7,41
<b>6</b>	/	54	05	4,9 x 10 <sup>7</sup>	7,69
<b>8</b>	/	45	04	4,1 x 10 <sup>7</sup>	7,61
<b>24</b>	/	81	25	7,2 x 10 <sup>7</sup>	7,86
<b>48</b>	/	67	10	6,1 x 10 <sup>7</sup>	7,78
<b>72</b>	250	20	/	1,8 x 10 <sup>6</sup>	7,25

**Tableau 7:** Nombre des UFC d'*S. aureus* en culture mixte avec *P.acidilactici* sur milieu MH en fonction du temps (h).

Temps (h)	Nombre de colonies			Nombre des UFC/ml	Log du nombre des UFC/ml
	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>		
<b>0</b>	/	55	/	5x 10 <sup>6</sup>	6,69
<b>2</b>		33	16	3,1x 10 <sup>6</sup>	6,48
<b>4</b>	168	38	07	1,8 x 10 <sup>6</sup>	6,27
<b>6</b>	188	40	10	2,6 x 10 <sup>6</sup>	6,31
<b>8</b>	20	05	/	1,8 x 10 <sup>5</sup>	5,26
<b>24</b>	25	03	/	2,2 x 10 <sup>5</sup>	5,35
<b>48</b>	65	/	/	5,9 x 10 <sup>5</sup>	5,77
<b>72</b>	10 <sup>-4</sup> 164	10 <sup>-5</sup> 15	/	1,3 x 10 <sup>6</sup>	5,13

## APPENDICE E

### RESULTATS DU DENOMBREMENT DE *P.acidilactici* CULTIVE SUR MILIEU MRS SEUL OU ENRICHI AVEC L'EXTRAIT BRUT DE *Yucca schidigera*

**Tableau 1:** Nombre des UFC de *P. acidilactici* cultivé sur milieu MRS en fonction du temps (h).

Temps (h)	Nombre de colonies			Nombre des UFC/ml	Log du nombre des UFC/ml
	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
0	75	03	/	6,8 x 10 <sup>6</sup>	6,83
2	150	18	/	1,5 x10 <sup>7</sup>	7,18
4	245	24	09	2,4 x10 <sup>7</sup>	7,38
6	/	64	12	5,6 x10 <sup>7</sup>	7,76
8		138	27	1,2 x10 <sup>8</sup>	8,09
24	/	102	22	9,3 x10 <sup>7</sup>	7,96

**Tableau 2:** Nombre des UFC de *P.acidilactici* cultivé sur milieu MRS enrichi avec l'extrait brut de *Yucca schidigera* (2%) en fonction du temps (h).

Temps (h)	Nombre de colonies			Nombre des UFC/ml	Log du nombre des UFC/ml
	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
<b>0</b>	82	01	/	7,4 x10 <sup>6</sup>	6,87
<b>2</b>	145	03	01	1,3 x10 <sup>7</sup>	7,11
<b>4</b>	206	20	05	1,8 x10 <sup>7</sup>	7,27
<b>6</b>	267	38	01	2,7x10 <sup>7</sup>	7,44
<b>8</b>	/	60	09	5,4x10 <sup>7</sup>	7,73
<b>24</b>	/	91	08	8,2 x10 <sup>7</sup>	7,91

## REFERENCES

1. **CREAD**, Centre de Recherche en Economie Appliquée pour le Développement, Division Agriculture, Territoire et Environnement, Alger.
2. **Ungemach, F.R., Müller-Bahrtdt, D. and Abraham, G.**, Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine, *Int. J. Med. Microbiol.*, V.296, n°2, (2006), 33-38.
3. **Corpet, M.**, Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques, *Rev. Med. Vet.*, (147), (1995), 851-862.
4. **Dorman, H.J.D. and Deans, S.G.**, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, *Journal of Applied Microbiology*, V.88, (2000), 308-316.
5. **Simon, O.**, Micro-organisms as Feed Additives- Probiotics. *Advances in Pork Production*, V.16, (2005), 161p.
6. **Vittorio, S. A., Mauro, F., Carla, B., Giovanna, D. D., Giovanni, S. et Chevaux, E.**, Effets de l'addition de *Pediococcus acidilactici* dans la ration de poulets de chair sur les performances zootechniques et la microflore intestinale, 6<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Avicole, St Malo (FRA), (2005), 208-211.
7. **Awad, W.A., Afify, M. A., Zouel-Fakar, S.A., Shalaby, B., Chevaux, E., Delforge, J., Dussert, L. et Khetrou, M.**, Effets de l'addition de *Pediococcus acidilactici* sur l'infection à *Escherichia coli* et sur la colonisation par *Clostridium perfringens* et *Salmonella typhimurium* chez le poulet, In: *Proceedings des 6èmes Journées de la Recherche Avicole*, (2005), 502-505.

8. **Vandeplas, S., Dubois Dauphin, R., Thiry C., Beckers, Y., Welling, G.W., Thonart, P. and Théwis, A.**, Efficiency of a *Lactobacillus plantarum*-xylanase combination on growth performances, microflora populations, and nutrient digestibilities of broilers infected with *Salmonella* Typhimurium, Poultry Science, V.88, (2009), 643-1654.
9. **Higgins, S. J.P., Higgins, E., Wolfenden, A.D. ,Henderson, S.N., Torres-Rodriguez, A., Vicente, J.L. Hargis, B.M. and Tellez, G.**, Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella* Enteritidis in neonatal broilers, Poultry Science, V.89, (2010), 243-247.
10. **Djezzar, R.**, le probiotique *Pediococcus acidilactici* comme alternatif aux antibiotiques chez le poulet de chair, Mémoire de Magistère en science vétérinaires : Elevage et pathologie aviaire et cunicole, Ecole national supérieure vétérinaire-Alger, (2008), 95p.
11. **Claude, J.B.**, Introduction à la nutrition des animaux domestiques, Edition : Technique et Documentation Lavoisier, (2002), 424p.
12. **Larbier, M. et Leclercq, B.**, Nutrition et alimentation des volailles, Edition : INRA, (1992), 355p.
13. **Gabriel, I., Mallet, S. et Lessire, M.**, La microflore digestive : une composante oubliée de la nutrition des volailles, Cinquièmes Journées de la Recherche Avicole Tours, (2003).
14. **Apajalahti, J., Kettunen, A. and Graham, H.**, Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken, World's Poultry Science, V.60, (2004), 223-232.
15. **Knarreborg, A., Simon, M.A., Engberg, R.M., Jensen, B.B. and Tannock, G.W.**, Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages, Appl. Environ. Microbiol., V.68, (2002), 5918-5924.

