



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département :** Microbiologie

**قسم :** ميكروبيولوجيا

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** Ecologie Microbienne

## **Intitulé:**

---

**Etude *in vitro* de quelques propriétés probiotiques de souches de bifidobactéries  
utilisées dans la fabrication d'un yaourt commercialisé en Algérie.**

---

**Présenté et soutenu par :** Deneche Rayane Nour Elhouda  
Merniz Ahlem.

**Le 24/06/2018**

**Jury d'évaluation :**

**Présidente du jury :** MERGOUD L. (M.A.A Université des frères Mentouri Constantine)

**Rapporteur :** BOULTIFAT L. (M.A.A Université des frères Mentouri Constantine)

**Examinatrice :** MEZIANI M. (M.A.A Université des frères Mentouri Constantine)

**Année universitaire  
2017 - 2018**

## *Remerciements*

*Tout d'abord, nous remercions Dieu Tout-Puissant de nous avoir aidées à compléter notre mémoire.*

*Ce travail a été réalisé sous la supervision de Mme Boultifat .L, maître assistante à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université des Frères Mentouri Constantine 1, nous lui exprimons tous nos remerciements et nos gratitude pour son soutien, ses conseils, ses encouragements, sa disponibilité et surtout pour sa patience durant la correction de ce mémoire.*

*Nous tenons à remercier Mme Mergoud.L maître assistance à l'université des Frères Mentouri Constantine 1, d'avoir accepté de présider notre jury.*

*Et on remercie également Mlle Meziani.M maître assistance à l'université des Frères Mentouri Constantine 1, d'avoir examiné ce travail.*

*Dédicace*

*Je remercie d'abord Dieu qui m'a aidé à atteindre ce niveau de science et m'a aidé à compléter ce mémoire. Dieu merci toujours*

*Pour mon ange dans la vie, à la signification de l'amour, à celui qui était le secret de mon succès, à la plus précieuse Mama.*

*Et aussi mon papa*

*Je vous aime beaucoup*

*A ma moitié INES ma petite sœur AllAh yarhamha*

*Ma sœur Lina et mon petit frère Mehdi*

*A tous ceux qui m'ont appelé pour le succès*

*Et pour tous ceux qui m'aiment.*

*Rayane Nour Elhouda*

## *Dédicace*

*Je dédié ce modeste travail à :*

*Mes très chers parents, pour leurs soutien, leurs encouragements, leurs sacrifices. Eux qui m'ont guidé durant toutes mes années d'étude vers chemin de la Réussite*

*« Papa, Maman merci pour tout ».*

*Mes adorables sœurs :*

*« Rania » ; « malak » ; « lamis » ; « manel ».*

*Mon frère : « Anouar ».*

*Mon fiancé « Anouar » qui m'a donnée l'aide et m'a Encouragée.*

*Ma future famille*

*Ma sœur et collaboratrice « Rayen » et a toute sa famille.*

*Toute ma famille, et mes amis : Oumaima, Ahlem , Maroua , Abir , fatima*

*A tous ceux qui ont contribués de près ou de loin pour la réalisation de ce Mémoire, je vous dis Merci.*

***Ahlem***

## Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Résumés	
Introduction.....	1

### I. Synthèse bibliographique

Chapitre1 : Le yaourt.	
1. Historique.....	2
2. Définition.....	2
3. Matière première et ingrédients.....	2
4. Les ferments lactiques spécifiques du yaourt.....	3
4.1. <i>Lactobacillus bulgaricus</i> .....	3
4.2. <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	4
5. Intérêt et fonctions des ferments lactiques du yaourt.....	5
5.1. Production d'acide lactique.....	5
5.2. Activité protéolytique.....	5
5.3. Activité aromatique.....	5
5.4. Activité texturante.....	5
6. Principaux facteurs influençant le métabolisme des ferments.....	6
6.1. Facteurs Physiques.....	6
6.1.1. La température.....	6
6.1.2. L'activité de l'eau.....	6
6.2 Facteurs chimiques.....	6

6.2.1. La qualité du lait.....	6
6.2.2. Le traitement thermique.....	6
6.2.3. Le PH.....	7
6.3. Facteur microbiologiques.....	7
7. La composition chimique du yaourt .....	7
7.1. Les Glucides.....	7
7.2. Les protéines.....	7
7.3. Les lipides.....	8
7.4. Les minéraux.....	8
7.5. Les vitamines.....	8
8. Apport nutritionnels du yaourt.....	8
9. Les effets bénéfiques du yaourt.....	9

## Chapitre2: Les probiotiques

1. Définition. ....	10
2. Découverte et historiques du développement des probiotiques.....	10
3. Propriétés et Critères de sélection des souches probiotiques.....	11
3.1. Critère de sécurité.....	12
3.2. Propriétés fonctionnelles.....	13
3.2.1. Résistance aux conditions gastriques.....	13
3.2.2. Résistance aux sels biliaires.....	13
3.2.3. Adhésion aux cellules épithéliales.....	14
3.2.4. Activité antimicrobienne.....	14
3.3. Critères technologiques.....	15
4. Les différentes souches probiotiques utilisées dans l'industrie alimentaire.....	16
5. Mécanisme d'action des probiotiques .....	17
6. Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine.....	17

6.1. Soulagement de la constipation .....	18
6.2. Amélioration de la digestion du lactose.....	18
6.3. Réduction du risque de diarrhée.....	19
6.4. Contrôle des infections intestinales par <i>Helicobacter pylori</i> .....	19
6.5. Protection contre les pathologies intestinales.....	19
6.6. Diminution des allergies alimentaires.....	20
6.7. Réduction du taux de cholestérol sanguin.....	20

### Chapitre 3 : Les bifidobateries

1. Taxonomie des bifidobactéries.....	21
2. Ecologie des bifidobactéries.....	23
3. Propriétés phénotypiques.....	24
3.1. Morphologie.....	24
3.2. Structure et composition de la paroi cellulaire.....	24
4. Propriétés physiologiques.....	26
4.1. La température .....	26
4.2. La sensibilité au pH.....	26
4.3. L'anaérobiose.....	26
4.4. Sensibilité aux antibiotiques.....	27
5. Besoins nutritionnels des bifidobactéries.....	27
5.1. Besoins en composés azotés et source de carbone.....	27
5.2. Besoins en sels minéraux et vitamines.....	28
6. Les facteurs bifidogènes.....	28
7. Biochimie des Bifidobactéries.....	29
7.1. Métabolisme des glucides.....	29
7.2. Métabolisme des vitamines.....	31

7.3. Production des substances antimicrobiennes .....	31
8. Génétique des Bifidobactéries.....	31
8.1. La composition en bases cytosine-guanine de l'ADN.....	31
8.2. Les plasmides.....	32
8.3. Les séquences d'ADN étudiées.....	32
8.3.1. Le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S.....	32
8.3.2. Le gène codant pour la protéine Hsp60.....	32

## **II. Matériel et Méthode**

1. Présentation du lieu de travail.....	33
2. Matériel.....	33
2.1. Matériel biologique.....	33
2.1.1. Le yaourt.....	33
2.1.2. Souches pathogènes cibles.....	33
2.2. Milieux de cultures.....	34
3. Méthodes.....	34
3.1. Traitement des échantillons.....	34
3.1.1. Préparation de la solution mère.....	34
3.1.2. Préparation des dilutions décimales.....	34
3.2. Isolement des bifidobactéries.....	34
3.3. Purification.....	36
3.4. Identification.....	36
3.4.1. Caractérisation morphologique.....	36
3.4.2. Caractérisation biochimique.....	36
3.5. Mise en évidence de quelques propriétés probiotiques.....	38
3.5.1. Résistance aux conditions gastriques de l'estomac.....	38
3.5.2. Etude de l'activité antibactérienne.....	40

### **III. Résultat et discussion**

1. Résultats.....	41
1.1. Isolement.....	41
1.2. Identification.....	41
1.2.1. Caractérisation morphologiques.....	41
1.2.2. Caractérisation biochimique.....	43
1.3. Mise en évidence de quelques propriétés probiotiques.....	47
1.3.1. Résistance aux conditions gastriques de l'estomac.....	47
1.3.2. L'activité antibactérienne.....	48
2. Discussion.....	50
VI. Conclusion .....	53

Références bibliographiques

Annexes

## Liste des abréviations

**FAO/OMS** : Food and Agriculture Organization / Organisation Mondiale de la Santé

**g** : gramme

**GRAS** : Generally Recognized As Safe

**h** : heure

**min** : minute

**ml** : millilitre

**m** : mètre

**kg** : kilo gramme

**C°** : Degré Celsius

**KDa** : Kilo Daltons

**MRS** : Milieu de Man Rogosa Sharpe

**UFC/ml** : Unité Formant Colonie par millilitre

**pH** : Le potentiel hydrogène

**TGI** : Tractus Gastro-Intestinal

**Pb** : Paire de base

**G+C** : Guanine+ Cytosine

**A+T** : Adénine + Thymine

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**ARN** : Acide Ribonucléique

**BB 12** : *Bifidobacterium lactis*

**Hsp60** : Heat shock proteins 60

**BAL**: Bacteria Acid Lactic

**Cys** : Cystéine

**µg** : Microgramme

**D°** : Degré dornic

**EPS** : Exo-Poly-Saccharide

**aw** : L'activité de l'eau

**UHT** : Ultra Haute Température.

**µm** : Micromètre

**M** : Mole

**PDA** : NN-diméthyl-paraphénylène diamine

## Listes des figures

<b>Figure 1.</b> Composition globale du lait de vache avec le détail de sa composition minérale....	<b>3</b>
<b>Figure 2.</b> Présentation des effets bénéfiques de la consommation des probiotiques sur la santé humaine .....	<b>18</b>
<b>Figure 3.</b> Observation microscopique des cellules de <i>Bifidobacterium</i> sp.....	<b>25</b>
<b>Figure 4.</b> Représentation schématique de principales étapes de la voie fermentative du glucose chez les <i>Bifidobacterium</i> .....	<b>30</b>
<b>Figure 5.</b> Schémas illustrant des étapes d'isolement des bifidobactéries.....	<b>35</b>
<b>Figure 6.</b> Schémas illustrant la méthode de détermination de l'effet du pH gastrique.....	<b>39</b>
<b>Figure 7.</b> Aspect microscopique de la souche de bifidobactéries isolée.....	<b>41</b>
<b>Figure 8.</b> Observation microscopique (X100) après coloration de Gram des différentes formes cellulaires de la souche de bifidobactéries isolée.....	<b>42</b>
<b>Figure 9.</b> Résultat du test de la recherche de catalase pour la souche de bifidobactérie isolée.....	<b>44</b>
<b>Figure 10.</b> Résultat du test de la recherche d'oxydase pour la souche de bifidobactérie isolée.....	<b>44</b>
<b>Figure 11.</b> Résultat du test de l'utilisation des sucres glucose, galactose, saccharose sur milieu TSI .....	<b>45</b>
<b>Figure 12.</b> Résultat de l'antibiogramme de la souche de bifidobactéries isolée .....	<b>46</b>
<b>Figure 13.</b> Résultat de la résistance aux pH acides (2 et 3) de la souche des bifidobactéries isolée comparés à un contrôle à pH 6,8.....	<b>47</b>
<b>Figure 14.</b> Résultat de l'activité antibactérienne de la souche isolée contre trois espèces pathogènes.....	<b>49</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Classification de <i>Lactobacillus delbruckii subsp bulgaricus</i> .....	<b>4</b>
<b>Tableau 2.</b> Classification de <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	<b>4</b>
<b>Tableau 3.</b> Apports nutritionnels de différents yaourts pour un pot de 125g.....	<b>8</b>
<b>Tableau 4.</b> Critères de sélection utilisés pour le screening des probiotiques.....	<b>12</b>
<b>Tableau 5.</b> Classification des bactéries lactiques considérées comme probiotiques.....	<b>16</b>
<b>Tableau 6.</b> Résultat de la caractérisation biochimique de la souche de bifidobactéries isolée.....	<b>43</b>
<b>Tableau 7.</b> Résultat de la sensibilité de la souche isolée vis-à-vis certains antibiotiques...	<b>45</b>
<b>Tableau 8.</b> Résultat du pouvoir antagoniste de la souche isolée contre des souches pathogènes cibles.....	<b>48</b>

**Titre:** Etude *in vitro* de quelques propriétés probiotiques de souches de bifidobactéries utilisées dans la fabrication d'un yaourt commercialisé en Algérie

## Résumé

Depuis quelques années, les produits laitiers contenant des bactéries probiotiques ont connu un gain de popularité auprès des consommateurs. Ces produits probiotiques contiennent des souches spécifiques de bactéries vivantes telles que les bifidobactéries possédant des effets potentiellement favorables sur la santé.

