

Sommaire :

Résumé :	6
Abstract:.....	7
المخلص:.....	Erreur ! Signet non défini.
Liste des tableaux	9
Liste des figures.....	10
Liste des abreviation :.....	12
Introduction :	13

Partie bibliographique

I. Tractus gastro-intestinale et microbiote:	16
I. 1 Tractus gastro-intestinale :.....	16
I. 1.1 Physiologie du tractus :	16
I. 1.2 Description générale du système digestif :.....	16
I. 2. Microbiote intestinal :.....	17
I. 2.1 Generalité :.....	17
I. 2.2 Origine et développement du microbiote intestinal :	18
I. 2.4 Effets bénéfique :	21
I. 2.4.1 Participation à la nutrition :	22
I. 2.4.2 Protection contre les pathogènes :.....	23
I. 2.4.3 Fonction imunologique :	24
I. 2.5 Facteurs agissant sur la colonisation bactérienne :	24
I. 2.5.1 Influence du terrain génétique:.....	24
I. 2.5.2 Influence du terme de naissance :.....	25
I. 2.5.3 Influence du mode d'accouchement :	25
I. 2.5.4 Influence de l'alimentation :	26
I. 2.5.5 Influence des traitements médicamenteux :.....	26
I. 2.5.6 Influence des conditions d'hygiène :	27
II. Les bifidobacteries	28
II. 1 taxonomie :	28
II. 2 Ecologie :.....	30
II. 3 Caractères morphologiques :	33
II. 3.1 Structure cellulaire :	33

II. 4 Physiologie :	34
II. 4.1 Anaerobiose :	34
II. 4.2 Température et pH :	34
II. 4.3 Résistance aux antibiotiques :	35
II. 5.1 Besoins en composés azotés et source de carbone :	35
II. 5.2 Besoins en sels minéraux et vitamines :	36
II. 5.3 Les facteurs bifidogènes :	37
II. 6. Métabolisme :	38
II. 7. Propriétés génotypiques :	40
III. Les probiotiques :	44
III.1 Historique et définition:	44
III.2 Critères de sélection :	46
III.2.1 Critères de sécurité :	49
III.2.2 Critères fonctionnelles :	49
III.2. 3 critères technologiques :	51
III.3 Effets bénéfiques :	53

Partie experimentale

I.Matériel et Méthodes :	60
1 .1 Matériel biologique	60
I.2. Méthodes :.....	62
I.2. 1 Isolement et purification des bifidobactéries :	62
I.2.2 Observation macroscopique et microscopique :	63
I.2. 3 Analyse des produits de la fermentation par HPLC :	63
I.2.4 Identification biochimique :	64
I.2.5 Identification par la galerie API 20A :	66
I.2.6 Caractérisation des espèces:.....	67
I.2.7 Conservation des souches :.....	68
I.3. Mise en évidence in vitro de quelque caractère probiotique :	68
I.3.1 Résistance aux ph acide de l'estomac :	68
I.3.2 Résistance aux sels biliaires :	69
I.3.3 L'activité antimicrobienne :.....	69
I.3.4 Résistance aux antibiotiques :.....	70
I.3.5 L'adhérence aux cellules épithéliales :.....	71

I.4. Fermentation du lait:	71
I.4.1 Inoculum des bifidobactéries :	71
I.4.2 Inoculum des bactéries lactique :	72
I.4.3 Cinétique de croissance :	72
I.4.4 Détermination de l'acidité titrable :	73
I.4.5 Suivi du PH au cour de la fermentation :	73
I.5 Evaluation de la viabilité des souches potentiellement probiotique :	73
I.5.1 Influence du stockage frigorifique à 4°C sur la viabilité :	73
I.5.2 Influence des arômes sur la viabilité :	74
I.5.3 Influence des additifs sur la viabilité :	74
II.Résultats :	76
II.1 Observation macroscopique et microscopique :	76
II.2 Identification du genre :	78
II.3 Identification biochimique :	79
II.4. Identification par la galerie Api 20 A :	80
II.5. Identification des espèces :	81
II.6. Mise en évidence des caractères probiotiques :	82
II.6.1 Résistance aux Ph acide :	82
II.6.2 Résistance aux sels biliaires :	84
II.6.3 Antibiogramme :	86
II.6.4 L'activité antimicrobienne :	87
II.6.5 L'adhérence aux cellules épithéliales :	88
II.7 Fermentation du lait :	89
II.7.1 Cinétique de croissance :	89
II.7.2 L'acidité titrable :	91
II.7.3 Suivi du pH au cour de la fermentation :	92
II.8 Viabilités des souches potentiellement probiotiques :	94
II.8.1 Viabilités pendant le stockage frigorifié à 4°C :	94
II.8.2 Influence des aromes sur la viabilité:	95
II.8.3 Influence des additifs sur la viabilité :	97
III.Discussion :	99
IV.Référence :	112
V. Annexe:	137

Résumé :

Les bifidobactéries sont des habitants naturels du microbiote intestinal, ils s'installent au niveau du colon au bout du 2ème ou 3ème jour suivant la naissance chez les enfants allaités au sein. Et en vue de leurs effets très bénéfiques sur la santé de l'homme, ces derniers, sont incorporés dans les aliments dits « probiotique ».

Neuf souches de bifidobactéries ont été isolées à partir des selles de nourissons. L'un des caractéristiques spécifiques de ces souches est la production de 3 moles d'acide acétique et 2 moles d'acide lactique à partir de 2 moles de glucose, ces deux acides ont été identifiés par HPLC.

Parmi les critères de sélection des souches probiotiques est la résistance aux pH acide de l'estomac, la tolérance aux sels biliaire de l'intestin, la résistance aux antibiotiques, l'activité antimicrobienne envers les souches pathogènes et l'adhérence aux cellules épithéliales. Ces tests ont été réalisés par des méthodes *in vitro* dont le résultat a dévoilé une bonne activité probiotique des souches appartenant à l'espèce longum.

Lors de la fermentation du lait, un taux élevé d'acidité a été produit et une bonne croissance a été observé chez nos souches en culture mixte avec la souche *Streptococcus thermophilus*.

Enfin, une différence significative du taux de la viabilité de nos souches envers certaines conditions technologiques (l'influence des arômes, l'influence des additifs et le stockage frigorifier) a été noté.

Mots-clés : *bifidobactérium*, probiotique, croissance, fermentation, viabilité.

Abstract:

Bifidobacteria are natural habitats of the intestinal microbiota, they settle in the colon after the 2nd or 3rd day after birth in breast-fed infants. And for their highly beneficial effects on human health they are incorporated in food as "probiotic".

Nine bifidobacterium strains were isolated from new born feces and identified. One of the specific characteristics of these strains is the production of 3 moles of acetic acid and 2 moles of lactic acid from 2 mol of glucose, both of these acids were identified by HPLC.

The criteria of the selection of probiotic strains is the resistance to acid pH in the stomach, tolerance to bile salts of intestine, resistance to antibiotics, the antimicrobial activity against pathogenic strains and adhesion to epithelial cells; these tests were conducted by *in vitro* methods, the result revealed a good probiotic activity of the strains belonging to the species longum.

During the fermentation of milk, a high level of acidity was produced and good growth was observed for our strains in mixed culture with the strain *Streptococcus thermophilus*.

Finally, a significant difference in the rate of the viability of our strains towards some technological conditions (the influence of aromas, the influence of additive and refrigerated storage) was noted.

Keywords: *bifidobacterium*, probiotic, growth, fermentation, viability.

المخلص:

البفيدوبكتيريا هي كائنات توجد بصفة طبيعية في الأمعاء وتحل في القولون في اليوم الثاني او الثالث بعد الولادة عند الأطفال الذين يرضعون حليب الأم. وبسبب تأثيرها المفيد على صحة الانسان تدرج هذه الكائنات في الأغذية المسماة "بروبيوتيك".

تم عزل تسع سلالات البفيدوبكتيريا من براز الرضع. واحدة من الخصائص التي تتفرد بها هذه السلالات هو إنتاج 3 مول من حمض الخل و2 مول من حمض اللبن انطلاقا من 2مول من الجلوكوز، تم التعرف على هذين الحمضين ب HPLC.

من بين المعايير لاختيار سلالات بروبيوتيك هي المقاومة لدرجة الحموضة في المعدة، مقاومة الأملاح الصفراء في الأمعاء، مقاومة المضادات الحيوية، النشاط البكتيري ضد السلالات المسببة للأمراض والالتصاق بالخلايا الظهارية؛ أجريت هذه الاختبارات بطرق *in vitro* أين كشفت النتائج أن السلالات التي تنتمي الى النوع *longum* هي التي أظهرت نشاط بروبيوتيك جيد.

خلال تخمير الحليب، تم إنتاج حموضة جيدة ولوحظ نمو جيد في سلالاتنا أثناء التخمير المختلطة مع سلالة *Streptococcus thermophilus*.

وأخيرا، لوحظ وجود اختلاف كبير في معدل نسبة المقاومة لسلالاتنا لبعض الخصائص التكنولوجية (تأثير العطور، تأثير المواد المضافة والتخزين البارد).

الكلمات المفتاحية: بفيدوبكتيريا، بروبيوتيك، نمو، التخمير، البقاء.

Liste des tableaux

Page

Tableau 1	Différenciation du genre <i>Bifidobacterium</i> avec les genres qui lui sont voisins	30
Tableau 2	les différentes espèces appartenant au genre <i>Bifidobacterium</i>	31
Tableau 3	Critères de sélections utilisés en laboratoires pour le screening des probiotiques	47
Tableau 4	Classification des bactéries lactiques considérées comme probiotiques	53
Tableau 5	Effets positifs des probiotiques sur la santé humaine	55
Tableau 6	Aspect macroscopique et microscopiques des souches de bifidobactérie (L1, B1, BV1)	77
Tableau 7	identification des souches de bifidobactéries par galerie API 20A	80
Tableau 8	Fermentation des sucres par les souches de bifidobactéries	81
Tableau 9	Antibiogramme des souches de bifidobactéries	86
Tableau 10	Les diamètres des zones d'inhibition en mm	88

Liste des figures

		Page
Figure 1	Schéma simplifié décrivant les compartiments de l'appareil digestif de l'homme	17
Figure 2	Le microbiote associé au tractus gastro-intestinal humain	20
Figure 3	Les fonctions du microbiote intestinal	22
Figure 4	Métabolisme général des bifidobactéries	39
Figure 5	Arbre phylogénétique des bifidobactéries et <i>Gardnerilla vaginalis</i> obtenue par l'analyse du gène codant pour L'ARN ribosomal 16S	43
Figure 6	Lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques en vue d'une utilisation alimentaire	48
Figure 7	aspect macroscopique des souches de bifidobactéries	76
Figure 8	observation microscopique des souches de bifidobactéries	78
Figure 9	La détermination des acides organique par la haute performance liquide chromatography (HPLC)	79
Figure 10	Identification des souches de <i>bifidobacterium</i> (A: L1 ; B: BV1 ; C : B1) par galerie API 20A	81
Figure 11	Taux de survie (%) des souches de <i>bifidobacterium longum</i> (L1, L2, L3, L4), <i>bifidobacterium breve</i> (BV1, BV2, BV3) et <i>bifidobacterium bifidum</i> (B1, B2) ; (A) : a pH2 (B) : a pH 3, (C) : a pH4	84
Figure 12	Taux de survie (%) des souches de <i>bifidobacterium longum</i> (L1, L2, L3, L4), <i>bifidobacterium breve</i> (BV1, BV2, BV3) et <i>bifidobacterium bifidum</i> (B1, B2) ; (A) : a 0.3%, (B) : a 0.5%, (C) : a 1%.	85
Figure 13	Antibiogramme de la souche L1	87
Figure 14	Activité inhibitrice des souches L1, L2, L3, L4, B1 et B2 sur <i>Staphylococcus aureus</i>	88
Figure 15	adhérence aux cellules épithéliales du colon de la souche L2	89
Figure 16	Cinétique de croissance des souches de bifidobactéries <i>B.longum</i> (L1, L2, L3, L4), <i>B. breve</i> (BV1, BV2, BV3), <i>B. bifidum</i> (B1, B2) (A) ; en culture pure, (B) en culture mixte avec <i>St.thermophilus</i> (C) en culture	91

	mixte avec <i>lactobacillus bulgaricus</i> au cours de la fermentation du lait	
Figure 17	Cinétique d'acidité (°D) produites par les bifidobactéries : <i>B. longum</i> (L1, L2, L3, L4), <i>B. breve</i> (BV1, BV2, BV3), <i>B. bifidum</i> (B1, B2) (A) ; en culture pure, (B) en culture mixte avec <i>St.thermophilus</i> (C) en culture mixte avec <i>lactobacillus bulgaricus</i> au cours de la fermentation du lait	92
Figure 18	Suivi du pH au cour de la fermentation du lait par les bifidobactéries : <i>B. longum</i> (L1, L2, L3, L4), <i>B. breve</i> (BV1, BV2, BV3), <i>B. bifidum</i> (B1, B2) (A) ; en culture pure, (B) en culture mixte avec <i>St.thermophilus</i> (C) en culture mixte avec <i>lactobacillus bulgaricus</i>	94
Figure 19	Viabilité des souches de bifidobactéries L1, L2 (<i>bifidobacterium longum</i>), BV1 (<i>bifidobacterium breve</i>) et B1 (<i>bifidobacterium bifidum</i>) pendant le stockage frigorifié à 4°C.	95
Figure 20	Taux de survie (%) des souches de bifidobactéries L1, L2, BV1 et B1 sous l'influence des aromes; (A) ; vanille, (B) ; banane, (C) ; fraise	96
Figure 21	Taux de survie (%) des souches de bifidobactéries L1, L2, BV1 et B1 sous l'influence des additifs ; (A) ; E414, (B) ; E1442	98

Liste des abreviation :

°C : degré Celsius.

°D : degré dornic

ADN: acide désoxyribonucléique.

ADNr /ARNr : ADN ou ARN ribosomal.

Ara: Arabinose

ATCC: American Type Culture Collection.

CO₂ : Dioxyde de carbone

Do: densité optique.

F6PPK : fructose-6-phosphokétolase

Fru: Fructose

Gal: Galactose

h: heure

HPLC : haute performance liquide chromatographie

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

j : jours

Lac: Lactose

Lb: *Lactobacillus*

Mal: Maltose

Man: Mannitol

Mél: Melibiose

mg: milligramme.

min: minute

MRS- Cys : milieu de Man, Rogosa and Sharpe cystéiné

MRS: Milieu de Man, Rogosa and Sharpe (1960)

nm: nanomètre.

pH: potentiel d'hydrogène

Rib: Ribose

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

Sac: Saccharose

Subsp. : sous-espèce

ufc : unité formant colonie

µg: microgrammes

Introduction :

Pendant longtemps, le colon a simplement été considéré comme organe d'élimination des restes du bol alimentaire par opposition à l'estomac ou à l'intestin grêle, siège des sécrétions enzymatiques et hormonales, responsable de la digestion et de l'absorption des nutriments.

Aujourd'hui le colon apparait comme un élément régulateur du bien-être intestinal, notamment par sa flore bactérienne complexe et le maintien de son équilibre. Parmi toutes les espèces présentes dans la flore, les bactéries productrices d'acide lactique fascinent depuis quelque décennie les chercheurs pour leurs effets bénéfiques pour la santé de l'homme dont les bifidobactéries.

Les bifidobactéries sont des habitants naturels du microbiote intestinal, ils s'installent au niveau de l'intestin au bout du 2ème ou 3ème jour après la naissance chez les enfants allaités au sein. Et en vue de leurs effets bénéfiques sur la santé de l'homme ces souches sont incorporées dans les aliments dites probiotique.

Les bactéries probiotiques sont des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, ont des effets bénéfiques sur l'équilibre et les fonctions physiologiques du microbiote intestinal **(FAO/WHO, 2002)**.

Les produits laitiers fermentés sont connus pour être de bons vecteurs de probiotiques notamment en raison de leurs larges consommations. Il a ainsi été suggéré que la prise quotidienne des probiotiques doit être comprise entre 10^8 et 10^9 unités formant colonie (UFC) pour avoir un effet.

Le maintien de la viabilité et de la fonctionnalité des bactéries probiotiques jusqu'à ce qu'elles atteignent leur destination dans le tube digestif est primordial **(Mattila-Sandholm *et al.*, 2002)**. Cependant, des études conduites sur plusieurs produits laitiers provenant du commerce montrent une perte de viabilité des probiotiques au moment de leurs consommations. Il est donc indispensable que

les souches sélectionnées doivent montrer une capacité à survivre dans des milieux à forte concentration en bile et en oxygène et à faibles valeurs de pH, à détenir des propriétés particulières de colonisation *in vitro*, et à être capables d'interagir avec l'hôte. Hors, les procédés de préparation et de fabrication (fermentation, stockage) perturbent significativement la fonction probiotique et donc l'efficacité des produits finis commercialisés.

Dans ce contexte, nous avons essayé d'élaborer des souches de bifidobactéries potentiellement probiotique par des tests *in vitro* (résistance au pH acide de l'estomac, résistance aux sels biliaire, l'adhérence aux cellules épithéliales et l'activité antimicrobienne envers les souches pathogènes) et les incorporer dans la production d'un lait fermenté et testés l'influence de certain aromes et additifs utilisés dans la production des yaourts probiotique et l'influence aussi du stockage frigorifié à 4C° sur leurs viabilités.

Partie bibliographique

I. Tractus gastro-intestinale et microbiote :

I. 1 Tractus gastro-intestinale :

I. 1.1 Physiologie du tractus :

Le système digestif inclut le tractus gastro-intestinal ainsi que les organes accessoires de la digestion, notamment les glandes salivaires, le foie, la vésicule biliaire et le pancréas exocrine. Le tractus gastro-intestinal permet l'acheminement des aliments mais aussi la digestion chimique et enzymatique de ces derniers depuis leur ingestion au niveau de la bouche jusqu'à leur excrétion au niveau du rectum. Il est composé de la bouche, de l'oesophage, de l'estomac, de l'intestin grêle, lui-même comportant le duodénum, le jéjunum et l'iléon et est terminé par le gros intestin (**Figure 1**). Il a pour fonction l'absorption des nutriments (glucides, protéines, lipides, minéraux et vitamines), mais aussi de l'eau et des électrolytes. Il joue aussi un rôle de protection de l'organisme en prévenant le passage des bactéries et des autres substances indésirables provenant de la lumière intestinale, et exerce enfin un rôle de surveillance immunitaire *via* l'association avec les tissus lymphoïdes. Les fonctions du tractus gastro-intestinal sont régulées par des hormones du système nerveux autonome (**Reed et al., 2009**).

La morphologie et la structure du tube digestif varie d'une personne à une autre en terme de dimension et de zones de surfaces d'absorption (**Desesso et Jacobson, 2001**).

I. 1.2 Description générale du système digestif :

Le tractus gastro-intestinal est un écosystème complexe et ouvert aux microorganismes exogènes. Sa muqueuse étant estimée à 200-300 m², il représente la plus grande surface du corps en contact avec l'environnement. L'écosystème gastro-intestinal est généré par une alliance stable entre 1)

l'épithélium gastro-intestinal, 2) le système immunitaire et 3) une importante flore microbienne. Si l'un des trois composants de l'écosystème est défaillant, des pathologies peuvent survenir. Les interactions entre les microorganismes et l'hôte peuvent être de trois types : symbiose, commensalisme ou pathogénicité. L'hôte est protégé contre la microflore intestinale pathogène par les barrières chimiques et physiques formées par l'épithélium gastro-intestinal (**Bäckhed et al., 2004**).

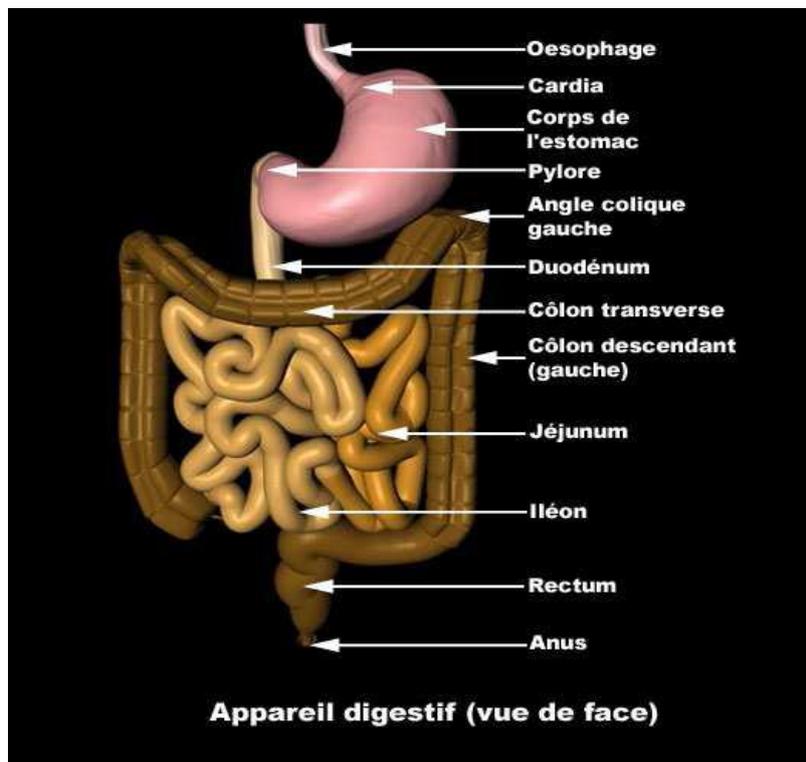


Figure 1 : Schéma simplifié décrivant les compartiments de l'appareil digestif de l'homme. D'après (**Ouwehand et Vesterlund, 2003**).

I. 2. Microbiote intestinal :

I. 2.1 Generalité :

Le microbiote intestinal désigne l'ensemble de la population de microorganismes vivant au sein du tractus gastro-intestinal en accord avec l'hôte. Il est composé de nombreuses espèces bactériennes, et est de loin le microbiote le plus peuplé et le plus complexe (**Raibaud et Ducluzeau 1989**).

La prévalence des bactéries dans le tractus gastro-intestinal dépend des conditions qui y régissent. Deux catégories de bactéries sont distinguées : les bactéries autochtones et les bactéries allochtones. Les bactéries autochtones ou indigènes se trouvent habituellement dans des niches particulières. On y trouve des bactéries dominantes, de 10^8 à 10^{11} UFC/g fèces, qui sont souvent anaérobies strictes et composée de 25 à 40 espèces, il y a aussi les bactéries sous-dominantes, de 10^6 à 10^8 UFC/g fèces. Les bactéries allochtones ou en transit provenant d'autres habitats que le tractus qui sont inférieures à 10^6 /g de fèces. La majorité des bactéries pathogènes sont allochtones. Quelques bactéries pathogènes peuvent cependant être autochtones. Elles vivent alors normalement en « harmonie » avec l'hôte, excepté lorsque l'équilibre du système est rompu (**Hao et Lee 2004**).

I. 2.2 Origine et développement du microbiote intestinal :

L'établissement du microbiote intestinal résulte de diverses séquences de colonisation bactérienne. Au moment de la naissance, le nouveau-né quitte un environnement stérile (utérus) et se retrouve exposé à de nombreuses bactéries provenant de sa mère (microbiotes vaginal, intestinal et cutané) et de son environnement immédiat (milieu hospitalier ou autre, personnel hospitalier, entourage...).

En effet, dès la rupture des membranes foetales, les bactéries envahissent le nouveau-né et colonisent les surfaces en contact avec l'extérieur (**McLoughlin et Mills 2011**). Les bactéries sont détectables dans les fèces quelques heures après la naissance (**Del Chierico et al., 2012**). Le niveau de colonisation de l'intestin du nouveau-né est estimé à 10^8 à 10^{11} UFC/g de fèces, 48 heures après sa naissance (**Campeotto et al., 2007**). Le tractus gastro-intestinal est d'abord colonisé par les bactéries aérobies et anaérobies facultatives. En consommant l'oxygène, ces bactéries, permettent la colonisation par des bactéries anaérobies strictes (**Vael et Desager 2009**). En effet, des études indiquent qu'en général, les

nouveaux-nés sont premièrement colonisés par des entérobactéries (*Escherichia coli*), des staphylocoques, des entérocoques (*Enterococcus faecalis*), des streptocoques et des lactobacilles qui semblent créer un environnement réduit favorable à l'établissement deux à trois jours après la naissance des bactéries appartenant à des genres comme *Bacteroides*, *Bifidobacterium* et *Clostridium* ainsi que les lactobacilles supportant mal l'oxygène (**Coudeyras et Forestier 2010**).

La composition du microbiote se diversifie en fonction de différents paramètres comme l'allaitement et se stabilise après la diversification du régime alimentaire. L'équivalent du microbiote adulte est atteint en moyenne à l'âge de deux ans (**Leclerc et al., 2007**). Des études indiquent que le vieillissement entraîne un déclin des bifidobactéries en faveur des entérobactéries (**Woodmansey 2007**). Cette diminution des bifidobactéries peut avoir un impact sur la santé du sujet âgé car ces bactéries sont impliquées dans la stimulation du système immunitaire et dans les processus métaboliques, ce qui pourrait en partie expliquer les problèmes de malnutrition des sujets âgés (**Guigoz, Doré et Schiffrin 2008**).

I. 2.3 Distribution des bactéries dans le tube gastro-intestinal humain :

L'environnement gastro-intestinal comprend trois régions principales qui offrent des conditions physico-chimiques très différentes aux microorganismes qui s'y trouvent.

Le premier compartiment, l'estomac, se caractérise par la présence d'oxygène apporté par la déglutition et par une forte acidité. De ce fait, l'estomac héberge sélectivement les microorganismes acido-tolérants et anaérobies facultatifs comme les lactobacilles, les streptocoques, les levures, etc.

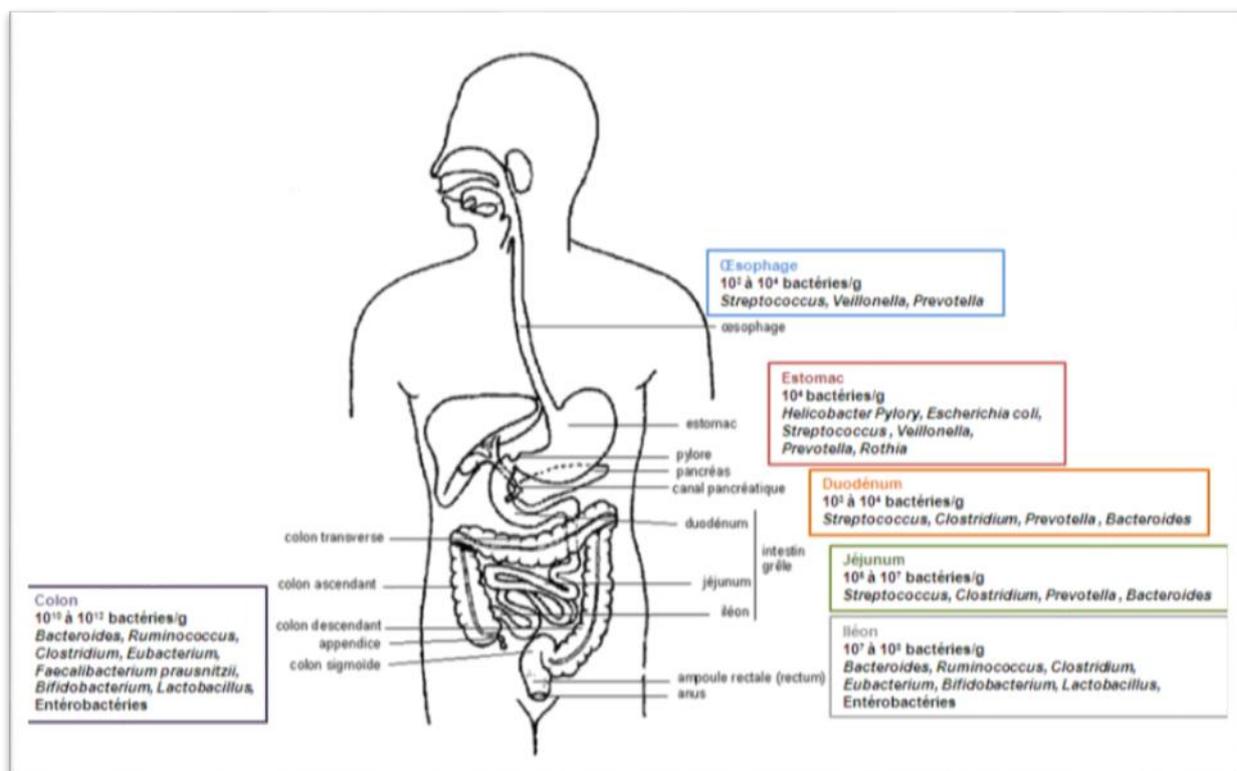


Figure 2 : Le microbiote associé au tractus gastro-intestinal humain D’après (Coudeyras et Forestier 2010).

Dans le deuxième compartiment, l'intestin grêle, la microflore est constituée essentiellement de bactéries anaérobies facultatives tels que les lactobacilles, les streptocoques et les entérobactéries, et anaérobies strictes notamment les bifidobactéries, les bactéroïdes et les clostridies.

Dans le dernier compartiment, le côlon (dépourvu d'oxygène), le transit digestif est plus lent et la flore microbienne est plus abondante, représentant 35 à 50 % du volume du contenu du côlon humain. La microflore du côlon est très complexe et est dominée par les bactéries anaérobies strictes (*Bacteroides* sp., *Clostridium* sp., *Bifidobacterium* sp...). Tandis que les bactéries anaérobies facultatives sont moins nombreuses et représentées par les lactobacilles, les entérocoques, les streptocoques et les Enterobacteriaceae. Les levures (ex. *Candida albicans*) sont peu représentées (**figure 2**).

La charge microbienne dans les différents compartiments a été estimée à environ : 10^4 , 10^{3-4} , 10^{5-7} , 10^{7-8} et 10^{10-11} unité formant colonies (UFC) par g dans l'estomac, le duodénum, le jéjunum, l'iléon et le côlon respectivement (**Ouwehand et Vesterlund 2003 ; Isolauri et al., 2004**).

La diversité des espèces bactériennes de chaque individu semble unique, mais demeure relativement stable au cours de la vie.

I. 2.4 Effets bénéfique :

Les bactéries du microbiote sont impliquées dans diverses fonctions bénéfiques à l'hôte, comme la prévention des infections causées par les pathogènes, la digestion et la mise à disposition de nutriments ainsi que la maturation du système immunitaire associé aux muqueuses (**Figure 3**).

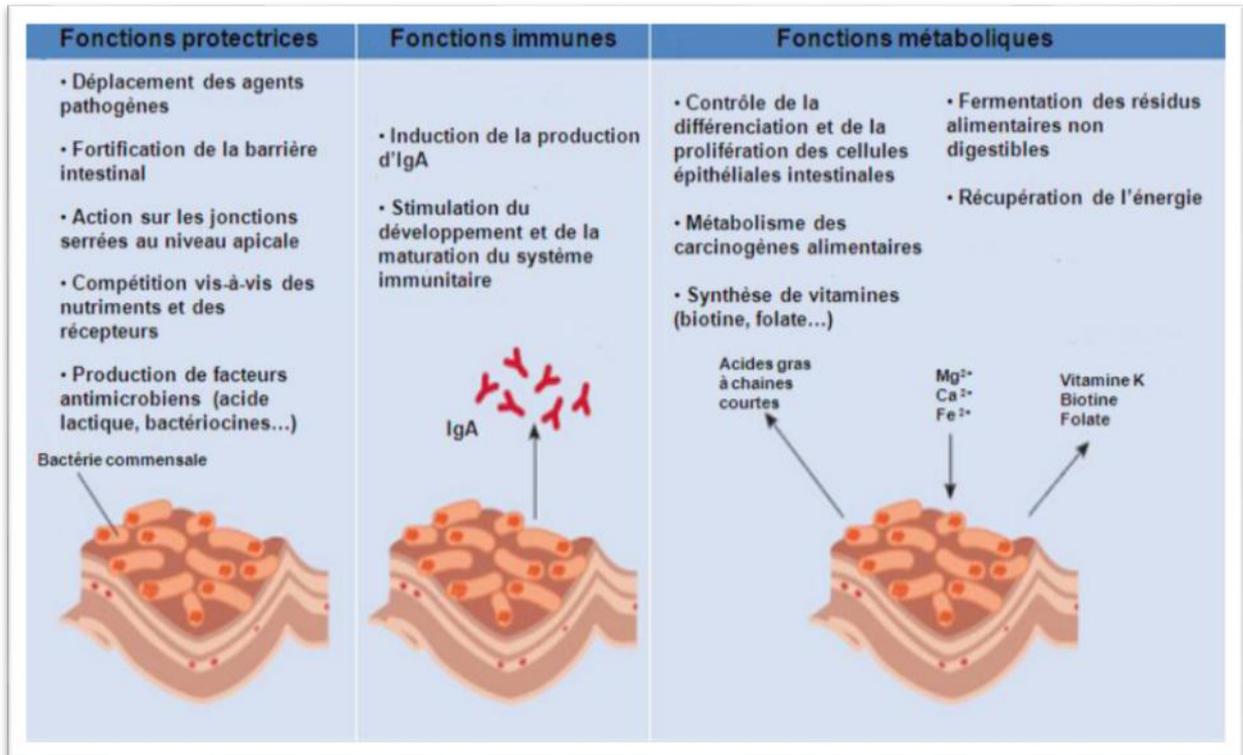


Figure 3 : Les fonctions du microbiote intestinal D'après (O'Hara and Shanahan 2006) :

I. 2.4.1 Participation à la nutrition :

Les bactéries du microbiote intestinal peuvent participer au métabolisme de l'hôte en consommant des éléments non digérés par l'hôte comme les carbohydrates (pectine, cellulose...), fournissant ainsi des nutriments à l'hôte ou à d'autres bactéries du microbiote.