16. **Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J.J. and Lee, M.D.,** Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing Broiler chicken. *Appl. Environ. Microbiol.*, V.69, (2003), 6816-6824.
17. **Gong, J., Forster, R.J., Yu H., Chambers, J.R., Wheatcroft, R., Sabour, P.M. and Chen, S.,** Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum, *FEMS Microbiol. Ecol.*, V.41, (2002), 171-179.
18. **Schrezenmier, J. and De Vresse, M.,** Probiotics, prebiotics, and symbiotics approaching a definition, *Am.j.Clin.Nutr.*, V.73, n°2, (2001), 361-364 .
19. **Gabriel, I., Mallet, S. et Sibille, P.,** La microflore digestive des volailles : facteurs de variation et conséquences pour l'animal, *INRA Productions Animales*, V.18, n°5, (2005), 309-322.
20. **Ducluzeau, R. et Raibaud, P.,** Écologie microbienne du tube digestif et mode d'action des probiotiques en alimentation animale, *Cahiers Agriculture*, V.3, (1994), 353-560.
21. **Hofacre, C.L., Froyman, R., Gautrias, B., George, B., Goodwin, M.A. and Brown, J.,** Use of Aviguard and other intestinal bioproducts in experimental *Clostridium perfringens*-associated necrotizing enteritis in broiler chickens, *Avian Diseases*, V.42, (1998), 579-584.
22. **La Ragione, R.M., Narbad, A., Gasson, M.J. and Woodward, M.J.,** *In vivo* characterization of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 for use as defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry, *Letters in Applied Microbiology*, V.38, (2004), 197-205.

23. **Kalliomäki, M., Salminen, S. and Isolauri, E.**, Positive interactions with microbiota: probiotics, *Advances in Experimental Medical Biology*, V.635, (2008), 57-66.
24. **Ng, S.G., Hart, A.L., Kamm, M.A., Stagg, A.J. and Knight, S.C.**, Mechanism of action of probiotics: recent advances, *Inflammatory Bowel Diseases*, V.15, (2009), 300-310 ;
25. **Roberfroid, M.B., Bornet, F., Bouley, C. and Cummings, J.H.**, Colonic microflora: nutrition and health, Summary and conclusions of an International Life Sciences Institute (ILSI) workshop held in Barcelona, Spain. *Nutr Rev.*, V.53, (1995), 127-30.
26. **Moreto, M. and Planas, J.M.**, Sugar and amino acid transport properties of the chicken caeca, *J. Exp. Zool.*, V.3, (1989), 111-116.
27. **Fonty, G. et Chaucheyras-Durand, F.**, *Les écosystèmes digestifs*. Edition : Techniques et Documentation Lavoisier, (2008), 311p.
28. **Gournier-Château, N., Larpent, J.P., Castellanos, M.I et Larpent, J.L.**, *Les probiotiques en alimentation animale et humaine*, Edition: Technique et Documentation Lavoisier, (1994), 192p.
29. **Kussaibati, R., Guillaume, J., Leclercq, B. and Lafont, J.P.**, Effect of the intestinal microflora and added bile salts on the metabolisable energy and digestibility of saturated fats in the chicken, *Arch. Geflügelkd.*, V.46, (1982), 42-46.
30. **Tannock, G.W., Dashkevich, M.P. and Feighner, S.D.**, Lactobacilli and bile salt hydrolase in the murine intestinal tract, *Appl. Environ. Microbiol.*, V.55, (1989), 1848-1851.

31. **Henry, P.R., Ammerman, C.B., Campbell, D.R. and Miles, R.D.**, Effect of antibiotics on tissue trace mineral concentration and intestinal tract weight of broiler chicks. *Poultry. Science*, V.66, (1987), 1014-1018.
32. **Braun, E.J.**, Regulation of renal and lower gastrointestinal function: role in fluid and electrolyte balance, *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, V.136, (2003), 499-505.
33. **Coates, M.E.**, The gut microflora and growth. In: *Growth in animals*. (Ed) T.L.J. Lawrence. Butterworths, London, UK, (1980), 175-188.
34. **Corthier, G.**, Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, *Nutrition clinique et métabolisme*, V.21, (2007), 76-80.
35. **Sakata, T. and Setoyam, H.**, Local stimulatory effect of short chain fatty acids on the mucus release from the hindgut mucosa of rats (*Rattus norvegicus*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.*, V.111, 429-432.
36. **Deplancke, B. and Gaskins, H.R.**, Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer, *Am. J. Clin. Nutr.*, V.73, (2001), 1131-1141.
37. **Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M.B. and Rowland I.**, Functional food science and gastrointestinal physiology and function, *Br J Nutr*. V.80, n°1, (1998), 147-171
38. **Moreau, M.C.**, L'immunité intestinale et le rôle de la microflore colique. In : *La flore intestinale : Miroir de notre santé ? Actes du colloque Yakult, faculté universitaire des sciences agronomiques, Gembloux*, (1997), 50-76.
39. **Moreau, M.C.**, Bactéries lactiques probiotiques et immunité. In : *Luquet F.M. et Corrieu G., Bactéries lactiques et probiotiques. Edition : Techniques et Documentation Lavoisier*, (2005), 307p.

40. **Ducluzeau, R. et Raibaud, P.**, Les interactions bactériennes dans le tube digestif, Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., V.8, n°2, (1989), 291-311.
41. **Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. and Huis In't Veld, J.H.**, Overview of gut flora and probiotics, Int. J. Food Microbiol V.41, (1998), 85-101.
42. **Hopkins, M. J. and Macfarlane, G.T.**, Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with Clostridium difficile infection, J Med Microbiol., V.51, n°5, (2002), 448-54.
43. **Zhu, X.Y., Zhong, T., Pandya, Y. and Joerger, R.D.**, 16S rRNA-based analysis of microbiota from the caecum of broiler chickens, Appl. Environ. Microbiol., V.68, (2002), 124-137.
44. **Mallet, S., Bouvarel, I. et Lessire, M.**, Facteurs de variation de la microflore intestinale des oiseaux domestiques : impact de l'alimentation, 4<sup>e</sup> Journée de recherche Avicoles, Nantes, France, (2001), 159-164.
45. **Suzuki K. and Kodam Y.**, Mitsuoka T., Stress and intestinal flora. Bifidobact. Microflora, V.8, (1989), 23-38.
46. **Kimura, N., Mimura, F., Nishida, S., Kobayshi, A. and Mitsuoka T.**, Studies on the relationship between intestinal flora and cecal coccidiosis in chickens, Poultry Science, V.55, (1979), 1375-1383.
47. **Mathlouthi, N., Mallet, S., Saulnier, L., Quemener, B. and Larbier, M.**, Effects of xylanase and b-glucanase addition on performance, nutrient digestibility, and physico-chemical conditions in the small intestine contents and caecal microflora of broiler chickens fed a wheat and barley-based diet, Anim. Res., V.51, (2002), 395-406.
48. **Apajalahti, J., Kettunen, A., Bedford, M. and Holden, W.**, Percent G+C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal

microbial community of broiler chickens, *Appl. Environ. Microbiol.*, V.67, (2001), 5656-5667.