Dans cette optique, notre étude a pour but d'évaluer quelques activités probiotiques *in vitro* de souches de bifidobactéries isolées à partir d'un yaourt commercialisé en Algérie.

Une seule souche de bifidobactérie a été isolée du yaourt probiotique « Activia actiregularis » (aromatisé) sur milieu sélectif le MRS cystéine gélosé.

L'identification basée sur l'étude des caractères morphologiques et biochimiques a permis de rattacher la souche isolée au genre *Bifidobacterium*.

Le résultat du test de la sensibilité de la souche isolée aux antibiotiques a montré une résistance à l'Acide Nalidixique et une sensibilité à quelques antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines : la Vancomycine, la Pénicilline et la Gentamicine. Ce résultat est probablement une caractéristique de l'espèce *Bifidobacterium lactis* utilisée dans la fabrication du yaourt retenu pour cette étude (mentionnée sur l'étiquetage du pot de yaourt).

L'étude *in vitro* de certaines propriétés probiotiques de l'espèce *Bifidobacterium lactis* (BB12) isolée, nous a permis de constater que cette dernière est dotée de propriétés probiotiques souhaitables en termes de résistance à l'acidité et la présence d'activité antimicrobienne.

**Mots clés :** Yaourt probiotique, bifidobactéries, activité antibactérienne, tolérance aux conditions acides de l'estomac.

**Title:** In vitro study of some probiotic properties of strains of bifidobacteria used in the manufacture of a yogurt marketed in Algeria

## **Summary**

In recent years, dairy products containing probiotic bacteria have been gaining popularity among consumers. These probiotic products contain specific strains of living bacteria such as bifidobacteria with potentially beneficial health effects.

In this context, our study aims to evaluate some in vitro probiotic activities of strains of bifidobacteria isolated from a yogurt marketed in Algeria.

Only one strain of bifidobacterium was isolated from the probiotic yogurt "Activia actiregularis" (flavored) on selective medium MRS cysteine agar.

The identification based on the study of morphological and biochemical characters allowed to link the isolated strain to the genus Bifidobacterium.

The result of the susceptibility testing of the isolated antibiotic strain showed resistance to Nalidixic Acid and sensitivity to some antibiotics of the  $\beta$ -lactam family: Vancomycin, Penicillin and Gentamicin. This result is probably a characteristic of the Bifidobacterium lactis species used in the yoghurt production used for this study (mentioned on the labeling of the yoghurt pot).

The in vitro study of certain probiotic properties of the isolated Bifidobacterium lactis (BB12) species, has allowed us to observe that the latter has desirable probiotic properties in terms of resistance to acidity and the presence of antimicrobial activity.

**Key words:** Probiotic yoghurt, bifidobacteria, , antibacterial activity, tolerance to acidic conditions of the stomach.

**العنوان:** دراسة في المختبر لبعض الخواص البروبيوتينية للبيفيدوباكتيريا (*bifidobactérie*) المستخدمة في تصنيع الياغورت المسوق في الجزائر .

## ملخص

في السنوات الاخيرة اكتسبت منتجات الالبان التي تحتوي على بكتيريا بروبيوتيك شعبية بين المستهلكين . تحتوي هذه المنتجات الحيوية على سلالات معينة من البكتيريا الحية مثل *les bifidobactéries* مع تاثيرات صحية محتملة مفيدة . في هذا السياق , تهدف دراستنا الى تقييم بعض الانشطة الحيوية في الختبر من سلالات *bifidobactérie* المعزولة من ياغورت تم تسويقه في الجزائر .

تم عزل سلالة واحدة فقط من *Bifidobacterium* من ياغورت بروبيوتيك *Activia Actiregularis* (منكه) على اجار انتقائية *MRS cyctéine* .

يتم التعرف على السلالة المعزولة عن طريق دراسة الخصائص المرفولوجية و الكميائية التي سمحت بنسب هذه السلالة الى جنس *Bifidobacterium* .

اظهرت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية للسلالة المعزولة مقاومة هذه الاخيرة لحمض *Nalixidique* و حساسيتها للمضادات الحيوية لعائلة *Vancomycine* :  $\beta$ -lactamines و *Penicilline* و *Gentamicine* . هذه النتيجة هي على الارجح من خصائص انواع البكتيريا (*Bifidobacteriumlactis* المدونة على ملصق وعاء الياغورت ) المستخدمة في انتاج الياغورت المستعمل في هذه الدراسة .

و قد سمحت لنا الدراسة المخبرية لبعض خواص الكائنات الحية المعزولة لانواع (*Bifidobacteriumlactis*(*BB12*) ان هذا الاخير له خصائص بروبيوتينية واعدة من حيث مقاومة الحموضة ووجود نشاط مضاد للميكروبات .

**الكلمات المفتاحية:** ياغورت بروبيوتيك *bifidobactéries* , النشاط المضاد للبكتيريا , مقاومة حموضة المعدة .

# Introduction

D'après la FAO et l'OMS les probiotiques sont des microorganismes vivants (bactéries ou levures) qui, lorsqu'ils sont consommés en quantité adéquate, produisent un effet bénéfique pour la santé de l'hôte. Ils peuvent être présents ou introduits dans certains aliments (compléments alimentaires) ou encore dans certains médicaments. Les probiotiques les plus connus sont les bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Lactococcus*) et les bifidobactéries, largement utilisés dans les yaourts et autres produits laitiers fermentés (Guidelines P, 2008).

Les bifidobactéries sont des habitants naturels de la flore intestinale humaine (Rasic et Kurmann, 1983). Ces microorganismes sont des bactéries probiotiques, exerçant différents effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. En effet, parmi ces effets, on note le contrôle de la flore intestinale et l'inhibition de la croissance de nombreux pathogènes et bactéries purifiantes (Shah, 1999; Gopal et al., 2001), la régulation du transit intestinal, l'amélioration de l'intolérance au lactose (DeVrese et al., 2001) et des allergies alimentaires (Isolauri et al., 2000), certaines propriétés anti-cancérogènes (Yoon et al., 2000) et anti-diarrhéiques (Shah, 2006), ainsi qu'une stimulation du système immunitaire (Heyman et Heuvelin, 2006).

Les produits laitiers fermentés sont connus pour être de bons vecteurs de probiotiques notamment en raison de leur large consommation. Il a ainsi été suggéré que la prise quotidienne de probiotiques doit être comprise entre  $10^8$  et  $10^9$  unités formant colonie (UFC) pour avoir des effets démontrés chez l'homme, garantissant aux consommateurs une satisfaction totale en termes de bénéfices santé (Ebel, 2012).

D'un point de vue technologique et afin d'être considérées comme de potentiels probiotiques, 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 (Ebel, 2012).

Dans ce contexte, l'objectif principal assigné à cette étude est d'évaluer quelques activités probiotiques *in vitro* de souches de bifidobactéries isolées à partir d'un yaourt commercialisé en Algérie.

# Synthèse bibliographique

# **Chapitre I :**

## Le yaourt

## 1. Historique

Originaire d'Asie, le mot yaourt (yoghourt ou yogurt) vient de « yoghurmark », mot turc signifiant « épaissir » (Tamime et Deeth, 1980). Dans le sillage des découvertes de Louis Pasteur sur la fermentation lactique, de nombreux chercheurs s'intéressent aux micro-organismes présents dans le lait. En 1902, Ris et Khoury, deux médecins français, isolent les bactéries présentes dans un lait fermenté égyptien, Elie Metchnikoff bactériologiste russe en France. Isole ensuite la bactérie spécifique du yaourt « le bacille bulgare » et analyse l'action acidifiante du lait caillé (Rousseau, 2005). De nombreux autres produits sont arrivés par la suite sur le marché : laits fermentés probiotiques, laits fermentés de longue conservation (pasteurisés, UHT, lyophilisés ou séchés), traditionnellement, c'est le yaourt dit « nature » et ferme qui constituait l'essentiel des productions de laits fermentés. Dans les années 1960-1970, sont apparus les produits sucrés puis aromatisés et aux fruits qui sont actuellement majoritaires sur le marché (Tamime et Deeth, 1980).

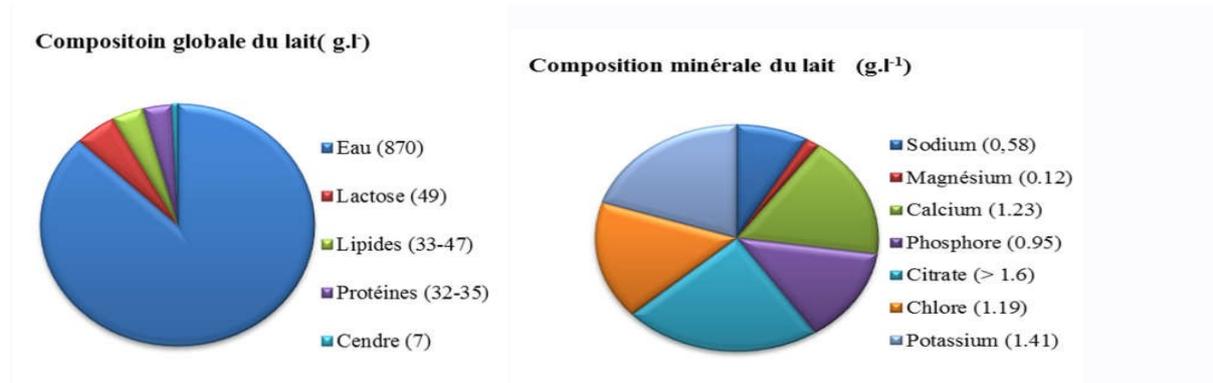
## 2. Définition

D'après le Codex Alimentarius et la FAO (Food and Agriculture Organization, 1975), le yaourt est un produit laitier coagulé obtenu par fermentation lactique grâce à l'action de *Lactobacillus delbrueckii* sous-espèce *bulgaricus* (*Lb. Bulgaricus*) et de *Streptococcus thermophilus* à partir du lait frais ainsi que du lait pasteurisé (ou concentré, partiellement écrémé, enrichi en extrait sec) avec ou sans addition de substances (lait en poudre, poudre de lait écrémé, les protéines lactosériques concentrées ou non, la caséine alimentaire ...etc). Les microorganismes du produit final doivent être viables et abondants.

## 3. Matière première et ingrédients

La principale matière première pour la fabrication des yaourts est le lait, essentiellement le lait de vache. Il est constitué d'environ 88% d'eau et 12% de matière sèche contenant des glucides, des protéines, des lipides et des minéraux (Tamime et Robinson, 1999). Figure 1 montre la composition globale du lait de vache avec le détail de sa composition minérale.

Les additifs les plus fréquemment utilisés sont : la gélatine, les alginates, la cellulose, les amidons, et les pectines. Les fruits dans les yaourts sont apportés sous forme de préparations de fruits avec ou sans sucres ajoutés. Les agents de texture, incorporés dans cette préparation, participent également à l'amélioration de la texture des yaourts (Vignola, 2002).



**Figure 1:** Composition globale du lait de vache avec le détail de sa composition minérale.

(Romain *et al.*, 2008).

#### 4. Les ferments lactiques spécifiques du yaourt

##### 4.1. *Lactobacillus bulgaricus*

Les espèces *Lactobacillus delbruckii sub sp. bulgaricus* sont des micro-organismes appartenant à la famille des Lactobacillaceae au genre *Lactobacillus* (Guiraud, 2003) (Tableau 1). Ces Micro-organismes thermophiles forment des colonies lenticulaires, de 1 à 3 mm de diamètre, sur milieu gélose de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) acidifié. Ils apparaissent sous microscopique en forme de bâtonnets généralement courts, mais quelquefois de forme allongée, ils sont non sporulés, Gram positifs, non mobiles, catalase négative (Journal officiel de la république algérienne, 2004). Leur milieu de culture et d'isolement de base le plus connu est le milieu MRS, qui contient aussi du Tween 80, son pH est habituellement ajusté à 6.2 ou 6.5 (Guiraud, 2003). Leur température optimale de développement est de 42 à 50 °C (Mahaut *et al.*, 2000).

Les lactobacilles sont caractérisés par l'hétérogénéité de la composition de leur ADN : le GC % varie de 32-53 % (Leveau et Bouix, 1993).