L'activité métabolique la plus intense se retrouve au niveau du colon qui contient le plus grand nombre de bactéries (Srikanth et McCormick 2008).

Plusieurs glucides résistants d'origine végétale représentent une part importante des sources de carbone utilisées par la flore colique comme l'amidon résistant, la cellulose, l'hémicellulose, la lignine, la pectine ou l'inuline (Louis *et al.*, 2007). De la même façon, de nombreuses protéines résistent aux protéases pancréatiques dans l'intestin grêle et arrivent donc intactes dans le côlon où elles sont dégradées par la microflore (Macfarlane *et al.*, 1986).

La fermentation des glucides résistants aboutit essentiellement à la formation de SCFA (Short Chain Fatty Acid), principalement de l'acétate, du propionate et du butyrate, ainsi qu'à différents gaz tels que du CO₂, CH₄, H₂, H₂S (**Topping et Clifton, 2001**). Ces SCFA sont une source d'énergie non négligeable utilisable par l'épithélium intestinal puisqu'ils couvrent 10 % à 15 % des besoins de l'organisme et jouent un rôle positif, notamment le butyrate, dans le contrôle de la prolifération et de l'apoptose des cellules tumorales de l'intestin (**Comalada et al., 2006**).

En plus de sa participation dans l'hydrolyse des macromolécules apportées par l'alimentation, le métabolisme du microbiote intestinal libère dans la lumière du tube digestif des vitamines B et K, essentielles à la santé de l'hôte, ou facilitent l'absorption de la vitamine D issue du bol alimentaire, en augmentant l'expression de son récepteur à la surface des entérocytes (**Feng et al., 2005**).

I. 2.4.2 Protection contre les pathogènes :

En dehors de son rôle au niveau des défenses immunitaires de l'hôte, le microbiote intestinal participe activement par d'autres mécanismes dans la lutte contre les infections (**Stecher et Hardt, 2008**).

Parmi les genres les plus abondants dans la flore intestinale commensale, les bifidobactéries et les lactobacilles ont été caractérisés pour leurs propriétés antimicrobiennes et plusieurs de leurs mécanismes inhibiteurs ont été décrits.

La production par des bactéries lactiques de composés antibactériens tels que des bactériocines et des molécules apparentées, des acides organiques ou le peroxyde d'hydrogène (uniquement en présence d'oxygène). Les bactériocines sont des molécules produites par des bactéries à Gram positif, comme les lactobacilles et ayant des effets toxiques sur d'autres bactéries à Gram positif en ménageant des pores dans les parois cellulaires.

Il agit également en perméabilisant les parois des bactéries à Gram négatif, augmentant ainsi leur sensibilité à d'autres composés antimicrobiens.

Par ailleurs, des bactéries lactiques peuvent entrer directement en compétition avec des espèces néfastes pour leurs sites d'adhésion. *L. reuteri* a la capacité de se fixer sur le même récepteur que celui de *Helicobacter pylori*. Certaines souches de bifidobactéries inhibent quant à elles l'adhésion d'*Escherichia coli* entérotoxiques en exprimant une molécule d'adhésion similaire à la leur (Gill, 2003 ; Servin et Coconnier, 2003).

I. 2.4.3 Fonction immunologique :

Le développement de l'immunité du nouveau-né est stimulé par la colonisation bactérienne du tractus gastro-intestinal qui est dépourvu de germe *in-utero*. Cette colonisation intervient dans le développement de l'immunité innée et adaptative.

Des résultats suggèrent que cette relation entre le microbiote intestinal et le système immunitaire est spécifique à l'hôte et aussi à l'espèce. Une étude récente montre en effet que l'influence du microbiote intestinal sur la maturation du système immunitaire de l'hôte est dépendante de la spécificité hôte microbiote. Dans cette étude, des souris axéniques (sans microbiote) ont été colonisées par un microbiote de souris, de rat ou d'humain. L'analyse des cellules du système immunitaire a révélé que les souris colonisées par les microbiotes provenant de rat et d'humain présentent certaines caractéristiques des souris axéniques c'est à- dire que leur système immunitaire semble être peu développé. De plus les souris axéniques colonisées par un microbiote de souris sont mieux protégées contre les infections comparées aux souris colonisées avec un microbiote humain (Chung *et al.*, 2012).

I. 2.5 Facteurs agissant sur la colonisation bactérienne :

I. 2.5.1 Influence du terrain génétique :

Malgré le fait que le nouveau-né se retrouve confronté à une multitude de microorganismes à la naissance, son tractus gastro-intestinal ne sera colonisé que par certaines bactéries capables d'interagir de façon symbiotique avec

l'hôte. L'influence du terrain génétique sur la modulation de la colonisation bactérienne a été mise en évidence par l'observation de l'importante similarité entre des microbiotes provenant de jumeaux.

Différentes études rapportent en effet que les similarités au niveau de la composition du microbiote intestinal sont liées au degré de similitude du terrain génétique (**Stewart, Chadwick et Murray 2005**).

I. 2.5.2 Influence du terme de naissance :

Le microbiote intestinal des nouveau-nés prématurés est moins diversifié et présente un retard d'implantation, notamment pour les espèces anaérobies strictes, comparé à celui des nouveau-nés à terme (**Campeotto et al., 2007**).

Ce retard peut s'expliquer par le fait que les enfants prématurés naissent souvent par césarienne et qu'ils nécessitent parfois une lourde prise en charge (soins intensifs, antibiotiques) associée à un environnement protégé qui les sépare de toute source de microorganismes (**Lorenz 2001**).

I. 2.5.3 Influence du mode d'accouchement :

Le mode d'accouchement influence fortement les conditions de la colonisation du tractus gastro-intestinal du nouveau-né. Des études rapportent que les enfants nés par césarienne présentent une composition du microbiote différente de celle des enfants nés par voie basse. De plus, la population bactérienne du microbiote intestinal des enfants nés par voie basse est semblable à celle du microbiote vaginal de leur mère tandis que le microbiote intestinal des enfants nés par césarienne présente des similitudes avec le microbiote cutané de la mère (**Reid et al., 2011**). Les enfants nés par césarienne présentent en général un retard de colonisation par les lactobacilles, les bifidobactéries et les *Bacteroides* associé à une colonisation par des *Clostridium* plus rapide et plus intense par rapport aux enfants nés par voie basse.

I. 2.5.4 Influence de l'alimentation :

La composition chimique du régime alimentaire apparaît avoir un rôle déterminant pour la définition du microbiote intestinal du tractus gastro-intestinal immature (**Poroyko et al., 2011**). Chez les enfants nourris au sein, la population bactérienne est plus uniforme et plus stable que celle des enfants nourris avec des formules infantiles (**Le Huërou-Luron et al., 2010**). Un enfant né à terme et nourri au sein possède un microbiote intestinal au sein duquel les lactobacilles et les bifidobactéries prédominent par rapport à d'autres bactéries potentiellement pathogènes alors que des coliformes de *Bacteroides* et d'entérocoques prédominent chez les enfants nourris avec des formules infantiles (**Bezirtzoglou et al., 2011**).

D'autre part, la consommation d'aliments dits fonctionnels du fait de leur contenu en probiotiques, prébiotiques ou en protéines bioactives (lactoferine) a également été décrite comme étant capable de modifier la composition du microbiote intestinal (**Prakash et al., 2011**).

I. 2.5.5 Influence des traitements médicamenteux :

L'antibiothérapie est le principal facteur de risque associé à l'altération du microbiote intestinal. Le manque de spécificité attribué à certains antibiotiques peut être responsable de divers désordres notamment au niveau des différents microbiotes d'un organisme.

Une étude a observé que les traitements à base d'antibiotiques réduisent la diversité du microbiote fécal des nouveau-nés et retardent la colonisation par des espèces, considérées comme ayant des effets bénéfiques, telles que les lactobacilles et les bifidobactéries. De plus, ces traitements durant les premiers mois de vie favorisent la colonisation par des pathogènes opportunistes résistant aux antibiotiques (**Bonnemaison et al., 2003**).

D'autres médicaments comme les anti-acides, les inhibiteurs des pompes à protons, ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent modifier

l'environnement intestinal et donc perturber l'équilibre au sein du microbiote (**Huffnagle, 2010**).

I. 2.5.6 Influence des conditions d'hygiène :

L'établissement du microbiote intestinal dépend du degré d'exposition aux bactéries. Cela explique pourquoi en général, le processus d'établissement du microbiote intestinal est différent entre des enfants nés dans les pays émergents par rapport aux pays industrialisés.

Au cours des dernières décennies, la colonisation précoce par les entérobactéries semble avoir fortement diminué dans les pays industrialisés en faveur de la colonisation par les staphylocoques (**Adlerberth et al., 2006**). Les procédures strictes d'obstétrique et d'hygiène appliquées dans les maternités au moment de la naissance semblent être à l'origine de la réduction de l'exposition aux microorganismes provenant de la mère et de l'environnement. Cela a pour conséquence de modifier le processus de colonisation du tractus gastro-intestinal du nouveau-né.

On observe en effet dans ces pays un retard de la colonisation par des bactéries appartenant aux groupes *Bifidobacterium* ou *Bacteroides* (**Campeotto et al., 2007**) et aussi des bactéries des groupes *Enterococcus*, *Lactobacillus* et *Eubacteria* (**Sepp et al., 1997**).

Ces différents facteurs influencent la composition du microbiote intestinal mais on peut noter que le microbiote intestinal est résilient. Cela signifie que malgré l'apparition de déséquilibres, la composition du microbiote intestinal tend à retrouver son état d'origine. Ces observations suggèrent l'existence d'une communication régulière entre le microbiote et son hôte.

II. Les bifidobactéries

II. 1 taxonomie :

Les bifidobactéries ont été isolées et décrites pour la première fois par Henry Tissier à la fin du XIX^{ème} siècle (**Tissier, 1900**). Il a observé en abondance une bactérie en forme de Y dans les fèces d'enfants nourris au sein et absente chez ceux nourris au biberon. Cette bactérie, Gram positive, non sporulée, non productrice de gaz, non mobile, anaérobie et de morphologie bifide a été dénommée *Bacillus bifidus*. Cependant, un microbiologiste Danois, Orla-Jensen, a proposé de classer *Bacillus bifidus* comme une espèce à part entière sous le nom de genre *Bifidobacterium* (**Orla-Jensen, 1924**). Pour lui, les bifidobactéries "constituent un genre séparé, formant probablement une connexion entre les bactéries lactiques et les bactéries propioniques". Néanmoins, il n'y a pas eu de consensus taxonomique clair pour ce nouveau genre et pendant une grande partie du 20^{ème} siècle, les bifidobactéries ont été classées comme membre du genre *Lactobacillus*, en raison de leur forme en bâtonnet et de leurs caractéristiques fermentaires.

Ainsi, le terme générique de *Bifidobacterium*, proposé pour la première fois par Orla Jensen est confirmé en 1974 dans la huitième édition de *Bergey's Manual* (**Buchanan et Gibbons, 1974**). En 1963, Reuter a effectué des tests biochimiques et sérologiques sur des souches de bifidobactéries isolées des fèces d'enfants et d'adultes et a proposé l'arrangement suivant pour l'identification de ces bactéries: des bactéries aux formes bacillaires ,anaérobie , Gram positif, ressemblaient à des lactobacilles, excepté la variabilité morphologique, elles fermentent le glucose en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique d'un rapport 2:1 et fermentent 11 sucres additionnel des sucres déjà étudiés. Sur cette base il conclut que ces bactéries devraient être classées dans la tribu *Lactobacilleae* , famille *Lactobacillaceae* dans le genre *Bifidobacterium*.

Scardovi et Trovatelli (1965) et De Vries *et al.* (1967) ont découvert une nouvelle voie de fermentation des hexoses chez les bifidobactéries, qui ne se trouve pas dans aucune des espèces du genre *Lactobacillus*. L'enzyme principale de cette voie est une fructose-6-phosphate phosphoketolase qui clive le fructose-6-phosphate en érythrose-4-phosphate et en acétyl phosphate. En 1970, Scardovi *et al.* ont commencé à appliquer intensivement le procédé d'hybridation ADN-ADN afin d'évaluer la validité des espèces de bifidobactéries précédemment décrites et pour identifier de nouveaux groupes de séquences ADN homologues parmi les souches qu'ils isolaient dans des diverses niches écologiques. Cette technique d'identification est une avancée significative en bactériologie déterminative et a aidé à résoudre une grande partie de la confusion précédemment rencontrée, quand à la différenciation d'espèce de *Bifidobacterium* qui a été faite principalement sur le profil fermentaire d'hydrate de carbone.

Cependant, l'accumulation d'études détaillant l'hybridation de l'ADN, le contenu en G+C et le métabolisme spécifique, a permis de ressusciter le genre *Bifidobacterium*. Les bifidobactéries forment un genre phylogénétiquement cohérent au sein de l'embranchement des *Actinobacteria* (Masco *et al.*, 2004). Cet embranchement comprend également les corynebactéries, les mycobactéries et les streptomycètes (Embley et Stackebrandt, 1994). Les bifidobactéries représentent aujourd'hui plus de 30 espèces, isolées principalement du TGI d'hommes ou d'animaux. Leur génome a un contenu en G+C généralement élevé qui varie de 42 à 67% (Felis and Dellaglio, 2007). La teneur en G+C de *Bifidobacterium bifidum* vaut approximativement 62% (Zhurina *et al.*, 2011). Le genre *Bifidobacterium* est différencié par rapport aux autres genres qui lui sont proches par un ensemble de caractères physiologiques et biochimiques (Tableau 1).

Tableau 1 : Différenciation du genre *Bifidobacterium* avec les genres qui lui sont voisins (**Heddadji, 2007**).

	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>
Produits majeurs de la fermentation	A-L	S	P	B, AF	L
Tolérance à l'oxygène	-	+	V	-	V
Production de gaz à partir du glucose	-	-	-	V	V
Catalase	-	V	(+)	-	-
Indole	-	-	V	-	-
Réduction des nitrates	-	(+)	(+)	V	-
Liquéfaction de gélatine	-	(-)	(+)	V	-
Acidification du :					
Rhamnose	-	V	(-)	(-)	V
Sorbose	-	V	V	(-)	(-)
Glycérol	-	-	(+)	(-)	(-)
Erythritol	-	-	(+)	(-)	(-)
Adonitol	-	-	V	(-)	(-)
Dulcitol	-	-	(-)	(-)	(-)

II. 2 Ecologie :

À ce jour, plus de 40 espèces ont été isolés et attribué au genre *Bifidobacterium* (**Heping et Cai., 2014**) (**Tableau 2**). Ces bactéries ont été isolées à partir de cinq différentes niches écologiques : l'intestin, la cavité buccale, les aliments, l'intestin des insectes, et les eaux usées (**Prasanna et al ; 2014**).

Tableau 2 : les différentes espèces appartenant au genre *Bifidobacterium*.

Numero	espèces	Date d'isolement	Source	phylogroupe
1	B.actinocoloniiforme	2011	Bee-GI	B. asteroides
2	B. adolescentis	1963	Human-GI	B. adolescentis
3	B. angulatum	1974	Human-GI	B. adolescentis
4	B. animalis ssp. animalis	2004	Rodent-GI	B.pseudolongum
5	B. animalis ssp. lactis	1997	Dairy products	B.pseudolongum
6	B. asteroides	1969	Bee-GI	B. asteroides
7	B. biavatii	2012	Monkey-GI	B. scardovii
8	B. bifidum	1924	Human-GI	SS
9	B. bohemicum	2011	Bee-GI	SS
10	B. bombi	2009	Bee-GI	SS
11	B. boum	1979	Bovine-GI	B. boum
12	B. breve	1963	Human-GI	SS
13	B. callitrichos	2012	Monkey-GI	B. adolescentis
14	B. catenulatum	1974	Human-GI	B. adolescentis
15	B. choerinum	1979	Swine-GI	B.pseudolongum
16	B. coryneforme	1982	Bee-GI	B. asteroides
17	B. cuniculi	1979	Rodent-GI	B. cuniculi
18	B. dentium	1974	Human-dental	B. adolescentis
19	B. gallicum	1990	Human-GI	B.pseudolongum
20	B. gallinarum	1983	Poultry-GI	B. pullorum
21	B. indicum	1969	Bee-GI	B. asteroides
22	B. kashiwanohense	2011	Human-GI	B. adolescentis
23	B. longum ssp. infantis	2008	Human-GI	B. longum
24	B. longum ssp. longum	1963	Human-GI	B. longum
25	B. longum ssp. suis	2008	Swine-GI	B. longum

26	<i>B. magnum</i>	1974	Rodent-GI	ss
27	<i>B. merycicum</i>	1991	Bovine-GI	<i>B. adolescentis</i>
28	<i>B. minimum</i>	1982	Sewage	ss
29	<i>B. mongoliense</i>	2009	Dairy products	ss
30	<i>B. pseudocatenulatum</i>	1979	Human-GI	<i>B. adolescentis</i>
31	<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i>	1992	Bovine-GI	<i>B. pseudolongum</i>
32	<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>pseudolongum</i>	1992	Swine-GI	<i>B. pseudolongum</i>
33	<i>B. psychraerophilum</i>	2004	Swine-GI	<i>B. cuniculi</i>
34	<i>B. pullorum</i>	1974	Poultry-GI	<i>B. pullorum</i>
35	<i>B. reuteri</i>	2012	Monkey-GI	ss
36	<i>B. ruminantium</i>	1991	Bovine-GI	<i>B. adolescentis</i>
37	<i>B. saeculare</i>	1992	Rodent-GI	<i>B. pullorum</i>
38	<i>B. saguini</i>	2012	Monkey-GI	ss
39	<i>B. scardovii</i>	2002	Human-blood	<i>B. scardovii</i>
40	<i>B. stellenboschense</i>	2012	Monkey-GI	<i>B. scardovii</i>
41	<i>B. stercoris</i>	2010	Human-GI	<i>B. adolescentis</i>
42	<i>B. subtile</i>	1982	Sewage	ss
43	<i>B. thermacidophilum</i> ssp. <i>Porcinum</i>	2003	Swine-GI	<i>B. boum</i>
44	<i>B. thermacidophilum</i> ssp. <i>thermacidophilum</i>	2003	Sewage	<i>B. boum</i>
45	<i>B. thermophilum</i>	1969	Swine-GI	<i>B. boum</i>
46	<i>B. tsurumiense</i>	2008	Rodent-dental	ss

Dans le règne animal, la présence des bifidobactéries a été constatée majoritairement dans le tube digestif des mammifères. La présence des bifidobactéries chez la souris est occasionnelle (**Mitsuoka et Kaneuchi, 1977**). Scardovi et Trovatelli (1969) et Biavatti et al (1982) ont identifié trois espèces de *Bifidobacterium*, *B. asteroides*, *B. coryneforme* et *B. indicum* chez les abeilles (**Biavati et al., 1982**).

Trois espèces de bifidobactéries ont été isolées à partir des eaux usées : *B. minimum*, *B. subtile* et *B. thermacidophilum* (**Dong et al., 2000**).

Il n'y a aucun test qui permet la détermination de l'origine d'une souche ; animale ou humaine (**Shah, 2011**).

II. 3 Caractères morphologiques :

Les bactéries du genre *Bifidobacterium* présentent une forme globalement bacillaire à Gram positif, anaérobie stricte, immobiles et non sporulante (**Roy, 2011**). Certaines souches développent des ramifications en formes V, Y, X, ou d'autres formes. Cependant, ce polymorphisme dépend principalement du milieu de culture et des conditions de croissance (**Shah, 2011**). Plusieurs constituants du milieu de culture peuvent influencer la forme de ces bactéries ; La concentration de N-acétylglucosamine (impliqué dans la synthèse de peptidoglycane) et les acides aminés (l'alanine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, et la serine). Plus les niveaux de N-acétylglucosamine et les acides aminés sont bas, plus les formes seront fortement ramifiées. En revanche, dans un milieu favorable les bacilles sont plus longs (**Seppo et al., 2004**).

Les colonies formés par les *Bifidobacteries* sont lisses, convexe, crème ou blanche , luisante et de consistance molle (**Shah, 2011**).

II. 3.1 Structure cellulaire :

La paroi cellulaire des bifidobactéries est constituée de plusieurs composants structurels, y compris le peptidoglycane (muréine), acides téchoïques et les polysaccharides. Le Peptidoglycane est composé de l'acide N-acétylmuramique et N-acétylglucosamine et ses ponts inter-peptidiques diffèrent entre les différentes espèces de *Bifidobacterium*, et même entre les souches appartenant à la même espèce. Cette caractéristique est parfois utilisée pour leurs différenciations. Les polysaccharides de la paroi cellulaire de *Bifidobacterium* sont constitués de glucose, galactose et rhamnose (**Prasanna et al., 2014**).

La composition en sucres de la paroi varie entre les souches, en particulier le pourcentage de rhamnose et de glucose. C'est le cas aussi des séquences d'acides aminés dans le peptidoglycane qui peuvent varier d'une espèce à une autre (**Seppo et al., 2004**).

La structure du peptidoglycane des bifidobactéries est plus proche des *Lactobacillaceae* que des *Actinomycetaceae* (**Delcenserie et al., 2002**).

II. 4 Physiologie :

II. 4.1 Anaérobiose :

Les bactéries aérobies et aérotolérantes utilisent l'oxygène (O₂) comme accepteur final d'électrons. Chez ces organismes, la croissance en aérobiose se traduit par conversion de l'O₂ en eau (H₂O). Par opposition, chez les microorganismes anaérobies, l'O₂ est une molécule toxique.

Les bifidobactéries sont décrites comme étant strictement anaérobies, bien que certaines souches tolèrent l'oxygène (**Simpson et al., 2005**). La sensibilité à l'oxygène peut différer entre les espèces mais également entre les souches d'une même espèce (**Talwalkar et Kailasapathy, 2003**).

Cependant, le degré de la tolérance à l'oxygène dépend de l'espèce de bifidobactéries et au milieu de culture et dépend même sur la morphologie des souches ; par exemple si elles sont ramifiées ou pas (**Prasanna et al., 2014**).

Les espèces du genre *Bifidobacterium* ne peuvent pas se développer en présence d'oxygène, mais survivent cependant (**Beerens et al., 2000**). Certaines espèces peuvent tolérer l'oxygène en présence de dioxyde de carbone (**Shah, 2011**).

II. 4.2 Température et pH :

La température optimale de croissance des souches de *Bifidobacterium* est comprise entre 37 à 41 °C, dont la température minimale varie de 25 à 28 °C et la maximale varie de 43 à 45 °C (**Roy, 2011**). La température optimale pour la croissance de *Bifidobacterium* d'origine humaine est comprise entre 36 et 38 °C, alors que pour celles d'origine animale varie entre 41 et 43 °C. Aucune

croissance en dessous de 20 °C, et ces organismes ne peuvent pas avoir une thermorésistance supérieure à 46 °C (**Prasanna et al., 2014**).

Le pH optimal pour la croissance de *Bifidobacterium* est de 6,5 à 7,0. Pas de croissance au-dessous du pH 4,5 à 5,0 et au-dessus de 8,0 à 8,5 (**Roy, 2011**). La plupart des espèces ne surviennent pas plus d'une semaine à un pH inférieur à 4,1 et même à 4°C. Et à un pH inférieur à 2,5 la plupart des espèces meurent en moins de 3 h (**Shah, 2011**).

II. 4.3 Résistance aux antibiotiques :

L'étude de la susceptibilité de différentes espèces de *Bifidobacterium* envers certains antibiotiques a pour but de définir des milieux de culture sélectifs et de maintenir les bifidobactéries dans le tractus digestif, en particulier pendant un traitement antibiotique (**Seppo et al., 2004**).

Ainsi, il a été démontré que les bifidobactéries sont résistantes vis-à-vis de nombreux antibiotiques tels que la kanamycine, la néomycine, la streptomycine, la polymyxine, la gentamicine, l'acide nalidixique et le métronidazole (**Biavati et Mattarelli, 2006**). En revanche, l'ampicilline, la bacitracine, le chloramphénicol, la clindamycine, l'érythromycine, la lincomycine, nitrofurantoïne, oléandomycine, la pénicilline G, et la vancomycine inhibent fortement la plupart des espèces. La sensibilité à la tétracycline varie entre les espèces et même entre les souches appartenant au même espèce (**Seppo et al., 2004**).

II. 5 Besoin nutritionnel :

II. 5.1 Besoins en composés azotés et source de carbone :

Les *bifidobacterium* sont d'une façon générale, capable d'utilisés les sels d'ammonium comme seule source d'azote. Mais les espèces *B. suis*, *B. magnum*, *B. choerinum*, *B. cuniculi* and *B. pseudolongum* subsp. *Globosum* ne poussent pas en absence d'azote organique. Et dans un milieu exempt d'azote organique,

une quantité considérable de divers acides aminés sont excrétés par les souches *B. thermophilum*, *B. adolescentis*, *B. dentium*, *B. animalis* et *B. infantis* (**Biavati et Mattarelli, 2006**).

En général, les acides aminés produits en grandes quantités sont l'alanine, la valine, et l'acide aspartique. A l'exception de la souche *B. bifidum* qui peut produire jusqu'à 150 mg / litre de thréonine. La glutamine synthétase et le glutamate déshydrogénase du *Bifidobacterium* peut être impliquée dans l'assimilation des composés azotés par ces micro-organismes (**Seppo et al., 2004**).

Les carbonates ou les bicarbonates sont des sources de carbone utilisées par les bifidobactéries (**scardovi, 1986**). L'utilisation des hydrates de carbone comme source de carbone varie d'une espèce à l'autre. L'espèce *B. infantis* peut fermenter quatre types d'hydrate de carbone alors que l'espèce *B. adolescentis* peut en fermenter plus de 19 (**Shah, 1997**). Toutes les souches d'origine humaine sont capables d'utiliser le glucose, le galactose, le lactose et généralement le fructose comme source de carbone.

II. 5.2 Besoins en sels minéraux et vitamines :

Les besoins en minéraux ont été étudiés surtout chez *B. bifidum*. Cette espèce a besoin de fer, de magnésium et de manganèse.

Le fer ferreux Fe^{2+} est utilisé à un pH 5. Le transport dépend d'une ATPase de la membrane, et son incorporation peut être inhibée de façon compétitive par le zinc. Le fer ferrique Fe^{3+} est utilisé uniquement à pH neutre. Par l'intermédiaire des enzymes ferro, le fer est impliqué dans la production d'acide acétique par *B. bifidum* (**Seppo et al., 2004**).

La plupart des espèces de bifidobactéries d'origine humaine sont capables de produire des vitamines telles que la thiamine (B1), riboflavine (B2), pyridoxine (B6), acide folique (B9), cobalamine (B12), acide ascorbique (C), acide

nicotinique (PP) et biotine (H). Toutefois, cette capacité est variable selon les espèces et les souches de la même espèce (**Biavati et Mattarelli, 2006**).

Les capacités synthétisant ces vitamines pourraient être importantes, les approvisionnements de vitamine pour l'hôte ne peuvent être affectés car la demande des vitamines par ces bactéries serait minimum ou zéro dans le système gastro-intestinal (**Shah et Lankaputhra, 2002**).

II. 5.3 Les facteurs bifidogènes :

➤ Définition :

Il y a des différences entre les facteurs bifidogènes et les facteurs de croissance pour les bifidobactéries en termes de leurs natures et de leurs fonctions. Les facteurs de croissance sont des composés qui favorisent la croissance des bifidobactéries *in vitro* mais ne peuvent pas être livrés aux grands intestins ou caecum pour favoriser sélectivement la prolifération des bifidobactéries.

En revanche, les facteurs bifidogènes sont définis en tant que composés, habituellement à caractère d'hydrate de carbone, qui ne sont pas digérés directement par l'hôte et atteignent le gros intestin ou caecum, où elles sont préférentiellement métabolisées par les bifidobactéries comme source d'énergie (**Ait Abdeslam, 2008**).

Les facteurs bifidogènes sont des substances qui peuvent survivre au métabolisme direct de l'hôte et atteindre le gros intestin où elles sont préférentiellement métabolisées par les bifidobactéries (**Ventura et al., 2004**).

On peut distinguer actuellement trois principale groupes de facteurs bifidogènes : les facteurs BB (BF1, BF2 et glycoprotéines), BI et les facteurs BL (**Ballongue, 2004**).

Le facteur BF1 est un complexe d'oligosaccharides présent dans le lait de femme et aussi, dans des parties mineures, dans le lait de plusieurs autres mammifères. Ces oligosaccharides ont été classés en deux groupes, neutres et acides. L'activité bifidogène est proportionnelle au nombre de résidus N-

acetylglucosamine contenue dans les oligosaccharides (**Biavati et Mattarelli, 2006**).

Le facteur BF2 est un protéolysat spécifiquement obtenu à partir de caséine bovine par hydrolyse, la trypsine, la papaïne ou du pancréas (**Biavati et Mattarelli, 2006**).

Les glycoprotéines isolées à partir de colostrum humain et le lactosérum du lait semblent être efficace contre les deux variantes, et ce type d'activité semble être lié à leur fraction de sucre (**Seppo et al., 2004**).

Les facteurs BI et BL : Le facteur BI qui stimule la croissance de *B. infantis*, est détruit par lyophilisation, tandis que le facteur BL, qui active la croissance de *B. longum*, est sensible au chauffage et à l'irradiation.

Ces facteurs sont abondants dans de nombreux extraits de plantes ainsi que des extraits de foie et le lait. Les facteurs de BI de lait humain sont de deux types : la thermo-radiolabile BI et la thermo-radiostable BI. Ces facteurs sont des protéines, de même que les facteurs BL du lait humain (**Seppo et al., 2004**).

II. 6. Métabolisme :

Chimio-organotrophes avec un métabolisme fermentaire, les bifidobactéries peuvent cataboliser plusieurs sources de sucre et toutes peuvent fermenter le glucose, le fructose et le galactose (**Figure 4**).

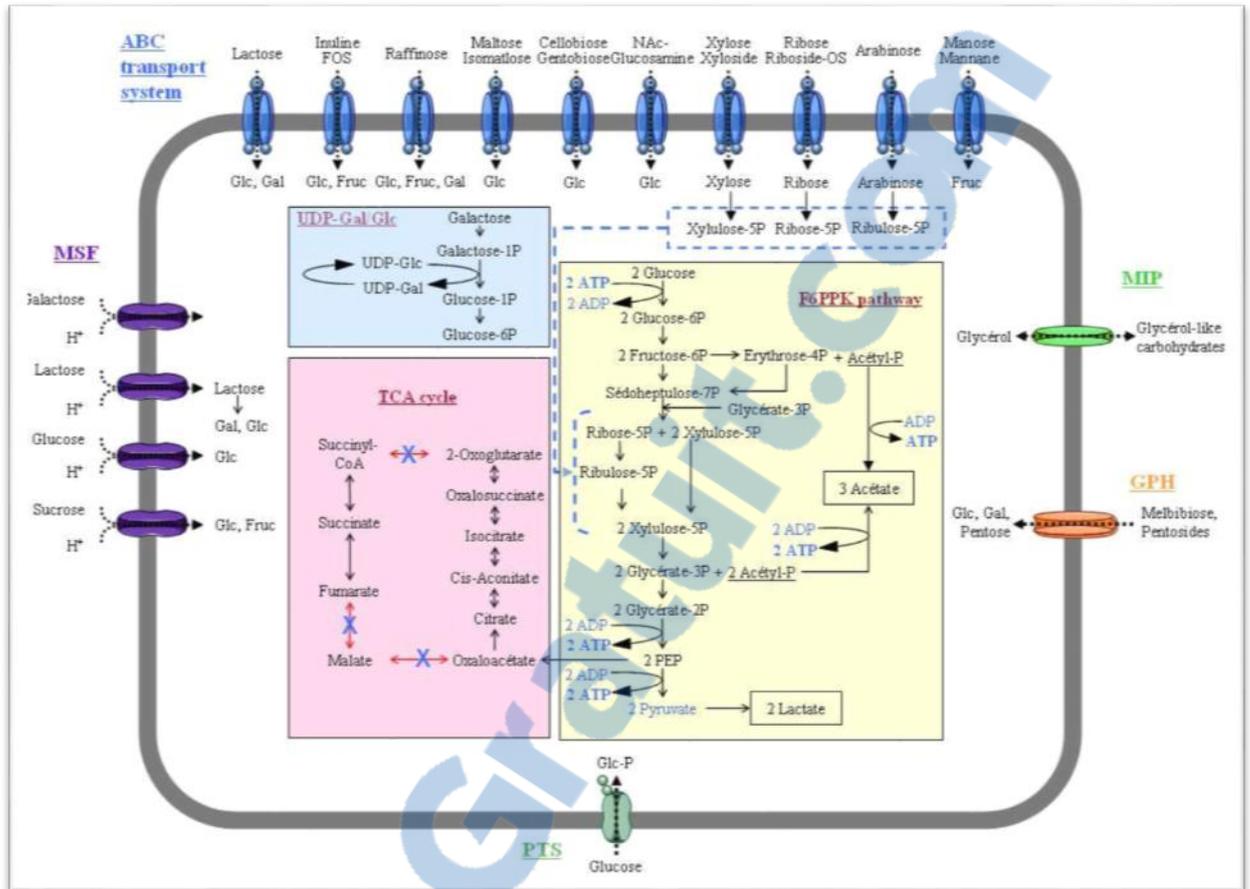


Figure 4: Métabolisme général des bifidobactéries. D'après (Lee et O'Sullivan, 2010). ABC : ATP binding cassette systems ; GPH : glycoside–pentoside–hexuronide cation symporter family ; MIP : major intrinsic protein ; MSF : major facilitator superfamily ; PTS : sugar phosphotransferase systems

Les hexoses sont dégradés par une voie métabolique particulière, la voie de la fructose-6- phosphate phosphoketolase (F6PPK) (EC 4.1.2.2) ou « bifid shunt ». Il existe également une voie partielle de la glycolyse ainsi qu'une voie partielle du cycle d'acide tricarboxylique (cycle de Krebs; les gènes codant pour la fumarase, l'oxoglutarate déshydrogénase et la malate déshydrogénase étant absents). Des différences existent entre les espèces dans leur capacité à fermenter d'autres glucides ou des alcools.