49. **Engberg, R.M., Hedemann, M.S., Steinfeldt, S. and Jensen, B.B.**, Influence of whole wheat and xylanase on broiler performance and microbial composition and activity in the digestive tract, *Poultry Science*, V.83, (2004), 925-938.
50. **Jansman, A.J.M., Van der Klis, J.D., Lemme, A. and Petri, A.**, Effects of dietary protein content and ingredient composition on the growth performance and microbial activity in the digestive tract of broilers, WPSA, 14<sup>th</sup> European Symposium of Poultry Nutrition, Lille hammer, Novége, (2003), 172-173.
51. **Orban, J.I., Patterson, J.A., Sutton, A.L. and Richards, G.N.**, Effect of sucrose thermal oligosaccharide caramel, dietary vitamin-mineral level, and brooding temperature on growth and intestinal bacterial populations of broiler chickens, *Poultry Science*, V.76, (1997), 482-490.
52. **Xia, M.S., Hu, C.H. and Xu, Z.R.**, Effects of copper-bearing montmorillonite on growth performance, digestive enzyme activities, and intestinal microflora and morphology of male broilers, *Poultry Science*, V.83, (2004), 1868-1875.
53. **Fonty, G. and Chaucheyras-Durand, F.**, Les écosystèmes digestifs, Monographies de microbiologie, Larpent J.P., Edition : Lavoisier, (2007).
54. **Fortineau, O. et Troncy, P.M.**, Coccidiose, maladies animales majeures : Les coccidioses du poulet, *Rev. Elev. Méd. Vét.*, (1985), 917p.
55. **Euzeby, J.**, Patozoologie médicale et comparée: Volume 2: Myxozoa- Microspora- Ascetospora- Apicomplexa, Fondation Mérieux, (1987), 474p.
56. **Gabriel, C. et Naciri, M.**, Effet de l'alimentation sur les coccidioses chez le poulet, *INRA. Productions Animales*, V.14, (2001), 231-246.

57. **Bories, G et Louisot, P.**, Rapport concernant l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance en alimentation animale », Paris : commission interministérielle et interprofessionnelle de l'alimentation animale, Conseil supérieur d'hygiène publique de France, (1998), 3-21.
58. **Corpet, 2000**, Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques, Méd. Vét., V.151, n°2, (2000), 99-104.
59. **Moubareck, C., Bourgeois, N., Courvalin, P. and Doucet-Populaire, F.**, Multiple antibiotic resistance gene transfer from animal to human enterococci in the digestive tract of gnotobiotic mice, Antimicrob Agents Chemother, V.47, (2003), 2993-2996.
60. **Wegener, H.C.**, Antibiotics in animal feed and their role in resistance development, Current Opinion in Microbiology, V.6, (2003), 439-445.
61. **Devie P., Le goaziou A., Divol A., Olivon M., Gilbert G., Petit J. et Laurent S.**, Les antibiotiques dans l'alimentation animale, (2006), 1-30.
62. **Maertens, L., Falcao-e cunha, L. and Marounek, M.**, feed additives to reduce the use of antibiotics, In: Maertens L. and Coudert P., Recent advances in rabbit sciences, Institute for agricultural and fisheries research (ILVO), (2006), 59-266.
63. **Brenes, A. and Roura, E.**, Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action, Animal Feed Science and Technology, V.158, (2010), 1-14.
64. **Huyghebaert, G., Ducatelle, R. and Immerseel, F.V.**, An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers, The Veterinary Journal, (2010) xxx–xxx.
65. **Quigley, E.M.M.**, Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota Pharmacological Research, V.61, (2010), 213–218.

66. **Gismondo, M.R., Drago, L. and Lombardi, A.**, Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora, *Int. J. Antimicrob. Agents*, V.12, (1999), 287-292.
67. **Gibson, G.R. and Fuller, R.**, Aspects of *In vitro* and *In vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use, *American Society for Nutritional Sciences*, V.130, (2000), 391–395.
68. **Hamilton-Miller, J.M.T., Shah, S. and Winkler, J.T.**, Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms, *Public Health Nutrition*, V. 2, n°2, (2003), 223-229.
69. **Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C. and Salminen, S.**, Probiotics: Mechanisms and established effects, *International Dairy Journal*, V.9, (1999), 43-52.
70. **Fooks, L.J., Fuller R. and Gibson, G.R.**, Prebiotics, probiotics and human gut microbiology, *International Dairy Journal*, V.9, (1999), 53-61.
71. **Fuller, R.**, Probiotics in man and animals, *J. Appl. Bacteriol.*, V.66, n°5, (1989), 365-78.
72. **FAO/WHO**, Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, *Amerian Córdoba Park Hotel, Córdoba, Argentina*, (2001), 1-34.
73. **Salminen, S., Isolauri, E. and Salminen, E.**, Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges, *Antonie. Van. Leeuwenhoek*, V.70, (1996), 347-358.

74. **Klaenhammer, T.R. and Kullen, M.J.**, Selection and design of probiotics, *International Journal of Food Microbiology*, V. 50, (1999), 45-57.
75. **Patterson, J.A. and Burkholder, K.M.**, Application of prebiotics and probiotics in poultry production, *Poultry Science*, V. 82, (2003), 627-631.
76. **Gueimonde, M. and Salminen, S.**, New methods for selecting and evaluating probiotics, *Digestive and Liver Disease*, V.38, n°2,(2006), 242–247.
77. **Gaggia, F., Mattarelli, P. and Biavati, B.**, Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production , *International Journal of Food Microbiology*, V.141, (2010), 15-28.
78. **Melmed, G.**, Thomas L.S., Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut, *J. Immunol.*, V.170, n°3, (2003), 14-15.
79. **Mottet, C. and Michetti P.**, Probiotics: wanted dead or alive, *Dig. Liver. Dis*, V.37, n°1, (2005), 3-6.
80. **Saarela, M., Mogensen, G., Fonde, R., Ma'tto", J. and Mattila-Sandholm, T.**, Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, *Journal of Biotechnology*, V. 84, (2000), 197-215.
81. **AFSSA**, Agence française de sécurité sanitaire des aliments, Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte, (2005).
82. **Guillot, J.F.**, Les probiotiques en alimentation animale. *Cahiers Agricultures*, V.7, (1998), 49-54.
83. **Kabir, S.M.L., Rahman, M.M., Rahman, M.B., Rahman, M.M. and Ahmed, S.U.**, The dynamics of probiotics on growth performance and immune

response in broilers, International Journal of Poultry Science, V.3, (2004), 361-364.