*Lb. bulgaricus* est une bactérie thermophile, très exigeante en Calcium et en Magnésium qui joue un rôle essentiel dans le développement des qualités organoleptiques et hygiéniques du yaourt (Marty-Teysset *et al.*, 2000).

**Tableau 1 :** Classification de *Lactobacillus delbruckii subsp. bulgaricus* (Orla-Jensen, 1919; Rosoga & Hansen, 1971; Weiss et al., 1984 (subspecies status)).

Règne	Bacteria
Division	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Lactobacillales
Famille	Lactobacillaceae
Genre	<i>Lactobacillus</i>
Espèce	<i>Lactobacillus delbruckii</i>

#### 4.2. *Streptococcus thermophilus*

*Streptococcus thermophilus* sont des micro-organismes appartenant à la famille Streptococcaceae, au genre *Streptococcus* (Tableau 2). Ces microorganismes thermophiles forment des colonies lenticulaires de 1 à 2 mm de diamètre sur milieu gélose M17 glucose-bouillon M17 saccharose. Ils ont un aspect microscopique en forme de cellules sphériques (Cocci) ou ovoïdes (0,7 - 0,9µm de diamètre), par paire ou en chaînes longues. Ils sont Gram positifs, catalase négative (Journal Officiel de la République Algérienne, 2004). Cette bactérie est dépourvue d'antigène du groupe D, thermorésistante, sensible au bleu de méthylène (0,1%) et aux antibiotiques, elle est aussi résistante au chauffage à 60°C pendant 30 minutes (Dellaglio et al., 1994). Elle est isolée exclusivement du lait et des produits laitiers et sa température optimale de croissance varie entre 40 et 50°C. Son métabolisme est de type homo-fermentaire (Lamoureux, 2000).

**Tableau 2:** Classification de *Streptococcus thermophilus* (Orla-Jensen, 1919).

Règne	Bacteria
Division	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Lactobacillales
Famille	Streptococcaceae
Genre	<i>Streptococcus</i>
Espèce	<i>Streptococcus thermophilus</i>

Le rôle principal de *St. thermophilus* est la fermentation du lactose du lait en acide lactique. En plus de son pouvoir acidifiant, elle est responsable de la texture dans les laits fermentés, et elle augmente la viscosité du lait par production de polysaccharides (composés

de galactose, glucose, ainsi que de petites quantités de rhamnose, arabinose et de mannose) (Bergamaier, 2002).

## **5. Intérêt et fonctions des ferments lactiques du yaourt**

### **5.1. Production d'acide lactique**

La production d'acide lactique est une des principales fonctions des bactéries lactiques en technologie laitière, car cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme coagulant et antimicrobien (Schmidt et *al.*, 1994). Le métabolisme est de type homo-fermentaire (production exclusif de l'acide lactique). L'acidité du yaourt est communément exprimée en degré Dornic ( $1^{\circ}\text{D} = 0,1\text{g/l}$  d'acide lactique). Elle se situe entre 100 et 130 °D (Loones, 1994).

### **5.2. Activité protéolytique**

Les bactéries du yaourt doivent dégrader la fraction protéique du lait constituée de caséine et de protéine sérique. On distingue deux types d'enzymes à partir de leur système protéolytique : les protéases et les peptidases. *Lb. bulgaricus* possède des protéases localisées, pour l'essentiel, au niveau de la paroi cellulaire (Marshall, 1987).

### **5.3. Activité aromatique**

Divers composés volatils et aromatiques interviennent dans la saveur et l'appétence du yaourt. C'est principalement le lactose qui intervient dans la formation de ces composés dans une fermentation de type hétéro-fermentaire. Parmi ceux-ci, l'acide lactique confère au yaourt son goût acidulé. L'acétaldéhyde est le composé aromatique le plus caractéristique de la flaveur du yoghourt est principalement produit par *Lb. bulgaricus* à partir de la thréonine, réaction catalysée par la thréonine (Marshall et Colf, 1983).

### **5.4. Activité texturante**

L'augmentation de la viscosité du yaourt est en général attribuée à la production d'exopolysaccharide (EPS) qui selon une étude portant sur plusieurs souches serait essentiellement composé de rhamnose, arabinose, et mannose (Schmidt et *al.*, 1994). Il est couramment admis que la production des EPS est le résultat de l'action exercée par *St. thermophilus*. Mais d'après Tamime (1999), *Lb. bulgaricus* possède une aptitude à produire des EPS composés de galactose, glucose, rhamnose. Les polysaccharides reliés aux micelles de caséine

augmentent le pouvoir de rétention d'eau du caillé lactique et protègent ce dernier contre les traitements mécaniques durant la fabrication (pompage, réfrigération) (Loones, 1994).

## **6. Principaux facteurs influençant le métabolisme des ferments**

### **6.1. Facteurs Physiques**

#### **6.1.1. La température**

Le premier facteur environnemental à considérer pour le développement des bactéries lactique est la température. Elle doit être aux alentours de 30°C pour les bactéries mésophiles et de 42°C pour les espèces thermophiles. Elle agit sur les vitesses des réactions chimiques et biochimiques.

#### **6.1.2. L'activité de l'eau**

L'activité de l'eau (aw) est liée à la présence de sels ou de sucres. Lorsqu'elle diminue, la quantité d'eau libre décroît et la disponibilité des nutriments est affectée. Concernant les laits fermentés seule la présence de saccharose (cas des yaourts sucrés) peut diminuer cette activité, c'est le cas lorsque cette dernière devient inférieure à 0.99 correspondant à une concentration en saccharose de 10%, l'activité métabolique des bactéries est alors affectée (Tamime et Robinson, 1985).

### **6.2 Facteurs chimiques**

#### **6.2.1. La qualité du lait**

La qualité du lait est primordiale pour la croissance des bactéries lactiques puisqu'il leur apporte les composés carbonés et azotés ainsi que les facteurs de croissance indispensables. L'exigence nutritionnelle est la quantité de l'azote libre qui peut être apporté sous forme d'acides aminés libres ou sous forme de petits peptides. Certains travaux ont montré l'importance de ces acides aminés : effet stimulant de l'acide glutamique, de l'histidine, de la méthionine, effet inhibiteur par compétition de l'acide aspartique et l'isoleucine, sur la croissance de *St. thermophilus* (Bracquard, 1985).

#### **6.2.2. Le traitement thermique**

Le traitement thermique du lait induit des réactions physico-chimiques qui agissent sur le métabolisme des bactéries lactiques, mais également sur les propriétés organoleptiques des laits (Loones, 1994). Le lait enrichi subit un traitement thermique qui a pour but de détruire tous les germes pathogènes et indésirables (bactéries, levures, moisissures), ce qui favorisera

le développement ultérieur des ferments, d'inactiver les  $\gamma$ -globulines et de nombreuses enzymes (phosphatase, peroxydase..... etc) (Jeantet *al.*, 2008).

### 6.2.3. Le PH

Le PH est important pour la croissance des bactéries lactiques, il intervient sur la disponibilité en nutriments du milieu, sur la perméabilité de la membrane cellulaire et sur les vitesses d'activité enzymatique (Beal et Sodini 2003).

## 6.3. Facteurs microbiologiques

Le taux d'ensemencement du lait avec les bactéries lactiques influence fortement sa transformation, plus il est élevé, plus rapide est la fermentation. Généralement, ce taux se situe autour de  $10^6$  UFC/ml (UFC : unités formant colonie) pour simultanément obtenir des durées de fabrication courtes et limiter le cout d'achat des ferments. Pour un ensemencement direct cela correspond à un taux d'inoculation compris entre 2,5 g et 70 g pour 100 L de lait selon l'espèce bactérienne considérée (Beal et Corrieu, 1991).

Les équilibres des populations agissent également sur les cinétiques microbiennes. Ainsi dans le cas de la fabrication du yaourt la durée de la fermentation varie selon la valeur initiale du rapport entre streptocoques et lactobacilles, même si en fin de culture les streptocoques sont toujours majoritaires (Beal et Corrieu, 1991).

## 7. La composition chimique du yaourt

### 7.1. Les Glucides

La teneur du yaourt en lactose résiduel est de l'ordre de 4,5 g pour 100 g. La dégradation du lactose conduit à la formation de galactose, de glucose et d'acide lactique qui passe d'un niveau pratique presque nul à un niveau de 0,8 à 1 %, dont 50 à 100 % d'acide lactique selon les ferments. La Quantité finale de galactose est de 1 à 1,5 %. Cependant les concentrations en glucose et oligosaccharides sont très faible (Toba et *al.*, 1981 ; Vidal-Val Verde et *al.*, 1984)

### 7.2. Les protéines

Les bactéries lactiques produisent des enzymes qui hydrolysent partiellement les protéines du lait. De ce fait, un yaourt est riche en peptides et en acides aminés libres (Rasic et *al.*, 1971).

### **7.3. Les lipides**

Il existe une hydrolyse très modérée des triglycérides du yaourt qui n'a pas d'incidence nutritionnelle observable (Boccignone et *al.*, 1984).

### **7.4. Les minéraux**

C'est surtout la richesse en calcium du yaourt et des laits fermentés qui est à noter. La poudre de lait ajoutée au lait lors de la fabrication des yaourts augmente en effet la teneur en calcium par rapport au lait d'origine. Un pot de yaourt de 125 g apporte 180 à 200 mg de calcium (Dupin, 1992; Meton, et *al.*, 2003; Hidvegi et *al.*, 2003).

### **7.5. Les vitamines**

La composition des vitamines du yaourt dépend principalement du lait utilisé, de plus, elle sera modulée au cours de la fermentation par les bactéries lactique. La composition en vitamines liposolubles A et D varie en fonction de leur teneur dans le lait utilisé (entier ou partiellement écrémé) (Dupin, 1992).

## **8. Apports nutritionnels du yaourt**

Les apports nutritionnels du yaourt dépendent de sa composition chimique, du lait utilisé et de la procédure de production. Par exemple un traitement thermique du yaourt à 70°C pendant 10 minutes entraîne des diminutions importantes des teneurs en vitamines du groupe B et en enzymes (De Felip et *al.*, 1977; Syndifrais, 1997). Les différents apports nutritionnels sont représentés dans le tableau 3.

**Tableau 3 :** Apports nutritionnels de différents yaourts pour un pot de 125 g  
(Syndifrais, 1997).

	Yaourt nature au lait partiel (écrémé)	Yaourt nature maigre (lait écrémé)	Yaourt nature au lait entier	Yaourt maigre aux fruits	Yaourt au lait partiel (écrémé et aux fruits)	Yaourt au lait entier et aux fruits	Yaourt aromatisé partiel écrémé sucré
Protides en g	5,4	5.6	5.2	4.5-5	4.6	4	4.8
Lipides en g	1,5	0.3	4.3	0.3	1.3	3.3	1.3
Glucides en g	6,2	6.5	6.2	13.7	21.2	23.7	17.5
Calcium en mg	185	185	194	175	175	175	175
Kilocalories	60	51	84	106	115	140	101
Kilojoules	251	213	351	443	481	585	422

## 9. Les effets bénéfiques du yaourt

Le yaourt a une valeur nutritive similaire au lait, puisqu'il contient une quantité importante de protéines, de calcium, de potassium et de phosphore, et une source importante de vitamines (A, B....) et ce, en ne fournissant que peu de calories (Deeth et Tamime, 1981). D'autre part, le transit intestinal du yaourt est deux fois plus long que celui du lait, ce qui améliore l'absorption des nutriments. Ce produit se différencie du lait par le fait qu'il est plus facile à digérer, tant au niveau de son contenu protéique qu'au niveau de son contenu en carbohydrates (Deeth et Tamime, 1981).

D'autres effets thérapeutiques ont été associés à l'absorption de yaourts, plusieurs études ont évaluées l'impact bénéfique de la consommation de yaourts sur les désordres gastro-intestinaux (Deeth et Tamime, 1981; Labell, 1989).

L'addition d'agents probiotiques, prébiotiques ou synbiotiques permet d'améliorer les valeurs nutritives et thérapeutiques des yaourts. Comparativement à un yaourt traditionnel, le yaourt « Actimel Cholesterol Control » aurait un effet hypocholestérolémique qui serait entièrement associé à son contenu en *Lb. acidophilus* et en fructo-oligosaccharides

(Schaafsma et *al.*, 1998 ; Roberfroid 2000 ; Simons et *al.*, 2006 ; Fava 2006 ; Piquet et *al.*, 2007).