La fermentation de deux moles de glucose produit approximativement trois moles d'acide acétique, deux moles d'acide lactique et 2,5 moles d'ATP. L'enzyme clé de cette voie métabolique, la F6PPK, est considérée comme un

identifiant taxonomique pour la famille des Bifidobacteriaceae (**Felis et Dellaglio, 2007**).

Il est intéressant de noter que 8.9% des protéines prédites à partir du génome de *Bifidobacterium bifidum* (**Turroni et al., 2010**) seraient impliquées dans le transport et le métabolisme des glucides. Ceci est équivalent à 30% de plus qu'observé chez d'autres organismes (**Schell et al., 2002**).

II. 7. Propriétés génotypiques :

➤ La composition en bases cytosine-guanine de l'ADN

Les bifidobactéries sont phylogénétiquement distinctes des autres bactéries lactiques avec un contenu en G+C généralement élevé qui varie de 42 % à 67 % (**Benkaddour, 2013**). Ce taux est en général supérieur à 55% par rapport aux bases A+T. Miyake *et al* ont classé les bifidobactéries en deux groupes : les « G+C pauvre » (45-55%) et les « G+C riches » (55-67%) tandis que Jian *et al* 2001 ont les a classer en 3 groupes : les « G+C riches » (55-67%), les « G+C pauvres » (45%) et les bifidobactéries ayant un % G+C intermédiaire (55%) (**Heddadji, 2007**).

➤ Les plasmides

Les plasmides ne sont ubiquitaires chez les bifidobactéries et lorsque sont présents soient de petite taille (1000 à 1500pb), leur présence chez une espèce donnée est plutôt considérée comme facteur de caractérisation que d'identification de cette espèce (**Mattarelli et Biavati, 2014**). Dans l'étude de Sgorbati *et al.*, (1982), vingt pour cent des souches de bifidobactéries contenaient un ou plusieurs plasmides. *B. longum* est la seule espèce d'origine humaine dont 70% des souches sont porteuse d'ADN extrachromosomique. De manière étonnante, *B. infantis*, souvent présent avec *B. longum* dans les prélèvements, ne présente pas de plasmides (**Kouame, 2013**).

A présent, les plasmides sont détectés chez cinq espèces de *Bifidobacterium* : *B. longum*, *B. breve*, *B. globosum*, *B. asteroides* et *B. indicum* (Lee et O'Sullivan, 2006).

- *B. longum* (espèce du genre *Bifidobacterium* la plus fréquente dans l'intestin humain) renferme treize modèles plasmidiques (1,25 à 9,5 MDa).
- *B. globosum* (bifidobactérie d'origine animale la plus courante) contient un plasmide de chacune des trois classes de poids moléculaires (13,5-24,5 et 46 MDa).
- *B. asterofdes* (exclusivement trouvé dans l'intestin d'abeille) possède quatorze types de plasmides (1,2 à 22 MDa) structurellement très hétérogènes.
- *B. indicum* (provenant également uniquement d'intestin d'abeille) : 60% des souches isolées contiennent un plasmide unique de 22 MDa.
- *B. breve* (espèce fréquente dans l'intestin d'enfant) : C'est dans le but d'utiliser cette souche pour des recherches en génie génétique que Iwata et Morishita (1989) se sont intéressés à *B. breve* et y ont mis en évidence des plasmides dans 40 % des souches de cette espèce. Cependant, (Sgorbati *et al*) n'avaient pas trouvé de plasmide chez *B. breve*. L'équipe d'IWATA expliquerait cette différence par l'origine écologique des souches testées, les siennes provenant bien d'intestins humains (Baratte-Euloge, 1992).

➤ Les séquences d'ADN étudiées

L'étude de la séquence de l'ADN est un bon moyen pour pouvoir identifier une espèce bactérienne, mais aussi pour pouvoir étudier le lien de parenté entre des souches appartenant à une même espèce (Hedaddji, 2007) :

Le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S : Le gène codant pour l'ARNr 16S a été séquencé pour presque toutes les espèces et sous espèces de bifidobactéries. Ce gène est très bien conservé, jusqu'à 99% dans le genre *Bifidobacterium* (Delcenserie *et al.*, 2002).



En tenant compte de leur différentes niches écologiques en combinant ces informations avec les analyses comparatives des séquences de leur ADN 16S, ainsi que le séquençage de gènes de ménages (*clpC*, *dnaJ*, *xfp*, *dnaB*, *rpoC* et *purF*), les différentes espèces de *Bifidobacterium* peuvent être regroupées en six (06) groupes : *B. adolescentis*, *B. asteroides*, *B. boum*, *B. longum*, *B. pullorum*, et *B. pseudolongum* (**figure 5**) (**Turroni et al., 2011**).

➤ **Le gène codant pour la protéine Hsp60 :**

La séquence partielle du gène codant pour la protéine de choc thermique de 60kDa (*hsp60*) de 30 espèces de bifidobactéries ainsi que de *Gardnerella vaginalis* a été déterminée afin d'étudier la taxonomie du genre. Il a été établi que la similitude de séquence est de 99,4 à 100% dans la même espèce, 96% en cas de sous-espèces et 73-96% (85% en moyenne) entre les différentes espèces. La similitude entre la séquence du gène *hsp60* de *G. vaginalis* et les séquences de *Bifidobacterium* est de l'ordre de 75%. Cette classification semble être meilleure que la classification par le 16SrDNA car le dendrogramme obtenu est mieux corrélé avec le contenu en G+C. Avec le classement phylogénique basé sur *hsp60*, toutes les bactéries « G+C riches » (55-67%, la plupart des espèces du genre *Bifidobacterium*) sont dans un même cluster tandis que les bactéries « G+C pauvres » (45%, *B. inopinatum*) se retrouvent dans un autre cluster avec *Gardnerella vaginalis*. Un troisième groupe est formé par des bifidobactéries ayant un « G+C moyen » (55%, *B. denticolens*) (**Kouame, 2013**).

➤ **L'espace intergénique 16S-23S :**

Les gènes codant pour les ARN ribosomiaux 16S et 23S forment un opéron présent en plusieurs copies. Autant la séquence du 16SrDNA est un bon moyen d'identification du genre *Bifidobacterium*, autant la séquence nucléotidique située dans l'espace intergénique 16SrDNA-23SrDNA est un bon moyen d'établissement des relations intraspécifiques. En effet, chaque souche est caractérisée par sa séquence ITS « *Internally Transcribed Spacer* » (**Delcenserie et al., 2002**).

Ainsi, ces séquences sont de bons outils pour l'identification des souches. Le taux maximum de divergence entre les souches appartenant à la même espèce est de 13% (Leblond-Bourget *et al.*, 1996).

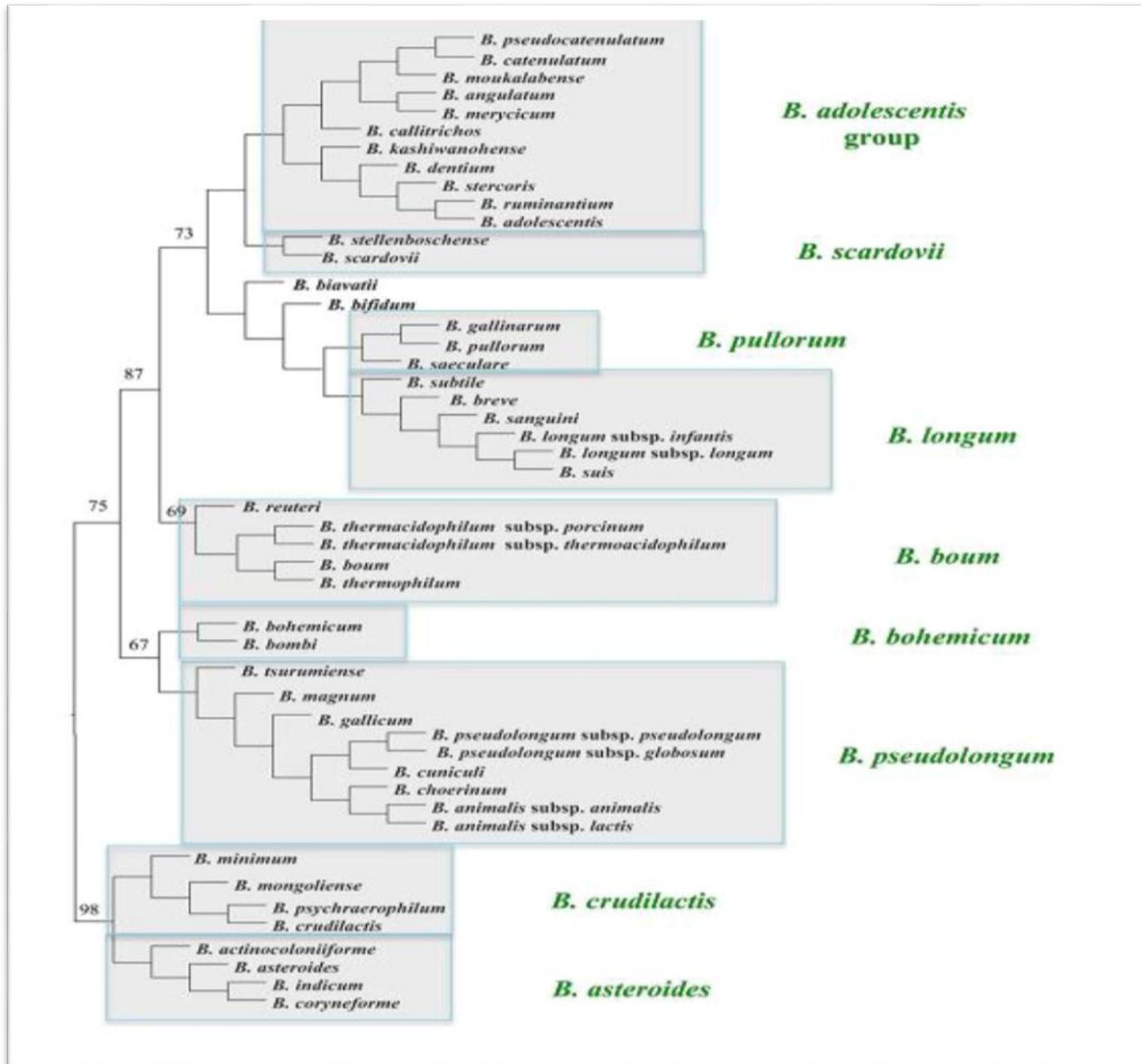


Figure 5 : Arbre phylogénétique des bifidobactéries obtenue par l'analyse du gène codant pour L'ARN ribosomal 16S (Bottacini *et al.*, 2014).

III. Les probiotique :

III. 1 Historique et définition :

Le terme « probiotique » a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques (Ait-Belgnaoui, 2006). Dans les années 1900, deux chercheurs découvrent des microorganismes qui ont le pouvoir de moduler la flore intestinale (Colarelli, 2010).

Le concept de probiotique a pour la première fois été proposé par Metchnikof, sans toutefois faire appel au terme probiotique. Ce dernier avait observé que certains paysans bulgares avaient une durée de vie plus longue que la moyenne de l'époque et il avait remarqué que ces derniers consommaient une grande quantité de laits fermentés. À ce moment, il a attribué le prolongement de la longévité à l'effet bénéfique sur la santé des micro-organismes vivants.

C'est suite à ces observations qu'il commença à modifier la flore intestinale de ses patients en leur donnant un lait acidifié par une souche de *Lactobacillus delbrueckii* sous-espèce *bulgaricus*, une espèce utilisée traditionnellement pour la fabrication de yogourt (Moroni, 2007).

Parallèlement, Henry Tissier, pédiatre français, remarque que les bactéries trouvées dans les selles des enfants sains présentent une morphologie particulière, en Y, elles sont dites bifides. Lors d'un épisode infectieux tel que la diarrhée, le nombre de ces bactéries diminue dans les selles des enfants malades. Il suggère d'administrer ces bactéries positives en quantité importante chez les jeunes patients souffrant de diarrhées afin de restaurer la flore microbienne intestinale.

Metchnikoff et Tissier sont donc les premiers à émettre l'idée d'administrer des microorganismes exogènes afin de pallier un éventuel dysfonctionnement de notre écosystème intestinal. Le concept « probiotiques » est né.

En 1935, l'administration d'une préparation contenant des bactéries de l'espèce *Lactobacillus acidophilus* était utilisée pour soulager des symptômes de la constipation (**moroni, 2007**). Mais il faudra attendre 1954 pour réellement voir apparaître le terme de « probiotique » dans la revue *Hippokrates* dans un article intitulé « AntiRund probiotika » de Ferdinand Vergin. Dans cet article, il traite des effets délétères des antibiotiques et des effets positifs de certaines substances antimicrobiennes sur la flore intestinale (**Colarelli, 2010**). Il nomme alors les bactéries capables de synthétiser ces substances positives pour l'hôte « probiotiques ».

Selon l'étymologie grecque du mot, « *pro* » qui signifie « pour » et « *bios* » « La vie », Vergin montre bien l'opposition entre les termes **antibiotiques** et **probiotiques**. Il cherche à souligner l'importance des effets bénéfiques qu'apportent ces microorganismes sur la flore intestinale (**Colarelli, 2010**).

En 1965, Lilly et Stilwell, dans la revue *Science*, définissent les probiotiques comme des substances produites par des microorganismes capables de stimuler la croissance d'autres microorganismes (**EM Consult, 2007**).

Ensuite, Parker élargit cette définition à des « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore ». Cette définition inclut potentiellement des produits métaboliques microbiens y compris les antibiotiques (**Ait-Belgnaoui, 2006**). C'est avec la définition de Fuller (1989) que se précise le concept de probiotique. Ce dernier a défini les probiotiques comme : « Un supplément alimentaire composé de micro-organismes vivants ayant des effets bénéfiques sur l'hôte par l'amélioration de la balance de sa flore intestinal ». Cette définition supprime le terme « substance » de la définition proposée par Parker et soulève l'importance de la viabilité des micro-organismes qui composent la préparation dite probiotique (**Fuller, 1989**).

En 1992, Havenaar et Huis in't Velt affinent un tout petit peu plus le terme en « une culture viable composée d'une ou d'un mélange de bactéries qui, lorsqu'elle

est appliquée à l'animal ou à l'homme, exerce un effet bénéfique sur l'hôte en améliorant les propriétés de la flore indigène. » (**Klaenhammer, 2000**).

Les bases amenées par Parker et Fuller ont conduit à une nouvelle définition : « Un supplément alimentaire composé de micro-organismes vivants ayant un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (**Salminen et al., 1998**). Cette définition conserve la nécessité de la viabilité des micro-organismes, comme proposé par Fuller, mais modifie la cible des effets du probiotique.

En 1998, Guarner et Schaafsma précisent que les probiotiques sont « des microorganismes vivants, qui lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (**Klaenhammer, 2000**).

Il est donc clair que toutes ces définitions soulignent que les probiotiques sont un concept **positif, vivant**, améliorant le microbiote intestinal, si la **concentration** consommée est **optimale**.

En 2002, l'Organisation Mondiale de la Santé se penche sur le sujet afin d'officialiser la définition et d'éviter toute dérive. Les probiotiques sont donc définis comme « organismes vivants (appelés bactéries ou ferments) qui, ingérés en quantité suffisante, procurent un bénéfice sur la santé de l'hôte » (**Afssa, 2005**). La recherche évoluant sur le sujet, il devenait primordial de déterminer également des directives pour l'évaluation des microorganismes probiotiques et pour justifier les allégations santé liées à leur consommation.

III. 2 Critères de sélection :

Afin de satisfaire à la définition des probiotiques, les micro-organismes doivent survivre, persister temporairement dans le tractus digestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets positifs pour l'hôte (**Izquierdo Alegre, 2009**).

Selon le rapport de la FAO/WHO (2002), pour qu'un produit soit reconnu comme étant probiotique, une évaluation du produit basée sur plusieurs critères doit être effectuée (**Tableau 03**) (**Amrouch, 2005**).

Tableau 03 : Critères de sélections utilisés en laboratoires pour le screening des probiotiques (Nousiainen et al., 2004).

<i>Critères</i>	<i>But cherché</i>
- Résistance à l'acidité gastrique.	- Survie pendant le passage par l'estomac et duodénum.
- Résistance aux sels biliaires.	- Survie pendant le passage par l'intestin grêle.
- Production d'acide (à partir de glucose et de lactose)	- Production « de barrière acide » efficace dans l'intestin.
- Adhésion au mucus et/ou aux cellules épithéliales humaines.	- Colonisation efficace, réduction des sites d'adhésion des pathogènes à la surface.
- Production de substances Antimicrobiennes.	- Inhibition du développement des germes pathogènes.
- Résistance à la chaleur.	- Survie pendant le processus de transformation.
- Bonnes propriétés technologiques.	- La stabilité, croissance sur une large échelle, survie dans le produit, résistance aux bactériophages.

Afin de démontrer qu'une souche possède ces caractéristiques, plusieurs tests *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires allant des simples essais de résistance aux pH acides jusqu'aux études cliniques chez l'humain. Cependant, il est essentiel que chaque souche à fort potentiel probiotique soit étudiée et documentée de façon indépendante car les caractéristiques nécessaires à l'appellation probiotique ne sont pas associées à l'espèce bactérienne mais bien à la souche elle-même (Dunne *et al.*, 2001). Ceci signifie que deux souches d'une même espèce bactérienne peuvent avoir des capacités très différentes l'une de l'autre et qu'il est impossible d'extrapoler les résultats obtenus chez une souche à une autre.

Une fois toutes les étapes de sélections franchies avec succès, une souche peut être considérée probiotique et utilisée dans des produits de nutrition humaine ou animale (**moroni, 2007**).

Afin de garantir les effets recherchés, il est habituellement recommandé de consommer les probiotiques à des doses de 10^9 à 10^{10} UFC/jour. Cependant, certaines souches sont plus efficaces à des doses moindres alors que d'autres en nécessitent de plus fortes. Les quantités administrées doivent donc être évaluées pour chaque microorganisme et ses conditions de mise en oeuvre (**Grimoud, 2010**).

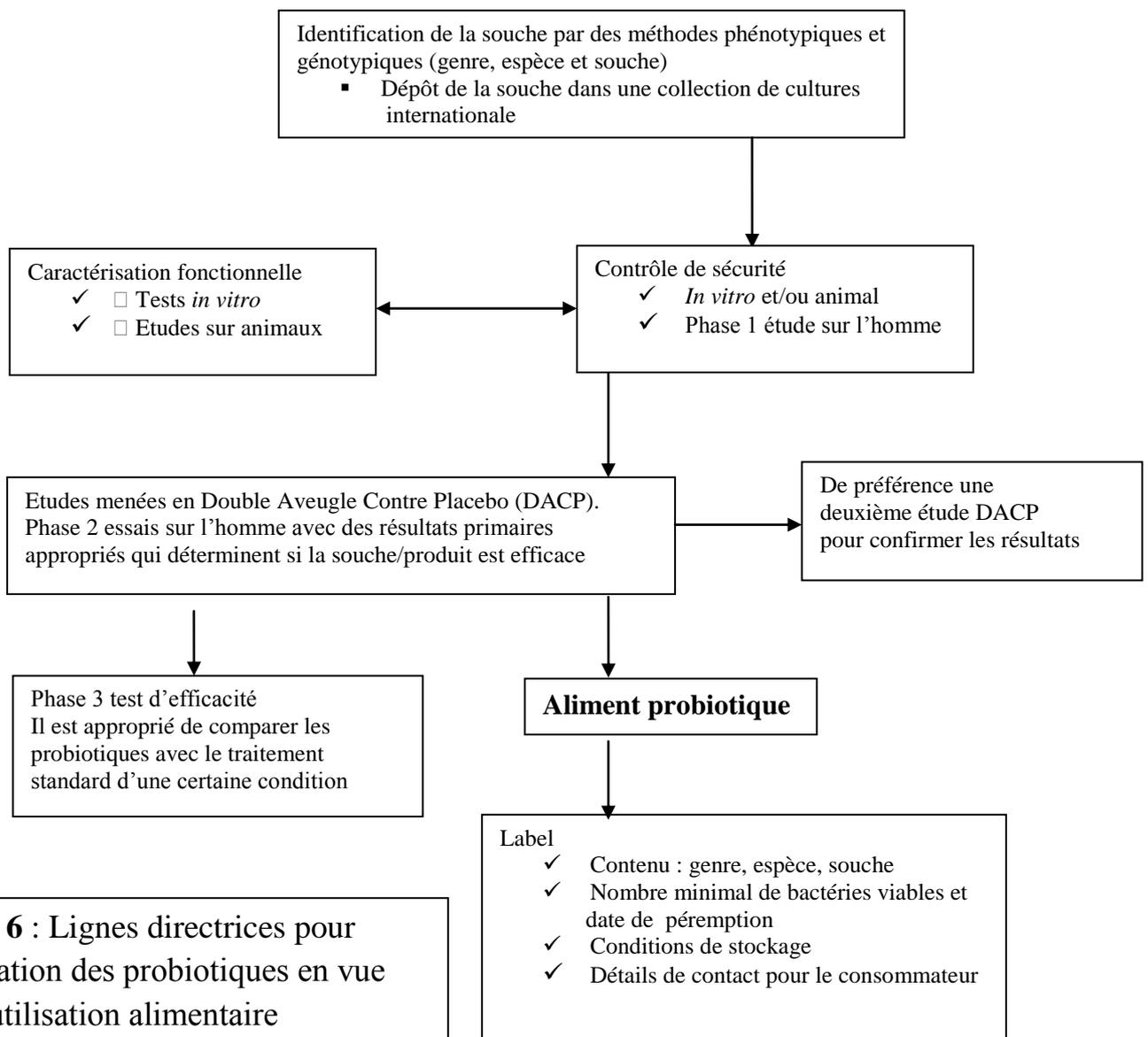


Figure 6 : Lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques en vue d'une utilisation alimentaire (**FAO/WHO. 2002**).

III. 2.1 Critères de sécurité :

Parmi les critères liés à la sécurité, l'identification taxonomique de la souche est une étape importante dans l'établissement de nouvelles souches potentiellement probiotiques (**Holzappel et al., 2001**). Chaque souche doit être identifiée par des techniques moléculaires fiables et confrontée à une nomenclature actualisée (**Gueimonde et Salminen, 2006**).

L'origine de la souche est également une condition importante car l'interaction spécifique avec l'hôte est maximisée lorsqu'elle provient du même habitat (**Alvarez-Olmos et Oberhelman, 2001**). Les souches probiotiques doivent également être sans effet négatif et être sécuritaires pour la santé humaine.

Le probiotique doit porter un nom reconnu scientifiquement et son identification doit être effectuée à l'aide de méthodes récentes et valides combinant les tests phénotypiques et génotypiques (**Amrouch, 2005**).

III. 2.2 Critères fonctionnelles :

➤ La résistance à l'acidité gastrique :

La survie des bactéries dans le suc gastrique dépend de leur capacité à tolérer les bas pH. Le temps de passage peut être d'une heure à quatre heures selon l'individu et son régime. Par conséquent, quelques auteurs proposent que les souches probiotiques doivent résister à un pH de 2.5 dans un milieu de culture pendant quatre heures (**Ammor et Mayo, 2007**).

➤ La résistance aux sels biliaries :

Dans l'intestin grêle, la tolérance aux sels biliaries est un facteur important qui contribue à la survie des probiotiques. Les bactéries qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaries libérés dans le duodénum après ingestion des repas gras.

Les bactéries peuvent réduire l'effet émulsifiant des sels biliaries en les hydrolysant avec des hydrolases, de ce fait diminuant leur solubilité (**Ammor et Mayo, 2007**).

La bile est le second facteur important qui influence le pourcentage de survie des microorganismes probiotiques. Le taux d'acides biliaires synthétisés dans le foie à partir du cholestérol est estimé à 500-700 ml / jour. Ces acides sont sécrétés par la vésicule biliaire dans le duodénum, après la prise alimentaire par un individu.

➤ **Activité antimicrobienne :**

Les bactéries probiotiques doivent essentiellement maintenir de bonnes conditions sanitaires au niveau du tractus digestif, il est donc important qu'elles soient aptes à inhiber le développement des germes indésirables soit :

- Par la production de substances antagonistes de type bactériocines ou autres tels que les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène.
- En empêchant l'adhésion des germes pathogènes aux cellules de la paroi intestinale (**Simon *et al.*, 2005**).

➤ **Colonisation et adhésion aux cellules intestinales :**

Il est généralement convenu que les bactéries probiotiques doivent adhérer au mucus intestinal ou aux cellules épithéliales dans le but de persister dans l'intestin. La capacité des BAL à adhérer aux surfaces des muqueuses empêche leur évacuation rapide par la contraction intestinale et après écoulement péristaltique du digeste, et pourrait également conférer un avantage concurrentiel. Un grand nombre de recherches ont été menées à l'écran des bactéries probiotiques pour leur capacité à se fixer aux cellules intestinales (**Goktepe *et al.*, 2006**).

La capacité d'adhésion à la couche intestinale est un critère de sélection recommandé pour le choix des probiotiques, parce que c'est une condition pour la colonisation des entrailles. L'adhérence constitue le premier mécanisme de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes. Elle est basée sur la réalisation d'un ensemble de tests *in vitro* puis *in vivo* en utilisant des cellules d'origine animale et/ou humaine (**Palomares *et al.*, 2007 ; Reyes-Gavilan *et al.*, 2011**).

L'adhésion permet d'accroître le temps de rétention des probiotiques dans l'intestin et met en contact étroit les bactéries et les cellules épithéliales (**Gueimonde et Salminen, 2006**). Ainsi, un probiotique ayant un fort pourcentage d'adhésion pourra éventuellement stimuler le système immunitaire et prévenir l'implantation de pathogènes sur les cellules épithéliales de l'intestin par des mécanismes de compétition (**Saarela et al., 2000**). Les modèles *in vitro* pour évaluer l'adhésion des probiotiques font appels à des lignées cellulaires provenant de côlons humains telles que les Caco-2 et HT-29 et à des techniques conventionnelles de détection de l'attachement bactérien telles que l'énumération par comptages sur plaques, par coloration Gram, par marquage radioactif ou par de nouvelles approches comme l'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) et la quantification par PCR en temps réel (**Candela et al., 2005**). La capacité d'adhésion évaluée à l'aide de ces modèles *in vitro* est différente pour chaque souche. Ceci est probablement lié à la physiologie et aux facteurs d'adhésion tels que les composés protéiques, polysaccharides, charges ioniques et aux acides lipotéichoïques propres à chaque souche bactérienne (**Crociani et al., 1995**).

III. 2. 3 critères technologiques :

Plusieurs aspects technologiques doivent être pris en compte dans la sélection des probiotiques pour conférer de bonnes propriétés sensorielles au produit fini, tels que :

➤ Viabilité et stabilité des microorganismes

Pour exercer leur effet bénéfique sur la santé, les probiotiques doivent survivre en grand nombre au procédé de fabrication, et à la période d'entreposage au froid qui s'ensuit. Il est en effet généralement admis qu'un nombre minimal de 10^7 cellules viables par gramme de produit est nécessaire pour exercer un effet probiotique. Cependant, la stabilité physique et génétique des cellules ainsi que

toutes les propriétés nécessaires pour exercer leurs bienfaits sur la santé doivent également être assurées (**Izquierdo, 2009**).

De plus, ces souches devraient être viables sans se multiplier pour ne pas provoquer d'effet indésirable sur le goût ou l'arôme du produit ni augmenter l'acidité (**Mattila-Sandholm et al., 2002**).

Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que des cellules en phase stationnaire de croissance, plus tolérantes aux stress environnementaux que des cellules en phase exponentielle, devraient être privilégiées pour la confection de produits contenant des probiotiques en grand nombre (**Heller, 2001**).

➤ **Propriété acidifiante :**

La fonction acidifiante est la plus recherchée des bactéries lactiques qui a pour effet une production importante d'acide lactique conduisant à une acidification rapide et durable (**Jones, 2004**).

III. 3 Principales souches probiotiques ;

Les bactéries probiotiques sont principalement des bactéries lactiques et des bifidobactéries (**Ait-Belgnaoui, 2006**). En effet, ces bactéries sont des membres de la flore normale de l'intestin (**Dunne et al., 2001**), connues pour ne pas présenter de risques toxique ou infectieux (GRAS) et sont relativement faciles à inclure dans des produits laitiers (**Izquierdo, 2009**). La plupart des microorganismes employés comme probiotiques sont cités dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Classification de bactéries lactiques considérées comme probiotiques (**Marteau et Seksik, 2005**)

Lactobacilles	Bifidobactéries	Autres bactéries lactiques
<i>Lb.acidophilus</i>	<i>B.adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lb.brevis</i>	<i>B.animalis DN 173010</i>	<i>Enterococcus faecium SF</i>
<i>Lb.amylovorus</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis c</i>
<i>Lb.bulgaricus</i>	<i>B.brève</i>	<i>Leuconostoc mesenteroidesc</i>
<i>Lb.casei DN 114001</i>	<i>B.infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>

<i>Lb.casei shirota</i>	<i>B.lactis Bb 12</i>	<i>Propionibacterium Freudenreichii</i>
<i>Lb.crispatus</i>	<i>B.langum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lb.gallinarum</i>	<i>B.thermophilus</i>	
<i>Lb.gasseri</i>		
<i>Lb.johnsonii La1</i>		
<i>Lb.lactis</i>		
<i>Lb.paracasei</i>		
<i>Lb.plantarum 299v</i>		
<i>Lb.reutri</i>		
<i>Lb.rhamnosus GG</i>		
<i>Lb.cellubiosus</i>		
<i>Lb.fermentum</i>		
<i>Lb.salivarius</i>		

Il faut noter que les bactéries du genre *Bifidobacterium* sont de plus en plus utilisées dans les produits probiotiques à causes des nombreux effets bénéfiques sur la santé associée à leur consommation (**Kimura et al., 1998**).

D'autre microorganisme ne faisant pas naturellement partie de la flore naturelle humaine peuvent également être utilisé comme probiotique et montré des effets thérapeutiques importants tels que l'immunostimulation. L'un des meilleurs exemples est représenté par *Saccharomyces boulardii*, une levure probiotique dans les effets sont les meilleurs documenté (**Izquierdo, 2009**).

III. 4 Effets bénéfiques :

De nombreux effets sur la santé ont été attribués aux probiotiques. Cette gamme diversifiée passe du simple soulagement des symptômes associés à l'intolérance au lactose à la protection contre certains cancers comme celui du côlon. Voici

une brève présentation des principaux effets bénéfiques sur la santé attribués aux probiotiques.

Tableau 5 : Effets positifs des probiotiques sur la santé humaine (effets probables ou suspectés).

Effets des probiotiques	Mécanismes d'activité proposés
Amélioration de la digestion du lactose	- Action de la β -galactosidase bactérienne dans l'intestin grêle
Diminution des allergies alimentaires	- Diminution du passage des protéines alimentaires par diminution de la perméabilité intestinale - Stimulation du système immunitaire
Réduction du risque des diarrhées	- Résistance à la colonisation par des pathogènes - Stimulation du système immunitaire
Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin	- Modulation de la flore intestinale - Stimulation du système immunitaire
Réduction du cholestérol	- Assimilation du cholestérol - Déconjugaison des sels biliaires
Prévention du cancer du côlon	- Stimulation du système immunitaire - Production de composés antimutagéniques - Modulation des enzymes fécales carcinogéniques - Dégradation de carcinogènes - Elimination des bactéries impliquées dans la production de cancérogènes

La majorité des applications des souches probiotiques sont en voie de développement et beaucoup reste encore à faire. Un intérêt particulier devra être

porté à la recherche de nouvelles souches plus efficaces, à la sélection des souches appropriées et des concentrations à utiliser, à la maîtrise des conditions des essais cliniques et à l'exploration des mécanismes d'action.

➤ **Amélioration de la digestion du lactose :**

L'intolérance au lactose est causée par la diminution dans l'intestin de l'enzyme qui hydrolyse de glucide : la β -galactosidase. Il provoque, lors d'ingestion de produits laitiers, des diarrhées, des ballonnements et des gaz (**de Vrese et al., 2001**). La diminution des symptômes dus à l'intolérance au lactose a été un des premiers effets documentés des probiotiques (**Marteau et al., 2002**) et est principalement dû à la production de β -galactosidase par de nombreuses bactéries probiotiques (entre autre celles du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*). Il a été démontré que les bactéries qui survivaient dans l'intestin gardaient une activité métabolique suffisante pour hydrolyser le lactose (**Drouault et al., 199**), et que celles dont la membrane est facilement lysée par les acides biliaires libéraient leur lactase dans l'intestin (**Marteau et al., 1990**).