84. **Mountzouris, K. C., Tsirtsikos P., Kalamara E., Nitsch S., Schatzmayr G., and Fegeros K.**, Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities, Poult. Sci., V.86, (2007), 309-317.
85. **Ahmad, I.**, Effect of probiotics on broiler performance, International Journal of Poultry Science, V. 5, n°6, (2006), 593-597.
86. **Marteau, P., and Shanahan, F.**, Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects, Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol., V.17, (2003), 725-740.
87. **Salminen, S., Nybom, S., Meriluoto, J., Collado, M.C., Vesterlund, S. and El-Nezami, H.**, Interaction of probiotics and pathogens-benefits to human health? Current Opinion in Biotechnology, V. 21, (2010), 157-167.
88. **Vitini, E., Alvarez, S., Medina, M., Medici, M., De Budeguer, M.V. and Perdigon G.**, Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria, Biocell, V.24, (2000), 223-232.
89. **Rochat T. et Langella P.**, Probiotiques, les bactéries lactiques : physiologie, génomique et application industrielles. Edition Economica, (2009).
90. **Oelschlaeger, A.**, Mechanisms of probiotic actions - A review, International Journal of Medical Microbiology, V. 300, (2010), 57-62.
91. **Gill, H. S., Rutherford, K. J., Prasad, J., and Gopal, P. K.**, Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019), Br. J. Nutr., V.83, (2000), 167-176.

92. **Lee, S.H., Lillehoj, H.S., Park, D.W., Hong, Y.H. and Lin, J.J.**, Effects of *Pediococcus*- and *Saccharomyces*-based probiotic (MitoMax®) on coccidiosis in broiler chickens, *Microbiology and Infectious Diseases*, V.30, (2007), 261-268.
93. **Lee, K.W., Lillehoj, H.S., J\$ang, S.I., Li, G., Lee, S.H., Lillehoj, E.P. and Siragusa, G.R.**, Effect of *Bacillus*-based direct-fed microbials on *Eimeria maxima* infection in broiler chickens, *Microbiology and Infectious Diseases*, V. 33, (2010), 105-110.
94. **Dalloul, R.A., Lillehoj, H.S., Shellem, T.A. and Doerr, J.A.**, Intestinal immunomodulation by vitamin A deficiency and *Lactobacillus*-based probiotic in *Eimeria acervulina*-infected broiler chickens, *Avian. Dis.*, V. 47, (2003), 1313-1320.
95. **Shu Q., Qu F. and Gill H.S.**, Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HN019 reduces weanling diarrhea associated with rotavirus and *Escherichia coli* infection in a piglet model, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, V.33, (2001),171-177.
96. **Vasiljevic, T. and Shah, N.P.**, Probiotics-From Metchnikoff to bioactives, *International Dairy Journal*, V.18, (2008), 714-728.
97. **Alakomi, H. L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K. and Helander, I. M.**, Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, V. 66, (2000), 2001-2005.
98. **Charles Vanderpool, M.D., Fang Yan, M.D., PhD. and D. Brent Polk, M.D.**, Mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases, *Inflamm Bowel Dis.*, V.14, n°11, (2008), 1585-1596.

99. **Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Servin, A. and De Vuyst, L.**, Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic *Lactobacilli* towards *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds, *Research in Microbiology*, V. 157, (2006), 241-247.
100. **Collado, M.C., Meriluoto, J. and Salminen, S.**, Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus, *Lett. Appl. Microbiol.*, V.45, (2007), 454-460.
101. **Collado, M.C., Meriluoto, J. and Salminen, S.**, Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *In vitro* evaluation of different methods, *Journal of Microbiological Methods*, V. 71, (2007), 71-74.
102. **Roselli, M., Finamore, A., Britti, M.S. and Mengheri, E.**, Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, *British Journal of Nutrition*, V.95, (2006), 1177-1184.
103. **Percival, M.**, Choosing a Probiotic, *Supplement clinical, Nutrition Insights*, V.6, n°1, (1997).
104. **Kung, L.J. R.**, Direct-fed microbials and enzymes for dairy cows. Department of Animal & and food Sciences, University of Delaware, (2001).
105. **Biernasiak, J., Piotrowska, M. and Libudzisz, Z.**, Mycotoxins by probiotic preparation for broiler chickens, *Mycotoxin Research*, Vol.22, n°4, (2006), 230-235.
106. **Slizewska, K., Nowak, A., Libudzisz, Z. and Blasiak, J.**, Probiotic preparation reduces the faecal water genotoxicity in chickens fed with aflatoxin B1 contaminated fodder, *Research in Veterinary Science*, V.89, (2010), 391-395.

107. **Knap, I.**, Use of Probiotic as Growth Promoters in Broiler Chicken: Proceedings of the 30th Western Nutrition Conference Optimizing Efficiency of Animal Production, September 23 and 24 (2009) Winnipeg, Manitoba.
108. **Bernardeau, M. and Vernoux, J.P.**, Overview of the use of probiotics in the Feed/Food chain, In: Probiotics: Production, Evaluation and Uses in Animal Feed, (2009), 15-45, Nelson Pérez Guerra and Lorenzo Pastrana Castro. Biotechnology & Applied Biochemistry, Kerala, India. ISBN.
109. **Huang, M.K., Choi, Y.J., Houde, R., Lee, J.W., Lee, B. and Zhao, X.**, Effects of *Lactobacilli* and an *Acidophilic fungus* on the production performance and immune responses in broiler chickens, Poultry Science, V.83, (2004), 788-795.
110. **Khaksefidi, A. and Ghoorchi, T.**, Effect of probiotics on performance and immunocompetence in broiler chicks, International Journal of Poultry Science, V.43, (2006), 296- 300.
111. **Temim, S., Hammami, N., Bedrani, L., Sahraoui, L., Kaddour, R., Boudina, H., Khelef, D., Adjou, K. et Ain Baziz, H.**, Evaluation de l'efficacité du probiotique *Pediococcus acidilactici* sur les performances de croissance la morphométrie et la flore *Lactobacillaire* de l'intestin du poulet de chair, European Journal of Scientific Research, V.38, n°1, (2009), 119-128.
112. **Taheri, H.R., Moravej, H., Malakzadegan, A., Tabandeh, F., Zaghari, M., Shivazad, M. and Adibmoradi, M.**, Efficacy of *Pediococcus acidilactici*-based probiotic on intestinal Coliforms and villus height, serum cholesterol level and performance of broiler chickens, African Journal of Biotechnology, V. 9, n°44, (2010), 7564-7567.
113. **Wang, Y. and Gu, Q.**, Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of Arbor Acres broilers, Research in Veterinary Science, V.89, (2010), 163-167.
114. **Nakphaichit, M., Thanomwongwattana, S., Phraephaisarn, C., Sakamoto, N., Keawsompong, S., Nakayama, J. and Nitisinprasert, S.**, The effect of

including *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens, *Poultry Science*, V.90, n°12, (2011), 2753-2765.