# **Chapitre II :**

## **Les probiotiques**

## 1. Définition

Le mot probiotique est d'origine grec : « pro » signifie « en faveur » et « bio » signifie « vie ». Ce terme est actuellement utilisé pour désigner des bactéries associées à des effets bénéfiques chez l'homme et les animaux (Ait abdeslam arezki, 2008).

Le terme « probioique » a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évoluées dans le temps en fonctions des connaissances scientifiques et des avancées technologiques (Ait-Belgnaoui, 2006). En 1965, Lilly et Stillwell utilisent le terme de probiotique pour désigner des « facteurs promoteurs de croissance produits par des micro-organismes » et en 1998, Guarner et Schaafsmaa 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).

A fin de souligner la nature microbienne des probiotiques, Fuller (1989) a redéfini le terme comme suit : « un complément nutritionnel microbien vivant qui a un effet positif sur l'animal hôte en améliorant son équilibre intestinal ».

Les probiotiques peuvent aussi être considérés comme un moyen permettant de véhiculer des principes actifs qu'ils contiennent (enzymes, composants de paroi, peptides immunomodulateurs, substances antibactériennes...) jusqu'à leur cibles d'action dans le tractus digestif (Marteau p, 2001).

En 2002, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 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).

Donc il est claire que toutes ces définitions soulignent que les probiotiques sont un concept positif, vivant, améliorant le microbiote intestinal, si la concentration consommée est optimale.

## 2. Découverte et historique du développement des probiotiques

La notion des probiotiques a été développée grâce aux travaux de Matchenikoff (1907) qui avait suggéré que la longévité des paysans bulgares était directement liée à leur consommation de laits fermentés (Hadjer jedidi, 2007).

Eli Metchnikoff, chercheur à l'institut Pasteur et prix Nobel en 1908, s'interroge sur l'effet bénéfique procuré sur le corps humain ou animal par la simple ingestion de certains aliments enrichis en microorganismes. Il suggère une dépendance des microbes intestinaux vis-à-vis de l'alimentation, ce qui rend possible une modification de la flore intestinale. Il suffit de « remplacer les microbes dangereux par des microbes utiles » (FAO/OMS, 2001).

A cette époque, Henry Tissier, pédiatre français, a observé que les selles des enfants souffrants de diarrhée contenaient un petit nombre de bactéries caractérisées par une morphologie particulière en forme de Y. Ces bactéries pourraient être administrées aux patients souffrants de diarrhée pour aider à rétablir une flore intestinale saine.

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

### **3. Propriétés et Critères de sélection des souches probiotiques**

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). d'une autre façon, les probiotiques doivent être capables d'exercer leurs effets bénéfiques sur l'hôte par leur croissance et/ou leur activité dans le corps humain (Collins et *al.*, 1998 ; Morelli, 2000).

La non pathogénicité (innocuité) des souches est un critère très important, les souches ayant le statut GRAS (Generally Regarded As Safe) son d'ailleurs à favoriser. Toutefois, le critère de viabilité ou de survie demeure essentiel dans la sélection des probiotiques qui doivent parvenir au site de leur action, à savoir l'intestin, et donc résister aux différents mécanismes de défense de l'hôte. Les bactéries étant administrées par voie orale, il faut qu'elles franchissent les obstacles majeurs du transit digestif : le pH acide, les sels biliaires, les enzymes pancréatiques....etc (Millette et *al.*, 2008 ; Lamoureux, 2000 ; Percival, 1997) (Tableau 4).

**Tableau 4:** Critères de sélection utilisés pour le screening des probiotiques(Nousiainen et *al.*, 2004).

Critères	But cherché
Résistance à l'acidité gastrique	Survie pendant le passage par l'estomac et le duodénum
Résistance aux sels biliaires	Survie pendant le passage par l'intestin grêle
Production d'acide (à partir de glucose et lactose)	Production d'une 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 des processus de transformation
Bonnes propriétés technologiques	Stabilité, croissance sur une large échelle, survie dans le produit, résistance aux bactériophages

### 3.1. 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 (Holzapfel et *al.*, 2001). Chaque souche doit être identifiée par des techniques moléculaires fiables et confrontées 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 provienne du même habitat (Alvarez-Olmos et Oberhelman, 2001).

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).

### 3.2. Propriétés fonctionnelles

Afin d'être conformes à la définition des probiotiques, les microorganismes doivent survivre, persister temporairement dans le tractus digestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets positifs pour l'hôte (Vasiljevic et Shah, 2008).

#### 3.2.1. Résistance aux conditions gastriques

Les souches probiotiques, pour être efficaces, doivent parvenir vivantes au site de leur action, à savoir l'intestin et donc résister au cours de leur passage aux conditions hostiles de l'estomac telles que l'acidité et l'action de la pepsine (Dunne et *al.*, 2001). Durant le jeûne, le pH stomacal peut descendre très bas, jusqu'à atteindre 1.5 chez certaines personnes ce qui peut affecter drastiquement la croissance et la viabilité bactérienne (Draser et *al.*, 1969).

D'une autre façon, 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).

#### 3.2.2. Résistance aux sels biliaires

La bile est une solution aqueuse jaune – verdâtre dont les constituants principaux sont les acides biliaires, le cholestérol, les phospholipides et le pigment biliverdine. Les acides biliaires (également connu sous le nom de sels biliaires) sont formés par des dérivés du cholestérol et par des stéroïdes acides sécrétés par le foie. Ils sont stockés et concentrés dans la vésicule biliaire et injectés dans le duodénum après la prise alimentaire (Begley et *al.*, 2006).

Dans l'intestin grêle, la tolérance aux sels biliaires est un facteur important qui contribue à la survie des probiotiques. Les bactéries qui surviennent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion des repas gras. Les bactéries peuvent réduire l'effet émulsifiant des sels biliaires en les hydrolysant avec des hydrolases, de ce fait diminuant leur solubilité (Gu et *al.*, 2008 ; Ammor et Mayo, 2007).

### 3.2.3. Adhésion aux cellules épithéliales

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 capacités 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'adhésion constitue le premier mécanisme de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes. Elle est basée sur la réalisation d'un ensemble de tests *in vivo* puis *in vitro* en utilisant des cellules d'origine animale et/ou humaine (Palomares *et al.*, 2007 ; Reyes-Gavilan *et al.*, 2011).

En raison de la difficulté d'étudier l'adhérence des probiotiques, *in vivo*, différentes méthodes ont utilisées, *in vitro*, des lignés cellulaires intestinales d'origine humaine en cultures comme modèles mimant l'épithélium intestinal (Vesterlund *et al.*, 2005 ; Gueimonde *et al.*, 2006). La ligné Caco-2 est l'un des meilleurs modèles pour étudier l'adhésion bactériennes (Servin, 2003). Elle a été isolée à l'origine d'un adénocarcinome du colon humain (Fogh *et al.*, 1977). Les cellules Caco-2 se différencient spontanément dans des conditions standard de cultures. Une fois différenciées ; elles expriment les caractéristiques des entérocytes matures (Pinto *et al.*, 1983). L'adhésion entre les cellules Caco-2 enterocyte-like et les bactéries probiotiques se fait par interactions entre récepteurs spécifiques eucaryotes et ligands bactériens. 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'adhésions tels que les composés protéiques, polysaccharides, charges ioniques et aux acides lipotéichoïques propres à chaque souche bactérienne (Crociani *et al.*, 1995).

### 3.2.4. Activité antimicrobienne

Un des critères fréquemment utilisés pour la sélection des souches probiotiques est l'activité antimicrobienne. La méthode la plus utilisée est la co-incubation généralement sur milieu gélosé permettant la croissance du probiotique et de gamme de souches pathogènes indicatrices (Dunne *et al.*, 2001).

Les bactéries lactiques (probiotiques) synthétisent des molécules à action bactéricide (ou bactériostatique) comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments (Labioui et *al.*, 2005 ; Titiek et *al.*, 1996).

### 3.3. Critères technologiques

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

- **Aptitude à la production industrielle**

Pour exercer leur effet bénéfique sur la santé, les probiotiques doivent survivre en grand nombre au procédé de fabrication (FAO/OMS, 2002). Il est généralement admis qu'un nombre minimal de  $10^7$  cellules viables par gramme de produit est nécessaire pour exercer un effet probiotique (Holzaphel, 2002). Une souche qui ne peut pas atteindre une concentration minimum de  $10^9$  cellules/g de produit déshydraté à chaud (spray) ou de  $10^{10}$  cellules/g de produit déshydraté à froid (lyophilisation) ne peut être utilisée industriellement car, à plus faible concentration, son prix de revient serait trop élevé et les doses de médicaments et d'additifs à ajouter aux aliments deviendraient trop importantes (Holzaphel, 2002 ; Hansen, 2002 ; Leroy et De Vuyst, 2004).

- **Présentation du probiotique et ses conditions de stockage**

Les probiotiques doivent rester stables dans les conditions de stockage. Sous forme de préparations concentrées, le médicament ou l'additif alimentaire doivent pouvoir se conserver au moins pendant une année (Bell, 2001). Pour ce faire, il est impératif que leur teneur en humidité ne dépasse pas 3%. Par contre, dans l'aliment dont l'humidité atteint normalement est légalement 13%, la conservation peut être réduite à environ 3 mois (Gardiner et *al.*, 2000 ; Bell, 2001 ; Matilla-Sandholm et *al.*, 2002). Tous ces facteurs doivent être connus. Le fait qu'ils ne soient pas assez respectés explique les fréquents échecs dans l'emploi des probiotiques (Siuta-Cruce et Goulet, 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). Les conséquences d'ordre physicochimique et microbiologique sont récapitulées (Surta et *al.*, 1998) : coagulation du lait, la synthèse du caillé et la

solubilisation du calcium micellaire, elle participe aux qualités organoleptiques des produits laitiers fermentés et inhibe la croissance de microorganismes nuisibles.

#### 4. Les différentes souches probiotiques utilisées dans l'industrie alimentaire

Les bactéries probiotiques sont principalement des bactéries lactiques et des bifidobactéries (Ait-Belgnaoui, 2006) (Tableau 5). 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).

D'autres microorganismes ne faisant pas naturellement partie de la flore naturelle humaine peuvent également être utilisés comme probiotiques, et montrant des effets thérapeutiques importants tels que l'immunostimulation. L'un des meilleurs exemples est présenté par *Saccharomyces boulardii*, une levure probiotique dont les effets sont les meilleurs documentés (Izquierdo, 2009).