➤ **Réduction du taux de cholestérol sanguin :**

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce fait, comme l'assimilation du cholestérol par les bactéries ou l'hydrolyse des sels biliaires conjugués.

Les acides biliaires, synthétisés par le foie à partir du cholestérol, sont "recyclés" et utilisés en moyenne trois fois pendant un même repas. L'hydrolyse des sels biliaires conjugués (les acides biliaires doivent être conjugués à la taurine et à la glycine pour être solubles) rend nécessaire la synthèse de sels biliaires supplémentaires, ce qui conduirait à une réduction du cholestérol (**Liong et shah, 2005**).

Une autre explication évoque une diminution du taux de cholestérol qui serait uniquement due à la co-précipitation du cholestérol avec les sels biliaires déconjugués, phénomène qui ne peut pas se produire *in vivo* car le pH est plus élevé que dans un milieu de culture acidifié par les BAL. Des études ont été réalisées sur des humains pour tester l'influence de la consommation de produits

laitiers fermentés sur le taux de cholestérol sanguin, mais les résultats n'ont jamais été concluants (**Pereira et Gibson., 2002**).

➤ **Réduction du risque de diarrhée :**

Plusieurs types de diarrhées sont dus à des infections microbiennes. Des effets protecteurs de souches probiotiques contre certaines infections intestinales ont été observés sur des modèles animaux. Les mécanismes potentiellement impliqués incluent la production d'acide lactique, de peroxyde d'hydrogène, d'autres substances antimicrobiennes telles que les bactériocines, la compétition pour des nutriments ou des récepteurs d'adhésion, des actions anti-toxines et la stimulation du système immunitaire (**Gill, 2003**).

Plusieurs études randomisées contrôlées sur l'homme ont montré l'efficacité des souches probiotiques pour prévenir ou atténuer les perturbations digestives liées à la prise d'antibiotiques (**Hickson et al., 2007**) et les diarrhées nosocomiales infantiles dues surtout à des rotavirus (**Szymanski, 2006**).

➤ **Protection contre les pathologies intestinales :**

Outre les infections intestinales, des études ont démontré l'effet des probiotiques sur des pathologies intestinales comme des maladies inflammatoires du côlon (maladie de Crohn, pouchites ou colite ulcéraire) ou le syndrome du côlon irritable (**Bergonzelli et al., 2005**). Malgré des résultats relativement positifs sur l'amélioration des symptômes associés à ces pathologies, les études cliniques demeurent peu nombreuses et il est difficile d'affirmer avec certitude que les probiotiques ont des effets marqués sur ces maladies intestinales.

➤ **Prévention du cancer du côlon et autres cancers :**

La flore intestinale et le système immunitaire jouent un rôle important dans le processus de la carcinogenèse et certains probiotiques semblent pouvoir agir sur la prévention et le traitement de tumeurs *in vitro* et chez les animaux (**Marteau et al., 2002**). Certains essais ont montré que des probiotiques peuvent diminuer le niveau des molécules impliquées dans le développement du cancer du côlon comme certains enzymes, mutagènes et sels biliaires secondaires (**Wollowski et**

al., 2001). Des études épidémiologiques ont montré une relation inverse entre la consommation de produits laitiers fermentés contenant des lactobacilles ou des bifidobactéries et l'incidence des cancers du colon et du poumon (**Boutron et al.**, 1996). Des études sur l'animal ont montré que la supplémentation de l'alimentation avec des souches spécifiques pouvait prévenir l'établissement, la croissance et la métastase des tumeurs induites chimiquement (**Moreno de LeBlanc et Perdigón**, 2007).

Cependant, cette avenue pour l'utilisation des probiotiques reste très attrayante compte tenu de l'augmentation constante des cas de cancer.

➤ **Stimulation du système immunitaire :**

Les probiotiques possèdent la capacité de stimuler le système immunitaire. Cette stimulation passe par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes comme l'activation de la production de macrophages et l'accélération de la phagocytose par ces derniers (**Perdigón et al.**, 1998), l'augmentation de la production de lymphocytes T et la sécrétion d'interféron- γ par ces derniers (**Halpern et al.**, 1991) et la stimulation de la sécrétion d'IgA lors d'une infection à rotavirus (**Kaila et al.**, 1992). Tous ces effets des probiotiques sur le système immunitaire mènent à un combat plus efficace des infections bactériennes et virales, à une diminution des symptômes de certaines pathologies comme la maladie inflammatoire du côlon ou à une diminution des allergies alimentaires (**Fooks and Gibson**, 2002).

Partie expérimentale

I. Matériel et Méthodes :

L'intégralité de notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de contrôle de la qualité AFAK control à Oran et au niveau du laboratoire de microbiologie appliquée à l'université Ahmed Ben Bella, Oran 1. Et le dosage des acides organiques par l'HPLC a été mené au sein du laboratoire de recherche à l'université Tahri Mohamed à Bechar.

Notre étude comprend les étapes suivantes :

- Isolement des souches de bifidobactéries à partir des selles de nourrissons, suivi par une identification du genre et des espèces.
- Mise en évidence des caractères probiotiques par des tests *in vitro*.
- Fermentation du lait en culture pure et en culture mixte avec les bactéries lactiques.
- Evaluation de l'influence de certaines conditions technologiques sur la viabilité des souches potentiellement probiotique.

I. 1. Matériel :

I. 1.1 Matériel biologique :

- **Provenance des souches :**

- ✓ Les bifidobactéries :

Les bifidobactéries sont des micro-organismes qui colonisent l'intestin du nouveau née juste après la naissance. Des échantillons de selles de nourrissons sains allaités au sein maternel, âgés entre 03 et 06 mois, naissant par voie basse et ne recevant pas de traitement antibiotique ont été prélevé dans des récipients stériles et maintenu en anaérobiose jusqu'au transport au laboratoire.

- ✓ Les bactéries lactiques :

Les deux souches *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus dulbreiki ssp bulgaricus* utilisées lors de la fermentation du lait en culture mixte

appartiennent au laboratoire de microbiologie appliquée université d'Oran, Ahmed Ben Bella 1.

✓ Les souches pathogènes :

Nous avons utilisé les souches pathogènes suivantes ;

La souche *Escherichia coli* ATCC23922, les souches *staphylococcus aureus* (ATCC 25923 et ATCC 43300) et la souche *pseudomonas aerogenosa* ATCC 27453 proviennent du laboratoire de bactériologie CHU d'Oran Algérie.

La souche *Escherichia coli* ATCC25922 appartient au laboratoire de microbiologie appliqué (LMA) à l'université d'Oran 1.

- **Milieux de Cultures :**

✓ Milieux de cultures pour l'isolement des bifidobactéries :

Milieu MRS-NNLP :

L'isolement des bifidobactéries a été réalisé sur milieu MRS (de Man, Rogosa et gélose de Sharpe) additionné d'un mélange d'antibiotique ; 2 g de sulfate de néomycine, 3 g d'acide nalidixique, 60 g de chlorure de lithium, et 4 g de sulfate de paromomycine, a été préparé dans 1 L d'eau distillée et stérilisée par filtration avec des filtres Millipore de 0,45 um et stockée à 4 ° C jusqu'à utilisation.

Le mélange (5 ml) a été ajouté à 100 ml de MRS avant utilisation (MRS-NNLP) (Ong *et al*; 2009; AL-Otaibi, 2009; Karimi *et al*, 2012).

Le sulfate de néomycine et l'acide nalidixique, inhibent la croissance des bacilles Gram positif et Gram négatif respectivement et le chlorure de lithium est couramment utilisé comme agent sélectif dans l'énumération de bifidobactéries (Karimi *et al.*, 2012).

La cystéine chlorydrique stérilisée par filtration a été également ajoutée à raison de 0,05% dans le milieu de culture précédant pour but d'abaisser le potentiel d'oxydo-réduction dans les milieux de culture et créer de meilleures conditions d'anaérobiose pour la croissance des bifidobactéries, cet acide aminé est

également considéré comme une source d'azote essentielle pour les bifidobactéries (**Roy, 2001**).

Et pour la purification des isolats et le repiquage nous avons utilisé uniquement le milieu MRS-cys.

✓ Milieux de cultures pour les bactéries lactiques :

Lors de la fermentation du lait en culture mixte, nous avons utilisé les milieux MRS et M17 (voir annexe) pour la culture des *Lactobacillus dulbreiki ssp bulgaricus* et des *streptococcus thermophilus* respectivement.

✓ Milieux de culture pour les souches pathogènes :

Pour illustrer l'activité antimicrobienne de nos souches nous avons utilisé le bouillon nutritif, la gélose nutritif et le milieu Muller Hinton (voir annex).

✓ Le lait utilisé pour la fermentation :

Afin de déterminer l'activité biotechnologique des bifidobactéries, nous avons utilisés du lait de vache, ce dernier à été collecté dans des conditions stériles auprès des fermes situées à Oran puis transporté dans des glacières maintenues à 4C°. Une fois au laboratoire, le lait collecté a subi une pasteurisation pendant 30 mn au bain marie maintenu à 85C° puis refroidit et conservé au réfrigérateur jusqu'à inoculation.

Tous les autres milieux de culture ainsi que leurs compositions et les produits (chimiques et réactifs) utilisés dans la présente étude sont cités dans la section Annexe.

I. 2. Méthodes :

I. 2. 1 Isolement et purification des bifidobactéries :

L'isolement des bifidobactéries à partir des selles a été réalisé sur milieu MRS-NNLP. 1g de chaque échantillon a été introduit dans un tube contenant 9ml d'eau peptone additionné de 0,5% de cystéine HCL stérilisé par filtration.

Après homogénéisation des dilutions décimales ont été effectués. 0,1 ml des dilutions suivante (10^{-9} 10^{-10} et 10^{-11}) a été introduit dans des boîtes de pétri et inoculé avec du milieu MRS-NNLP gélosé à raison de trois boîtes pour chaque

dilution puis incubés dans une jarre d'anaérobiose contenant des anaerocultes et des gas pack (capable de produire du H_2 et du CO_2) à 37°C pendant 5 jours.

Les colonies poussées ont subi des purifications, cette dernière consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS-cys, jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, même forme et même couleur (**Idoui et al., 2009**).

I. 2.2 Observation macroscopique et microscopique :

L'observation macroscopique consiste à noter la taille, la forme, la couleur et la viscosité des colonies, et celles présentant un aspect semblable à celui des bifidobactéries ont été sélectionnées pour l'étude microscopique, cette dernière est révélée par la coloration de Gram (voir Annexe). Cette coloration permet la distinction de deux groupes majeurs de bactéries : à Gram positif et à Gram négatif et aussi entre les coques et les bâtonnets ainsi que le mode de regroupement (**Ahmed et Kanawal, 2004**).

Les bifidobactéries sont connues par leurs productions en plus de l'acide lactique (cas des bactéries lactiques) de l'acide acétique avec une concentration de 2/3 moles respectivement. Et pour la mise en évidence de ces deux acides, nous avons opté pour l'HPLC.

I. 2.3 Analyse des produits de la fermentation par HPLC :

- **Milieu de culture utilisé pour la fermentation :**

Le milieu MRS sans acétate de sodium a été préparé, car ce dernier pourrait fausser les résultats des analyses des acides organiques. Le milieu MRS modifié a été autoclavé pendant 15 mn à 121°C , puis additionné avec 0,05% (p / v) de la cystéine-HCl (**Qian Qian Wu et al., 2012**).

Les acides organiques ont été déterminés en utilisant la méthode décrite par (**Ong et al., 2006; Qian Qian Wu et al., 2012; Elghali et al., 2012**) avec les modifications suivantes :

- **Préparation des échantillons :**

A partir de la culture jeune sur bouillon MRS modifié, 1,5 ml à été centrifugés à 13 000 rpm pendant 30 minutes et les surnageants ont été filtrés à travers des filtres millipores de 0,45 μ m. Les échantillons ont été dilués avec une solution d'éthanol a 95% a raison de (1: 4, v/v) juste avant l'injection.

Les standards (l'acide lactique et l'acide acétique) ont été également dilués.

- **Injection :**

Une fois l'échantillon filtré et dilué il est tout de suite injecté dans un système HPLC Shimadzu équipé d'un dégazeur à vide (proéminence dégazeur PGU-20AS), une pompe à gradient (proéminence chromatographe liquide LC-20AD), un détecteur UV Vis / (SPD-20A) et une colonne (18C). La solution mobile utilisé est l'éthanol à 95% avec un débit de 0,1 ml / min. La longueur d'onde du détecteur UV était 210 nm.

Les acides organiques ont été identifiés selon leurs temps de rétention comparé à celui des solutions standard d'acides lactique et acétique.

I. 2.4 Identification biochimique :

- **Recherche de la catalase :**

La catalase est un enzyme contenant du fer qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène, cette enzyme est synthétisée par la plupart des bactéries aérobie.

Le test consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes et d'y ajouté une colonie développée sur milieu solide. La présence de la catalase se traduit par le dégagement de bulles gazeuses et le contraire indique l'absence de l'enzyme (**Marchal *et al.*, 1991**).

- **Recherche de l'oxydase :**

L'oxydase est une sous-classe des oxydo-reductase, c'est un enzyme qui catalyse une réaction d'oxydo-réduction. La recherche de cette enzyme est très répondeur pour l'identification des bacilles Gram négatif.

Sur une lame on dépose un disque d'oxydase et une goutte d'eau distillé, un peu de culture est prélevée et déposée sur le disque, le résultat positif se manifeste par une coloration rose violette (Marchal *et al.*, 1991).

- **Recherche du citrate perméase sur milieu Kempler et Mc Kay 1980 :**

L'utilisation du citrate est étudiée sur milieu Kempler et Mc Kay, ce milieu contient une solution du ferricyanide de potassium et une solution de citrate ferrique. La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le ferricyanide de potassium. Les colonies qui fermentent le citrate lancent la réaction entre ces ions, il en résulte la formation de colonies bleues ou ayant un centre bleu foncé après 18 à 72h d'incubation. Les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanches (Mami, 2013).

- **Recherche du nitrate réductase :**

Le nitrate réductase est un enzyme capable de réaliser la réaction de réduction des nitrates soit jusqu'au stade des nitrites, ou jusqu'au stade diazote gazeux. Les souches des bifidobactéries sontensemencées dans un bouillon nitrate (1% nitrate de potassium), après une incubation à 37°C en anaérobiose, on ajoute 5 gouttes du réactif (Nit1) et 5 gouttes du réactif (Nit2) (Voir annexe).

Si le milieu prend une teinte rouge cela signifie que la bactérie possède un nitrate réductase et s'il reste incolore, il y'a une possibilité que la bactérie possède un nitrate réductase très actif et qu'il a réduit les nitrites en diazotes gazeux (consommation complète des nitrites présent) pour cela on ajoute de la poudre de zinc et on attend 5 mn ; si le milieu devient rose rouge, la bactérie est nitrate réductase négatif. Si le milieu reste incolore, la bactérie est nitrate réductase positif (Marchal *et al.*, 1991).

- **Recherche du type fermentaire :**

Les souches sont repiquées dans des tubes contenant le milieu MRS-cys liquide mené d'une cloche de Durham et incubés en anaérobiose à 37°C pendant 24 h.

La présence du gaz dans la cloche indique que la souche est hétérofermentaire et son absence indique qu'elle est homofermentaire (**Iarpent, 1990**).

La mise en évidence de la production d'indole, de l'uréase, la protéolyse de la gélatine et la protéolyse de l'esculin ont été réalisées sur galerie API 20A.

I. 2.5 Identification par la galerie API 20A :

La galerie API 20A permet de rechercher rapidement 20 caractères pour l'identification biochimique des bactéries anaérobies. Elle comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés, ces derniers sont inoculés avec la suspension bactérienne à identifier.

- **Préparation de l'inoculum :**

Toutes les colonies poussées sur milieu MRS-cys ont été prélevées à l'aide d'un écouvillon stérile et inoculées dans le medium, et pour bien émulsifier les germes on a frotté l'écouvillon par rotation contre la paroi de l'ampoule. L'opacité finale doit être supérieure ou égale à celle de l'étalon 3 de McFarland (voir annexe).

- **Préparation de la galerie :**

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir 5ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Placer la galerie dans la boîte d'incubation et l'inoculer par la suspension bactérienne précédente tout en évitant la formation des bulles d'air.

- **Incubation de la galerie :**

Toutes les boîtes sont incubées dans une jarre d'anaérobiose pendant 24-48h à 37°C.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par un virage des couleurs. L'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

- **Tests complémentaires :**

- Test de thermo-résistance :

Des tubes contenant du bouillon MRS-cys ont été repiqué par des suspensions bactériennes de bifidobactéries puis maintenu dans un bain marie régler à 46,5 °C pendant 30 mn. Ces tubes sont par la suites incubés à 37°C pendant 48h sous conditions d'anaérobiose (Klein *et al.*, 1998).

Croissance dans un milieu hyper salé :

Ce test est réalisé pour éliminer les entérocoques, les souches de bifidobactéries sont ensemencées dans des tubes contenant du bouillon MRS-cys à 4% de NaCl et à 6.5% de NaCl puis incubé à 37°C pendant 24h sous conditions d'anaérobiose (Devriese *et al.*, 1993). La croissance des souches à 6,5% de NaCl témoigne la présence des entérocoques.

➤ Croissance en aérobie :

Les souches de bifidobactéries sont repiquées sur bouillon MRS-Cys et incubés à 37°C pendant 24h sous condition d'aérobie.

➤ Influence de la température d'incubation :

Les souches de bifidobactéries sont repiquées sur bouillon MRS-Cys et incubés pendant 24h sous condition d'anaérobiose à différente température 30°C, 37°C et 45°C.

I. 2.6 Caractérisation des espèces :

Les sucres présents dans la galerie Api 20A ne sont pas suffisant pour faire une identification plus précise des espèces, pour cela l'étude du profil fermentaire a été également testé pour les sucres suivant ; fructose, galactose, inuline, melibiose, ribose et sucrose.

Les souches sont repiquées sur milieu MRS-cys. Après incubation, 4ml des cultures sont centrifugées à 5000 g pendant 5 mn et lavée deux fois avec l'eau physiologique (à 0,05 % de cysteine-HCl).

Le surnageant est éliminé et le culot est suspendues dans 1ml d'eau physiologique cystéine. Cette suspension sert à inoculer le milieu MRS-cys liquide additionné de 40mg /l de pourpre de bromocrésol (BCP) comme

indicateur de pH (**Mannu et al., 2000**) et supplémenté de 2 % des sucres cités précédemment (**Tamime et al., 1995**).

Les préparations sont recouvertes de 1 ml de l'huile de paraffine stérile pour obtenir l'anaérobiose. L'incubation s'effectue à 37°C pendant 24 à 48 h. La fermentation des sucres est révélée par le virement de l'indicateur le (BCP) du violet au jaune.

I. .2.7 Conservation des souches :

La conservation des souches purifier a été réalisé sur milieu MRS-cys gélosé préparé dans des tubes inclinés, puis incubé pendant 24h à 37°C. Les tubes sont conservés en condition d'anaérobiose à 4°C pour une durée de deux semaines.

Et pour une conservation à long terme les souches sont congelées à -20°C dans du lait écrémé contenant 30 % de glycérol, 10 % d'extrait de levure et 0,05 % de cysteine-HCl (**Saidi et al., 2002**). (Voir annexe)

I. 3. Mise en évidence *in vitro* de quelque caractère probiotique :

Les probiotiques ne doivent pas être seulement capables de résister à leur passage dans le tube digestif mais avoir aussi la capacité de proliférer dans l'intestin pour exercer leurs effets bénéfiques sur l'hôte (**Mailys, 2010**).

Plusieurs tests doivent être réalisés pour l'évaluation des caractères probiotiques dont les suivant ;

I. 3.1 Résistance aux pH acide de l'estomac :

La résistance des souches aux pH acide a été testée selon la méthode décrite par **Roopashri et al., 2009**.

Une série de tubes contenant du bouillon MRS-cys ajustée à différente valeur de pH (2, 3, 4 et 5) par l'HCL 1N a été préparé et autoclavé. Du bouillon MRS-cys ajusté à pH 6,8 a été utilisé comme témoin. Ces tubes ont été inoculés par la culture jeune de nos souches à raison de 1% et incubées pour les intervalles de temps suivants ; 0, 60, 120, 180 et 240 minutes. Et afin de ne pas perturbé les

conditions d'incubation, des tubes indépendants ont été utilisés pour chaque intervalle de temps.

Pour le dénombrement des cellules viables après chaque intervalle de temps, nous avons prélevé des aliquotes de 1ml et réalisé des dilutions en cascade jusqu'à 10^{-7} . Les dilutions sont ensuite ensemencées en masse sur la gélose MRS-cys et incubées en anaérobiose à 37°C pendant 48 à 72h.

Le taux de survie est calculé par l'équation suivante

$$\text{Taux de survie (\%)} = \log\text{UFC à } T_x\text{h} / \log\text{UFC à } T_0\text{h} \times 100$$

La résistance de nos souches à ce facteur hostile a également été estimée par mesure de la densité optique à 560nm (Thirabunyanon *et al.*, 2009): .

$$\text{Cellules viables (\%)} = (\text{D.O. échantillon} / \text{D.O. témoin}) \times 100$$

I. 3.2 Résistance aux sels biliaries :

La résistance des souches aux sels biliaries a été testée selon la méthode décrite par Roopashri *et al.*, 2009.

Une concentration de sels biliaires à 20% a été préparée dans de l'eau distillée, et stérilisée par filtration sur membrane 0,45 µm. Et à partir de cette concentration nous avons préparé une série de tubes contenant du bouillon MRS-cys à 0,3%, 0,5% et 1%. Un bouillon MRS-cys sans sels biliaires a été utilisé comme témoin.

Nous avons procédé au même mode opératoire pour la résistance au pH acide ; 1ml de la culture jeune de nos souches a été aseptiquement introduit dans les tubes contenant les différentes concentrations de sels biliaries et incubé à 37°C en anaérobiose pour les intervalles de temps suivants : 0, 60, 120 et 180 minutes. Le dénombrement des cellules viables a été calculé par les deux équations citées précédemment.

I. 3.3 L'activité antimicrobienne :

La détection de l'activité antibactérienne a été réalisée selon la méthode décrite par Fleming *et al.*, (1975), qui consiste à cultiver les souches de *Bifidobacterium* et les souches pathogènes en double couche.

Les différentes souches de *bifidobactérium* ont été ensemencé à l'aide d'un multipoint sur milieu MRS solide. Après séchage à la température ambiante, les boîtes de Pétri sont incubées en anaérobiose à 37 °C pendant 18h.

7 ml du milieu MH est inoculé avec 500 µl de la culture jeune de chaque souche pathogène puis coulé sur la couche précédente. Après solidification, les boîtes sont remises à l'étuve et incubés en anaérobiose à 37°C pendant 24h.

La présence des zones claires autour des souches ensemencées par touche indique l'inhibition de la souche indicatrice. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés.

I. 3.4 Résistance aux antibiotiques :

L'antibiogramme des souches de bifidobactéries a été réalisé par la technique de diffusion en milieu MRS gélosée en utilisant des disques imprégnés d'antibiotiques. Chaque souche de bifidobactérie a été incubé pendant 18h sur milieu MRS liquide et l'inoculum bactérien a été standardisé dont la DO 660 varie entre 0.08 et 0.1 pour avoir une densité cellulaire aux alentours de 10^8 UFC/ml. L'inoculum a été ensemencé à l'aide d'un écouvillon sur la surface de la gélose MRS, déjà coulée et solidifiée. Après séchage à la température ambiante, chaque boîte reçoit cinq (5) disques d'antibiotiques et incubés pendant 48h. Les diamètres des zones d'inhibitions ont été mesurés et les résultats ont été exprimés comme sensible (S), intermédiaire (I) et résistant (R) selon les normes recommandées (comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, 2011) (voir annex). Les disques d'antibiotiques testés sont les suivants ; néomycine (30U.I), chloramphénicol (30U.I), acide nalidixique (30 mcg), chloramphenicol (30 mcg), kanamycin (30 mcg), imipenem (10ug), pénicilline G (10 iu), céphalothine (30ug), céphazoline (30ug), spiramycine (100ug), amoxicilline (30 ug), nitrofurantoin (300ug), tétracycline (30ug), céftazidime (30ug), céfoxitine (30 ug), vancomycine (30Ug), Gentamycine (10 mcg), Streptomycine (10UI).

I. 3.5 L'adhérence aux cellules épithéliales :

Pour la mise en évidence de ce test, la méthode décrite par (**Wen-Hsin Lin et al., 2007**) a été utilisée, cette dernière comporte les étapes suivantes :

- Préparation des cellules épithéliales :

Un segment de l'iléum et du colon du poulet de chair ont été ouvert et laver avec du PBS (voir annex). Les deux segments ont été maintenu dans du PBS a 4°C pendant 30mn pour éliminer les mucus de surface. Puis rincer encor 3 fois par du PBS. Les cellules ont été par la suite gratté dans du PBS stérile et examiner par microscope photonique afin de s'assuré de leur pureté et de l'élimination des bactéries contaminant. Enfin la concentration des cellules épithéliales a été ajusté à environ $5 \cdot 10^4$ cellules / ml.

- Préparation des cellules bactériennes :

A partir de la culture jeune sur bouillon MRS-cys une centrifugation a été réalisé, le culot bactérien a été maintenu dans du PBS, puis des dilutions décimales ont été réalisé jusqu'à obtention d'une concentration de 10^8 CFU/ml.

- Réalisation du test :

Un millilitre de chaque suspension bactérienne a été mélangé avec 1 ml de la suspension des cellules épithéliales de l'iléum et du colon séparément. Le mélange a été par la suite maintenu à 37°C pendant 30 mn.

L'adhérence a été observée au microscope photonique après coloration au cristal violet à 0,5%. Le test a été considérée comme positif s'il y'a adhérence de plus de 15 bactéries par cellule.

I. 4. Fermentation du lait :

Préparation d'inoculum :

I. 4.1 Inoculum des bifidobactéries :

A partir de la culture jeunes sur bouillon MRS-cys, 2ml de chaque souche de bifidobactéries a été introduite dans 10 ml du lait reconstitué écrémé à 10% (p/v) additionné de 0,5 % (p/v) d'extrait de levure et de 0,05% (p/v) de cystéine-HCl

(Frank *et al.*, 1993) et incubé à 37°C pendant 18h, la préculture a été utilisée comme inoculum.

I. 4.2 Inoculum des bactéries lactique :

A partir de la culture jeune des souches de *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* sur bouillon MRS et M17 respectivement, 2ml a été introduite séparément dans 10ml de lait reconstitués écrémé à 10% (p/v) et incubés à 42 °C pendant 18h. Ces précultures servent comme inoculum.

I. 4.3 Cinétique de croissance :

En culture pure :

Des flacons de 100ml de lait de vache ont été inoculés par les souches de bifidobactéries à raison de 1% (v/v) puis répartie dans des tubes à raison de 10ml et incubés à 37°C en anaérobiose. Des prélèvements ont été effectués au temps 0, 2, 4, 6, 8, 10, et 24h d'incubation. Une série de tubes à été préparé pour chaque intervalle de temps pour ne pas fausser les résultats. Le dénombrement des cellules à été réalisé sur milieu MRS-cys gélosé après dilutions décimales

En culture mixte :

Deux séries de flacon contenant 100ml de lait de vache stérile ont été préparé ; la première série a été inoculées par les souches de bifidobactéries et la souche *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* à raison de 1% chaque'une, et la deuxième série a été inoculé par des souches de bifidobactéries et la souche *Streptococcus thermophilus* à raison de 1% aussi. Ces flacons sont par la suite répartis dans des tubes à raison de 10ml puis incubés à 42°C. Des prélèvements ont été effectués au temps 0, 2, 4, 6, 8, 10, et 24h d'incubation. Une série de tubes à été préparé pour chaque intervalle de temps pour ne pas fausser les résultats. Le dénombrement des cellules de bifidobactries à été réalisé sur milieu MRS-cys gélosé après dilutions décimales.

I. 4.4 Détermination de l'acidité titrable :

Le dosage de l'acidité au cours de la croissance dans le lait de vache est effectué selon la méthode décrite par (Accolas *et al.*, 1977), en utilisant le NaOH (N/9) en présence de l'indicateur Phénolphtaleine (à 1 % dans l'alcool).

A partir des tubes incubés contenant les cultures en lait, le contenu d'un tube est versé dans un bêcher dans lequel sont ajoutées 5 gouttes de phénolphtaleine. Le titrage s'effectue à l'aide d'une burette avec de la soude dornic sous agitation. On considère que le virage est atteint, quand la couleur blanche du lait vire au rose pale et persiste pendant une dizaine de secondes.

Nous avons noté alors le volume de la soude utilisée. Les résultats sont exprimés en degrés dornic selon la formule suivante :

$$\text{Acidité} = n \times 10$$

Avec n : volume de la soude dornic.

1 degré dornic = 1°D = 0,1 g d'acide lactique dans un l de lait.

En culture pure, l'acidité titrable juste après l'inoculation est soustraite aux valeurs de l'acidité mesurée au cours de la croissance pour obtenir l'acidité réellement produite (acidité acquise) (Heddadji, 2007).

I. 4.5 Suivi du pH au cour de la fermentation :

L'acidité développée dans le lait est suivie aussi par une mesure de pH à l'aide d'un pH mètre.

I. 5 Evaluation de la viabilité des souches potentiellement probiotique :

L'objectif de cette partie était d'évaluer l'influence des arômes et des additifs ainsi que du stockage frigorifié à 4°C pendant 21 jours sur la viabilité de quelques souches sélectionnées présentant un fort potentiel probiotiques (L1, L2, BV1, B1).

I. 5.1 Influence du stockage frigorifique à 4°C sur la viabilité :

Ce teste a été réléisé selon la méthode décrite par (Georgieva *et al.*, 2009), cette dernière consiste a inoculés des lots contenat 100 ml du lait écremé (traité

préalablement pendant 10mn a 100°C) par chaque souche testée a raison de 5% (selon le protocole d'inoculation utilisé dans l'industrie algérienne qui varie de 2 à 7%). Ces lots sont par la suite incubés pendant 18-20h a 37°C et stocké à 4°C pour une durée de 21 jours.

Le dénombrement des cellules viables a été réléisé par culture sur MRS-cys gélosé apres dilution décimales. Le taux de la viabilité a été calculé par l'équation suivante (Shao-Chi Wu *et al.*, 2007) :

$$\text{Viabilité (\%)} = (\text{UFC après } n \text{ semaine(s) de stockage} / \text{UFC initial}) \times 100$$

I. 6.2 Influence des arômes sur la viabilité :

Les arômes les plus utilisés dans les industries laitière algérienne sont ; banane, fraise et vanille avec les concentrations suivantes ; 0,2%, 0,2%, et 0,14% respectivement. Et afin de testés leurs influences sur nos souches, la méthode décrite par (Vinderola *et al.*, 2002) réalisé sur bouillon MRS-cys a été utilisés.

Une série de tubes contenant 3ml du bouillon MRs-cys a été préparé et inoculé par les arômes cités au dessus avec les concentrations mentionnées. Les tubes sont par la suite inoculés à raison de 2% pour chaque souche testée. Ces tubes sont par la suite incubés en anaérobiose à 37°C pendant 24h. D'autre tubes sans addition d'arômes ont été également incubés est servant comme contrôle.

Le dénombrement des cellules viables a été caluclés par mesure de la densité optique par spectrophotomètre à 600 nm selon l'équation suivante ;

$$\text{Cellules viables (\%)} = (\text{D.O. échantillon} / \text{D.O. témoin}) \times 100$$

Les valeurs inférieures à 30% et supérieur à 70% ont été considérer comme négatif et positif respectivement. Et celle comprise entre ces deux valeurs sont considérer comme faible.

I. 6.3 Influence des additifs sur la viabilité :

Les deux additifs E414 (gomme arabique) et E1442 (phosphate de diamidon hydroxypropylé) sont les plus courament utilisés dans l'industrie laitière

algérienne à raison de 0,1% w/v et 0,2% w/v respectivement. Et afin de tester leurs influences sur la viabilité de nos souches nous avons utilisé la méthode décrite par (**Georgieva *et al.*, 2009**).

Le test a été réalisé sur bouillon MRS-cys répartie dans des tubes à raison de 2ml et additionné par les concentrations d'additif cités au dessus. Les tubes ainsi préparés ont été inoculés à raison de 10% (v/v) de chaque souche testés et incubés en anaérobiose à 37°C pendant 24h. Des tubes sans addition d'additif ont été également incubés et servant comme témoin.

Le dénombrement des cellules viables a été calculés par mesure de la densité optique par spectrophotomètre à 600nm selon l'équation précédente.

II. Résultats :

II. 1 Observation macroscopique et microscopique :

Les colonies formées sur milieu MRS-NNLP gélosé ont montré un aspect lisses, convexe, luisant et de consistance molle avec un contour régulier dont le diamètre varie de 0,1 à 0,5 mm et d'une couleur blanchâtre à crème. Cet aspect est très semblable à celui des bifidobactéries décrites par (Heddadji., 2007 ; Shah., 2011 ; Benkaddour., 2013) (Figure 7).