115. **Senani, S., Rai, R.B., Padhi, M.K. and Saha, S.K.**, Effects of feeding different levels of Lactobacilli on the performance of broilers, *Indian Veterinary Journal*, V.74, (1997), 808-810.
116. **Panda, A.K., Reddy, M.R., Ramarao, S.V. and Praharaj, N.K.**, Effect of dietary supplementation of probiotic on performance and immune response of layers in the decline phase of production, *Indian J. Poult. Sci.* V.35, (2000), 102-104.
117. **Willis, W.L. and Reid, L.**, Investigating the effects of dietary probiotic feed ingredients on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence, *Poultry Science*, V.87, (2008), 606-611.
118. **Mohamed Said, R. et Guetarni, Dj.**, Effets des probiotiques sur trois germes de la flore intestinale de poulet de chair, *Bulletin UASVM Horticulture*, V.65, n°2, (2008), 614-620.
119. **Jin, L.Z., Ho, Y. W., Abdollahi, N. and Jalaludin, S.**, Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diet containing *Lactobacillus cultures*, *Poultry Science*, V.77, (1998), 1259-1265.
120. **Kabir, S.M.L., Rahman, M.M. and Rahman, M.B.**, Potentiation of probiotics in promoting microbiological meat quality of broilers, *J. Bangladesh Soc. Agric. Sci. Technol.*, V.2, (2005), 93-96.
121. **Wambeke, F.V. and Peeters, J.**, The effect of Paciflor (R) on the performances, carcass composition and caecal bacterial numbers of broilers. *Arch. Geflugelkd.*, V.59, (1995), 125-129.

122. **Haddadin, M.S.Y., Abdulrahim, S.M., Hashlamoun, E.A.R. and Robinson, R.K.**, The effect of *Lactobacillus acidophilus* on the production and chemical composition of hen's eggs, *Poultry Science*, V.75, (1996), 491-494.
123. **Zhang, A.W., Lee, B.D., Lee, S.K., Lee, K.W., An, G.H.; Song, K.B. and Lee, C.H.**, Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks, *International Journal of Poultry Science*, V.84, (2005), 1015-1021.
124. **Mohan, B., Kadirvel, R., Bhaskaran, M. and Natarajan, A.**, Effect of probiotic supplementation on serum/yolk cholesterol and on egg shell thickness in layers, *Poultry Science*, V.36, (1995), 799- 803.
125. **Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H.**, Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, V.36, (1997), 1-9.
126. **Pot, B.**, The taxonomy of lactic acid bacteria, In: *Bactéries lactiques la génétique aux ferments*, Corrieu G. et Luquet F.M., Edition : Technique et Documentation, Lavoisier, 1-109.
127. **Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., Schillinger, U.**, Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition, *American Journal of Clinical Nutrition*, V.73, (2001), 365-373.
128. **Tailliez, P.**, Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années, *Lait*, V.81, (2001), 1-11.
129. **Dortu, C. et Thonart, P.**, Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, V.13, n°1, (2009), 143-154.
130. **Françoise, L.**, Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products, *Food Microbiology*, V. 27, (2010), 698-709.

131. **Bergey**, Manuel de la systématique bactérienne, Ed: RE Buchan and the Gibbons, (2004), 600p.
132. **Simpson, W. J. and Taguchi, H.**, The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*, In: Wood B.J.B. and Holzapfel W.H., The Genera of Lactic Acid Bacteria, Blackie Academic & Professional, (2005), 125-172.
133. **Larpent, J.P. et Larpent-Gourgaud, M.**, Mémento technique de microbiologie : microorganismes eucaryotes et procaryotes, structure , métabolique, systématique, applications industrielles, milieux de culture, réactifs, Tec & Doc, Lavoisier, 3<sup>ème</sup> édition, Paris, France, (1997), 946p.
134. **Bourgeois, C. M., et J. P. Larpent.**, Microbiologie alimentaire : aliments fermentés et fermentations alimentaires, Lavoisier Technique & documentation, 2<sup>ème</sup> Edition, Paris, (1996), 523p.
135. **Federighi, M.**, Bactériologie alimentaire : Compendium d'hygiène des aliments, Edition : Economica Paris, (2005), 292p.
136. **Cai, Y., Suyanandana, P., Saman, P. and Benno, Y.**, Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns, J. Gen. Appl. Microbio., V.45, (1999), 177-184.
137. **Anonyme 1**, "La solution probiotique de la réussite", [www.lallemandanimalnutrition.com](http://www.lallemandanimalnutrition.com), 2011.
138. **Cenatiempo, Y., Berjeaud, J.M., Biet, F., Fremaux, C., Hechard, Y. et Robichon, O.**, Bactériocines de bactéries lactiques: données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques, Lait, V.76, (1996), 169-177.
139. **Deumier, F. and Collignan, A.**, The effects of sodium lactate and starter cultures on pH, lactic acid bacteria, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella*

*spp.* levels in pure chicken dry fermented sausage, Meat Science, V.65, (2003) 1165-1174.

140. **Ammor M.S. et Mayo B.**, Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production, An update, Meat Science, Vol.76, (2007), 138-146.
141. **Hsiao, C. and Siebert, K.**, Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. Int. J. Food Microbiol., V. 47, n°3, (1999), 189-201.
142. **Gravesen, A., Diao, Z., Voss, J., Budde, B. and Knochel, S.**, Differential inactivation of *L. monocytogenes* by D- and L-lactic acid. Lett. Appl. Microbiol. V.39, (2004), 528-532.
143. **Benthin, S. et Villadsen, J.**, Different inhibition of *Lactobacillus delbrueckii* by D6 and L- lactic acid: effects on lag phase growth rate and cell yield, J. Appl. Bacteriol., Vol. 78, (1995), 647-654.
144. **Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B.**, Bacteriocins of Gram positive bacteria, Microbiol. Rev., V. 59, (1995), 171-200.
145. **Nigutova, K., Morovsky, M., Pristas, P., Teather, R.M., Holo, H. et Javorsky, P.**, Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enIA homologues among ruminal Gram-positive cocci, J. Appl. Microbiol., V.102, n°2,(2007), 563-569.
146. **Maqueda, M., Sanchez-Hidalgo, M., Fernandez, M., Montalban-Lopez, M., Valdivia, E. and Martinez-Bueno, M.**, Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria, FEMS Microbiol. Rev., V.32, (2008), 2-22.
147. **Rosslanda, E., Langsruda, T., Granumb, P.E. and Sbrhaug, T.**, Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-

cultured with *Bacillus cereus* in milk, *International Journal of Food Microbiology*, V.98, (2005), 193-200.

148. **Harris, L.J., Daeschel, M.A., STILES, M.E. and Klaenhammer, T.R.**, antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*, *Journal of food protection*, V.52, (1989).
149. **Lewus, C.B., Kaiser, A. and Montville, T.J.**, Inhibition of Food-Borne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meatt, *Applied and Environmental Microbiology*, V. 57, n°6, (1991), 1683-1688.
150. **Naghmouchi, K., Drider, D., Kheadr, E., Lacroix, C., Prévost, H. and Fliss, I.**, Multiple characterizations of *Listeria monocytogenes* sensitive and insensitive variants to divergicin M35, a new pediocin-like bacteriocin, *Journal of Applied Microbiology*, V.10, (2006), 29-39.
151. **Naghmouchi, K., Lacroix, C., Kheadr, E. and Fliss, I.**, Detection of pediocin PA-1 in food matrices using specific polyclonal antibodies, *Journal of Microbiological Methods*, V.71, (2007), 175-177.
152. **Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, U.I., Peláez-Martínez, M.D.C., Sacristán-Pérez-Minayo, G., Gutiérrez-Fernández, A.J. and Hardisson de la Torre, A.**, The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters, *Food Control*, V.21, (2010), 679-685.
153. **Chikindas, M. L., M. J. Garcia-Garcera, A. J. Driessen, A. M. Ledebøer, J. Nissen- Meyer, I. F. Nes, T. Abee, W. N. Konings, and G. Venema.**, Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells, *Appl Environ Microbiol.*, V.59, (1993), 3577- 3584.