**Tableau 5:** classification de bactéries lactiques considérées comme probiotiques (Marteau et Seksik, 2005)

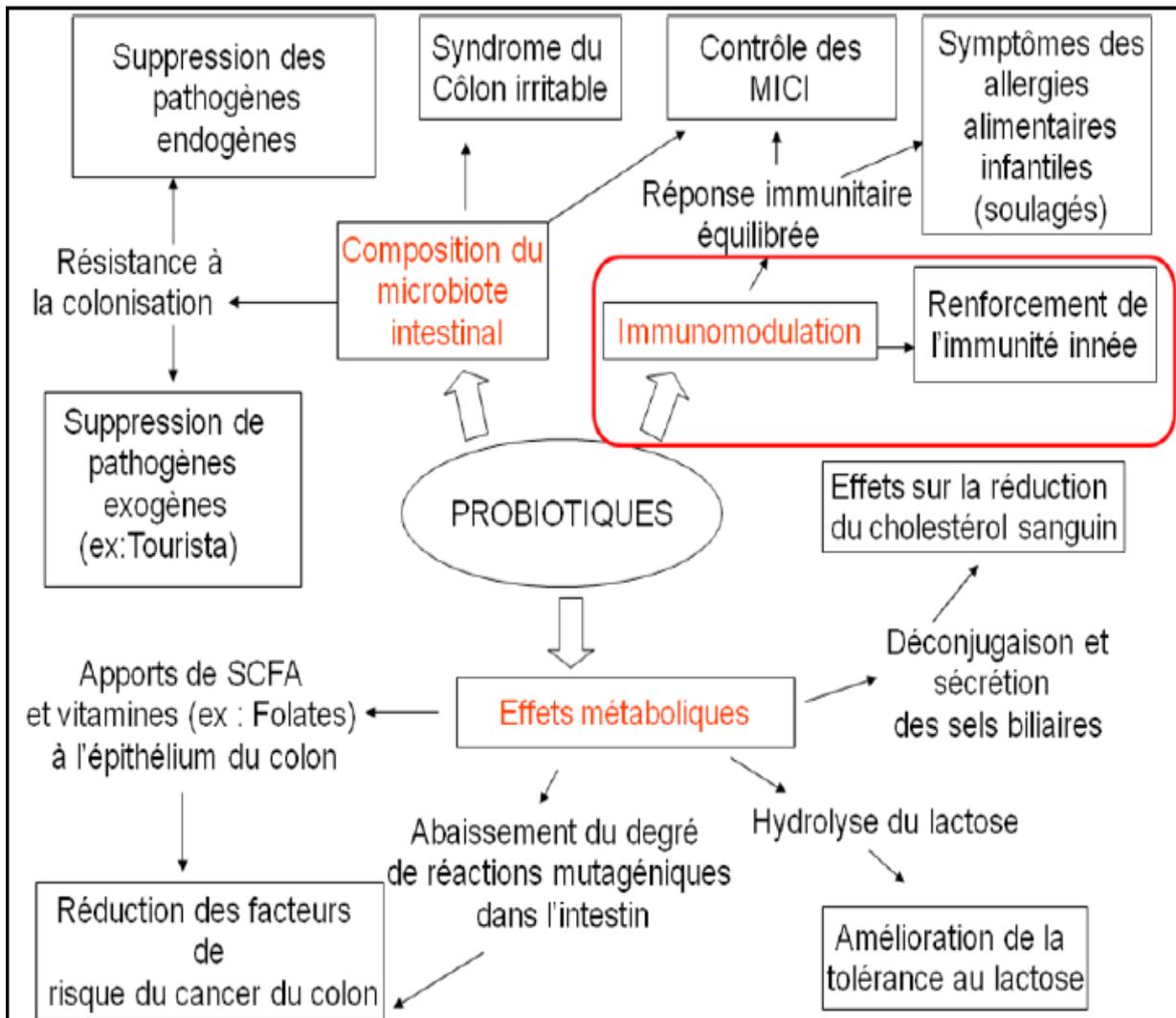
Lactobacilles	Bifidobactéries	Autres bactéries lactiques
<i>Lb.acidophilus</i>	<i>B.adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lb.brevis</i>	<i>B.animalis</i> DN 173010	<i>Enterococcus faecium</i> SF
<i>Lb.amylovorus</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> c
<i>Lb.bulgaricus</i>	<i>B.breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroidesc</i>
<i>Lb.casei</i> DN 114001	<i>B.infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lb.casei chirota</i>	<i>B.lactis</i> Bb 12	<i>Propionibacterium Freudenreichii</i>
<i>Lb.crispatus</i>	<i>B.langum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lb.johnsonii</i> La1	<i>B.thermophilus</i>	
<i>Lb.lactis</i>		
<i>Lb.paracasei</i>		
<i>Lb.plantarum</i> 299v		
<i>Lb.reutri</i>		
<i>Lb.rhamnosus</i> GG		
<i>Lb.cellubiosus</i>		
<i>Lb.fermentum</i>		
<i>Lb.salivarius</i>		

## **5. Mécanisme d'action des probiotiques**

Les probiotiques font actuellement l'objet d'un certain consensus dans la communauté scientifique grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. Plusieurs mécanismes par lesquels certains probiotiques exercent des effets protecteurs ou thérapeutiques ont été proposés. Toutefois, ces modes d'action ne sont pas encore complètement élucidés. Parmi ces principaux mécanismes d'action, on trouve le renforcement de la barrière intestinale, l'inhibition de l'adhésion des pathogènes à la muqueuse intestinale, la production de substances antimicrobienne et la modulation du système immunitaire (Naiimi.S, 2014)

## **6. Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine**

Les probiotiques ont pour but d'aider la flore microbienne naturelle de l'intestin. Plusieurs avantages pour la santé sont fournis par l'ingestion des aliments contenant des cultures probiotiques (Da Cruz et *al.*, 2010) (Figure 2).



**Figure 2:** Présentation des effets bénéfiques de la consommation des probiotiques sur la santé humaine (Saarela et *al.*, 2000).

Les principaux effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine sont comme suit :

### 6.1. Soulagement de la constipation

Les lactobacilles peuvent avoir des effets sur la constipation (selles difficiles, dureté excessive des selles, transit intestinal lent) et permettent de réduire l'utilisation de laxatifs, qui ont l'inconvénient majeur d'éliminer différentes substances essentielles à l'organisme comme les acides aminés et les minéraux (Guarner et *al.*, 2008).

### 6.2. Amélioration de la digestion du lactose

L'intolérance au lactose est causée par la diminution dans l'intestin de l'enzyme qui hydrolyse les glucides : la beta galactosidase. Il provoque, lors d'ingestion de produits laitiers, des diarrhées, des ballonnement 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 beta-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.*, 1999), et que celles dont la membrane est facilement lysée par les acides biliaires libéraient leur lactose dans l'intestin (Marteau et *al.*, 1990).

### **6.3. 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 montrées 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 à des rotavirus (Szymanski, 2006).

### **6.4. Contrôle des infections intestinales par *Helicobacter pylori***

L'infection par *Helicobacter pylori* favorise les risques d'ulcère du duodénum et de l'estomac et de certains cancers et lymphomes gastriques (Dial et Lichtenberges, 2002).

Wang et *al.* (2004) ont rapportés que la consommation régulière de yaourt additionné des *L.acidophilus* ou de *Bifidobacterium lactis* BB12 induit une suppression effective de l'infection due à *Helicobacter pylori*. La croissance d'*Helicobacter pylori* est inhibée par la production de quantités importantes d'acide lactique (Zubillaga et *al.*, 2001) et par la production de bactériocines notamment la lacticine produite par *Lactococcus lactis* et qui exerce une activité antimicrobienne contre plusieurs souches d'*Helicobacter pylori*.

### **6.5. Protection contre les pathologies intestinales**

Outre les infections intestinales, des études ont montré l'effet des probiotiques sur des pathologies intestinales comme les maladies inflammatoires du colon (maladie de Crohn, pouchites ou colite ulcéraire) ou le syndrome du colon 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.

### **6.6. Diminution des allergies alimentaires**

L'allergie alimentaire du nourrisson se traduit souvent par de l'eczéma atopique. Les traitements curatif et préventif de cette pathologie par des BAL ont été évalués lors d'une étude clinique sur 27 enfants nourris au sein et souffrant d'eczéma atopique (Arvola et al., 2000). Il a été notamment observé qu'après deux mois de traitement avec une formule supplémentée en *L.rhamnosus* GG et *B.lactis* BB12, il y a eu une amélioration plus rapide de l'état atopique en comparaison avec le groupe placebo. Un effet préventif de *L.rhamnosus* GG a aussi été observé chez des enfants à risque nés de parents atopique (Kalliomaki et al., 2001). Les mécanismes ainsi que les processus régulateurs de l'allergie sont loin d'être tous connus.

Plusieurs mécanismes touchant à l'immunité ou à l'état de la muqueuse ont été suggérés pour expliquer l'effet protecteur des BAL. Celles-ci pourraient, en diminuant la perméabilité intestinale très augmentée en période de réactivité allergique, et de participer à la diminution du passage des protéines alimentaires (Rautava et al., 2002).

### **6.7. Réduction du taux de cholestérol sanguin**

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce fait, comme l'assimilation du cholestérol par des 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 par 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).

# **Chapitre III :**

Les

**Bifidobactéries**

## 1. Taxonomie des bifidobactéries

Les bifidobactéries ont été isolées pour la première fois par Henry Tissier à la fin du XIX<sup>ème</sup> 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* comme une espèce à part entière sous le nom de genre *Bifidobacterium* (Orla-Jensen, 1924). Pour lui, les bifidobactériens « constituent un genre séparé, formant probablement une connexion entre les bactéries lactiques et les bactéries propioniques ».

Depuis leur première description, la classification de ces bactéries n'a cessé d'être révisée passant du genre *Bacillus*, à celui de *Bacteroide* (Castellani et Chalmers, 1919), *Lactobacillus* (Hollande, 1920), *Bifidobacterium* (Orla-Jensen, 1924), *Bacterium* (Lehmann et Neumann, 1927), *Tissieria* (Pribram, 1929), *Nocardia* (Vuillemin, 1931), *Actinomyces* (Nannizzi, 1934), *Actinobacterium* (Puntoni, 1937) et *Corynebacterium* (Olsen, 1949).

En raison des similitudes entre les bifidobactéries et les bactéries du genre *Lactobacillus*, ils ont été inclus dans ce genre comme classifiés dans la 7<sup>e</sup> édition du manuel de Bergey de la bactériologie déterminative (Breed et al., 1957).

Dehnert (1957) décrit l'existence des biotypes multiples des bifidobactéries et a proposé un arrangement pour la différenciation entre les souches basées sur leurs modèles de fermentation d'hydrate de carbone.

Durant la même année Cummins et al. en 1957 ont examinés la composition de la paroi cellulaire de plusieurs souches des bifidobactéries et ont conclu que ces bactéries sont différentes de toutes les bactéries Gram positives précédemment examinées. La classification taxonomique des bifidobactéries était donc à revoir et le sujet a été relancé de nouveau à l'investigation.

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, anaérobies, Gram

positive, 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 additionnels des sucres déjà étudiés. Sur cette base, il conclu que ces bactéries devraient être classées dans la tribu *Lactobacilleae*, famille *Lactobacillaceae* dans le genre *Bifidobacterium*.

Une nouvelle voie de fermentation des hexoses chez les bifidobactéries a été découverte, 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 acétyle phosphate (Scardovi et Trovatelli, 1965 ; De Varies et *al.*, 1967).

Le procédé d'hybridation ADN/ADN a été appliqué intensivement par Scardovi et *al.* en 1970 afin d'évaluer la validité des espèces de bifidobactéries précédemment décrite et pour identifier de nouveaux groupes de séquences ADN homologique parmi les souches qu'ils isolaient dans diverses niches écologiques. Cette technique d'identification est une avance significative en bactériologie déterminative et a aidé à résoudre une grande partie de la confusion précédemment rencontré quand à la différenciation d'espèce de *Bifidobacterium* qui a été faite principalement sur le profil fermentaire d'hydrate de carbone.

Dans la 8<sup>e</sup> édition du manuel de Bergey du déterminatif de la bactériologie (Rogosa, 1974), les bifidobactéries ont été classifiées dans le genre *Bifidobacterium* en utilisant le même nom proposé par Orla-Jensen. Le genre a comporté huit espèces ; il a été inclus dans la famille des *Actinomycetaceae* d'ordre *Actinomycetales*.

Une autre correction à la classification a été apportée après l'introduction de l'électrophorèse des protéines cellulaires solubles sur le gel de polyacrylamide comme critère d'identification d'espèce (Biavati et *al.*, 1982).

La nouvelle description d'espèce et les remises en ordre apportées à la classification précédente ont contribué à l'identification de 24 espèces rapportées dans la première édition du manuel de Bergey de la bactériologie systématique (Scardovi, 1986).

Les bifidobactéries sont répertoriées en 32 espèces, 12 seraient d'origine humaine, 3 proviendraient de l'abeille, 14 seraient d'origine animale à sang chaud et 2 proviendraient des eaux usées (Crociani et *al.*, 1996).

Stackebrand et *al.*(1997), par l'analyse de ARNr16s, ont proposés une structure hiérarchique rassemblant le genre *Bifidobacterium* avec le genre *Gardnerella* dans une seule famille Bifidobacteriaceae dans l'ordre des Bifidobacteriales. De nos jours, cette famille comporte 6 genres : *Aeriscardovia*, *Alloiscardovia*, *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Parascardovia* et *Scardovia* (Euzéby, 2007).

## 2. Ecologie des bifidobactéries

Les bactéries du genre *Bifidobacterium* 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).

Ces microorganismes sont les bactéries intestinales majeures chez les bébés nourris au lait maternel, ces derniers ont une flore intestinale composée de 85-99% de bifidobactéries et les principales espèces retrouvées sont *Bifidobacterium infantis* et *Bifidobacterium bifidum* (Rasic et Kurmann, 1983).

L'habitat des bifidobactéries n'est cependant pas restreint à l'intestin. Quelques espèces comme *B. bifidum*, *B. breve* ou *B. longum biovar infantis* peuvent également coloniser le vagin de la femme. *B. dentium* a pour habitat la cavité orale de l'homme, mais cette espèce est également retrouvée dans les fèces et dans le vagin. Les espèces douées du plus fort pouvoir pathogène potentiel sont : *B. dentium* isolée notamment des caries dentaires (Scardovi et Crociani, 1974) et des abcès et *B. scardovii* isolée de divers prélèvements d'origine humaine (sang d'une femme âgée de 50 ans, urines de patients âgés, hanche d'une femme de 44 ans) (Hoyle et *al.*, 2002).