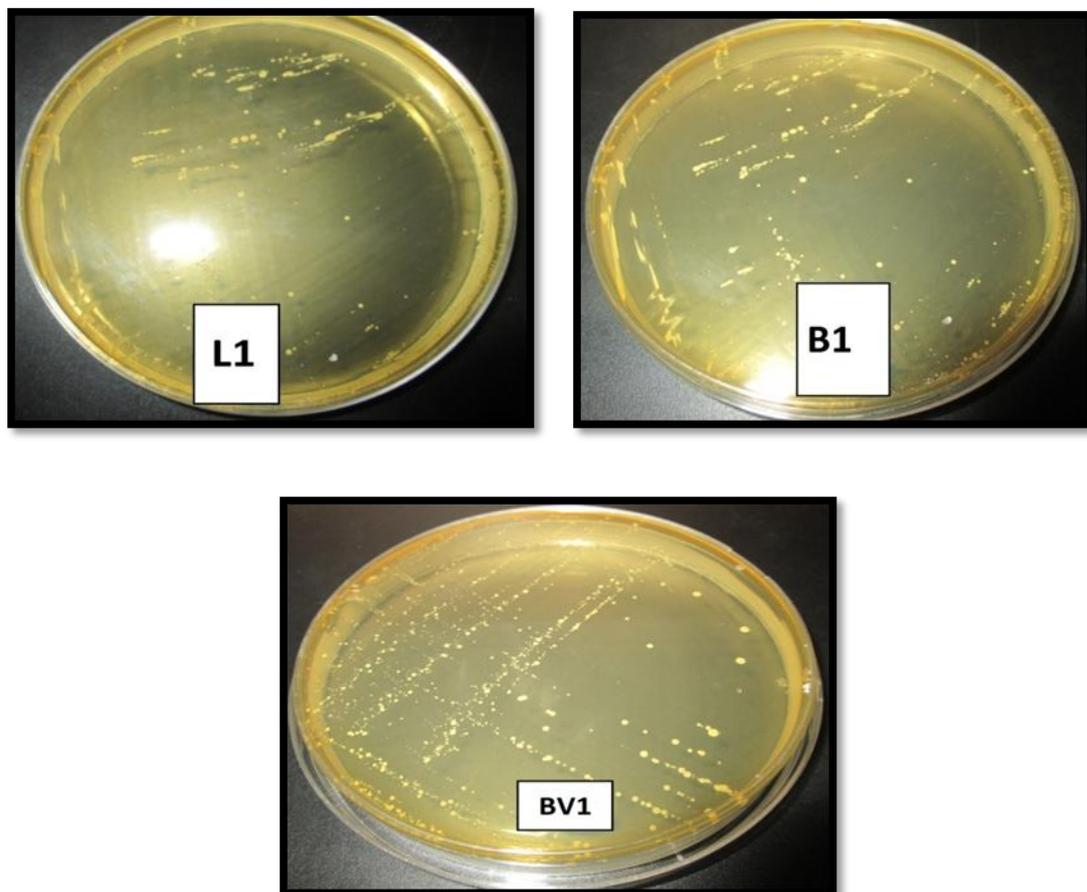


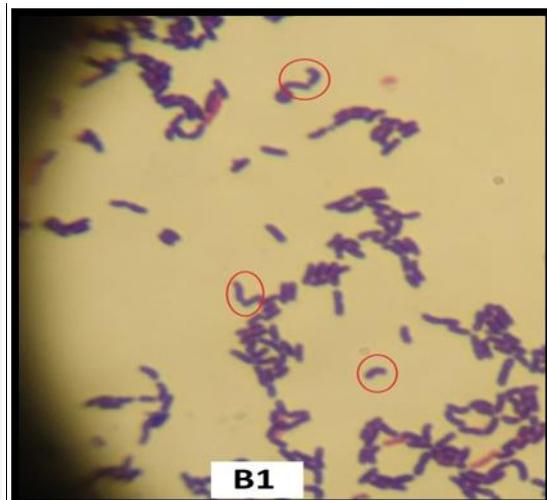
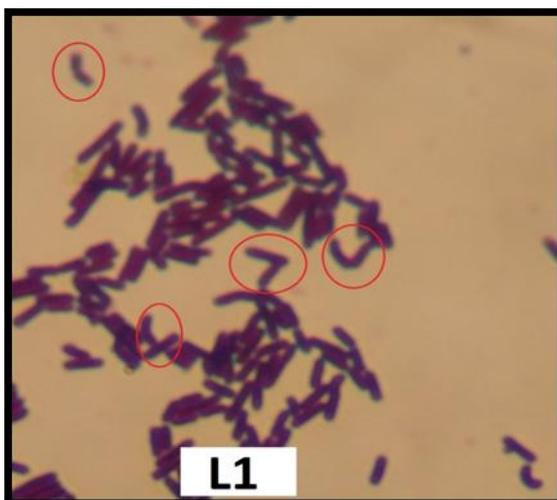
Figure 7 : aspect macroscopique des souches de bifidobactéries (L1, B1, BV1).

L'aspect microscopique des colonies après coloration de gramme a montré en général des bacilles à Gram positif avec des formes bifides (y et v) (**figure 8**).

Le tableau n°6 montre les différentes formes observées.

Tableau 6 : Aspect macroscopique et microscopique des souches de bifidobactérie (L1, B1, BV1).

Souches	Forme des colonies	Forme des cellules
L1	Colonies blanchâtre et punctiformes avec un contour régulier	Cellules en bâtonnets longs, a extrémité arrondie et en forme bifide (V,Y).
B1	Colonies blanchâtre et opaque avec une surface lisse et un contour régulier	Cellules en bâtonnets courts, spatulés, a extrémité arrondie et en forme bifide (V,Y).
BV1	Colonies blanchâtre, bombés, luisante et visqueuse à surface lisse et à contour régulier.	Cellules en bâtonnets courts a contour ondulés et irrégulier et en forme bifide (V,Y).



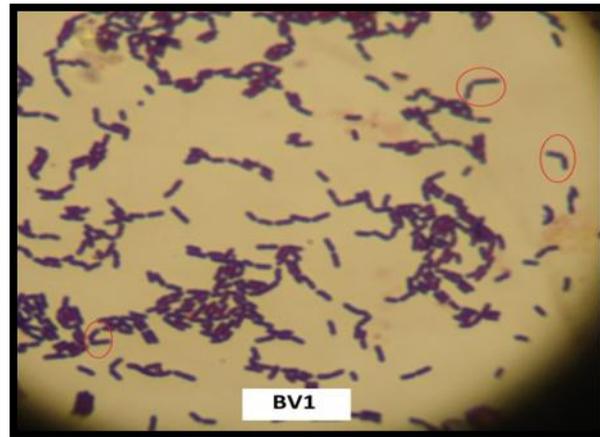
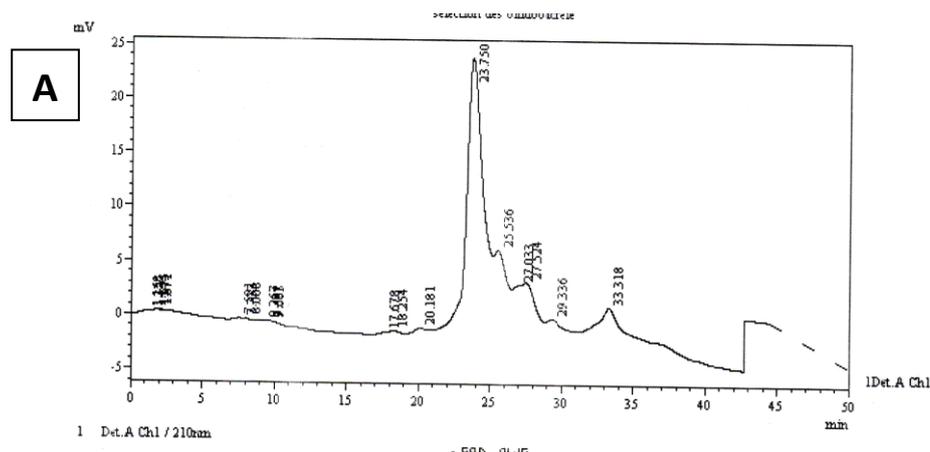


Figure 8 : observation microscopique des souches de bifidobactéries (L1, B1, BV1) avec G x1000.

II. 2 Identification du genre :

Les acides organiques produits au cours de la fermentation sur milieu MRS modifié ont été identifiés selon leurs temps de rétention comparé à celui des solutions des standards de l'acide lactique et l'acide acétique. Au cours de la fermentation, environ 3/2 moles d'acide acétique / lactique ont été produits (**figure 9 ; A, B, C**), observations qui concourent avec les montants théoriques rapportés par Scardovi (**Ong et Shah, 2009**) ce résultat nous permet de classer nos souches au genre *Bifidobacterium*.



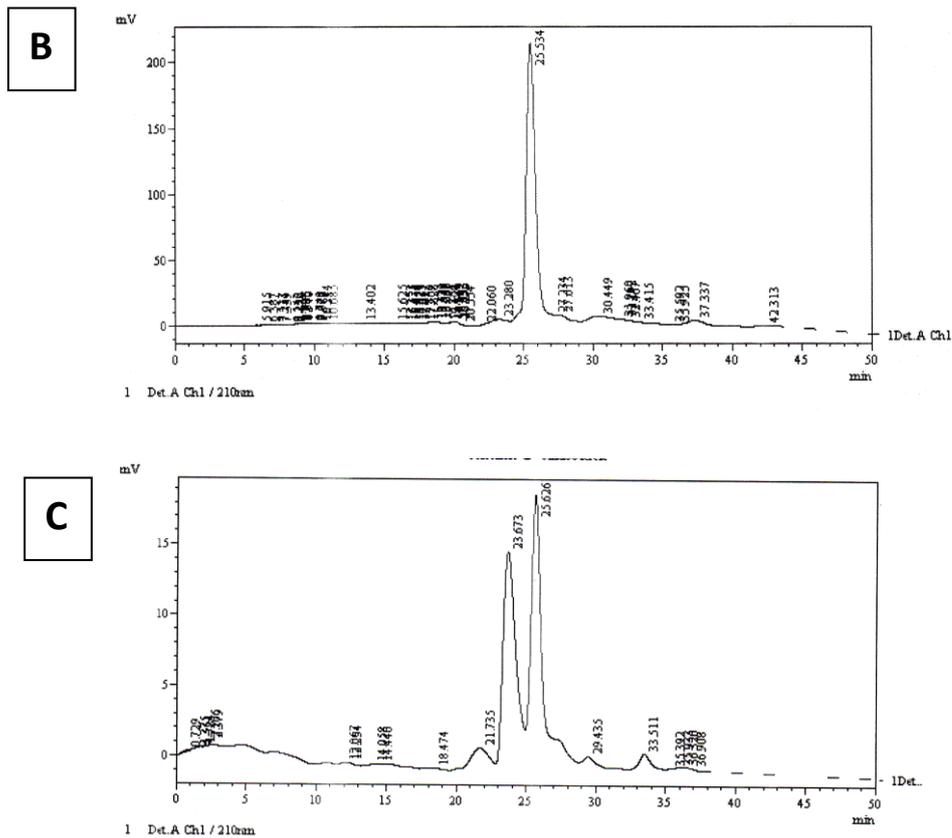


Figure 9 : la détermination des acides organique par la haute performance liquide chromatography (HPLC) ; A ; le temps de rétention de l'acide lactique, B ; le temps de rétention de l'acide acitique, C ; le profil fermentaire de la souche L2.

II. 3 Identification biochimique :

Tests enzymatique :

La mise en évidence des enzymes catalase, oxydase, nitrate réductase a montré un résultat négatif pour toutes les souches testées, sauf pour la citrate perméase qui à donner un résultat positif. Ce résultat nous confirme l'appartenance de nos souches au genre *Bifidobacterium*.

Type fermentaires :

Une bonne croissance au fond des tubes a été observée pour chaque souche testée et sans dégagement de gaz, cela indique que toutes les souches sont homo-fermentaires.

II. 4. Identification par la galerie Api 20 A :

Le tableau suivant montre le résultat de l'identification de nos souches par la galerie Api 20A

Tableau 7 : identification des souches de bifidobactéries par galerie API 20A.

tests	Reaction/enzymes	results		Strains results										
		positive	negative	L1	L2	L3	L4	BV 1	BV 2	BV 3	B1	B2		
IND	indol formation	Red	Yellow	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
URE	urease	red	Yellow	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
GLU	Acidification glucose	Yellow	Purple	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
MAN	Acidification manitol			-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LAC	Acidification lactose			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAC	Acidification saccharose			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAL	Acidification maltose			+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SAL	Acidification salicin			+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
XYL	Acidification xylose			+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ARA	Acidification arabinose			+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
GLE	Hydrolysis gelatin			Diffusion of black pigment	No diffusion of pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESC	Hydrolysis esculin			+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
GLY	Acidification glycerol	Yellow	Purple	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
GEL	Acidification cellobiose			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MNE	Acidification mannose			-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MLZ	Acidification melezitose			+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
RAF	Acidification raffinose			+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SOR	Acidification sorbitol			-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
RHA	Acidification rhamnose			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TRE	Acidification trehalose			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-





Figure 10 : identification des souches de *bifidobacterium* (A: L1 ; B: BV1 ; C : B1) par galerie API 20A.

Tests complémentaires :

- Test de thermo-résistance :

Aucune croissance n’a été observée pour une incubation à 46,5C°.

- Croissance en milieux hyper salé :

Toutes les souches testées ont montré leurs capacités de croitre dans des milieux hyper salés à raison de 4% mais pas à 6,5%.

- Croissance en aérobiose :

Aucune colonie n’a poussé sur milieu MRS gélosé après une incubation à 37 C° en condition d’aérobiose.

II. 5. Identification des espèces :

En plus du profil fermentaire des sucres présents dans la galerie API 20A nous avons également testé la fermentation d’autre sucre dont le résultat est mentionné dans le tableau suivant :

Tableau 8 : fermentation des sucres par les souches de bifidobactéries.

	Fructose	Galactose	inuline	Melibiose	Ribose	sucrose
L1	+	+	-	+	+	-
L2	+	+	-	+	+	-
L3	+	+	-	+	+	-
L4	+	+	-	+	+	-
BV1	+	+	+	+	+	+
BV2	+	+	+	+	+	+

BV3	+	+	+	+	+	+
B1	+	+	-	+	-	+
B2	+	+	-	+	-	+

L'ensemble des résultats obtenu par les galeries Api 20A et l'étude du profil fermentaire par la méthode classique nous a permis de noter les remarques suivantes : Toutes les souches testées avais la capacité de fermenté le glucose, lactose, saccharose, fructose, galactose et milibiose. Les sucres restant sont considéré comme des sucres clefs pour la différenciation des espèces.

Le résultat montre que les souches L1, L2, L3, et L4 avais la capacité de fermenté une grande partie de sucres par rapport aux autres espèces, les sucres non fermentés par ces souches sont ; inuline, sucrose, glycerol, manitol, cellobiose, manose, sorbitol, rhamnose et trehalose, ce résultat nous permet de classifier ces souches à l'espèce *longum*. Les souches BV1, BV2 et BV3 ont pu fermenter le sorbitol et non pas le salicin, ces souches appartiennent à l'espèce *brève*. Les deux souches restantes appartiennent à l'espèce *bifidum*.

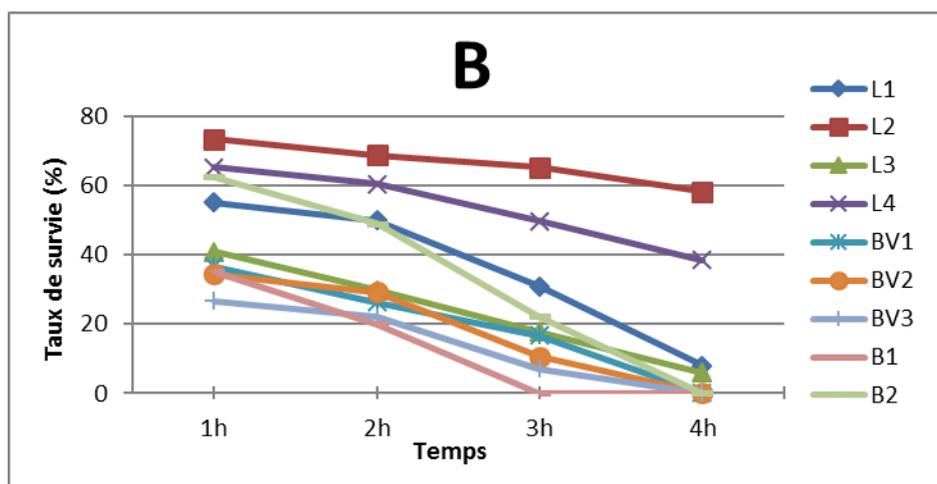
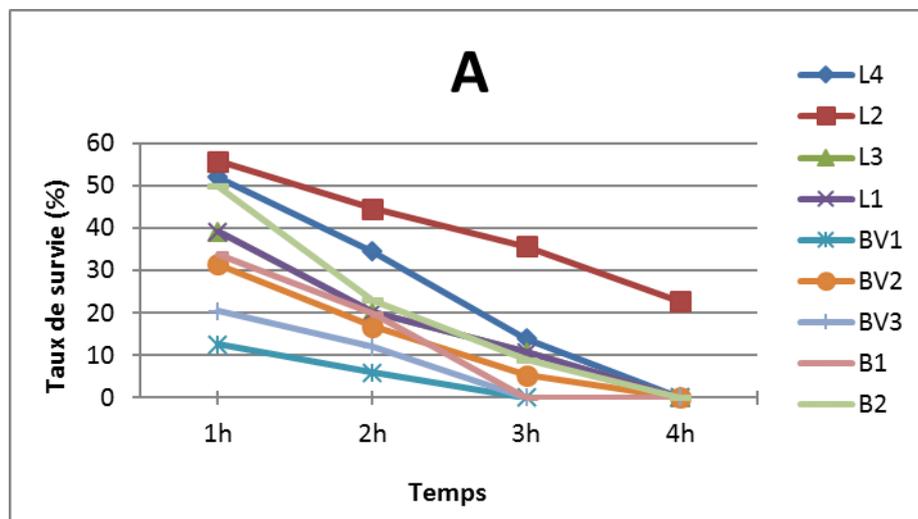
II. 6. Mise en évidence des caractères probiotiques :

II. 6.1 Résistance aux pH acide :

Les résultats de la résistance aux pH acide sont présentés dans la (**figure 11 : A, B, C**). Aucune résistance n'a été remarquée à pH 1 pour toutes les souches testées et même après 1h d'incubation. À pH 2, toutes les souches ont montré une chute rapide de viabilité au fil du temps d'incubation comparé à celle du pH 3 et pH 4. La seule souche qui a montré une résistance remarquable est la souche L2, cette dernière a pu gardée un taux de survie important même après 4h d'incubation. Une autre souche qui a montré les mêmes caractéristiques de la souche L2 mais avec un taux de survie moins important est la souche L4.

On peut dire que ces deux dernières souches ont montré un taux de survie largement remarquable par rapport aux autres souches testés, qui eux n'ont montré aucune résistance après 4h d'incubation pour toutes les valeurs de pH.

Pour les pH3 et pH4 toutes les souches ont pu gardées un taux plus aux moins stable mais après 2h d'incubation, les souches BV1, BV3, BV2 et B1 n'ont pas pu survivre. A la lumière de ces résultats on peut dire que les souches L2 et L4 appartenant à l'espèce *longum* ont montré une bonne résistance a ce facteur hostile en gardant un taux plus au moins stable pour toutes les pH testés et au fil du temps d'incubation.



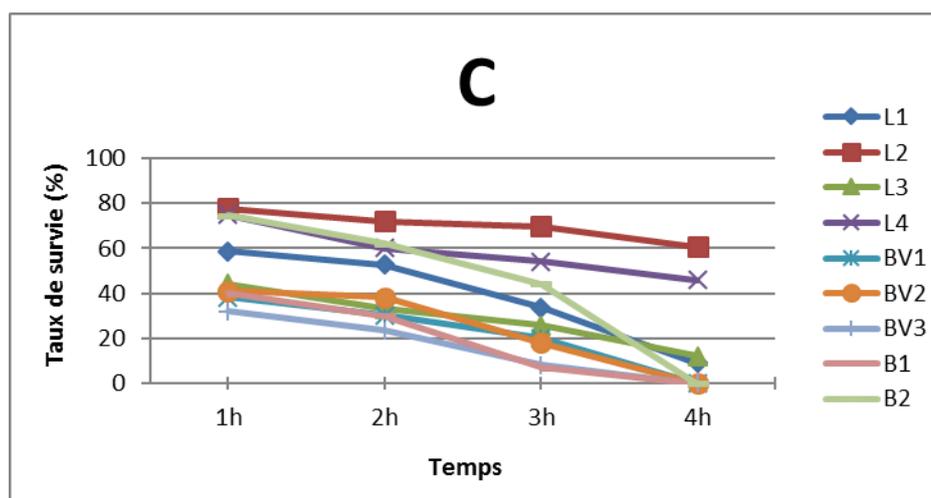


Figure 11 : Taux de survie (%) des souches de *bifidobacterium longum* (L1, L2, L3, L4), *bifidobacterium breve* (BV1, BV2, BV3) et *bifidobacterium bifidum* (B1, B2) ; (A) : a pH2, (B) : a pH 3, (C) : a pH4.

II. 6.2 Résistance aux sels biliaries :

Le résultat de la résistance aux sels biliaries est mentionné dans la figure (12 ; A, B, C). Nous avons remarqué que la tolérance est ont relation étroite avec le taux de survie ; plus la concentration de la bile augmente plus le taux de la survie diminue et cela est pour toutes les souches testées.

Pour toutes les concentrations de sels biliaries, toutes les souches avaient présenté un taux de survie inférieur à 50% après seulement 1h d'incubation. A l'exception de la souche L2 avec un taux très proche de 50% pour 0,3% de sels biliaries et après 2h d'incubation.

Deux autres souches L1 et L3 ont montré des taux supérieurs à 20% et égal à 30% pour les concentrations 0,5% et 0,3% respectivement. Ainsi, toutes les autres souches ont montré des taux inférieurs à 20% dont le plus faible taux été obtenu par la souche BV3 avec 7% et 0% pour les concentrations 0,3% et 0,5% respectivement. Seulement la souche L2 qui a présenté une résistance a 1% se sels biliaries avec un taux égal a 20% après 3h d'incubation.

On peut dir que c'est la souche L2 qui a montré une résistance importante suivi par la souche L3, c'est deux souches appartiennent à l'espèce longum.

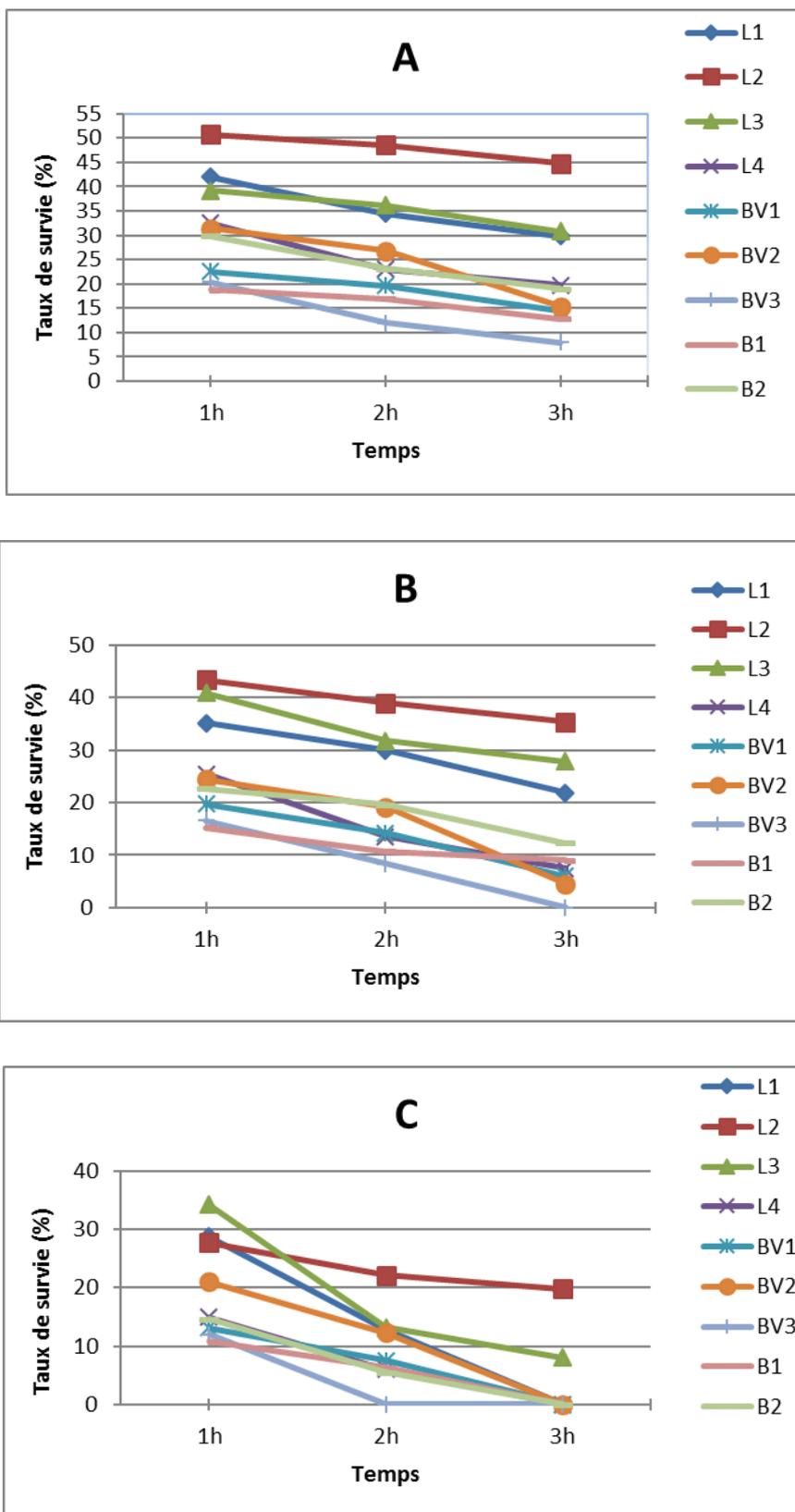


Figure 12 : Taux de survie (%) des souches de *bifidobacterium longum* (L1, L2, L3, L4), *bifidobacterium breve* (BV1, BV2, BV3) et *bifidobacterium bifidum* (B1, B2) ; (A) : a 0.3%, (B) : a 0.5%, (C) : a 1%.

II. 6.3 Antibiogramme :

Toutes les souches testées ont montré une résistance aux antibiotiques suivants ; l'acide nalidixique, kanamycine, ceftazidime et cefoxitin et une sensibilité aux rifampin, chloramphenicol, spiramycin, amoxiciline et tetracycline. Le reste des antibiotiques à montré les résultats cités dans le tableau 9.

Tableau 9 : antibiogramme des souches de bifidobactéries.

L'antibiotique	La dose	L1	L2	L3	L4	BV1	BV2	BV3	B1	B2
CN₁₀	10mcg	S	R	S	I	I	R	I	S	I
RA₅	5mcg	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NA₃₀	30mcg	R	R	R	R	R	R	R	R	R
C₃₀	30mcg	S	S	S	S	S	S	S	S	S
K₃₀	30mcg	R	R	R	R	R	R	R	R	R
IMI₁₀	10ug	R	S	R	I	R	I	I	S	I
P₁₀	10iu	S	R	I	R	S	R	S	R	R
KF₃₀	30ug	R	R	R	R	I	R	R	I	R
KZ₃₀	30ug	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SP₁₀₀	100ug	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AML₃₀	30ug	R	S	S	S	S	S	S	S	S
F₃₀₀	300ug	S	S	S	I	S	S	S	S	S
TE₃₀	30ug	R	I	R	R	S	S	S	S	S
CAZ₃₀	30ug	R	R	R	R	R	R	R	R	R
FOX₃₀	30ug	R	R	R	R	R	R	R	R	R

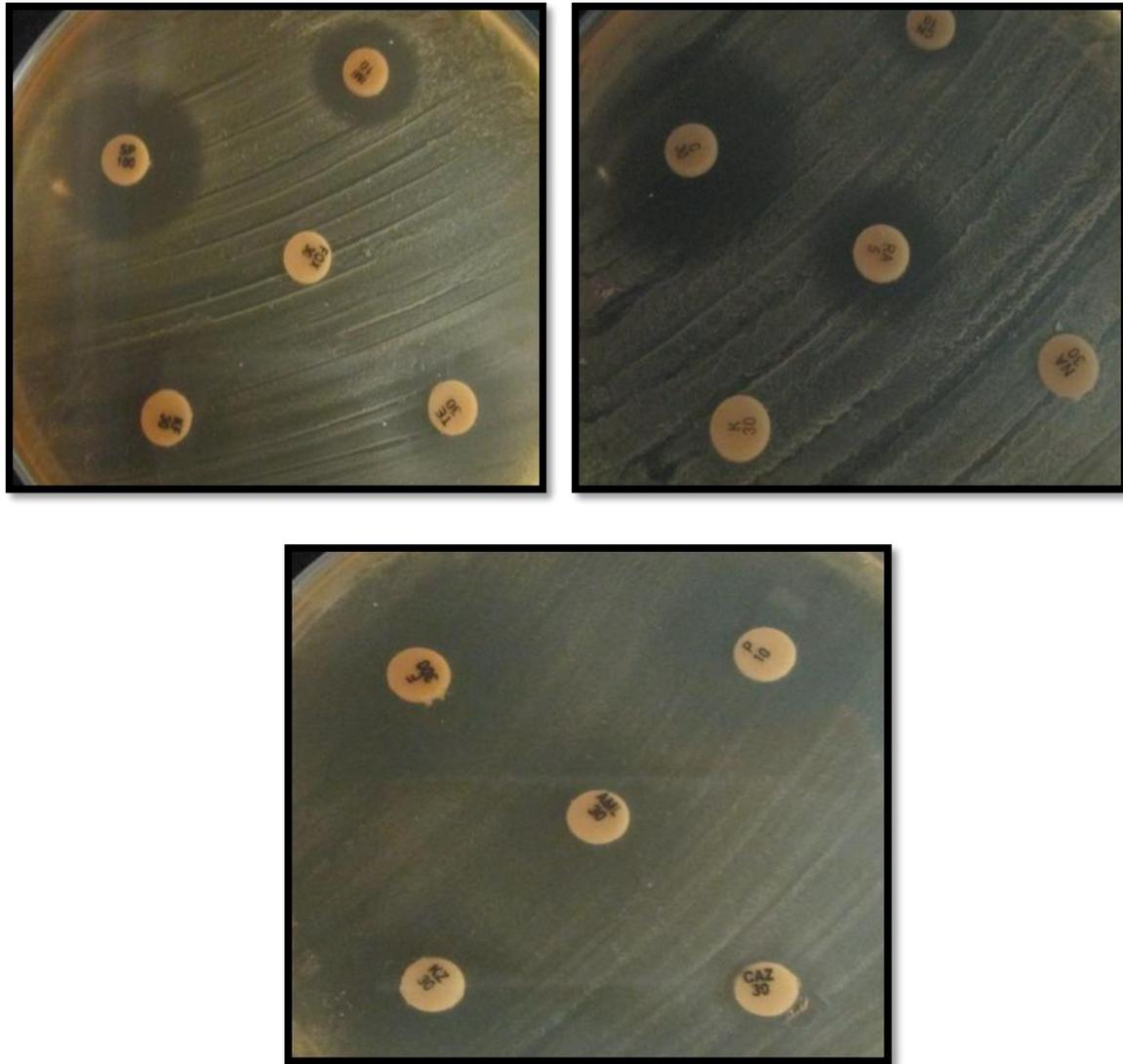


Figure 13 : *Antibiogramme de la souche L1.*

II. 6.4 L'activité antimicrobienne :

Le résultat de l'activité antimicrobienne a démontré que toutes les souches n'avaient aucune activité inhibitrice envers *pseudomonas aérogénosa* ; les autres souches ont montré une activité inhibitrice limitée envers les souches pathogènes dont le résultat est mentionné dans le tableau 10 et la figure 14. La seule souche qui a montré une activité inhibitrice assez importante est la souche L4 appartenant à l'espèce longum.

Tableau 10 : les diaètres des zones d'inhibition en mm lors des interactions des souches de Bifidobacterium et les bactéries pathogènes.