154. **Zalan, Z., Barath, A. and Halasz, A.**, Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains, Food Technol. Biotech., V.43, n°3, (2005), 219- 225.
155. **Strus, M., Gosiewski, T., Kochan, P. and Heczko, P.B.**, The *in vitro* effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities, FEMS Immuno. Medical Microbiol., V.48, (2006), 56- 63.
156. **Ammor S., Tauveron G., Dufour E. et Chevallier I.**, Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogens bacteria isolated from the same meat small-scale facility, Food Control, Vol.17, (2006), 454-468.
157. **El-Ziney, M.G., Uyttendaele, M., Debevere, J. and Jakobsen M.**, Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures, Biotechnol. Lett., V.20, n°10, (1998), 913-916.
158. **Ramade F.**, Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement, Edition: Edisciences, (1993), 822p.
159. **Odum E.P.**, *Fundamentals of Ecology*, Saunders, Philadelphia, (1953).
160. **Frederickson A. G.**, Behaviour of mixed cultures of microorganisms, *Annu. Rev. Microbiol.*, V.31, (1977), 63-87.
161. **IRISSON J-O. 2000.** Les relations interspécifiques, conséquences au niveau écologique et évolutif. 'Ecole Pratique des Hautes 'Etudes, UMR – CNRS. 18p.
162. **Singleton P.**, Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies, 6<sup>ème</sup> édition, Ed : DUNOD, (2005), 542p.
163. **Sieuwertz S., de Bok F. A. M., Hugenholtz J. et van Hylckama Vlieg J. E. T.**, Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to

Genomics Approaches, *Applied and environmental microbiology*, V.74, (2008), 4997-5007.

164. **Nehme N.**, Etude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni* : impact sur la réalisation de la fermentation malolactique en cultures séquentielles et mixtes. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse, Génie des procédés et de l'environnement, (2008), 235p.
165. BIBEL D.J., ALY R., BAYLES C., STRAUSS W.G., SHINEFIELD H.R., MAIBACH H.I. (1983). Competitive adherence as a mechanism of bacterial interference. *Canadian Journal of Microbiology*. 29:700-703.
166. **Herve-Jimenez L., Guillouard I., Guedon E., Gautier C., Boudebouze S., Hols P., Monnet V., Rul F. et Maguin E.**, Physiology of *Streptococcus thermophilus* during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino-acid metabolism, *Proteomics*, V.8, (2008), 4273-4286.
167. **El-Gazzar F.E. and Marth E.H.**, *Salmonellae*, salmonellosis and dairy foods: a review. *Journal of Dairy Science*, V.75, (1992), 2327-2343.
168. **Weimer, P.J.**, Interactions among cellulolytic and noncellulolytic ruminal microorganisms, In: Martin S.A., *Gastrointestinal microbiology in animals*, Research Signpost, (2002), 117-138.
169. **Renouf V.**, Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : interactions et équilibres – relation avec la qualité du vin, Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse, Génie des procédés et de l'environnement, (2006), 178p.
170. **Piacente S., Montoro P., Oleszek W. and Pizza C.**, *Yucca schidigera* bark: phenolic constituents and antioxidant activity, *J. Nat. Prod.*, Vol. 67, n°5, (2004), 882-885.

171. **Vaquier A.R.L.** intérêt d'un nouveau nutriment a visée anti-inflammatoire dans la gestion de troubles locomoteurs chez le cheval aspects bibliographiques et étude clinique. doctorat vétérinaire école nationale veterinaire d'alfort2010 178p.
172. **Bietrix J.**, Utilisation des nutraceutiques dans la gestion de l'arthrose du cheval, Etude bibliographique. Thèse *Méd. Vét.*, Lyon, n° 119, (2004), 218p.
173. **Cheeke P.R.**, Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition, *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*, V.13, (2001), 115-126.
174. **Cheeke P.R. and Otero R.**, *Yucca*, *Quillaja* may have role in animal nutrition, *Feedstuffs*, V.3, (2005), 11-14.
175. **Wallace R.J.**, Antimicrobial properties of plant secondary metabolites, *Proceedings of Nutrition Society.*, V. 63, (2004), 621-629.
176. **Güclü-Ustundag O. and Mazza G.**, Saponins: properties, applications and processing, *Crit. Rev. Food Sci.*, V.47, n°3, (2007), 231-258.
177. **Oleszek O., Sitek M., Stochmal A., Piacente S., Pizza C.,Cheeke P.**, Steroidal saponins of *Yucca schidigera*, *J. Agric. Food Chem.*, V.49, n°9, (2001), 4392-4396.
178. **Piacente S., Pizza C. and Oleszek W.**, Saponins and phenolics of *Yucca schidigera* Roezl: Chemistry and bioactivity, *Phytochemistry Reviews*, V.4, (2005), 177-190.
179. **Oleszek W.; Sitek M., Stochmal A., Piacente S., Pizza C. and Cheeke P.**, Resverateol and other phenolics from the bark of *yucca schidigera*, *J. Agric. Food Chem.*, V.49, n° 2, (2001), 747-752.

180. **Piacente S., Bifulco G., Pizza C., Stochmal A. and Oleszek W. A.**, novel phenolic spiro derivate, Yuccaone A, from *Yucca schidigera* bark, *Tetrahedron Lett.*, V.43, n°50, (2002), 9133-9136.
181. **Amon, M.M., Dobeic R.W., Sneath V.R., Phillips T.H., and Pain B.F.**, A farm-scale study on the use of clinoptilolite zeolite and De-odorase for reducing odour and ammonia emissions from broiler houses, *Biores. Tec.*, V.61, (1997), 229-237.
182. **Çabuk M., Alçiçek A., Bozkurt M. and Akkan S.**, Effect of *Yucca schidigera* and Natural Zeolite on Broiler Performance, *International Journal of Poultry Science*, V.3, n°10, (2004), 651-654.
183. **Yeo, J. and Kim K.**, Effect of Feeding Diets Containing an Antibiotic, a Probiotic, or Yucca Extract on Growth and Intestinal Urease Activity in Broiler Chicks, *Poultry Science*, V.76, (1997), 381-385.
184. **Makkar H.P.S., Sen S., Blummel M. and Becker K.**, Effect of fractions containing saponins from *Yucca schidigera*, *Quillaia saponaria*, and *Acacia auriculoformis* on rumen fermentation, *J. Agric. Sci.*, V.46, (1998), 4324-4328.
185. **Cheeke P.R., Piacente S. and Oleszek W.**, Anti-inflammatory and antiarthritic effects of *Yucca Schidigera*: A review, *J. Inflamm.*, 2006, 3-6.
186. **Olson, M. E., McAllister T.A., Deselliers L., Morck D.W, Cheng K.J., Buret A.G., and Ceri H.**, Effect of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model, *Am. J. Vet. Res.*, V.56, (1995), 1470-1474.
187. **Rambozzi L., Molinar Min A.R. and Menzano A.**, *In vivo* anticoccidial activity of *Yucca schidigera* saponins in naturally infected calves, *Journal of animal and veterinary advances*, V.10, n°3, (2011), 391-394.