Dans le règne animal, la présence des bifidobactéries a été constatée majoritairement dans le tube digestif des mammifères (Mitsuoka et Kaneuchi, 1977). Cinq espèces de *Bifidobacterium* ont été détectées chez la volaille (*B. animalis*, *B. galinarum*, *B. pseudolongum*, *B. pullorum*, *B. thermophilum*) (Yaeshima et *al.*, 1992 ; Watabe et *al.*, 1983 ; Mitsuoka et *al.*, 1969). Trois espèces de *Bifidobacterium* ont été identifiées chez les abeilles : *B. asteroides*, *B. coryneforme*, et *B. indicum* (Biavati et *al.*, 1982 ; Scardovi et Trovatielli,

1965). Et trois autres espèces de bifidobactéries ont été isolées à partir des eaux usées : *B. minimum*, *B. subtile*, et *B. thermacidophilum* (Dong et al., 2000 ; Biavati et al., 1982).

### 3. Propriétés phénotypiques

#### 3.1. Morphologie

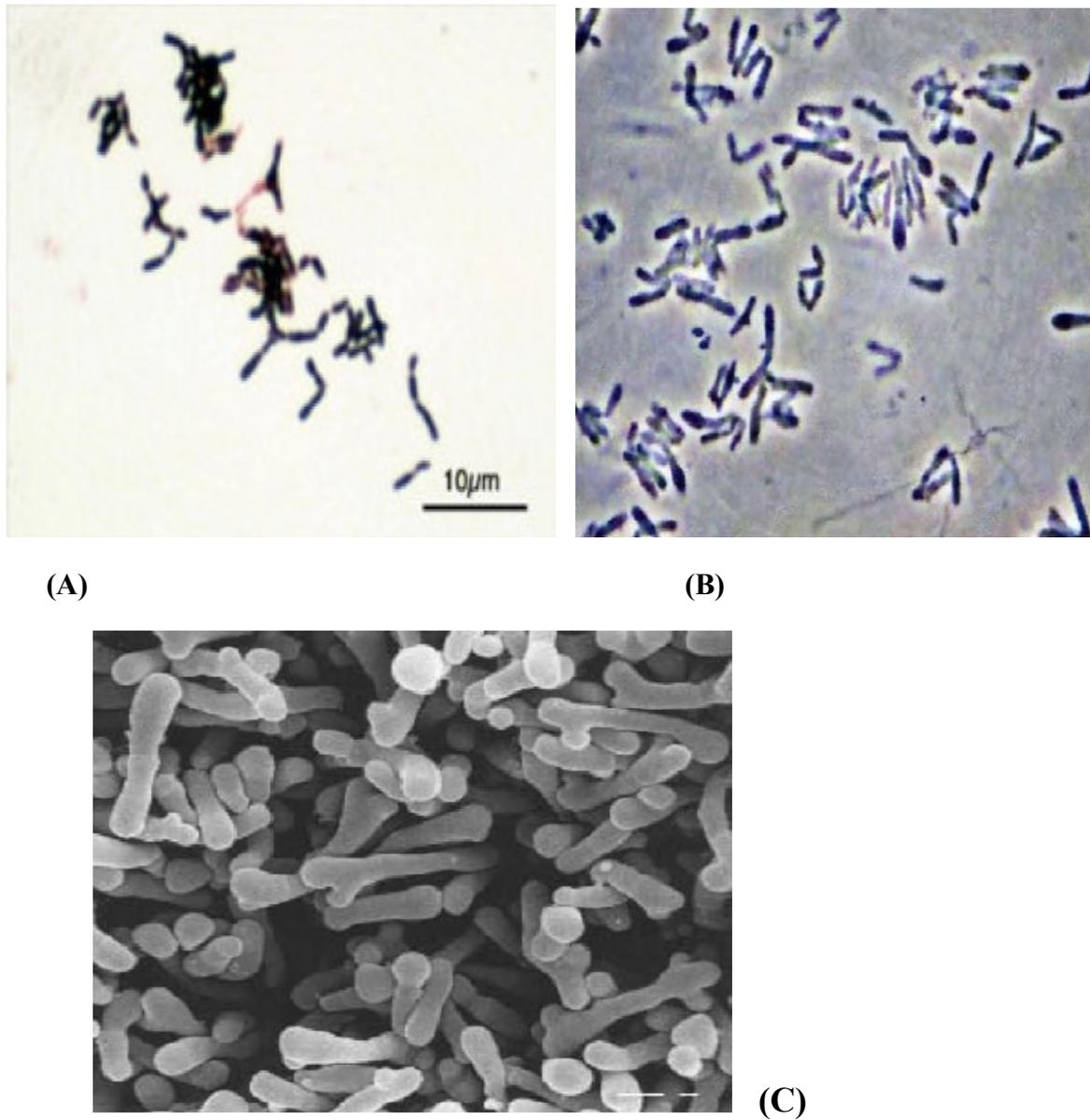
Les membres du genre *Bifidobacterium* montrent des formes bacillaires qui développent des ramifications donnant des formes en V, Y, X (Figure 3). Cependant, leur polymorphisme dépend principalement du milieu de culture et des conditions de croissance (Shah, 2011). Plusieurs constituants du milieu de culture peuvent influencer la forme de ces bactéries ; la concentration de N-acétylglucosamine (impliqué dans la synthèse du 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 long (Seppo et al., 2004).

Les colonies formés par les bifidobactéries sont lisses, convexes, crèmes ou blanches, luisantes et de consistance molle (Shah, 2011).

#### 3.2. Structure et composition de la paroi cellulaire

La paroi cellulaire des bifidobactéries a une structure spécifique aux bactéries Gram positives. Elle est constituée d'une épaisse couche de muréine (peptidoglycane) entremêlée de longue chaîne de polysaccharides ainsi que de protéines et d'acides lipoteichoïques.

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. Les polysaccharides de la paroi cellulaire de *Bifidobacterium* sont constitués de glucose, galactose et rhamnose (Prasanna et al., 2014). La structure du peptidoglycane des bifidobactéries est plus proche des *Lactobacillaceae* que des *Actinomycetaceae* (Delcenserie et al., 2002).



**Figure 3 :** Observation microscopique des cellules de *Bifidobacterium sp.*

Observation au microscope optique de :

(A): *Bifidobacterium adolescentis* (Bar: 10 µm) (Anonyme, 2008).

(B): *Bifidobacterium animalis* (X500) (Trojanova et al., 2006).

Observation au microscope électronique :

(C): *Bifidobacterium sp.* (Bar: 1 µm) (Biavati et al., 2000).

## 4. Propriétés physiologiques

### 4.1. La température

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).

Les souches d'origine humaine montrent une croissance à une température qui varie entre 36 et 38°C par contre les espèces d'origine animales peuvent croître à des températures plus élevée qui varient entre 41 et 43°C (Scardovi, 1986 ; Martin et chou, 1992). L'espèce *B. thermacidophilum* pousse à une température plus élevée égale 49.5°C (Dong et al., 2000). Au dessous de 20°C, la croissance des bifidobactéries n'est plus détectable à l'exception de *B. psychroaerophilum* qui présente une faible croissance à 8°C (Simpson et al., 2003).

### 4.2. La sensibilité au pH

Les bifidobactéries ont un optimum de croissance compris entre 6,5 et 7 (Hadadji et al., 2005). Les souches de *Bifidobacterium lactis* et *Bifidobacterium animalis* peuvent survivre à pH 3,5, tandis que les bifidobactéries dans un environnement supérieur à pH 8,5 ne survivent pas (Matsumoto et al., 2004 ; Biavati et al., 2000).

La production maximale d'acide lactique et acétique chez les bifidobactéries exige un pH optimal initial proche de la neutralité qui varie entre 6-7 (Scardovi, 1986 ; Collins et Hall, 1984).

### 4.3. L'anaérobiose

L'oxygène (O<sub>2</sub>) est utilisé comme accepteur final d'électrons par les bactéries aérobies et aérotolérantes. Chez ces organismes, la croissance en aérobiose se traduit par conversion de l'O<sub>2</sub> en eau (H<sub>2</sub>O). Par opposition, l'O<sub>2</sub> est une molécule toxique chez les microorganismes anaérobies.

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 du milieu de culture et dépend même de la morphologie des souches (ramifiées ou pas) (Prasanna et al., 2014).

L'exposition à l'air pendant 4 jours à une température de 20°C permet la survie de beaucoup d'espèces d'origine animale (*B. pseudolongum* subsp *pseudolongum* et *B. thermophilum* (Beerens et al., 2000). *Bifidobacterium psychraerophilum* cultive faiblement en aérobiose (Simpson et al., 2004) et *B. animalis* subsp *lactis* est capable de croître en présence d'une concentration d'oxygène (Meile et al., 1997 ; Masco et al., 2004).

#### **4.4. Sensibilité 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).

Les bifidobactéries sont résistantes vis-à-vis de nombreux antibiotiques tels que la Kanamycine, la Néomycine, la Streptomycine, la Polymycine, la Gentamicine, l'Acide Nalidixique et le Métronidazole (Biavati et Mattarelli, 2006). En revanche, l'Ampicilline, la Bacitracine, le Chloramphénicol, la Clindamycine, l'Erythromycine, la Lincomycine, Nitrofurantoinne, 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 à la même espèce (Seppo et al., 2004).

### **5. Besoins nutritionnels des bifidobactéries**

#### **5.1. Besoins en composés azotés et source de carbone**

Les bifidobactéries sont d'une façon générale, capables d'utiliser les sels d'ammonium comme seule source d'azote. Mais les espèces *B. suis*, *B. magnum*, *B. choerinum*, *B. cunicul* et *B. pseudolongum* subsp. *globosum* ne poussent pas en absence d'azote organique. Dans un milieu exempt de 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).

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 fermenter plus de 19 (shah, 1997).

## 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 (Bezkorovainy et Topouzian, 1981). 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 à synthétiser 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).

## 6. Les facteurs bifidogènes

Il y a des différences entre les facteurs bifidogènes et les facteurs de croissance pour les bifidobactéries en termes de leur nature et de leur fonction. Les facteurs de croissances 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 (Modler, 1994).

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 premières études consacrées à la découverte des facteurs bifidogènes ont été réalisées avec la souche *Bifidobacterium bifidum* var, *pennsylvonicus*. Le composé N-acetyl-D-glucosamine présent dans le lait d'origine humaine a alors été identifié comme étant la substance essentielle et a été nommé facteur bifidogène 1 (Tamura, 1983).

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

- **BF1** : isolé de polysaccharides, de mucines gastriques et d'oligo-saccharides non dialysable de lait de femme. Il est essentiellement actif sur *B. bifidum* var b (Gyorgy et al., 1974).

L'activité des facteurs BF1 dépend de la présence nécessaire de N-acetyl glucosamine puisque il semble que *B. bifidum* métabolise plus rapidement la N-acetyl glucosamine en fructose-6-phosphate, lui-même converti en lactate et acétate (Yoshika, 1971).

- **BF2** : c'est un facteur de nature peptidique non glycosylé dépourvu de la N-acetylglucosamine (Romond et Romond, 1990). Il a une activité positive sur la croissance de *Bifidobacterium bifidum* var a.
- **Glycoprotéines** : ce sont des glycoprotéines spécifiques au lactosérum et à la caséine humaine, il a été démontré que l'hydrolyse trypsine et chymotrypsine de la caséine libèrent des glycoprotéines similaires à celle du lactosérum (Romond et Romond, 1990).
- **Facteurs Longum-Infantis (BL-BI)** : Se sont des facteurs retrouvés en abondance dans les laits animaux, en particulier des bovins mais, ils sont souvent absents dans le lait de vache et les laits humanisés (maternisés) (Beerens et *al.*, 1980).

La majorité des facteurs 3BL et BI se localisent dans le lactosérum, ils sont de nature peptidique et de poids moléculaire inférieur à 10.000 Da (Hadadji, 2007).