	<i>Escherichia coli</i> ATCC23922	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	<i>pseudomonas aerogenosa</i> ATCC 27453
L1	12	10	7	9	0
L2	13	9	6	8	0
L3	10	7	10	7	0
L4	15	13	10	7	0
BV1	11	9	0	4	0
BV2	9	8	4	3	0
BV3	10	11	7	5	0
B1	10	7	6	5	0
B2	11	9	9	7	0

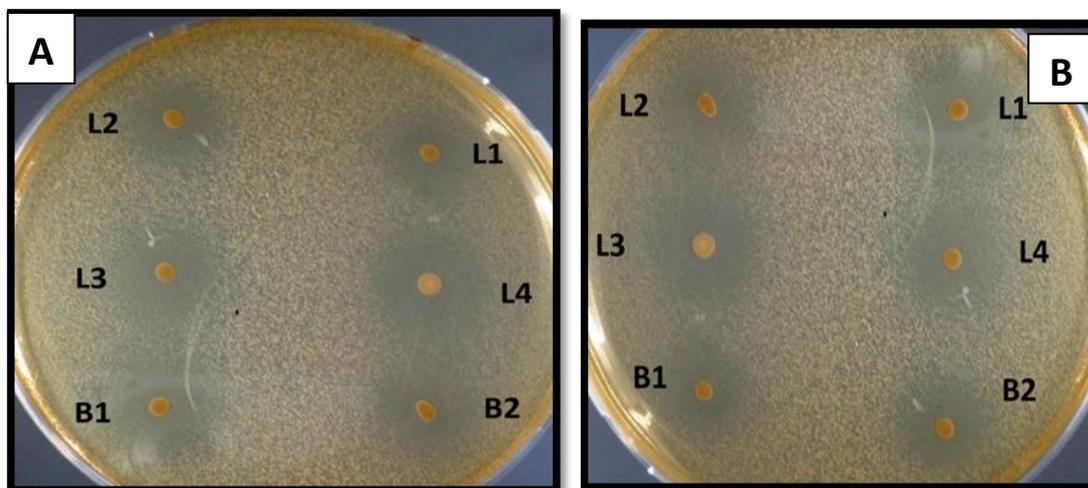


Figure 14 : *Activité inhibitrice des souches L1, L2, L3, L4, B1 et B2 sur A :Staphylococcus aureus ATCC 25923 ; B : Escherichia coli ATCC25922.*

II. 6.5 L'adhérence aux cellules épithéliales :

C'est l'un des critères les plus importants lors de la sélection des souches probiotique. Nous avons utilisé des cellules épithéliales d'origine animale (un

segment de l'iléon et un segment du colon du poulet de chair). Le résultat à dévoilé que toutes les souches testées n'ont montrés aucune adhésion aux cellules épithéliales de l'iléon et du colon a l'exception de deux souches L2 et L1 appartenant à l'espèce *longum* ; la première souche à montré une bonne adhésion a l'iléon et au colon tandis que la souche L1 s'est adhééré uniquement aux cellules épithéliales du colon.

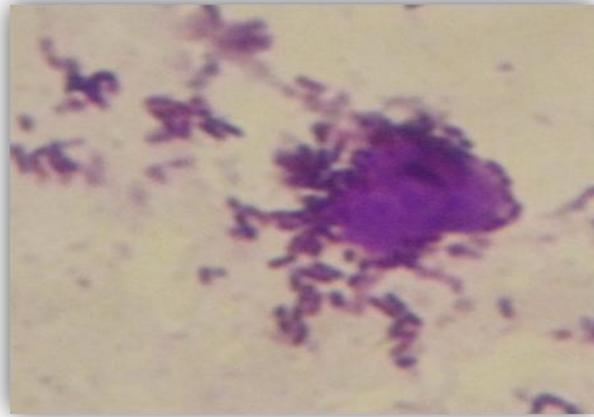


Figure 15 : adhérence aux cellules épithéliales du colon de la souche L2.

II. 7 Fermentation du lait :

II. 7.1 Cinétique de croissance :

L'évolution de la croissance des bifidobactéries en culture pure et en culture mixte avec les bactéries lactique est exprimée en log ufc/ml, les résultats sont représentés dans la **figure 16 (A, B, C)**.

Une meilleure croissance a été observée chez nos souches en culture mixte avec la souche *St.thermophilus* dont l'association de cette dernière avec les souches appartenant à l'espèce longum a atteint le nombre le plus élevé avec 28×10^8 ufc/ml pour la souche L2.

L'association de nos souches avec la souche *lactobacillus bulgaricus* a également été bonne comparant avec celle en culture pure, dont les souches appartenant à l'espèce longum qui ont atteient les nombre le plus élevée avec 4×10^8 ufc/ml et 28×10^7 ufc/ml Pour L2 et L3 respectivement.

Une croissance très lente a été observée chez nos souches en culture pure, ce n'est qu'après 24h de fermentation que les souches augmentent et atteignent de bons nombres de croissance.

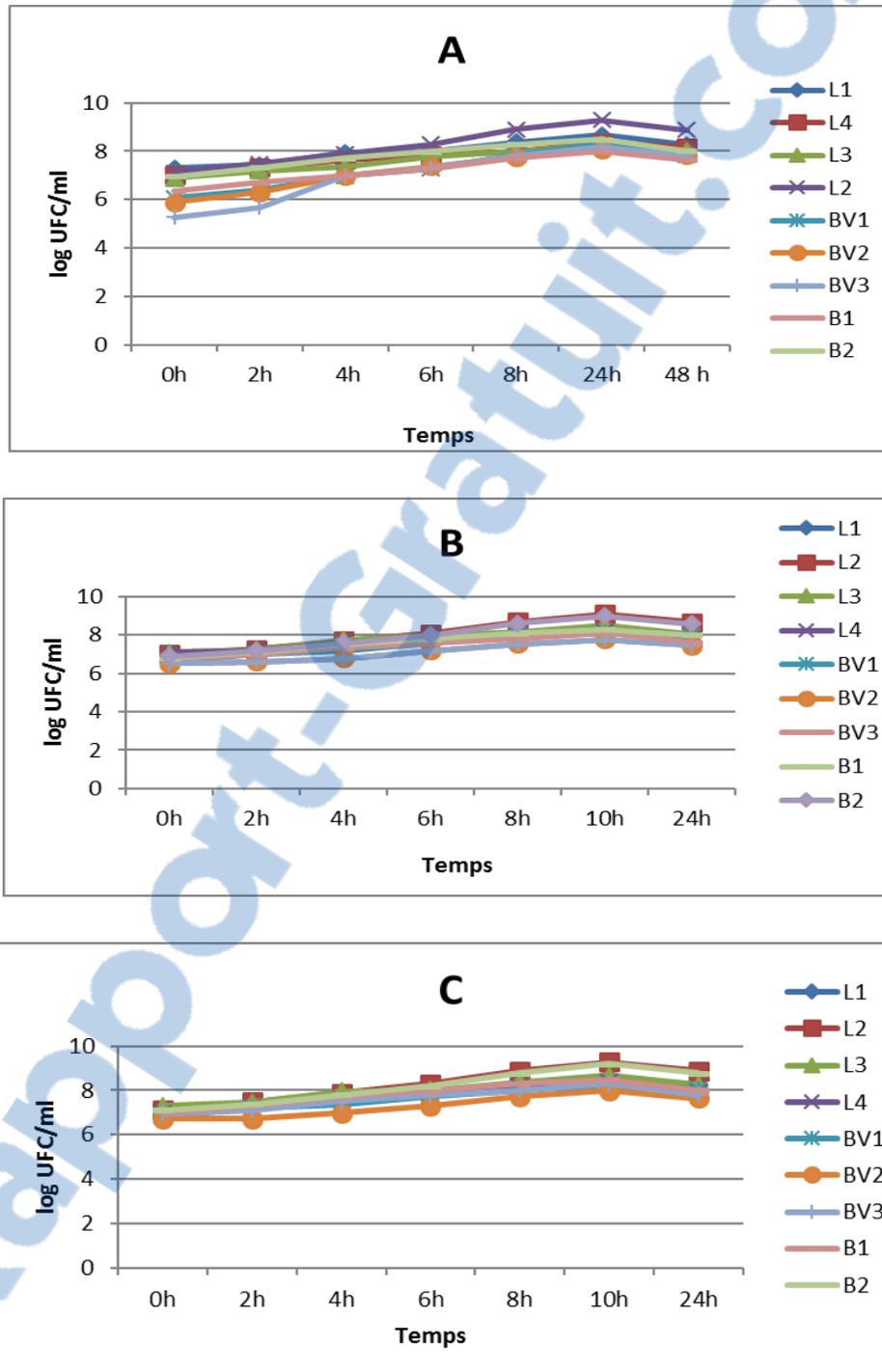


Figure 16 : Cinétique de croissance des souches de bifidobactéries *B. longum* (L1, L2, L3, L4), *B. breve* (BV1, BV2, BV3), *B. bifidum* (B1, B2) (A) ; en culture pure, (B) en culture mixte avec *Lactobacillus bulgaricus* (C) en culture mixte avec *St.thermophilus* au cours de la fermentation du lait.

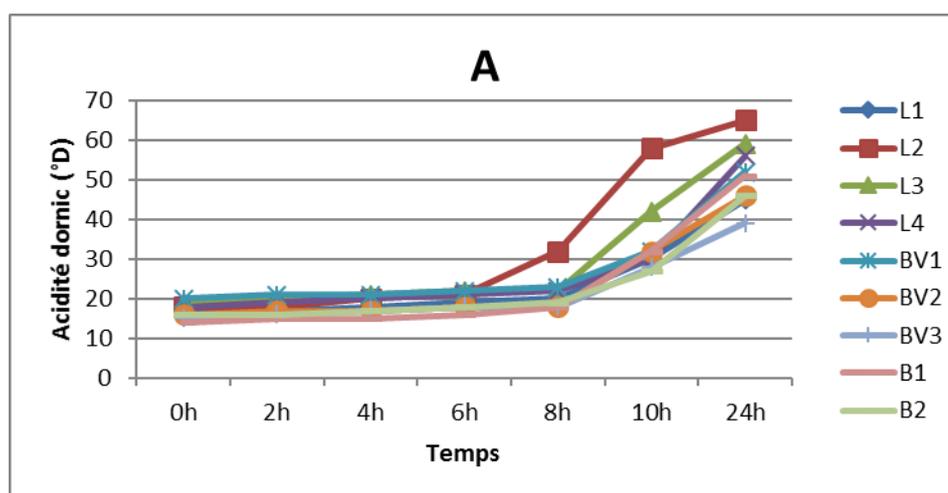
II. 7.2 L'acidité titrable :

La figure 17 montre la cinétique d'acidité produite par les souches de bifidobactéries en culture pure et en culture mixte avec les bactéries lactiques.

L'acidité produites par les souches de bifidobactéries en culture pure été faible par rapport a celle produites en culture mixte avec les bactéries lactiques.

En culture pure, ce n'est qu'après 10h d'incubation qu'il y a eu production d'acidité pour toutes les souches testées à l'exception de la souche L2, qui a produit 32D° après 8h. Le taux d'acidité augmente progressivement pour atteindre 65D° pour la souche L2 et un taux qui varie entre 50 et 60D° pour les souches L3, L4, B1 et BV après 24h d'incubation, alors que ces valeurs sont obtenues après uniquement 10h d'incubation en culture mixte avec *streptococcus thermophilus* pour toutes les souches testées a l'expection de la souche L2 avec un taux plus important.

En culture mixte avec *lactobacillus bulgaricus*, les souches L1, L2, L3, L4, BV1 et B1 produisent une acidité qui varie entre 50 et 60 D° après 10h d'incubation, a cette heur les souches B1 et B2 produisent uniquement 42 et 44 D° respectivement.



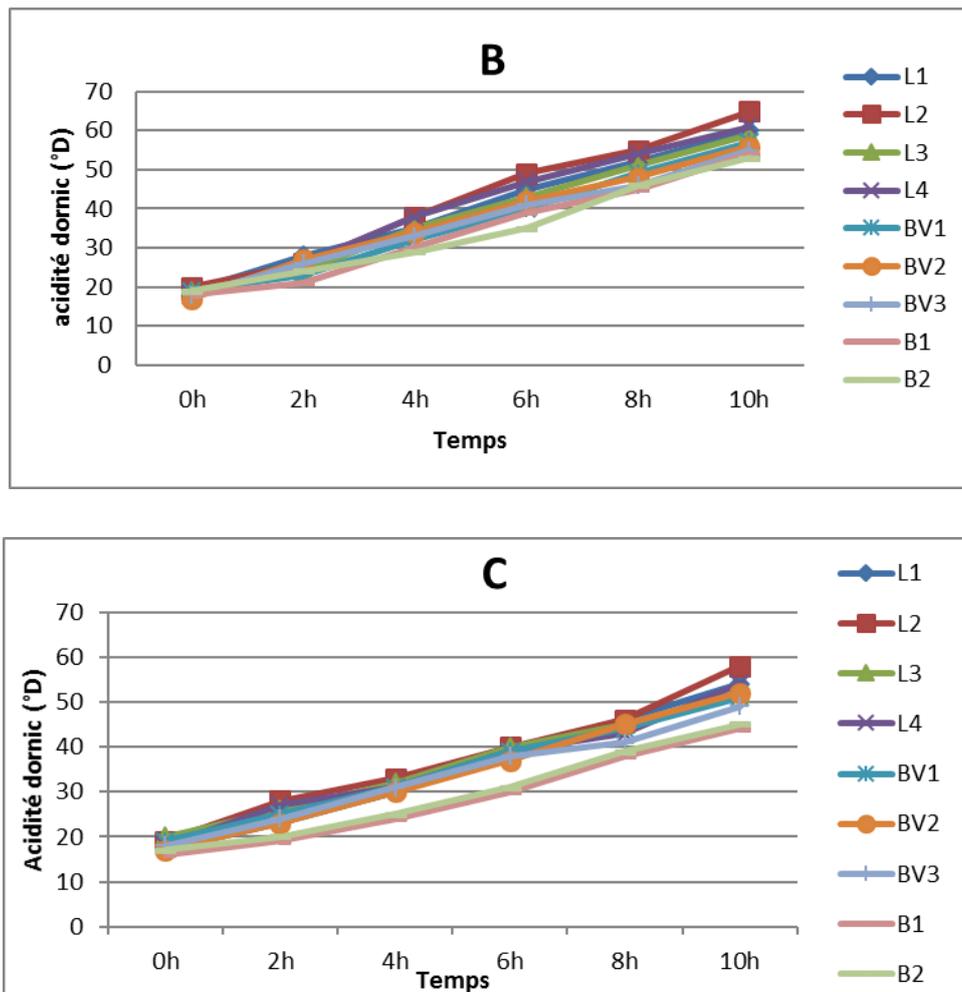


Figure 17 : Cinétique d'acidité (°D) produites par les bifidobactéries : *B. longum* (L1, L2, L3, L4), *B. breve* (BV1, BV2, BV3), *B. bifidum* (B1, B2) (A) ; en culture pure, (B) en culture mixte avec *streptococcus thermophilus* (C) en culture mixte avec *lactobacillus bulgaricus* au cours de la fermentation du lait.

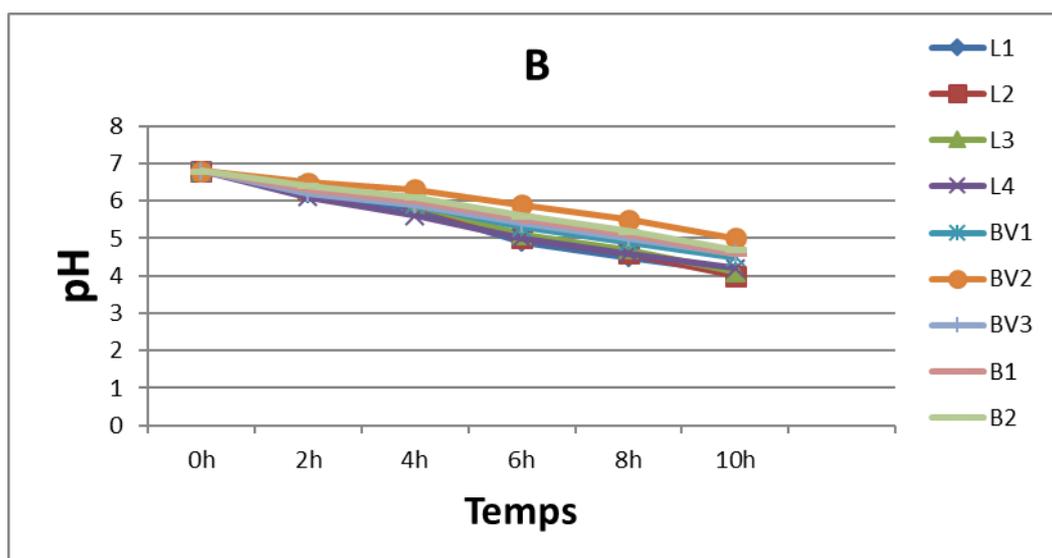
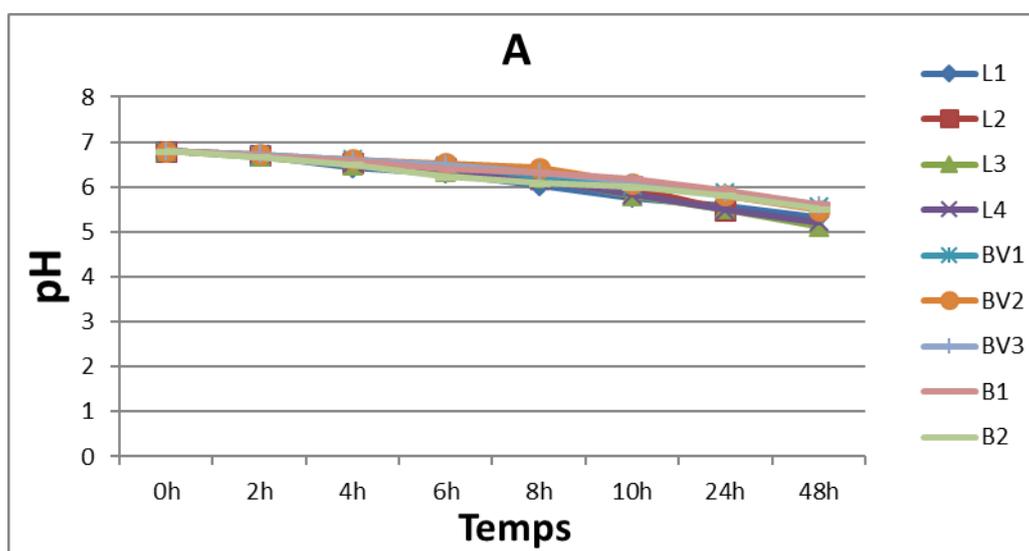
II. 7.3 Suivi du pH au cour de la fermentation :

Comme cités précédemment, le taux d'acidité produite au cours de la fermentation du lait varie entre les espèces et même entre les souches appartenant aux mêmes espèces, cette production d'acidité conduit a un abaissement de pH du milieu ; qui ce dernier est en relation étroite avec le taux d'acidités produites.

Au cours de la fermentation du lait en culture pure le plus bas pH est obtenu par la souche L3 appartenant au genre longum après 48h de fermentation dont le pH est égal à 5.

Les plus bas pH sont obtenus par les souches L2 et L3 appartenant à l'espèce longum au cours de la fermentation en culture mixte avec *streptococcus thermophilus* et après 10h de fermentation, à cette heure également tous les pH sont inférieurs à 5.

En culture mixte avec *lactobacillus bulgaricus* et après 10h de fermentation les pH des milieux fermenté par les souches L2, L3 et L1 appartenenat à l'espèce longum sont egal a 4.5, 4.7 et 4.8 respectivement.



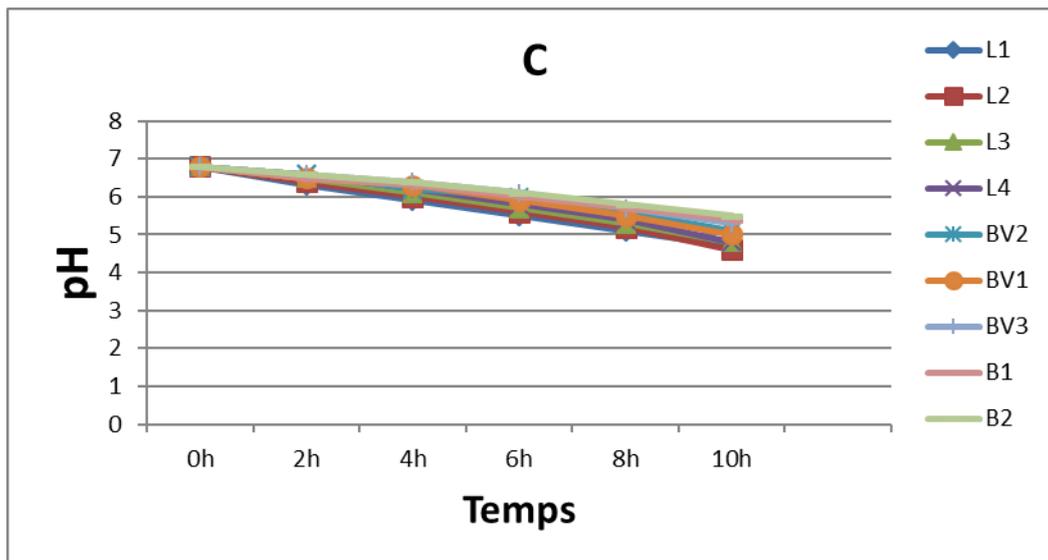


Figure 18 : suivi du pH au cours de la fermentation du lait par les bifidobactéries : *B. longum* (L1, L2, L3, L4), *B. breve* (BV1, BV2, BV3), *B. bifidum* (B1, B2) (A) ; en culture pure, (B) en culture mixte avec *St.thermophilus* (C) en culture mixte avec *lactobacillus bulgaricus*.

II. 8 Viabilités des souches potentiellement probiotiques :

4 souches ont été sélectionné pour l'évaluation de ce test ; L1, L2 (*bifidobacterium longum*), BV1 (*bifidobacterium breve*) et B1 (*bifidobacterium bifidum*).

II. 8.1 Viabilités pendant le stockage frigorifié à 4°C :

Le résultat de l'étude de la vaibilité des souches de bifidobactéries dans le lait fermenté et stocké à 4°C pendant 21 jours a dévoilé que le taux de viabilité est élevé chez la souche L2 appartenant au genre longum et la souche B1 appartenant à l'espèce bifidum avec un taux de 68,67% et 66,82% respectivement. Suivi par la souche L1 appartenant à l'espèce longum avec 53,93%.

La seule souche qui a montré un taux de viabilité moins important par rapport aux autres souches est la souche BV2 avec 46,11%.

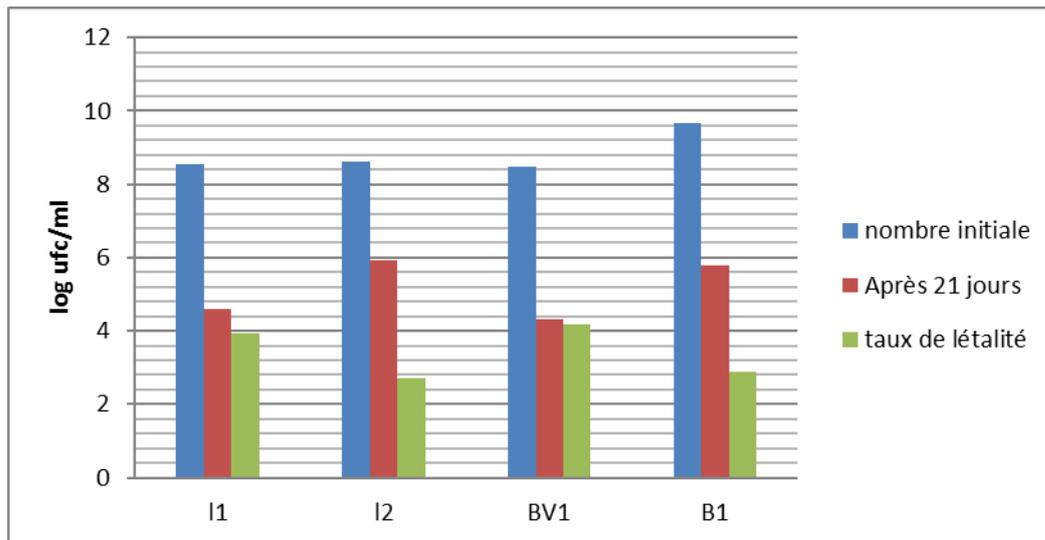
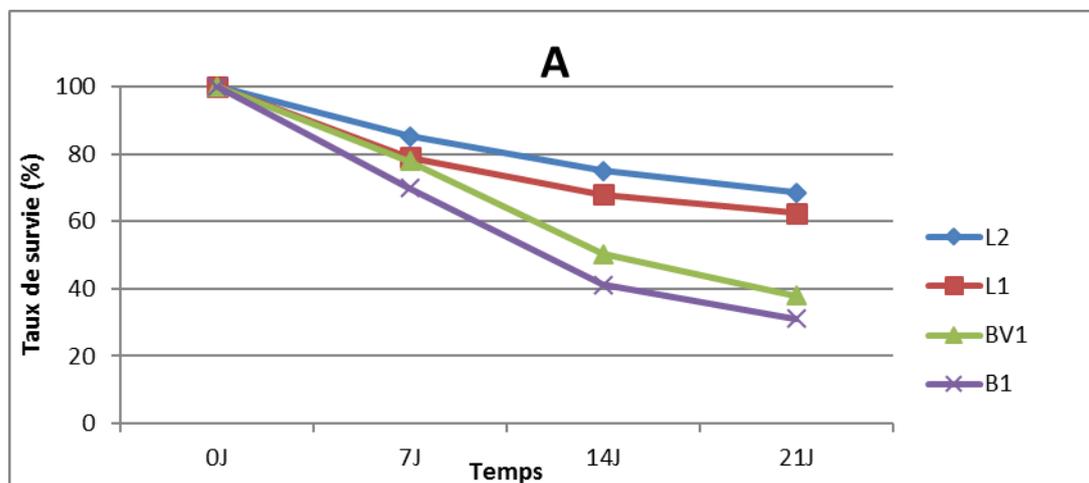


Figure 19 : viabilité des souches de bifidobactéries L1, L2 (*bifidobacterium longum*), BV1 (*bifidobacterium breve*) et B1 (*bifidobacterium bifidum*) pendant le stockage frigorifié à 4°C.

II. 8.2 Influence des aromes sur la viabilité :

L'influence des aromes fraise, banane et vanille sur la viabilité de nos souches est exprimés en pourcentage du taux de survie et présenté dans la **figure 19**.



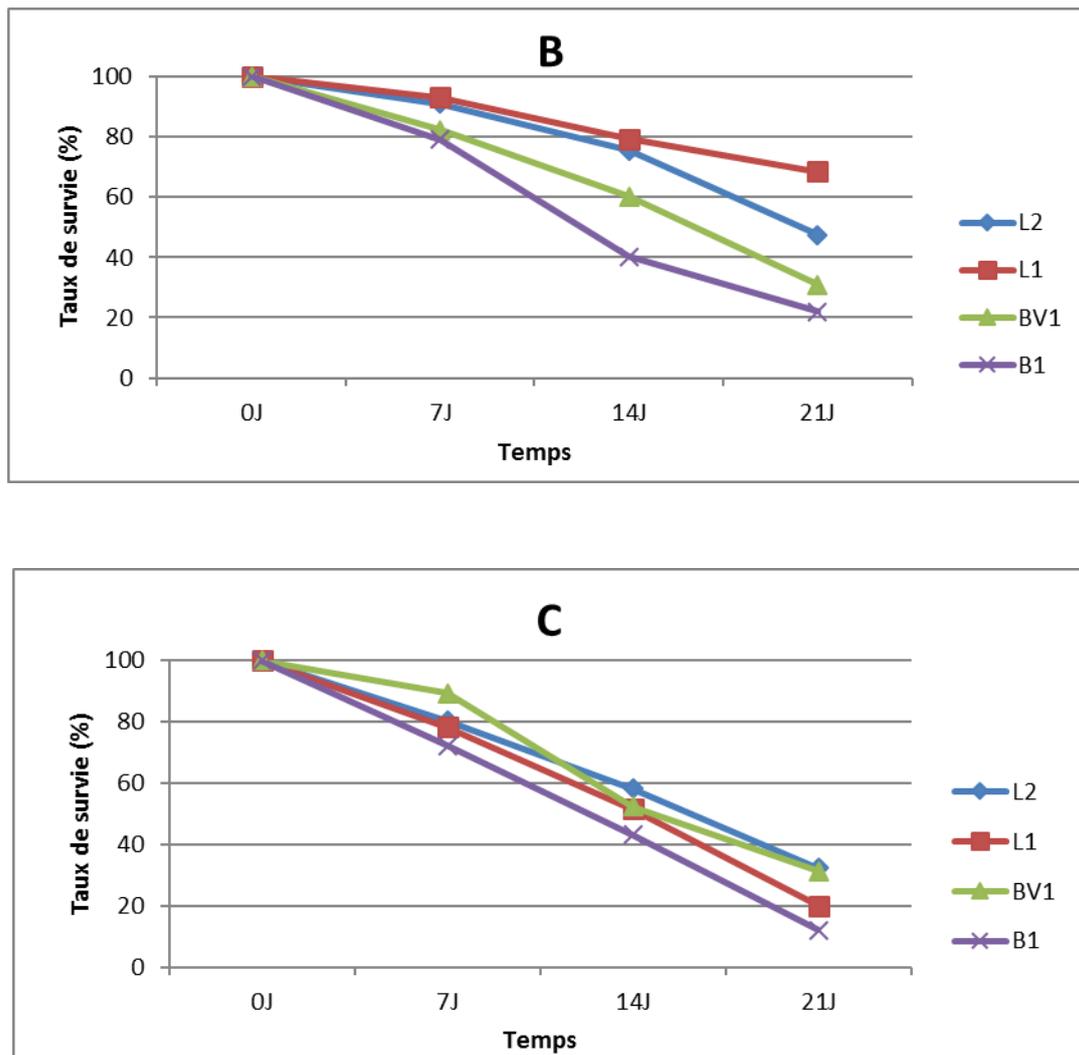


Figure 20 : taux de survie (%) des souches de bifidobactéries L1, L2, BV1 et B1 sous l'influence des aromes ; (A) ; vanille, (B) ; banane, (C) ; fraise.

A partir de ces résultats, on remarque que l'influence des aromes sur les souches testés est nettement remarquable car le taux de survie de ces derniers décroît rapidement au fil des semaines.

C'est l'arome fraise qui a conduit à des taux de létalité les plus élevés ; après 21 jour de conservation, toutes les souches testées ont montrés un taux de survie inférieur a 40% avec 20% et 17% pour L1 et B1 respectivement, ces taux sont très bas par rapport a celle obtenu par les deux autres aromes.

Et c'est l'arome vanille qui a représenté des taux de survie très important avec 70%, 62%, 39% et 32% pour les souches L2, L1, BV1 et B1 respectivement suivi

par l'arome banane avec 70%, 48%, 30% et 22% pour L2, L1, BV1 et B1 respectivement.

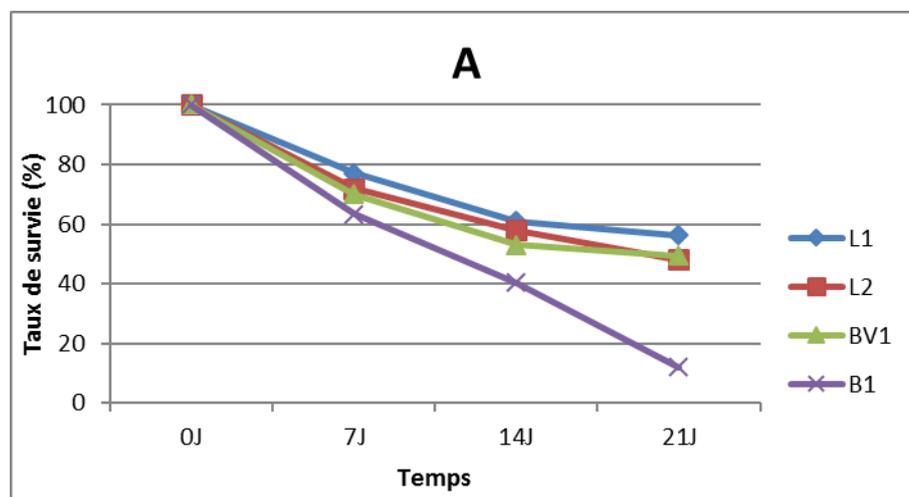
A la lumière de ces résultats on constate que c'est les deux souches L1 et L2 appartenant à *B. longum* qui ont pu résister à l'influence de ces trois aromes.

8.2 Influence des additifs sur la viabilité :

Le résultat de l'influence des additifs E414 et E1442 sur la viabilité de nos souches est représenté dans la **figure 20**.

Une résistance très importante a été observée chez nos souches sous l'influence de l'additif E1442 dont toutes les souches avaient présenté un taux supérieur à 50%, à l'exception de la souche BV1 avec 33,4%.

Et pour l'additif E414, le meilleur taux de survie a été noté par la souche L1 avec 56,3% suivi par les souches L2 et BV1 avec 48,2% et 49,3% respectivement. C'est la souche bifidum B1 qui a montré le taux de létalité le plus élevée.



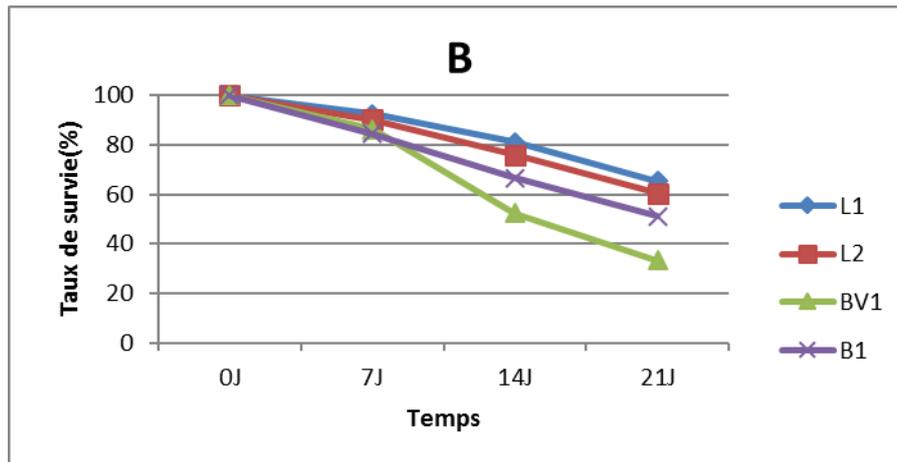


Figure 21 : taux de survie (%) des souches de bifidobactéries L1, L2, BV1 et B1 sous l'influence des additifs ; (A) ; E414, (B) ; E1442.