188. **Killen G.F. and Madigan C.A.**, Connolly C.R. and Walsh G.A., Antimicrobial saponins of yucca schidigera and the implications of their in vitro properties for their in vivo impact, *J. Agric. Food Chem.*, V.46, n°8, (1998), 3178-3186.
189. **Wang Y., McAllister T.A., Yanke L.J. and Cheeke P.R.**, Effect of steroidal saponin from yucca schidigera extract on ruminal microbes, *J. Appl. Microbiol.*, V.88, n°5, (2000), 887-896.
190. **Miyakoshi M., Tamura Y., Masuda H., Mizutani K., Tanaka O. and Ikeda T.**, Antiyeast steroidal saponins from Yucca schidigera (Mohave yucca), a new anti-food-deteriorating agent, *J. Nat. Prod.*, V. 63, N°3, (2000), 332-33.
191. **Cheeke, P.R.**, Biological effects of feed and forage saponins and their impacts on animal production. *Advances in Experimental Biology*, V.405, (1996), 377-385.
192. **Amlan K., Patra J.S.**, A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, V.71, (2010), 1198-1222.
193. **Cicergi I.H., Fidan A.F., Konuk M., Yuksel H., Kucukkurt I. and Eryavuz A.**, The protective potential of Yucca schidigera (Sarsaponin 30R) against nitrite-induced oxidative stress in rats, *J. Nat. Med.*, V.63, n°3, (2009), 311-317.
194. **Wenzig E.M., Oleszek W., Stochmal A., Kunert O. and Bauer R.**, Influence of phenolic constituents from yucca schidigera bark on arachidonate metabolism *In vitro*, *J. Food Chem.*, V.56, n°19, (2008), 8885-8890.
195. **Marzocco S., Piacente S., Pissa C., Oleszek W., Stochmal A. and Pinto A.**, Inhibition of inducible nitric oxide synthetase expression by yuccaol C from Yucca schidigera Roezl, *Life Sci.*, V.75, n°12, (2004), 1491-1501.

196. **Khoubai A. et Merrouki A.**, Essai d'utilisation des probiotiques comme alternative des antibiotiques chez le poulet de chair. Département de vétérinaire. Université de Blida, (2010), 100p.
197. **Savadogo A., Ouattara C.A.T., Bassole I.H.N. and Traore A.S.**, Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from burkina faso fermented milk, *Pak. J. Nutr.*, V. 3, (2004), 174-179.
198. **Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filiouisis, G., Ambrosiadis, I., Koidis, P.**, Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation. Purification, characterisation and properties of the produced pediocin SM-1, *Enzyme and Microbial Technology*, V.43, (2008), 448-454.
199. **Haines W. C. and Harmon L. G.**, Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. *Appl. Microbiol.*, V.25, n° 3, (1973), 436-41.
200. **Skytta, E.A., Hikara, A. and Mattila-Sandholm, T.**, Production and characterisation of antibacterial compounds produced by *Pediococcus damanosus* and *Pediococcus pentosaceus*, *J. Appl. Bacteriol.*, V.74, (1993), 134-142.
201. **Mountzouris K. C., Tsirtikos P., Palamidi I., Arvaniti A., Mohnl M., Schatzmary G., Fegeros K.**, Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition, *Poultry Science*, V.89, (2010), 58-67.
202. **Lessard M., Dupuis M., Gagnon N., Matte J.J., Nadeau É., Fairbrother J.M., Goule J.**, Influence du *Pediococcus acidilactici* et du *Saccharomyces cerevisiae boulardii* sur l'immunité du porcelet et la translocation bactérienne *Journées Recherche Porcine*, V.37, (2005), 359-366.

203. **Schneitz, C. and Mead, G.**, Competitive exclusion. In: Salmonella in domestic animals Wray C. and Wray A., Ed. CAB International, (2000), 301-322.
204. **Kralik, G., Milaković, Z. and Ivanković, S.**, Effect of probiotic supplementation on the performance and the composition of the intestinal microflora in broilers, *Acta Agraria Kaposváriensis*, V.8, n°2, (2004), 23-31.
205. **Idoui T., Boudjerda D., Leghouchi E. et Karam N.**, Activite probiotique de *Lactobacillus plantarum*: Etude réalisée chez le poulet de chair ISA 15, *Huitièmes Journées de la Recherche Avicole, St Malo, 25 et 26 mars 2009*.
206. **Kabir S.M.L.**, The Role of Probiotics in the Poultry Industry, *International Journal of Molecular Sciences*, V.10, (2009), 3531-3546.
207. **Yaman H., Ulukanli Z., Elmali M., Unal Y.**, The effect of a fermented probiotic, the kefir on intestinal flora of poultry domesticated geese (anser anser), *Revue Méd. Vét.*, V.157, n°7, (2006), 379-386.
208. **Kalchayanand, N., Hanlin, M.B., Ray, B.**, Sublethal injury makes Gramnegative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin, *Letters in Applied Microbiology*, V.15, (1992), 239-243.
209. **Kang, D.H. and Fung, D.Y.C.**, Effect of MnSO<sub>4</sub> and Oxyrase on bacteriocin production by *Pediococcus acidilactici*. *Proceedings of Food Safety Consortium Annual Meeting*, Kansas City, MO, USA, (1996).
210. **Kang, D.H., Fung, D.Y.**, Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 by stimulated *Pediococcus acidilactici*, *Letters in Applied Microbiology*, V. 29, (1999), 206–210.
211. **Doumandji A.**, Effet de l'association de *Bifidobacterium bifidum* avec *Streptococcus thermophilus* sur l'activité antagoniste envers *Escherichia coli* enteropathogene, *Sciences & Technologie c – n°25*, (2007), 65-70.