## 7. Biochimie des Bifidobactéries

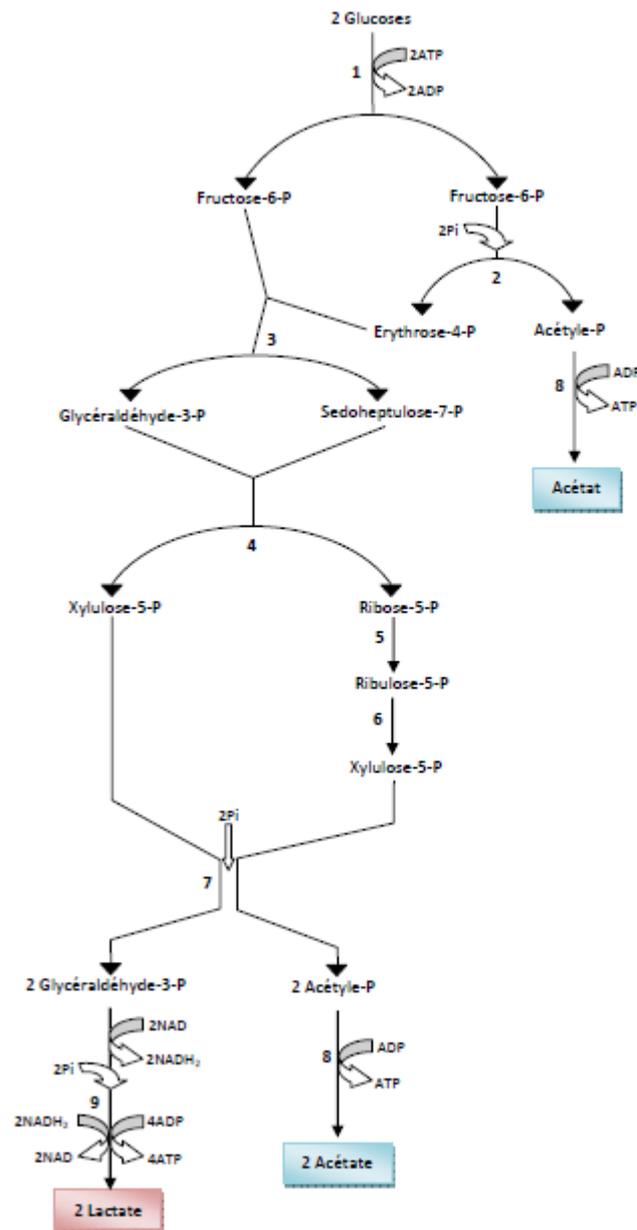
### 7.1. Métabolisme des glucides

La majorité des bifidobactéries utilisent le lactose, le glucose, le sucrose et le galactose comme source de carbone (Hadadji, 2007).

L'ammoniac est la seule source d'azote utilisée par la majorité des espèces de bifidobactéries. Contrairement aux autres bactéries lactiques qui dégradent le glucose via le système glycolytique ou encore par la voie des hexoses monophosphates, les bifidobactéries dégradent le glucose par la voie du fructose-6-phosphate. La dégradation du glucose par cette voie est rendue possible grâce à l'enzyme fructose-6-phosphate phosphocétolase, qui est particulière aux bifidobactéries et qui scinde le fructose-6-phosphate en acétylphosphate et en érythrose-4-phosphate (Rasic et Kurmann, 1983). Par la suite, ces métabolites intermédiaires sont transformés en acide acétique et en acide lactique (Figure 4).

Les bifidobactéries ne produisent ni l'acide butyrique ni l'acide propionique et le CO<sub>2</sub> est synthétisé seulement lors de la dégradation du gluconate (Scardovi, 1986). Toutefois, certaines souches de bifidobactéries vont produire plus d'acide acétique et moins d'acide

lactique. Le surplus d'acide acétique formé provient d'une autre voie métabolique des bifidobactéries qui convertit le pyruvate en acide formique et en acétate plutôt qu'en acide lactique. Par suite, une partie de l'acide acétique est transformé en éthanol (De Vries et Stouthamer, 1968 ; Lauer et Kandler, 1976).



**Figure 4:** Représentation schématique de principales étapes de la voie fermentative du glucose chez les *Bifidobacterium* (Rasic et Kurmann, 1983).

1 : hexokinase et fructose-6-phosphate isomérase,

2 : fructose-6-phosphate phosphoketolase,

- 3 : transaldolase,
- 4 : transketolase,
- 5 : ribose-5-phosphate isomerase,
- 6 : ribulose-5-phosphate-3-epimerase,
- 7 : xylulose-5-phosphoketolase,
- 8 : acétate kinase,
- 9 : les même enzymes appliquées dans la vois homofermentaire,

## 7.2. Métabolisme des vitamines

Les bifidobactéries sont capables de produire des vitamines tels que thiamine (B1), l'acide folique (B9) et l'acide nicotinique (Tamura, 1983 ; Deguchi et *al.*, 1985). Les espèces *B. breve* et *B. infantis* excrètent un taux trop élevé de l'acide nicotinique et la biotine, de même *B. bifidum* et *B. infantis* possèdent une bonne production de vitamine B1 et B9 (Tamura, 1983).

## 7.3. Production des substances antimicrobiennes

Malgré la grande utilisation des bifidobactéries dans la production des aliments fonctionnels, les études sur leurs pouvoir antimicrobien est peu restreint (Ventura et *al.*, 2007). L'activité antimicrobienne du genre *Bifidobacterium* a été détectée en premier lieu par Tissier en 1900, il a étudié l'effet antagoniste de *B. bifidum* contre *E. coli*. D'autres études décrivent l'activité antagoniste ou l'activité antimicrobienne spécifique des bifidobactéries liée à la production des acides lactiques et acétiques (Bruno et Shah, 2002), ou à la production des bactériocines (Cheikhyoussef et *al.*, 2010 ; Abd El-Salam et *al.*, 2004 ; Bevilacqua et *al.*, 2003).

## 8. Génétique des bifidobactéries

### 8.1. 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 générale supérieur à 55% par rapport aux bases A+T.

Les bifidobactéries sont classés en trois groupes en fonction de leur contenu en G+C : le premier regroupe les riches en G+C et dont le pourcentage est de 55-67%, le deuxième

regroupe les pauvres en G+C dont le pourcentage est de 45% et les bifidobactéries ayant un pourcentage de G+C intermédiaire (55%) (Delcenserie et *al.*, 2002).

## 8.2. Les plasmides

Les plasmides ne sont pas ubiquitaires chez les bifidobactéries et lorsqu'ils 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). Seulement 20% des souches de bifidobactéries contiennent un ou plusieurs plasmides (Sgorbati et *al.*, 1982). *B. longum* est la seule espèce d'origine humaine dont 70% des souches sont porteuses d'ADN extrachromosomique. De manière étonnante, *B. infantis*, souvent présent avec *B. longum* dans les prélèvements, ne présente pas de plasmides (Kouame, 2013).

## 8.3. Les séquences d'ADN étudiées

L'étude de la séquence d'ADN est un moyen pour pouvoir identifier une espèce bactérienne, mais aussi pour pouvoir étudier le lien de parenté entre des souches appartenant à une espèce. En ce qui concerne les bifidobactéries, certaines régions du génome ont particulièrement été étudiées (Delcenserie et *al.*, 2002).

### 8.3.1. Le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S

L'analyse du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (16SrDNA) est un moyen utile pour identifier des relations phylogéniques entre les espèces (Mangin et *al.*, 1996). Le 16S DNA 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*. En tenant compte de la séquence du 16SrDNA, presque toutes les espèces du genre *Bifidobacterium* et l'espèce *Gardnerella vaginalis* appartiennent à un groupe phylogénétiquement distinct des autres genres (Miyake et *al.*, 1998).

### 8.3.2. Le gène codant pour la protéine Hsp60

La séquence partielle du gène codant pour la protéine du choc thermique de 60 KDa (*hsp60*) de 30 espèces de bifidobactéries ainsi que de *G. vaginalis* a été déterminée (Jian et *al.*, 2001) afin d'étudier la taxonomie du genre.

Matériel  
et  
Méthodes

## 1. L'objectif du travail

Notre travail pratique a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, de l'Université des Frères Mentouri-Constantine 1.

L'objectif principal de cette étude s'articule autour des points suivants :

- Isolement et identification de bifidobactéries à partir d'un yaourt probiotique produit et commercialisé en Algérie.
- Etude *in vitro* de quelques propriétés probiotiques des souches isolées en l'occurrence la résistance aux conditions gastro-intestinales simulées (Tolérances aux conditions acides de l'estomac) et le pouvoir antagoniste vis-à-vis certaines bactéries pathogènes.

## 2. Matériel

### 2.1. Matériel biologique

La partie expérimentale de cette étude a été réalisée en utilisant le matériel biologique suivant : yaourt et souches pathogènes cibles.

#### 2.1.1. Le yaourt

Le yaourt retenu pour l'isolement des bifidobactéries est le yaourt « Activia actiregularis » du groupe DANONE Algérie et dont la composition est la suivante :

Lait entier (82,4%), sucre (8,3%), lait écrémé concentré ou en poudre, crème (lait), arôme, vitamine D, ferments lactiques dont bifidobacterium (Bifidus Actiregularis) (lait).

Les échantillons de yaourts collectés d'un supermarché local à Constantine ont été conservés à 4°C et acheminés au laboratoire pour être analysés dès leurs réceptions.

#### 2.1.2. Souches pathogènes cibles

Les souches test ou cibles utilisées dans l'étude de l'activité antibactérienne des bifidobactéries isolées sont les suivantes :

-*Escherichia coli*

- *Klebsiella sp*,

-*Salmonella sp*

Ces souches nous ont été fournies par le Centre Hospitalo- Universitaire de Constantine (CHU Constantine), isolées à partir des urines.

## **2.2. Milieux de cultures**

Les bifidobactéries ont été isolés sur milieu gélosé sélectif le MRS (Man Rogosa et Sharpe) additionné de 0.05% de cystéine chlorhydrique (Annexe 1).

Les souches pathogènes sont cultivées sur Gélose Nutritive (GN) (Annexe 2) et l'étude de l'activité antibactérienne est réalisée sur milieu Hektoen (Annexe 3).

## **3. Méthodes**

### **3.1. Traitement des échantillons**

#### **3.1.1. Préparation de la solution mère**

Pour la préparation de la solution mère, 1g d'échantillon de yaourt est placé dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. Le mélange est ensuite agité au vortex (Belarbi, 2011).

#### **3.1.2. Préparation des dilutions décimales**

La dilution est un processus qui consiste à réduire la concentration d'une substance dans une solution. Les dilutions décimales sont préparées en cascade par le prélèvement de 1 ml de la solution mère, placé dans des tubes à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile jusqu'à la dilution  $10^{-6}$  (Belarbi, 2011).

### **3.2. Isolement des bifidobactéries**

L'isolement des bifidobactéries à partir des échantillons de yaourt est réalisé par ensemencement de 0,1ml de la solution mère ou de ses dilutions, en surface, sur milieu MRS cystéine (2 boîtes pour chaque dilution) préalablement coulé sur boîtes de Pétri. Ces dernières sont incubées en anaérobiose (jarre d'anaérobiose + anaérocult) pendant 72 heures à 37°C (Figure 5).