III. Discussion :

Isolement et identification des bifidobactéries :

Les bifidobactéries sont les bactéries les plus dominantes dans les selles des nourrissons allaités au sein (**Roy, 2011**). Ces derniers s'installent au niveau du colon au bout du 2^{ème} ou 3^{ème} jour suivant la naissance (**Jonathan, 2006**).

Le niveau élevé de bifidobactéries observées chez les nourrissons allaités au sein a été attribuée à la présence d'oligosaccharides bifidogènes dans le lait maternel (**Arboleya et al., 2011 ; Takumi et al., 2013**).

Comme les bifidobactéries sont des anaérobies stricts, leurs isolements a nécessité des conditions d'anaérobiose par l'utilisation des anaerocultes et des gas-pack ainsi qu'un milieu de culture sélectif.

L'utilisation du milieu MRS-NNLP a révélé être efficace pour leurs isolement, effectivement ce milieu a été utilisé par (**Tharmaraj, 2003 ; Ong et al., 2009; AL-Otaibi, 2009; Karimi et al., 2012**). Ces derniers ont noté que ce milieu est sélectif pour l'isolement des *Bifidobactérium*.

Les antibiotiques additionnés au milieu MRS sont le sulfate de néomycine, l'acide nalidixique, le chlorure de lithium, et le sulfate de paromomycine. Les deux premiers inhibent la croissance des bacilles Gram positif et Gram négatif respectivement et le chlorure de lithium est couramment utilisé comme agent sélectif dans l'énumération de bifidobactéries (**Karimi et al., 2012**).

L'utilisation de la cystéine chlorydrique stérilisé par filtration semble être très importante pour les bifidobactéries, selon (**Roy, 2001 ; Shah, 2011 ; Sánchez-Zapataa et al., 2012**) cette dernière réduit le potentiel d'oxydo-réduction dans les milieux de culture et crée de meilleures conditions d'anaérobiose.

La recherche de l'enzyme fructose-6-phosphate phospho-cétolase (F6PPK) est très importante pour l'identification du genre *Bifidobacterium* (**Biavati et Mattarelli, 2006**).

L'absence de l'enzyme F6PPK dans les autres bactéries anaérobies à Gram positif comme *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Propionobacterium*, *Corynebacterium* et *Actinomycetacea* qui peuvent être morphologiquement confondu avec les bifidobactéries est très important pour l'identification du genre *bifidobactérium* (**Lankaputhra, 1997**).

Selon (**Biavati et Mattarelli, 2006**) la recherche des acides lactique et acétique est aussi un moyen pour l'identification des bifidobactéries, car contrairement aux bactéries lactique qui produisent uniquement de l'acide lactique, les bifidobactéries produise également de l'acide acétique avec 2/3 moles lactique/acétique respectivement.

La mise en évidence de ces deux derniers acides a été révélée par la haute performance liquide chromatographie (HPLC), effectivement après fermentation sur milieu MRS nos souches ont bien produit approximativement 2/3 moles de l'acide lactique et l'acide acétique respectivement. Ce résultat nous a bien permis de classier nos souches au genre *Bifidobacterium*. Ces résultats ont également été noté par (**Dinakar et Mistry, 1994 ; Hilde et al., 2003 ; Elghali et al., 2012**).

Les Bifidobacteries produisent du L (+) acide lactique, qui est rapidement absorbé dans le côlon (**Guerzoni, 2011**) en comparaison avec le D (-) isomère de l'acide lactique produit par d'autres bactéries telles que *L. acidophilus* et *L. bulgaricus* (**Rodrigues Florence, 2014**).

L'identification biochimique est également importante pour la confirmation du genre *Bifidobactérium*, nos souches ont présenté un résultat négatif pour la catalase, l'oxydase et la nitrate réductase et un résultat positif pour la citrate perméase, des résultats similaires ont été noté par (**Bahloul et al., 2012 ; Mahmoudi et al., 2013**).

Du point de vue physiologique, les bifidobactéries se caractérisent par leur activité enzymatique leur permettant d'utiliser de nombreux sucres, comme le

lactose, le galactose, la raffinose, le sucrose, l'amylopectine, l'amylose et le xylan (**Kouame, 2013**).

En ce référant aux travaux précédent, l'ensemble des résultats de la fermentation des différents sucres nous a permis de classifier nos souches au trois espèces suivante ; *B. longum* (L1, L2, L3, L4), *B. breve* (BV1, BV2, BV3) et *B. bifidum* (B1, B2).

Selon (**Vlkova et al., 2005 ; Sonomoto et Yokota, 2011**) Les espèces les plus dominante dans les selles des nourrissons sont ; *B. breve*, *B. longum*, et *B. bifidum*. Effectivement l'isolement des bifidobactéries à partir des selles a révélé la présence de ces 3 espèces différentes. Ce résultat a également été obtenu par (**Heddadji, 2007 ; Benkaddour, 2013**).

Chez les nourrissons allaités au sein, *bifidobacterium brève* est la souche la plus dominante suivi par *bifidobacterium infantis*, *bifidobacterium longum* et *bifidobacterium bifidum* respectivement (**Sonomoto et Yokota, 2011**).

L'observation microscopiques de ces espèces a révélé un pléomorphisme cellulaire et cela est du aux hexoses N-acétylés présent dans le milieu de culture et qui influence le processus de synthèse de la paroi cellulaire.

Une déficience du milieu de culture en hexoses N- acétylhexosamines influence le processus de synthèse de la paroi cellulaire et serait la cause du pléomorphisme des bifidobactéries. En effet, Des formes bacillaires très ramifiées sont présentes en absence de N-acétylhexosamines. Des formes bifurquées sont observées pour des concentrations "intermédiaires" en N-acétylhexosamines. Et enfin, des formes bacillaires classiques apparaissent lorsque le milieu de culture renferme des quantités importantes de N-acétylhexosamines (**Caescu, 2004**).

Mais, le plus souvent, la morphologie cellulaire ne permet pas une bonne différenciation du genre et de l'espèce. Même l'aspect bifide des extrémités des

bâtonnets sont rencontrés aussi chez les genres *Corynebacterium* et *Propionibacterium* (Kouame, 2013).

La mise en évidence des caractères probiotique :

Actuellement, ce sont les cinq espèces suivant qui ont préconisé une attention particulière pour la production d'aliment probiotique ; *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, and *Bifidobacterium longum*. Et pour la fermentation du lait, l'espèce *bifidum* est la plus largement utilisé suivi par *longum* et enfin *brève* (Shah, 2011).

Les bactéries probiotiques utilisés dans les aliments pour la consommation humaine sont généralement d'origine humaine et ils ne sont pas pathogènes (Salminen, 2011).

Les bactéries probiotiques contenues dans les produits commerciaux doivent conserver les caractéristiques pour lesquelles ils ont été initialement sélectionnés. Ceux-ci comprennent la croissance et la survie des micro-organismes pendant la production des produits, le stockage, et la post-consommation dans le transit de l'estomac vers l'intestin (Roy, 2011).

Généralement, les premiers critères a recherché lors de la sélection de souches probiotique sont la résistance au pH acide et aux sels biliaire, ces tests sont conçu pour s'assuré de leurs passage a travers l'estomac et l'intestin respectivement.

En général, les bifidobactéries ont été rapportés pour être résistants à l'acide gastrique, le suc pancréatique et la bile, mais de grandes différences existent entre les souches (Shigeru *et al.*, 2001).

Le pH de l'estomac varie de 1 pendant le jeun à 4 après un repas et le temps du passage a travers l'estomac est estimer de 3h (Osmanagaoglu *et al.*, 2010).

Le résultat de la résistance aux bas pH, a dévoilé une différence significative du taux de survie, mais aucune souche n'a pu résister au delà de 4h d'incubation à l'exception de deux souches L2 et L4 appartenant à l'espèce *longum*. Ces deux dernières ont pu garder un taux de survie plus au moins stable par rapport aux autres souches. Les résultats sont en accord avec des études précédentes trouvés par (Takahashi, Arboleya *et al.*, 2013 ; Andriantsoanirina *et al.*, 2013) qui ont dévoilé que les espèces *longum* sont les plus résistantes.

Contrairement à (Matsumoto *et al.*, 2004) qui ont indiqué que les souches appartenant à l'espèce *longum* sont les moins résistantes. Ainsi (Collado *et al.*, 2006) a trouvé que les souches les plus résistantes sont celles qui appartiennent à l'espèce brève. D'autres chercheurs ont indiqué qu'il y a une relation entre la prédominance de la souche *B. brève* dans les selles et sa capacité de survivre dans les conditions gastro-intestinales.

Des études ont indiqué que la pepsine peut protéger les cellules de *Bifidobacterium* lors de l'exposition à un pH bas en diminuant l'hyperpolarisation des cellules, qui est suggéré d'être associé à l'activité de H⁺-ATPase (Matsumoto *et al.*, 2004 ; Matto *et al.*, 2006).

Et pour la tolérance aux sels biliaires, une résistance a été observée chez nos souches pour les concentrations 0,3% et 0,5%. Les seules souches qui ont présenté un taux de survie important à 1% de sels biliaires sont L2 et L3 appartenant à l'espèce *longum*.

Nos résultats sont en accord avec des études similaires rapportées par (Clark et Martin, 1994 ; Arboleya *et al.*, 2011 ; Andriantsoanirina *et al.*, 2013). Ces derniers ont indiqué que c'est la souche *longum* qui a présenté un taux de survie important. Contrairement à (Ibrahim et Korovainy, 1993) qui ont indiqué que la souche la plus résistante est *B. infantis* suivie par *B. bifidum*, *B. breve* et *B. longum* respectivement.

L'activité antimicrobienne de nos souches envers les souches pathogènes avait dévoilé une activité inhibitrice importante envers *staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. A l'exception des souches bifidum qui n'avaient aucune activité inhibitrice. Selon (Shah, 2011) cette inhibition est due à la capacité des bifidobactéries de produire des substances antimicrobiennes telles que des acides organiques (par exemple, acides lactique et acétique), du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines.

Selon (Shah, 2011) Les *Bifidobacterium* ont montré des propriétés antimicrobiennes fortes contre les bactéries Gram-positives telles que *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens* que contre les Gram négatif telles que *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli*.

Des niveaux élevés d'inoculum doivent être utilisés, car un produit alimentaire doit contenir au moins 10 millions de bactéries vivantes par gramme lorsqu'il est placé sur les rayons des magasins. En outre, la perte de la viabilité des cellules qui se produit généralement pendant le transit gastrique doit également être prise en compte. Par conséquent, à la consommation, le produit doit contenir un nombre suffisant de cellules pour fournir l'intestin avec la dose appropriée de bactéries vivantes (Roy, 2011).

L'adhérence à la muqueuse intestinale est un critère clé de sélection des souches probiotiques, il est considéré comme une condition préalable pour la colonisation et la croissance. Ainsi l'effet probiotique est maximal lorsque ces organismes s'adhèrent aux cellules de la muqueuse intestinale (Roy, 2011).

L'adhérence aux cellules épithéliales testées sur modèle animal a été jugée comme mauvaise, sur les neuf souches testées uniquement la souche L2 appartenant à l'espèce longum qui a montré une adhérence au deux segments de l'ilium et du colon du poulet de chair.

Selon (**Fontaine, 1995**) l'adhérence se fait par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques aux bifidobactéries, présents au niveau de la muqueuse ou apparaissant après traitement par les systèmes enzymatiques de la bactérie.

La première protéine décrite d'être directement impliqués dans l'adhérence des bifidobactéries est une lipoprotéine qui a été purifiée par chromatographie et proposé en tant que promoteur d'adhérence (**Wang, 2010**).

Les parois du côlon fournissent des sites écologiques particuliers pour la prolifération de *Bifidobacterium*. Les acides lipotéichoïques associés avec les parois de bactéries Gram-positives peuvent initier l'adhérence aux cellules épithéliales de l'intestin.

Les sites les plus probables pour l'interaction entre les cellules épithéliales et les bifidobactéries sont des protéines ou des glycoprotéines, qui peuvent se lier fractions d'acides gras d'acides lipotéichoïques. Certaines souches de *Bifidobacterium*, telles que *Bif. infantis*, sécrètent des polysaccharides, qui peuvent initier l'adhérence aux cellules épithéliales de l'intestin (**shah, 2011**).

Certaines souches de *Bifidobacterium* ont montré leurs pouvoirs de s'adhérer et de coloniser un grand nombre de différents types de culture de cellules épithéliales intestinales (**Carolina et al., 2012**).

Aptitudes technologiques des bifidobactéries :

La fermentation du lait par les bactéries lactiques et les bifidobactéries conduit à la production d'une acidité titrable qui détermine les propriétés technologiques de ces bactéries. En revanche, la production de l'acidité dépend de plusieurs paramètres La température d'incubation, l'état physiologique des bactéries, la concentration de l'inoculum, et le lait utilisé (**Heddadji, 2007**).

Au cours de la fermentation du lait en culture pure et en culture mixte, nous avons notés la croissance de nos souches, l'acidité titrable produites ainsi que l'évolution du pH.

Une meilleure croissance été observé chez nos souche en culture mixte avec *streptococcus thermophilus* suivi par l'association avec *lactobacillus bulgaricus*. Et une croissance très lente a été notée en culture pure. En effet, certains auteurs ont mentionné qu'il existe une synergie active entre les souches en culture mixte (**Bensoltane et al., 2004, Chiriguene et al., 2006**). Ce sont les souches appartenant à l'espèce longum qui ont atteint les meilleurs nombres de croissance que ça soit en culture pure ou en culture mixte.

Les Bifidobacterium pousse lentement dans le lait et et la pratique habituelle consiste à ajouter des bactéries du yaourt pour améliorer le processus de fermentation pour la production de yogourt probiotique (**Ayse et al., 2004**).

La croissance des bifidobactéries dans le lait est souvent lente ou limitée par rapport à d'autres bactéries lactiques utilisées dans les produits laitiers fermentés, et cela semble en partie en raison des faibles activités protéolytiques (**Roy, 2005**).

D'autres études ont également montré que la croissance des bifidobactéries dans le lait peut être améliorée par l'addition de facteurs bifidogènes tels que les hydrolysats de protéines (**Gomes et al., 1998**).

Ce genre est rarement utilisé seul en raison de ses faibles aptitudes fermentaires sur milieu lait et il est souvent associé aux bactéries lactiques classiques telles que *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (**Riazi Et Ziar, 2010**).

Une différence significative a été observée pour le taux d'acidités produites par nos souches en culture pure et en culture mixte. En culture pure, ce n'est

qu'après 8h d'incubation qu'il y a eu production d'acidité titrable au alentour de 30 D° par la souche L2 appartenant à l'espèce longum, ce taux continu à évoluer pour atteindre 65D° mais après 24h d'incubation. Alors que cette valeur a été obtenu après seulement 10h d'incubation en culture mixte avec *streptococcus thermophilus*, a cette heur également la souche L2 en culture mixte avec *lactobacillus bulgariccus* a produit une acidité au alentour de 60 D°.

Cette production d'acidité conduit a un baisseement du pH du milieu, et comme la meilleure acidité été obtenu par l'association des bifidobactéries avec la souche *streptococcus thermophilus*, le plus bas pH a été également obtenu par cette dernière avec un pH qui égal a 4, 4.1, 4,2 pour les souches L2, L3 et L4 respectivement. Et en culture mixte avec *lactobacillus bulgariccus*, le plus bas pH été obtenu par la souche L2 avec 4,6. L'abaissement du pH du milieu en culture pure été très lent, ce n'est qu'après 48h d'incubation que le pH arrive a 5 par la souche L3.

L'avantage d'utiliser une culture mixte contenant des bifidobactéries et des bactéries lactiques est non seulement la réduction du temps de la fermentation, mais aussi d'éviter d'autres défauts que les produits fermentés par des bifidobactéries en culture pure peuvent survenir, comme la séparation de lactosérum, une texture gluante, goût trop légère, de levure ou de goût vinaigré. En outre, l'ajout de cultures de yogourt aux produits bifidus peut améliorer leur diététique (Samona, 1996 ; El-Zahar *at al.*, 2004).

Viabilité des souches potentiellement probiotique :

Le maintien de la viabilité des bifidobactéries dans les laits fermentés représente un défi pour les industries laitières en raison de leur grande sensibilité à faible pH et température lors du stockage. En plus, la diminution du nombre de cellules peut aussi être la conséquence d'une sensibilité élevée à l'oxygène (Rodrigues Florence, 2014).

Au cours de la production de lait fermenté et le stockage à 4 ° C, les *Bifidobacterium* sont exposés à des stress combinés. Tout d'abord, les conditions acides générées par la production des acides organiques et la diminution des valeurs de pH qui se produit au cours de la fermentation. Deuxièmement, l'exposition à l'oxygène est inévitable lors de la transformation du lait fermenté dans l'industrie alimentaire, et les niveaux d'oxygène ont tendance à augmenter au cours du stockage réfrigéré. Troisièmement, ces deux facteurs technologiques ainsi que la faible température pendant l'entreposage frigorifique sont considérées comme préjudiciables à la survie de bifidobactéries dans les produits fermentés (**Rodrigues Florence, 2014**).

Le stockage au froid est aussi un moment critique au cours de la durée de vie des laits fermentés, comme les souches de *Bifidobacterium* sont soumises à des contraintes à basse température qui ne sont pas rencontrées dans leur environnement intestinal normale (**Rodrigues Florence, 2014**).

Le taux de viabilités de nos souches dans le lait fermenté et stocké à 4°C pendant 21 jours été élevée dont toutes les souches ont montré un taux supérieur à 50% à l'exception de la souche BV2 avec 46,11%.

Des pertes de viabilité entre 0 et 3 ufc/ml ont été rapportées précédemment par d'autres auteurs pendant le stockage frigorifié des laits fermentés (**Rosenthal & Bernstein, 1998; Shin et al., 2000; Gilliland et al., 2002**).

Selon (**Shah, 2000**) cette perte de viabilité des bifidobactéries pourrait être due à la formation d'acide, le pH, les autres micro-organismes et l'oxygène dissous dans le lait.

Selon (**Rodrigues Florence, 2014**) la fermentation du lait par les *Bifidobacterium* en culture mixte avec *Streptococcus thermophilus*; espèce

tolérante à l'oxygène, l'effet de l'oxygène dissous dans le produit est fortement réduit.

S. thermophilus peut agir comme un absorbeur d'oxygène, en consommant de l'oxygène dans le produit fermenté, c'est ce qui réduit l'exposition des bifidobactéries à ces stress létaux.

Le système d'emballage exerce également une forte incidence sur l'oxygène dissous contenu dans les laits fermentés. Il a été noté qu'au cours de la durée de conservation du produit, la teneur en oxygène de 20 ppm a augmenté de 50 ppm dans l'emballage de polystyrène. En revanche, l'utilisation d'un matériau d'emballage avec une couche de barrière à l'oxygène réduit la teneur initiale en oxygène de 20 ppm à 8 ppm à plus de 42 jours (**Rodrigues Florence, 2014**).

L'un des composants qui peuvent affecter la viabilité des souches probiotiques sont les arômes additionnés dans les yaourts, effectivement le résultat de l'influence de ces dernières sur la viabilité de nos souches a dévoilé que le taux de survie, qui était faible, décroît rapidement au fil des semaines de stockage.

Une différence significative a été observée pour le taux de survie de nos souches influencées par les trois différents arômes ; fraise, Banane et vanille. Dont les taux de létalité les plus élevés ont été obtenus par l'influence de l'arôme fraise, suivi par l'arôme banane et l'arôme vanille, n'empêche que seulement deux souches appartenant à l'espèce *longum* L1 et L2 ont présenté un taux de survie important pour les trois arômes.

(**Demers mathieu, 2015**) a montré que les arômes fraises inhibent la croissance de *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum* et *B. animalis*.

Ainsi, l'ajout de certains additifs dans les produits probiotiques, peut influencer la viabilité des souches probiotiques. Effectivement nous avons notés des taux de

létalité de 88% pour la souche B1 sous l'influence de l'additif E414 et 66,6% pour la souche BV1 pour l'additif E1442. A l'exception des souches L1 et L2 avec des taux de survie égal et supérieur à 50% pour les deux additifs.

Rapport-Gratuit.com

III. Conclusion général et perspective :

L'isolement à partir d'un milieu de culture sélectif MRS-NNLP et la production de nos souches de deux acides organiques acétique et lactique avec 3/2 mol respectivement nous a permis de confirmer l'appartenance de ces isolats au genre *Bifidobacterium*.

La présence de ce genre bactérien est très abondante dans les selles de nourrissons allaité au sein dont les principales espèces trouvées ont été *B. longum*, *B. breve* et *B. bifidum* ; 4 souches, 3 souches et 2 souches respectivement.

L'objectif de notre étude a été d'élaborer des souches de bifidobactéries à caractères probiotiques, c'est la raison pour laquelle des tests *in vitro* ont été réalisés, parmi ces tests ; la résistance au pH acide de l'estomac et la tolérance aux sels biliaires dans l'intestin dont le résultat a dévoilé que toutes les souches testées avaient une résistance à ces deux facteurs hostiles et c'est plus particulièrement les souches appartenant à l'espèce *longum* qui ont montré un taux de viabilité très élevés.

Le 3^{ème} test a été la résistance aux antibiotiques, dont on n'a pas remarqué une différence importante entre nos souches envers les antibiotiques testés. Et concernant l'inhibition des germes pathogènes, aucune souche n'avait une activité inhibitrice envers *pseudomonas aerogenosa*, une inhibition limitée a été notée concernant l'inhibition des autres germes pathogènes *Escherichia coli* (ATCC23922, ATCC25922) et *staphylococcus aureus* (ATCC 25923, ATCC 43300).

Enfin, pour l'adhérence aux cellules épithéliales de l'iléon et du colon testés sur modèle animal, seulement deux souches appartenant à l'espèce *longum* ont montré une adhésion importante.

Le 2^{ème} objectif de notre étude été la fermentation du lait en culture mixte avec des bactéries lactiques, c'est plutôt l'association de nos souches avec la souche *Streptococcus thermophilus* qui a dévoilé une bonne croissance de ces derniers ainsi qu'une production d'un taux d'acidité élevée par rapport a celle produite avec *Lactobacillus dulbreiki ssp bulgaricus*.

Afin de pouvoir incorporés les souches qui ont montré des caractéristiques potentiellement probiotiques dans la production des yaourts probiotique quelques tests technologique ont été réalisé (l'influence des arômes, l'influence des additifs, et le stockage frigorifier), dont des taux de létalité très variables envers ces facteurs ont été notés.

A partir de cette étude, on a pu conclure que c'est les souches appartenant à l'espèce longum qui ont montré de très bonne caractéristique probiotique, ces derniers peuvent être incorporé dans les aliments fermenté et demeuré viable.

En perspectives, il serait intéressant de réaliser les points suivants :

- Identification génotypique des souches de bifidobactéries.
- Etude *in vivo* des propriétés probiotiques de ces souches.

IV. Référence :

- **Accolas J. P., Bloquel R., et Regnier J. (1977).** Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yaourt ; *Lait*. 67 : 1-23.
- **Adlerberth, I., E. Lindberg, N. Aberg, B. Hesselmar, R. Saalman, I. L. Strannegård & A. E. Wold (2006)** Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle? *Pediatr Res*, 59, 96-101.
- **Afssa. (2005).** Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte.
- **Ahmed T. and Kanawal R., 2004.** Biochimical characteristics of lactic acid bacteria producing bacteria and preparation of camel milk cheese by using starter culture. *Pakistan Vet. J.*, 24 (2), pp : 87-91.
- **Ahmed T. and Kanawal R., 2004.** Biochimical characteristics of lactic acid bacteria producing bacteria and preparation of camel milk cheese by using starter culture. *Pakistan Vet. J.*, 24 (2), pp : 87-91.
- **Ait Abdeslam Arezki, 2008.** Etude de croissance de *Bifidobacterium* sp. dans le de brebis. Mémoire de magister, Université d'Oran, Es-Sénia.
- **Ait Belgnaoui, A. 2006** Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress : rôle de la barrière épithéliale colique. Thèse de doctorat, l'institut national polytechnique de toulouse.
- **Ali Riazi , Hasnia Ziar, 2010.** Croissance et viabilité des Bifidobactéries dans le lait écrémé additionné de miel d'abeille. *Revue « Nature et Technologie »*. n° 02/Janvier 2010. Pages 17 à 24.

- **Al-Otaibi, M.M., 2009.** Evaluation of some probiotic fermented milk products from Al-Ahsa markets, Saudi Arabia, *American journal of food technology*, 4(1): 1557-4571.
- **Alvarez-Olmos MI, and Oberhelman RA. 2001.** Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clin Infect Dis.* 32: 1567-1576.
- **Ammor M.S. et Mayo B., 2007.** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat Science.* 76 : 138-146.
- **Amrouche, T. 2005,** contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries : analyse *in vitro* et étude *ex vivo* des mécanismes moléculaires impliqués. Thèse de doctorat en Sciences et Technologie des aliments, Université Laval Québec.
- **Andriantsoanirina Valérie, Solène Allano, Marie José Butel, Julio Aires, 2013.** Tolerance of Bifidobacterium human isolates to bile, acid and oxygen, *Anaerobe*, 21: 39-42.
- **Arboleya Silvia, Patricia Ruas-Madiedo, Abelardo Margolles, Gonzalo Solís, Seppo Salminen, Clara G. de los Reyes-Gavilán, Miguel Gueimonde, 2011.** Characterization and in vitro properties of potentially probiotic Bifidobacterium strains isolated from breast-milk, *International Journal of Food Microbiology*, 149: 28-36.
- **Bäckhed, F., H. Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. F. Semenkovich and J. I. Gordon (2004).** "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(44): 15718-15723.
- **Bahloul Halima Auras, Hadadji Miloud, Guessas bettache, Saidi Nouredine and Kihal mebrouk (2012).** Characterization and Technological Properties of *Bifidobacterium* Strains Isolated from

- Breast-fed Infants, *Journal of Food Science and Engineering* 2 (2012) 576-582.
- **Ballongue, J.2004.** Bifidobacteria and probiotic action. In Salminen, S., von Wright, A. and Ouwehand, A. Eds., *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and functional Aspects.* Marcel Dekker, New York, pp 67-123.
 - **Baratte-Euloge Pascale, 1992.** Action comparée sur la flore intestinale de trois laits fermentés au *Bifidobacterium*. Evaluation de propriétés probiotique et du comportement de la souche BB536 *Bifidobacterium longum* chez l'homme. Thèse de doctorat. Université de Nancy 1.
 - **Beerens H., Gavini F., Neut C. 2000,** Effect of exposure to air on 84 strains of Bifidobacteria. *Anaerobe*, **6**, 65- 67.
 - **Benkaddour Bachir, 2013.** Caractérisation des bifidobactéries isolées des selles des nourrissons et leur viabilité dans le lait de chamelle stérile. Thèse de magister, Université d'Oran, Es-Senia.
 - **Bensoltane, A., Yagoubi, A., Mahi, M and Cheriguene, A. (2004).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional Algerian butter. *Egypt Journal Applied Sciences; 19* : (11B), 604-614.
 - **Bergonzelli, G. E., Blum, S., Briissow, H., et Corthésy-Theulaz, I. (2005)** Probiotics as a treatment strategy for gastrointestinal diseases? *Digestion.* 72:57-68.
 - **Bezirtzoglou, E., A. Tsiotsias & G. W. Welling (2011)** Microbiota profile in feces of breastand formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe*, 17, 478-82.
 - **Biavati Bruno And Paola Mattarelli, 2006.** The Family Bifidobacteriaceae. CHAPTER 1.1.2, *Prokaryotes* (2006) 3:322–382.

- **Biavati, B., V. Scardovi, and W. E. C. Moore. 1982.** Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**:368-373.
- **Bonnemaison, E., P. Lanotte, S. Cantagrel, S. Thionois, R. Quentin, C. Chamboux & J. Laugier (2003)** Comparison of fecal flora following administration of two antibiotic protocols for suspected maternofetal infection. *Biol Neonate*, 84, 304-10.
- **Bottacini F., Ventura M., Van Sinderen D., Motherway M O. (2014).** Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. *Microbial Cell Factories*.13 (Suppl 1):S4
- **Boutron, M. C., J. Faivre, P. Marteau, C. Couillault, P. Senesse, and V. Quipourt. 1996.** Calcium, phosphorus, vitamin D, dairy products and colorectal carcinogenesis: A French case-control study. *British Journal of Cancer* 74:145-151.
- **Bruno E. (2012).** Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la survie et de la fonctionnalité d'une bactérie modèle, *Bifidobacterium bifidum*, par modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz. Thèse de doctorat. Ecole Doctorale Environnement – Santé. Université de Bourgogne – Agro Sup Dijon
- **Buchanan, R.E., Gibbons, N. E., 1974.** In « Bergey's Manual of Determinative Bacteriology », 8th ed., Williams et Wilkens CO., Baltimore, USA.
- **Caescu Iuliana Cristina, 2004.** Métabolisme saccharidique chez les bifidobactéries Approche biomoléculaire des enzymes de phosphorylation. Thèse de doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé, Université de lille.

- **Campeotto, F., A. J. Waligora-Dupriet, F. Doucet-Populaire, N. Kalach, C. Dupont & M. J. Butel (2007)** [Establishment of the intestinal microflora in neonates]. *Gastroenterol Clin Biol*, 31, 533-42.
- **Candela M, Seibold G, Vitali B, Lachenmaier S, Eikmanns BJ, Brigidi P. 2005.** Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to Caco-2 cells: Competition between bifidobacteria and enteropathogens. *Res Microbiol*. 156: 887-895.
- **Carolina Ana R. Florence, Ricardo P.S. Oliveira, Roberta C. Silva, Fabiana A.S.M. Soares, Luiz A. Gioielli, Maricê N. Oliveira, 2012.** Organic milk improves *Bifidobacterium lactis* counts and bioactive fatty acids contents in fermented milk. *LWT - Food Science and Technology* 49 (2012) 89-95.
- **Cheriguene, A., Chougrani, F and Bensoltane, A. (2006).** Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian goat's milk. *Pakistan journal of biological sciences* 9 : (7), 1242-1249.
- **Choukri T. 2007,** Antagonisme de quelques souches de bifidobactéries vis-à-vis de *staphylococcus aureus* et *bacillus cereus.*, université de Mostaganem.
- **Chung, H., S. J. Pamp, J. A. Hill, N. K. Surana, S. M. Edelman, E. B. Troy, N. C. Reading, E. J. Villablanca, S. Wang, J. R. Mora, Y. Umesaki, D. Mathis, C. Benoist, D. A. Relman & D. L. Kasper (2012)** Gut immune maturation depends on colonization with a hostspecific microbiota. *Cell*, 149, 1578-93.
- **Clark, P.A., J.H. Martin, 1994.** Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: III -Tolerance to bile concentrations of human small intestines. *Cult. Dairy Prod. J.*, 29: 18-21.

- **Colarelli, M. 2010** les probiotiques, du conseil officinal a la prise en charge micronutritionnelle. Thèse de doctorat en pharmacie, UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY.
- **Collado M.C., Hernandez M. & Sanz Y., (2005)**. Production of bacteriocine-like inhibitory compounds by human fecal *Bifidobacterium* strains. *Journal of Food Protection*, 68:1034-1040.
- **Comalada, M., E. Bailon, O. de Haro, F. Lara-Villoslada, J. Xaus, A. Zarzuelo and J. Galvez (2006)**. "The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype." *J Cancer Res Clin Oncol* 132(8): 487-97.
- **Coudeyras, S. & C. Forestier (2010)** [Microbiota and probiotics: effects on human health]. *Can J Microbiol*, 56, 611-50.
- **Crociani J, Grill JP, Huppert M, Ballongue J. 1995**. Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with *in vivo* study. *Lett Appl Microbiol*. 21: 146-148.
- **Del Chierico, F., P. Vernocchi, L. Bonizzi, R. Carsetti, A. M. Castellazzi, B. Dallapiccola, W. de Vos, M. E. Guerzoni, M. Manco, G. L. Marseglia, M. Muraca, P. Roncada, G. Salvatori, F. Signore, A. Urbani & L. Putignani (2012)**. Early-life gut microbiota under physiological and pathological conditions: The central role of combined meta-omicsbased approaches. *J Proteomics*.
- **Delcenserie V., China B., Gavini F., Beerens H., Daube G.2002**. Proposition pour un nouveau standard indicateur de la contamination d'origine fécale dans les aliments : le genre *Bifidobacterium*. *Ann. Méd. Vét*, 146: 279-293
- **Demers Mathieu Veronique, 2015**. Viabilité, propriétés technologiques et effets anti-inflammatoires et anti-obésité de nouvelles souches

probiotiques dans les produits laitiers. These de doctorat en microbiologie agro-alimentaire.