212. **Tatini S. R., Jezeski J. J., Olson J. C., Jr. et Casman E. P.**, Factors influencing the production of staphylococcal enterotoxin A in milk, *J. Dairy Sci.*, V.54, n° 3, (1971), 312-20.
213. **Charlier C., Even S., Gautier M. and Le Loir Y.**, Acidification is not involved in the early inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by *Lactococcus lactis* in milk. *International Dairy Journal*, V.18, n°2, (2008), 197-203.
214. **Charlier C., Cretenet M., Even S. and Le Loir Y.**, Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives, *Int. J. Food Microbiol.*, V.131, n° 1, (2009), 30-9.
215. **Kaban G. and Kaya M.**, Effect of starter culture on growth of *Staphylococcus aureus* in sucuk, *Food Control*, V.17, n°10, (2006), 797-801.
216. **Sameshima, T., Magome, C., Takeshita, K., Arihara, K., Itoh, M., and Kondo, Y.**, Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage, *International Journal of Food Microbiology*, V.41, (1998), 1-7.
217. **Alomar J., Loubiere P., Delbes C., Nouaille S. et Montel M. C.**, Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk, *Food Microbiol*, V.25, n°3, (2008), 502-508.
218. **Even S., Charlier C., Nouaille S., Ben Zakour N. L., Cretenet M., Cousin F. J., Gautier M., Coccagn-Bousquet M., Loubiere P. et Le Loir Y.**, *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures, *App.I Environ. Microbiol.*, V.75, n°13, (2009), 4459-72.
219. **Piard, J. C. and Desmazaud, M.**, Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins and other antibacterial substances, *Lait*, V.72, (1992), 113-142.

220. **Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C., and Ray, B.**, Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H, *Applied and Environmental Microbiology*, V.57, (1991), 1265-1267.
221. **Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I. and Peláez-Martinez, M.C.**, Hardisson de la Torre, A., 2002. Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry. *Meat Sci.*, V.62, (2002), 237-243.
222. **Richard J.**, Utilisation de bactériocines pour la production d'aliments plus sûrs: mythe ou réalité? *Lait*, V.76, (1996), 179-189.
223. **Doumandji A., bousbia N. et hellal N.**, Effet anti-*listeria* de *Bifidobacterium infantis* isolé a partir de selles de nourrisson allaité au sein, *Sciences & Technologie c* – n°31, (2010), 14-21.
224. **Achemchem A., Abrini J., Martinez-Bueno M., Valdivia E. et Maqueda M.**, Purification et caractérisation d'une bactériocine antilistéria produite par *enterococcus faecium* F-420 isolée à partir de lait de chèvre, Congrès International de Biochimie, Marrakech Maroc, 3-6 Mai 2004, 384-388.
225. **Janssen, M., Geeraerd, A.H., Cappuyns, A., Garcia-Gonzalez, L., Schockaert, G., Houteghem, N.V., Vereecken, K.M., Debevere, J., Devlieghere, F., Impe, J.**, Individual and combined effects of pH and lactic acid concentration on *L. innocua* inactivation: Development of a predictive model and assessment of Experimental Variability, *Appl. Environ. Microbiol.*, V.73, n°5, (2007), 1601-1611.
226. **Daeschel, M.A., Klaenhammer, T.R.**, Association of a 13.6 megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity, *Appl. Environ. Microbiol.*, V.50, (1985), 1538-1541.

227. **Bhunja, A. K., Johnson, M. C., and Ray, B.**, Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* H, *Journal of Applied Bacteriology*, V.65, (1988), 261-268.
228. **Bailey, F. J. and Hurst, A.**, Preparation of highly active form of nisin from *Streptococcus lactis*, *Canadian Journal of Microbiology*, V.17, (1971), 61-67.
229. **Gonza´lez, C. F and Kunka, B. S.**, Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*, *Applied and Environmental Microbiology*, V.53, (1987), 2534-2538.
230. **Schved, F., Lalazar, A., Hensis, Y. and Juven, B. J.**, Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*, *Journal of Applied Bacteriology*, V.74, (1993), 67-77.
231. **Gurira O.Z. and Buys E.M.**, Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese, *Food Microbiol*, V.22, (2005), 159-168.
232. **Gi-Seong M., Kim W.J. and Kim M.**, Synergistic Effects of Bacteriocin-Producing *Pediococcus acidilactici* K10 and Organic Acids on Inhibiting *Escherichia coli* O157:H7 and Applications in Ground Beef, *J. Microbiol. Biotechnol.*, V.12, n°6, (2002), 936-942.
233. **Hadj Salem J.**, Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoides de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyle de ses molécules par voie enzymatique, Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Lorraine, (2009), 270p.
234. **Coinu R., Carta S., Urgeghe P. P., Mulinacci N., Pinelli P., Franconi F. and Romani A.**, Dose-effect study on the antioxidant properties of leaves and outer bracts of extracts obtained from Violetto di Toscana artichoke, *Food Chemistry*, V. 101, (2007), 524–531.

235. **Salem A.Z.M., Robinson P.H., López S., Gohar Y.M., Rojo R and Tinoco J.L.**, Sensitivity of sheep intestinal lactic acid bacteria to secondary compounds extracted from *Acacia saligna* leaves, *Animal Feed Science and Technology*. V.161, (2010), 85-93.
236. **Grandhi R.R.**, Efficacy of Biopowder-M and Bioliquid-3000 (*Yucca schidigera* plant extract products) for reduction of odours in swine manure. Final report of the MII project 8466 prepared by the Brandon Research Centre, Brandon, (1998).
237. **Price, K.R., Johnson, I.T. and Fenwick, G.R.**, The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedstuffs, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, V.26, n°1, (1987), 127-135.
238. **Wallace R.J.**, Antimicrobial properties of plant secondary metabolites, *Proceedings of the Nutrition Society*, V.63, (2004), 621-629.
239. **Sen S., Makkar H.P.S., Muetzel S. and Becker K.**, Effect of *Quillaja saponaria* saponins and *Yucca schidigera* plant extract on growth of *Escherichia coli*, *Applied Microbiology*, V.27, (1998), 35-38.
240. **Peris S. and Calafat F.**, Acidification and other physiological additives, *Cahiers Options Méditerranéennes*, V.54, (2001), 63-70.
241. **Hammer, K. A., Carson C.F, and Riley T.V.**, Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology*, V.86, (1999), 985-990.
242. **Hostettmann, K., Hostettmann, M. and Marston, A.**, Saponins: Chemistry and pharmacology of natural products, Cambridge University Press, (1995), 560p.
243. **Saunier M., David S., Tounsi M. et Gillmann L.**, Effet de différents extraits végétaux riches en saponines sur quelques indicateurs bactériologiques de la

microflore intestinale de souris *Mus mus musculus* s. swiss, CNRIUT (2008), Session Posters.

- 244. Wang J.P. and Kim I.H. (2011),** Effect of caprylic acid and *Yucca schidigera* extract on production performance, egg quality, blood characteristics, and excreta microflora in laying hens, *British Poultry Science*, V.52, n°6, (2011), 711-717.
- 245. Czerwiński J., Hjberg O., Smulikowska S., Engberg R.M. and Mieczkowska A.,** Influence of dietary peas and organic acids and probiotic supplementation on performance and caecal microbial ecology of broiler chickens, *British Poultry Science*, V.51, n°2, (2010), 258-269.