- **Desesso JM, Jacobson CF. 2001.** Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food and chemical toxicology*, 39, 209-228.
- **Devriese, L.A., Pot, B and Collins, M.D. (1993).** Phynotypic identification of the genus enterococcus and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Microbiology*. 75: 399-408.
- **Dinakar, P., & Mistry, V. V. (1994).** Growth of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 77, 2854–2864.
- **Dong X, Xin Y, Jian W, Liu X, Ling D. 2000.** *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *Int J Syst Evol Microbiol*. 50 Pt 1:119-25.
- **Dunne, C, O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C, Kiely, B., O'Sullivan, G. C, Shanahan, F., et Collins, J. K. (2001)** In vitro sélection criteria for probiotic bacteria of human origin: corrélation with in vivo findings. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73 Suppl.:S386-S392.
- **Dunne, C, O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C, Kiely, B., O'Sullivan, G. C, Shanahan, F., et Collins, J. K. (2001)** In vitro sélection criteria for probiotic bacteria of human origin: corrélation with in vivo findings. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73 Suppl.:S386-S392.
- **E. Vlkova, J. Nevoral, B. Jencikova, J. Kopecny, J. Godefrooij, I. Trojanova, V. Rada, 2005.** Detection of infant faecal bifidobacteria by

enzymatic methods. *Journal of Microbiological Methods* 60 (2005) 365–373.

- **Elghali Salma, Shuhaimi Mustafa, Mehrnoush Amid, Mohd Yaizd ABD Manap, Amin Ismail, Faridah Abas, 2012.** Bioconversion of daidzein to equol by *Bifidobacterium breve* 15700 and *Bifidobacterium longum* BB536, *journal of functional foods*, 4: 736-745.
- **El-Zahar Kahled, Jean-Marc Chobert', Michele Dalgalarondo, Mahmoud Sitohy~ And Thomas Haertle, 2003.** proteolysis of ewe's caseins and whey proteins during fermentation of yogurt and storage. effect of the starters used. *journal of food biochemistry* 28 (2004) 319-335.
- **EM Consult. (2007, avril).** Prébiotiques, Probiotiques et Symbiotiques : Définitions. (E. Masson, Éd.) *Cahiers de Nutrition et Diététique* , 42 (HS2), p. 7.
- **Embley, T. M. and E. Stackebrandt (1994).** "The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes." *Annual Review of Microbiology* 48(1): 257-289.
- **FAO/WHO, 2002.** Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.
- **Felis, G. E. and F. Dellaglio (2007).** "Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*." *Current Issues in Intestinal Microbiology* 8: 44-61.
- **Felis, G. E. and F. Dellaglio (2007).** "Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*." *Current Issues in Intestinal Microbiology* 8: 44-61.
- **Feng, J., S. J. Lee and S. Resta-Lenert (2005).** "Effect of probiotic and commensal bacteria on vitamin D-receptor and calcium transport protein expression in intestinal epithelial cells in vitro." *Gastroenterology* 128: A-47204.

- **Fleming, H.P., Herchells, J.L et Caslilow, E.N. (1975).** Microbiol inhibition on isolate *Pedicoccus* from cucumber bunc. *Applied Environmental Microbiology*. 30: 1040-1042.
- **Fontaine Isabelle, 1995.** Bifidobactéries et muqueuse intestinale :contribution à l'étude du mécanisme d'adhérence. Thèse de doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé. Université des Sciences et Technologies de Lille.
- **Fooks, L. J., et Gibson, G. R. (2002)** Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*. 88 suppl. 1:S39-S49.
- **Frank AMK., Kegma F, and Weerkamp HA. (1993).** Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Neth. Milk. Dairy.J.* 47: 151-164.
- **Fuller, R. (1989)** Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66:365-378.
- **Georgieva R., Danova S., Iliev I., Haertle T., Chobert J. M. and Ivanova S., 2009.** Technological properties of candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Int. Dairy J.*, 19. pp : 696–702.
- **Gill, H. S. 2003.** Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastro-intestinal tract. *Best.Pract.Res.Clin.Gstroenterol.* 17:755-773.*globosum*, subjective synonym of *Bifidobacterium pseudolongum*, and description of *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *pseudolongum* comb. nov and *Bifidobacterium pseudolongum* subs. *globosum* comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 15:380-385.
- **Gilliland, S. E., Reilly, S. S., Kim, G. B., & Kim, H. S. (2002).** Viability during storage of selected probiotic lactobacilli and bifidobacteria in a yogurt-like product. *Journal of Food Science*, 67, 3091– 3095.
- **Goktepe I., Juneja V. K. and Ahmedna M., 2006.** Probiotics in food safety and human health. Boca Raton, FL: *Taylor and Francis group*: 494.

- **Gomes, A. M. P. and F. X. Malcata (1999).** "Bifidobacterium spp. And *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics." Trends in Food Science & Technology **10**(4): 139-157.
- **Grimoud Julien, 2010.** Probiotiques, prébiotiques, synbiotiques et prévention des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : proposition d'un crible de sélection in vitro. Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse.
- **Grimoud, J. 2007,** Probiotiques, prébiotiques, synbiotiques et prévention des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : proposition d'un crible de sélection in vitro. Thèse de doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA Toulouse). **2010 sur paragraphe**
- **Gueimonde M, and Salminen S. 2006.** New methods for selecting and evaluating probiotics. Dig Liver Dis. 38: S242-S247.
- **Guerzoni Elisabetta Andrea Gianotti, Pamela Vernocchi, 2011.** Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention, Pages 375-384.
- **Guigoz, Y., J. Doré & E. J. Schiffrin (2008).** The inflammatory status of old age can be nurtured from the intestinal environment. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 11, 13-20.
- **H.-S. SHIN, J.-H. LEE, J.J. PESTKA, AND Z. USTUNOL, 2000.** Growth and Viability of Commercial *Bifidobacterium* spp in Skim Milk Containing Oligosaccharides and Inulin. JOURNAL OF FOOD SCIENCE—Vol. 65, No. 5, 2000.
- **Heddadji Miloud, 2007.** Caractérisation Microbiologique et Biochimique des Bifidobactéries isolées à partir des selles de nourrissons. Etude des

critères Technologiques et Thérapeutiques. Thèse de doctorat, Université d'Oran, Es-Senia.

- **Halpern, G. M., Vruwink, K. G., Van de Water, J., Keen, C. L., et Gershwin, M. E. (1991)** Influence of long-term yoghurt consumption in young adults. *International Journal of Immunotherapy*. 7:205-210.
- **Hao, W. L. and Y. K. Lee (2004).** "Microflora of the gastrointestinal tract: a review." *Methods Mol Biol* **268**: 491-502.
- **Heller K. J., 2001.** Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 pp: 374–379.
- **Heping Zhang • Yimin Cai, 2014.** Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice.
- **Hickson, M., A. L. D'Souza, N. Muthu, T. R. Rogers, S. Want, C. Rajkumar, and C. J. Bulpitt. 2007.** Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: Randomised double blind placebo controlled trial. *British Medical Journal* 335:80-83.
- **Hilde M. Østlie, Merete H. Helland, Judith A. Narvhus, 2003.** Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. *International Journal of Food Microbiology* 87 (2003) 17– 27.
- **Holzappel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. 2001.** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr*. 73: 365S-373S.
- **Huffnagle, G. B. (2010)** The microbiota and allergies/asthma. *PLoS Pathog*, 6, e1000549.
- **Huffnagle, G. B. (2010)** The microbiota and allergies/asthma. *PLoS Pathog*, 6, e1000549.

- **Ibrahim, S.A., Bezkorovainy, A., 1993.** Survival of bifidobacteria suggest that the screening procedure developed in in the presence of bile salt. *J. Sci. Food Agric.* 62, 351–354.
- **Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E. et Karam N.E., 2009.** Lactic acid bacteria from “Sheep’s Dhan”, a traditional butter from sheep’s milk: Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites.* 60(2) : 177-183.
- **Isolauri, E., S. Salminen, et al. (2004).** "Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18(2): 299-313.
- **Izquierdo Alegre, E. 2009,** les protéines bactériennes en tant que biomarqueur de l’activité probiotique. Thèse de doctorat en Chimie Analytique, Strasbourg.
- **Jonathan E. Teitelbaum, 2006.** Pediatric gastrointestinal and liver disease (third edition), 35-50.
- **Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virtanen, E., Laine, S., et Arvilommi, H. (1992).** Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by human *Lactobacillus* strain. *Pédiatrie Research.* 32:141-144.
- **Karimi Reza, Amir M. Mortazavian, Atefeh Amiri-Rigi, 2012.** Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese, *Food Microbiology*, 29: 1-9.
- **Kimura K., McCartney A. L., McConnell M. A., & Tannock G. W., 1998.** Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. *Applied and Environmental. Microbiology*, 63, 3394-3398.

- **Klaenhammer, T. R. (2000).** Probiotic Bacteria : Today and Tomorrow. *Journal of Nutrition*(130), pp. 415S-416S.
- **Klein, G Pack, A et Bonapart, G. (1998).** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol. 41: 103-125.*
- **Kouame - Sina Sylvie Mireille, 2013.** Contribution a la gestion des risques de contamination microbienne et diversité génotypique des espèces du genre *bifidobacterium* isolées de la chaîne de production du lait local a Abidjan. Thèse de doctorat, Université Nangui Abrogoua.
- **Lamoureux L., 2000.** Exploitation de l'activité β -galactosidase de cultures de bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto oligosaccharides. *National Library of Canada. 23-47.*
- **Lankaputhra W. E. V, 1997.** Viability and Therapeutic Properties of Probiotic Bacteria. A thesis of Doctor of Philosophy.
- **Lankaputhra W. E. V. 1997.** Viability and Therapeutic Properties of Probiotic Bacteria. thesis of Doctor of Philosophy. Centre for Bioprocessing and Food Technology Victoria University of Technology, Werribee Campus Victoria, AUSTRALIA.
- **Larrent J. P., et Larrent MG., (1990).** Memento technique de microbiologie . *Second Ed. Technique et Documentaire Lavoisier. 417 p.*
- **Le Huërou-Luron, I., S. Blat & G. Boudry (2010)** Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutr Res Rev, 23, 23-36.*
- **Leblond-Bourget N., Philippe, H., Mangin I., Decaris B. (1996).** 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribe spacer sequence analyses reveal inter- and intra-studies on synthesis of water soluble vitamins among specific *Bifidobacterium* phylogeny. *Int. J. Syst.*

- **Leclerc, M., C. Juste, H. Blottière & J. Doré (2007)** Microbiote intestinal: un univers méconnu. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42, 22-27.
- **Lee Y H., O'Sullivan DJ. (2006).** Sequence analysis of cryptic plasmids from *Bifidobacterium* DJO10A and construction of a shuttle cloning vector. *App. Environ. Microbiol.* 72 (1): 527-535.
- **Lee, J.-H. and D. J. O'Sullivan (2010).** "Genomic insights into *Bifidobacteria*." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(3): 378-416.
- **Lim KS, Huh CS, Baek YJ. 1993.** Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *J Dairy Sci.* 76(8):2168-74.
- **Liong, M. T. and N. P. Shah. 2005.** Bile salt deconjugation and BSH activity of five bifidobacterial strains and their cholesterol co-precipitating properties. *Food Research International* 38:135-142.
- **Li-Qun Wang • Xiang-Chen Meng Bai-Rong Zhang • Yan Wang • Yu-Lin Shang, 2010.** Influence of cell surface properties on adhesion ability of bifidobacteria. *World J Microbiol Biotechnol* (2010) 26:1999–2007.
- **Lorenz, M. (2001)** The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiol*, 3, 1-11.
- **Louis, P., K. P. Scott, S. H. Duncan and H. J. Flint (2007).** "Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine." *J Appl Microbiol* 102(5): 1197-208.
- **Macfarlane, G. T., J. H. Cummings and C. Allison (1986).** "Protein degradation by human intestinal bacteria." *J Gen Microbiol* 132(6): 1647-56.
- **Mahmoudi Fatima, Hadadji Miloud, Guessas Bettache and Kihal Mebrouk (2013).** Identification and Physiological Properties of

- Bifidobacterium* Strains Isolated from Different Origin. *Journal of Food Science and Engineering* 3 (2013) 196-206
- **Mahmoudi Fatima, Miloud Hadadji, Kheira Benlahcen (2015).** Safety and protective effect of bifidobacterium spp. used as probiotic agent in vivo against enteropathogenic escherichia coli, innovative romanian food biotechnology.
 - **Mailys Colarelli, 2010 ;** les probiotiques, du conseil officinal a la prise en charge micronutritionnelle, faculte de pharmacie, universite henri poincare - nancy 1.
 - **Mami Anas, 2013.** Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de doctorat, Université d'Oran, Es-Sénia.
 - **Mannu, L, Paba, A, Pes, M, Scintu, M.F. (2000).** Genotypic and phenotypic heterogeneity among lactococci isolated from traditional pecoroni sardo cheese. *J. Appl. Microbiol.* 84 : 191-197.
 - **Marchal N., Bourdon J. L., et Richard C.L., (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Ed. Doin. P. 65-149.*
 - **Marteau P. et Seksik P., 2005.** Probiotiques et alicaments in Bactéries lactiques et probiotiques. De Luquet F.M. et Corrieu G. *Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris : 256-260.*
 - **Marteau, P., B. Flourie, P. Pochart, C. Chastang, J. F. Desjeux, and J. C. Rambaud. 1990.** Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: An in vivo study in lactase-deficient humans. *British Journal of Nutrition* 64:71-79.

- **Marteau, P., Seksik, P., et Jian, R. (2002)** Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. *British Journal of Nutrition*. 88 Suppl. 1: S51-S57.
- **Masco L., Ventura M., Zink R., Huys G, and Swing J., (2004).** Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp *animalis* comb. Nov and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* comb. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*
- **Matilla-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R. and Saarela M., 2002.** Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12 pp: 173-182.
- **Matsumoto, M., Ohishi, H., & Benno, Y. (2004).** H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 109–113.
- **Mattarelli P. and Biavati B. (2014).** The genera *Bifidobacterium*, *Parascardovia* and *Scardovia*. *Lactic Acid Bacteria, biodiversity and taxonomy*. John Wiley & Sons, Ltd, The Atrium Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, UK: 510-541.
- **Matto, J., Alakomi, H.-L., Vaari, A., Virkajärvi, I., & Saarela, M. (2006).** Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp, *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *International Dairy Journal*, 16, 1029–1037.
- **McLoughlin, R. M. & K. H. Mills (2011).** Influence of gastrointestinal commensal bacteria on the immune responses that mediate allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 127,1097-107; quiz 1108-9.
- **Mitsuoka, T. and Kaneuchi, C. 1977.** Ecology of the bifidobacteria. *Am J Clin Nutr* **30**: 1799-1810.

- **Moreno de LeBlanc, A., C. Matar, and G. Perdigón. 2007.** The application of probiotics in cancer. *British Journal of Nutrition* 98.
- **Moroni, O. 2007** contribution a l'etude du role des probiotiques dans le contrôle et la prévention des infections enteriques à *listeria monocytogenes*: analyse *in vitro* et étude *in vivo* des mécanismes d'action antimicrobien. Thèse de doctorat en sciences et technologie des aliments, université laval Québec.
- **Nousiainen J., Javanainen P., Setala J. et Wright A.V., 2004.** Lactic acid bacteria as animal probiotics. *In* : Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). *3e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 547-560.
- **O'Hara, A. M. & F. Shanahan (2006)** The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*, 7, 688- 93.
- **Ong, L., A. Henrikssonb, N.P. Shah, 2006.** Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid, *International Dairy Journal*, 16: 446-456.
- **Ong, L., N.P. Shah, 2009.** Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening Temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles, *Food Science and Technology*, 42: 1260-1268.
- **Orla-Jensen, S. (1924).** "La classification des bactéries lactiques. ." *Lait* 4(468 474).
- **Osmanagaoglu Ozlem, Fadime Kiran, Haluk Ataoglu, 2010.** Evaluation of in vitro Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF Isolated from Human Breast Milk, *Probiotics & Antimicro. Prot*, 162-174.

- **Ouwehand AC, Salminen S, Tolkkio S, Roberts P, Ovaska J, Salminen E. 2003.** Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9: 184-186.
- **P.H.P. Prasanna a,b,□, A.S. Grandison a, D. Charalampopoulos, 2014.** Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. *Food Research International* 55 (2014) 247–262.
- **Palomares I.C., Pérez-Morales R. et Acedo-Félix E., 2007.** Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 49(3-4) : 46-54.
- **Perdigôn, G., de Macias, M. E., Alvarez, S., Oliver, G., et de Ruiz Holgado, A. P. (1998)** Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milk with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology.* 63:17-23.
- **Pereira, D. I. A. and G. R. Gibson. 2002.** Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 37:259-281.
- **Poroyko, V., M. Morowitz, T. Bell, A. Ulanov, M. Wang, S. Donovan, N. Bao, S. Gu, L. Hong, J. C. Alverdy, J. Bergelson & D. C. Liu (2011)** Diet creates metabolic niches in the "immature gut" that shape microbial communities. *Nutr Hosp,* 26, 1283-95.
- **Prakash, S., L. Rodes, M. Coussa-Charley & C. Tomaro-Duchesneau (2011)** Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics,* 5, 71-86.
- **Qian Qian Wu, Hyun Ju You, Hyung Jin Ahn, Bin Kwon, Geun Eog Ji, 2012.** Changes in growth and survival of Bifidobacterium by

- coculture with *Propionibacterium* in soy milk, cow's milk, and modified MRS medium, *International Journal of Food Microbiology*, 157: 65-72.
- **Raibaud, P. & R. Ducluzeau (1989)** Etude de la colonisation bactérienne du tractus-gastrointestinal à l'aide de modèle expérimentaux. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 8, 361-373.
 - **Reed K. K. and Wickam R. (2009)**. "Review of the gastrointestinal tract: from macro to micro." *Seminars in oncology nursing* 25(1): 3-14.
 - **Reid, G., J. A. Younes, H. C. Van der Mei, G. B. Gloor, R. Knight & H. J. Busscher (2011)** Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol*, 9, 27-38.
 - **Reyes-Gavilan C.G., Suarez A., Fernandez-Garcia M., Margolles A., Gueimonde M. et Ruas- Madiedo P., 2011**. Adhesion of bile-adapted *Bifidobacterium* strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. *Res. Microbiol.* 162 : 514-519.
 - **Riazi A. and Ziar H., 2008**. Growth and viability of yogurt starter organisms in honeysweetened skimmed milk. *Afr. J. Biotech.*, 7(12) pp: 2055-2063.
 - **Rodrigues Florence Ana Carolina, 2014**. Physiological responses of bifidobacteria subjected to acid, cold and gastro-intestinal stress in organic and conventional milks. thèse de doctorat en Génie Microbiologique. AgroParisTech/INRA.
 - **Roopashri Arekal N & Mandyam C. Varadaraj, 2009**. Molecular characterization of native isolates of lactic acid bacteria, bifidobacteria and yeasts for beneficial attributes. *Appl Microbiol Biotechnol* (2009) 83:1115–1126

- **Rosenthal, I., & Bernstein, S. (1998).** The survival of a commercial culture of bifidobacteria in milk products. *Milchwissenschaft*, 53, 441–443.
- **Roy D., 2011.** *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, Volume 4, 91-602.
- **Roy Denis, 2001.** Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products, *International Journal of Food Microbiology*, 69: 167-182.
- **ROY Denis, 2005.** Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Lait* 85 (2005) 39–56.
- **Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T. 2000.** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol.* 84: 197-215.
- **Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D E., Prevost H et kihel M 2002 .**caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvres des régions arides. *J. Alg. Reg. Arides.* 1: 1-1.
- **Salminen, S., Ouwehand, A. C, et Isolauri, E. (1998)** Clinical applications of probiotic bacteria. *International Dairy Journal.* 8:563-572.
- **Salminen. S, W. Kenifel, A.C. Ouwehand, 2011.** *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, 2011, Pages 412-419.
- **Samona, R. K. Robinson and S. Marakis, 1996.** Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. *Food Microbiology*, 1996, 13, 275–280
- **Scardovi V. Genus Bifidobacterium, In : Sneath P., Mair N., Sharpe M., Holt J 1986.** *Bergey's manuel of Systematic Bacteriology (volume 2)*, Williams and Wilkins : Baltimore, , 1418-1434.

- **Schell, M. A., M. Karmirantzou, B. Snel, D. Vilanova, B. Berger, G. Pessi, M.-C. Zwahlen, F. Desiere, P. Bork, M. Delley, R. D. Pridmore and F. Arigoni (2002).** "The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**(22): 14422- 14427.
- **Sepp, E., K. Julge, M. Vasar, P. Naaber, B. Björkstén & M. Mikelsaar (1997)** Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatr*, 86, 956-61.
- **Seppo Salminen, Atte Vonne Wright, Arthur Ouwehand, 2004.** Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects, *Third Edition, Revised and Expanded*.
- **Servin, A. L. and M. H. Coconnier (2003).** "Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **17**(5): 741-54.
- **Shah N. P. and Lankaputhra W. E. V. (2002).** *Bifidobacterium* spp. Morphology and Physiology. *Elsevier Sci. Ltd* , 141-146
- **Shah N.P. (1997).** Bifidobacteria : Characteristics and potential for application in fermented milk products. *Milchwissenschaft*, 52(1):16-21.
- **Shah, N.P., 2011.** *Encyclopedia of dairy science* (second edition), 381-387.
- **Shao-Chi Wu*, Fu-Jin Wang**, and Chorng-Liang Pan, 2007.** growth and survival of lactic acid bacteria during the fermentation and storage of seaweed oligosaccharides solution. *Journal of Marine Science and Technology*, Vol. 15, No. 2, pp. 104-114 (2007).
- **Shigeru Fujiwara, Honoo Hashiba, Tetsuji Hirota, Janet F. Forstner, 2001.** Inhibition of the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 to human intestinal epithelial cell line HCT-8 by an extracellular protein fraction containing BIF of *Bifidobacterium longum* SBT2928:

suggestive evidence of blocking of the binding receptor gangliotetraosylceramide on the cell surface. *International Journal of Food Microbiology* 67 Ž2001. 97–106.

- **Shin, H. S., Lee, J. H., Pestka, J. J., & Ustunol, Z. (2000).** Viability of bifidobacteria in commercial dairy products during refrigerated storage. *Journal of Food Protection*, 63, 327–331.
- **Simpson, P. J., C. Stanton, G. F. Fitzgerald and R. P. Ross (2005).** "Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage." *Journal of Applied Microbiology* 99(3): 493-501.
- Sonomoto kenji, Astushi yokota, 2011. Lactic acid bacteria and bifidobacteria, current progress in advanced research.
- **Srikanth, C. V. & B. A. McCormick (2008)** Interactions of the intestinal epithelium with the pathogen and the indigenous microbiota: a three-way crosstalk. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2008, 626827.
- **Stecher, B. and W. D. Hardt (2008).** "The role of microbiota in infectious disease." *Trends Microbiol* 16(3): 107-14.
- **Stewart, J. A., V. S. Chadwick & A. Murray (2005)** Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria in the faecal microflora of children. *J Med Microbiol*, 54, 1239-42.
- **Szymanski, H., J. Pejcz, M. Jawien, A. Chmielarczyk, M. Strus, and P. B. Heczko. 2006.** Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three *Lactobacillus rhamnosus* strains - A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 23:247-253.
- **Takumi Satoh, Toshitaka Odamaki , Mariko Namura, Takashi Shimizu, Keiji Iwatsuki, Mamoru Nishimoto, Motomitsu Kitaoka, Jin-zhong Xiao, 2013.** In vitro comparative evaluation of the impact of

lacto-N-biose I, a major building block of human milk oligosaccharides, on the fecal microbiota of infants. *Anaerobe* 19 (2013) 50-57

- **Talwalkar, A. and K. Kailasapathy (2003).** "Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen." *Journal of Dairy Science* **86**(8): 2537-2546.
- **Tamime A.Y., Marshall V.M.E. et Robinson R. K, (1995).** Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *J. Dairy. Res.* 62 : 151-187.
- **Tharmaraj. N and N. P. Shah, 2003.** Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria, *J. Dairy Sci.* 86:2288–2296.
- **Thirabunyanon M., Boonprasom P. and Niamsup P., 2009.** Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnol. Lett.*, 31 pp: 571–576.
- **Tissier, H. (1900).** Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (Etat normal et pathologique). Paris, Université de Paris: 253.
- **Topping, D. L. and P. M. Clifton (2001).** "Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides." *Physiol Rev* **81**(3): 1031- 64.
- **Tuomola E, Crittenden R, Playne M, Isolauri E, Salminen S. 2001.** Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr.* 73: 393S-398S.
- **Turroni, F., F. Bottacini, E. Foroni, I. Mulder, J.-H. Kim, A. Zomer, B. SÃ¡nchez, A. Bidossi, A. Ferrarini, V. Giubellini, M. Delledonne, B. Henrissat, P. Coutinho, M. Oggioni, G. F. Fitzgerald, D. Mills, A. Margolles, D. Kelly, D. van Sinderen and M. Ventura (2010).**

- "Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(45): 19514-19519.
- **Turroni, F., van Sinderen, D., Ventura, M., 2011.** Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. International Journal of Food Microbiology 149: 37-44
 - **Ustunol Z. and Gandhi H., 2001.** Growth and viability of commercial *Bifidobacterium spp* in honey-sweetened skim milk. *J. Food Protec.*, 64 (11) pp: 1775-1779.
 - **Vael, C. & K. Desager (2009)** The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr Opin Pediatr*, 21, 794-800.
 - **Ventura, M., D. van Sinderen, G. F. Fitzgerald and R. Zink (2004).** "Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria." *Antonie van Leeuwenhoek* **86**(3): 205-223.
 - **Vinderola C. G., Costa G. A. and Regenhardt S., 2002.** Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, 12 pp : 579–589.
 - **Wen-Hsin Lin, Bi Yu, Sheng-Hon Jang, Hau-Yang Tsen, 2007.** Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe* 13 (2007) 107–113.
 - **Wollowski, L, Rechkemmer, G., et Pool-Zobel, B. L. (2001)** Protective rôle of probiotics and prebiotics in colon cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73 Suppl.:451S-455S.
 - **Woodmansey, E. J. (2007) Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol*, 102, 1178-86. Guigoz, Y., J. Doré & E. J. Schiffrin (2008)** The inflammatory status of old age can be nurtured from the intestinal environment. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 11, 13-20.

- **Yaeshima, T., T. Fujisawa, and T. Mitsuoka. 1992.** *Bifidobacterium* *Zentralbl Bakteriol* [Orig A]. **228**(1):29-45.
- **Zhurina, D., A. Zomer, M. Gleinser, V. F. Brancaccio, M. Auchter, M. S. Waidmann, C. Westermann, D. van Sinderen and C. U. Riedel (2011).** "Complete genome sequence of *Bifidobacterium bifidum* S17." *Journal of Bacteriology* **1**.

Annexe 1 :**• Milieu MRS (De Man Rogosa et Sharpe, 1960)**

Extrait de levure 5 g

Extrait de viande 10 g

Peptone 10 g

Acétate de sodium 5 g

Citrate de sodium 2 g

Glucose 20 g

KH₂PO₄ 2 g

Mgso₄ 0,25 g

Mnso₄ 0,05 g

Agar-agar 15 g

Cystéine-HCL 0,5 g

Eau distillée 1000 ml

PH=6,8

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

• Milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)

Peptone de caséine 10 g

Peptone pepsique de viande 2,5 g

Peptone papaïne de soja 5 g

Extrait de levure 2,5 g

Extrait de viande 5 g

B-glycérophosphate 19 g

MgSO₄ 0,25 g

Lactose 5 g

Acide ascorbique 0,5 g

Agar-agar 20 g

Eau distillée 1000 ml

pH=7,2

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

• Eau physiologique

Chlorure de sodium 8,5 g

Peptone 0,5 g

Eau distillée 1000 ml

pH=7

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

- **Lait écrémé**

Lait écrémé 10 g

Extrait de levure 0,5 g

Eau distillée 100 ml

pH=7

Autoclavage : 110 °C pendant 10 mn.

- **Eau peptonée**

Peptone 10 g

NaCl 5 g

Eau distillée 1000 ml

pH 7,2

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

- **Reactifs de kovacs**

Diméthyl-amino-4 benzaldéhyde 50 g

Acide chlorhydrique pur 250 ml

Pentanol 1 750 ml

- **Les reactifs de Griess**

Nit1

Acide Sulfanilique 8 g

Eau distillée 750 ml

Nit2

Alpha-naphtyl-amine 5 g

Acide éthanoïque à 1 mol.dm³ 1 dm³

- **Milieu KMK (Kempler et Mc Kay, 1980)**

Extrait de levure 3g

Biopolytone 2,5g

Glucose 5g

Agar 15g

Eau distillée 1000ml

pH=6,8

Le milieu est réparti à raison de 100 ml par flacon, puis autoclavé 15mn à 121°C

Au moment de l'emploi on ajoute :

1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium 10 % (P/V)

1 ml d'une solution aqueuse à 2.5 % (P/V) de citrate ferrique et citrate de sodium (P/P)

Ces solutions stérilisation par filtration (millipores 0.22 µm) sont conservées à l'obscurité à 4°C.

- **Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)**

Infusion de viande de boeuf 3000 cm³

Peptone de caséine 17,5 g

Amidon de maïs 1,5 g

Agar-agar 17 g

pH=7.4

Autoclavage 120°C, 20 min

- **Bouillon nutritif**

extrait de viande 1 g

extrait de levure 2 g

peptone 5 g

chlorure de sodium 5 g

pH =7.4

Autoclavage 120°C, 20 min

- **Gélose nutritive**

extrait de viande 1 g

extrait de levure 2 g

peptone 5 g

chlorure de sodium 5 g

agar 15 g

pH =7.4

Autoclavage 120°C, 20 min

- **Eau physiologique**

Chlorure de sodium 8,5 g

peptone 0,5 g

eau distillée 1000 ml

ph =7

autoclavage : 120° c pendant 20 minute

- **Lait écrémé**

lait ecreme 10 g

extrait de levure 0.5 g

eau distillée 100 ml

ph =7

autoclavage 120°C, 20 min

- **Eau peptonée**

peptone exemple d'indole 10 g

chlorure de sodium 5 g

ph=7.2

Autoclavage 120°C, 20 min

- **Tampon phosphate de sodium**

Solution (a): 27,8 g NaH_2PO_4 dans 100ml d'eau distillée

Solution (b): 53,65g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ dans 100ml d'eau distillée

Tampon 0,1 M: 39ml (a) + 61 ml (b) + eau distillée

Stérilisation à 110° pendant 20mn

Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20mn sauf ceux contenant le lait (110° C pendant 10 min).

Annexe 2

❖ Coloration de Gram :

- ✓ Préparer un frottis d'une culture bactérienne pure ;
- ✓ Recouvrir le frottis avec de cristal violet ; laisser agir une minute ; rincer à l'eau distillée ;
- ✓ Verser du Lugol et le laisser agir pendant une minute ; rincer à l'eau distillée ;
- ✓ Décolorer à l'alcool à 95° entre 15 et 30 secondes ; rincer à l'eau distillée ;
- ✓ Recolorer avec de la fuchsine phénique ; pendant 10 seconde si elle est concentrée ou 1 minute si elle est diluée. Rincer à l'eau distillée ;
- ✓ Sécher au dessus de la flamme d'un bec Bunsen ;
- ✓ Observer à l'objectif à immersion (objectif x 100) et à pleine lumière.

Les bactéries « Gram-positif » apparaissent en violet foncé, les bactéries « Gram négatif » en rose ou rouge.

❖ Conservation des souches :

A partir de la culture jeune (18h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 r/min pendant 10 min dans des epeindorfs stériles. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute le milieu de conservation sur le culot, puis on mélange et on conserve les epeindorfs à -20°C.

➤ Composition du milieu de conservation :

Ce milieu contient 70% d'une solution de lait écrémé et 30% de glycérole (stérilisé au bain marie à 100°C pendant 10mn). Ces derniers sont mis dans un tube, bien mélangé et réparti dans les epeindorfs précédant.

La solution du lait écrémé contient :

Lait écrémé	100g
Extrait de levure	0,5g
Cystéine chlorydroique	0,5g



Eau distillée 1L
 Ph= 6,8 , autoclaver à 110C° pendant 10 mn.

❖ **La densité optique et le Mcfarland :**

Mcfarland standard No	0,5	1	2	3	4
1.0% Barium chloride (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
1.0% sulfuric acid (ml)	9,95	9,9	9,8	9,7	9,6
Approx. Celle density 1×10^8 ufc/ml	1,5	3	6	9	12
% transmittance *	74,3	55,6	35,6	26,4	21,5
Absorbance *	0,132	0,257	0,451	0,582	0,669

*at wavelength of 600nm

Référence : <http://scholar.google.com.secure.sci-hub.cc/scholar?q=the+nephelometer%3A+an+instrument+for+estimating+the+number+of+bacteria+in+suspensions+used+for+calculating+the+opsonic+index+and+for+vaccines+>

Publication et communications

1/ Publication :

Kheira Mehdi, Miloud Hadadji, Bachir Benkaddour, Betache Guessas and Mebrouk Kihal (2015). Resistance at Low Ph Values and Bile Tolerance for Selection of Bifidobacterium Strains Isolated from New Born Feces as Potential Probiotic. *Advances in Environmental Biology*, 9(14) July 2015, Pages: 122-128.

2/ communication national:

- Selection of potentially probiotic Bifidobacterium strains based on their acid-adaptation ability. **21ème journées nationale de microbiologie. Béchar le 08 et 09 novembre 2015.**

3/ communications internationals:

- Fermentation of milk by probiotic Bifidobacterium strains isolated from new born baby feces. **2 ème congrès internationaux CI-SAN 2015. Alager, 13-15 octobre 2015.**
- Resistance at Low Ph Values and Bile Tolerance for Selection of Bifidobacterium Strains Isolated from New Born Feces as Potential Probiotic. **The first international congress of Nutrition and Food science “from bench to bedside”. Tlemcen 20-22 novembre 2015.**
- Fermentation of milk by probiotic Bifidobacterium strains in pure culture and in mixed culture. **Séminaire Internationale des Biotechnologies (SIBC). Constantine 19, 20 et 21 octobre 2015.**