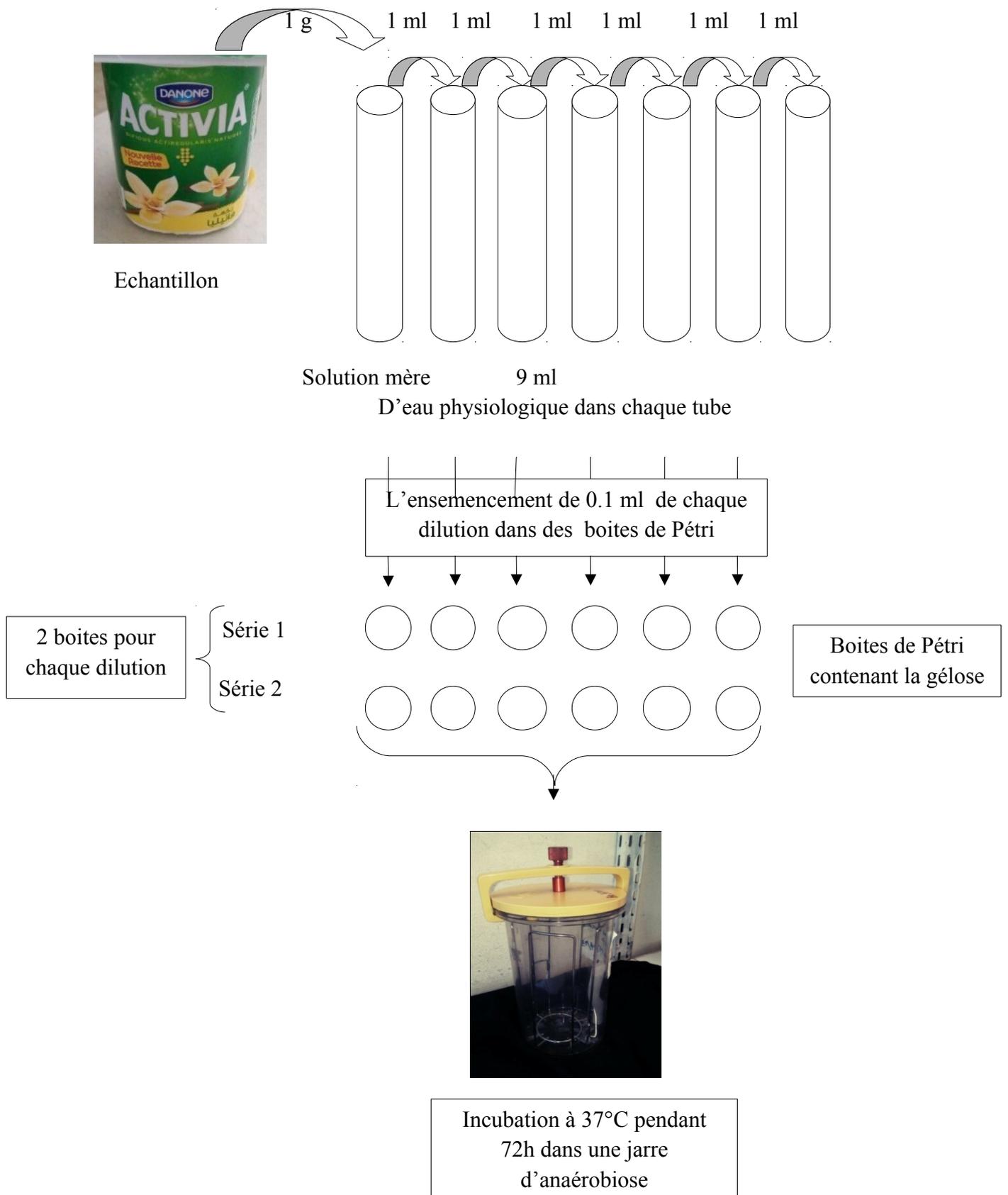


Figure 5 : Schémas illustrant les étapes d'isolement des bifidobactéries.

### 3.3. Purification

Les souches des bifidobactéries obtenues après isolement sont purifiées, en effectuant un repiquage sur milieu MRS cystéine. L'opération est renouvelée jusqu'à ce qu'on s'assure de la pureté des souches, estimée par observation microscopique après coloration de Gram (Annexe 5).

### 3.4. Identification

L'identification des bactéries bifides est établie en se basant sur l'étude de leurs caractères morphologiques (examens macroscopique et microscopique) et divers caractères biochimiques : catalase, oxydase, culture en anaérobiose, production de gaz carbonique, fermentation de divers sucres, ...etc.

#### 3.4.1. Caractérisation morphologique

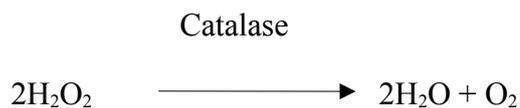
**a/ Examen macroscopique :** C'est le premier examen effectué après l'étape d'isolement. Il consiste à noter l'aspect des colonies bactériennes sur milieu gélosé (taille, forme, élévation, contour, viscosité, ...etc).

**b/ Examen microscopique :** Cet examen qui consiste à soumettre les colonies des bactéries isolées à une coloration de Gram, permet de connaître la morphologie des cellules bactérienne : forme (coques ou bacilles), leur arrangement et leur Gram.

#### 3.4.2. Caractérisation biochimique

- **Recherche de la catalase**

Chez les bactéries douées d'un métabolisme oxydatif, le système respiratoire compte parmi d'autres enzymes une catalase, celle-ci décompose l'eau oxygénée selon la réaction suivante :



La recherche de la catalase consiste à étaler une colonie sur une lame en verre sur laquelle on ajoute une goutte de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 10 volumes. La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement de bulles de gaz (Abid, 2015).

- **Recherche de l'oxydase**

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylène diamine (Guillaume, 2004).

Sur une lame en verre on dépose un disque d'oxydase et une goutte d'eau distillée. A partir d'une culture bactérienne jeune une colonie est prélevée et mise en contact avec le disque. Le résultat positif se manifeste par une coloration rose violette (Marchal et *al.*, 1991).

- **Croissance en anaérobiose**

Il s'agit de vérifier la présence ou l'absence de culture des souches isolées sur milieu MRScys incubé à 37°C pendant 72 heures dans des conditions d'anaérobiose. (Beerens, 1990 ; Crociani et *al.*, 1996).

- **Production de gaz à partir du glucose**

La production de gaz suite à la fermentation du glucose est une caractéristique de certaines espèces.

Les bifidobactéries isolés sont ensemencées dans le bouillon MRS cystéine contenant la cloche de Durham recouvert d'une couche d'huile de vaseline et incubé en anaérobiose à 37°C pendant 48heures (Beerebs, 1990 ; Crociani et *al.*, 1996).

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

- **Production d'indole**

Ce test permet la mise en évidence de la production d'indole qui est le produit de l'hydrolyse du tryptophane par une enzyme, la tryptophanase.

Une colonie d'une culture de bifidobactéries est inoculée dans un tube d'eau peptonée exempte d'indole additionnée d'huile de vaseline et incubée en anaérobiose à 37°C pendant 48 heures. La recherche d'indole est effectuée à l'aide du réactif Kovacs (Beerens, 1990 ; Crociani et *al.*, 1996).

Le réactif de Kovacs est utilisé pour la mise en évidence de la production d'indole par les bactéries possédant une tryptophanase. Une réaction positive se caractérise par une coloration rouge cerise en surface de bouillon en moins d'une minute et une réaction négative se caractérise par l'absence de coloration (Kovacs, 1928).

- **Utilisation des sucres (Gélose au Glucose-Lactose-Saccharose)**

Ce test réalisé sur milieu TSI (Triple Sugar Iron) permet de mettre en évidence, d'une part la fermentation des 3 sucres : lactose, saccharose et glucose avec ou sans production de gaz et d'autre part, la production d'hydrogène sulfureux (H<sub>2</sub>S) (Anonyme, 2013).

À l'aide d'une anse de platine contenant des colonies prélevées, on ensemence la pente du tube TSI par des stries sèches puis le culot par piqûre centrale. L'incubation se fait à 37°C pendant 48 à 72h.

- une coloration jaune de la pente indique un lactose positif.
- une coloration jaune du culot montre un glucose positif.
- une coloration jaune de la zone intermédiaire indique un saccharose positif.

Ce test permet également la mise en évidence de la production d'H<sub>2</sub>S (noircissement de la zone joignant la pente et le culot) et de gaz (bulles dans la gélose) (Marchal et *al.*, 1991).

- **Etude de la sensibilité et de la résistance aux antibiotiques (Antibiogramme)**

La sensibilité et la résistance des souches des bifidobactéries aux antibiotiques ont été réalisées par la technique de diffusion sur milieu MRS cystéine solide en utilisant les disques d'antibiotiques suivants : l'Acide Nalidixique la Gentamicine, la Pénicilline et la Vancomycine.

Les boîtes sont ensuite incubées à une température de 37°C pendant une période de 72 heures en anaérobiose et la lecture s'effectue par la mesure de la zone d'inhibition.

### **3.5. Mise en évidence de quelques propriétés probiotiques**

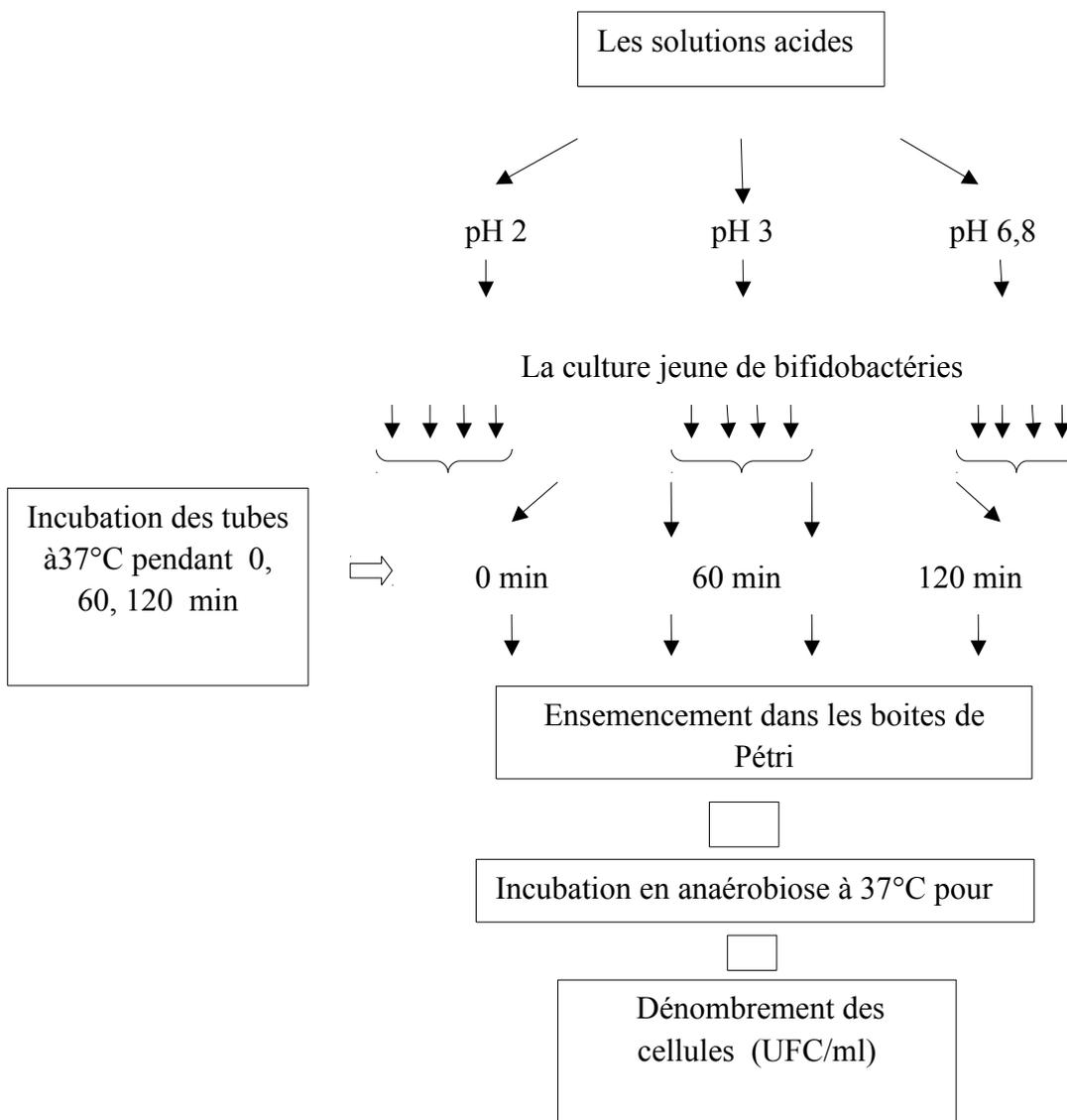
#### **3.5.1. Résistance aux conditions gastriques de l'estomac**

Ce test est réalisé selon la technique décrite par (Mosilhey, 2003 ; Kanamet *al.*, 2007 ; Izquierdo, 2009 ; Thirabunyanon et *al.*, 2009) qui comporte les étapes suivantes :

- **Préparation des solutions acides simulées au pH de l'estomac humain**

Des solutions d'eau distillée sont ajustées au pH 2 et 3 avec l'HCL 1 M. l'eau distillée au pH 6,8 est utilisée comme témoin. Les solutions sont préparées dans un volume de 250 ml, stérilisées et conservées à température ambiante avant leur utilisation. Ensuite, 1 ml de notre culture de bifidobactéries rajeunie est transférée dans 9 ml de chaque solution acide,

l'incubation est faite à une température de 37°C pour des intervalles de temps de 0, 60 et 120 minutes afin de simuler la survie des espèces dans les conditions acides de l'estomac humain. Le dénombrement des cellules viables est par la suite effectué. Afin de ne pas perturber les conditions d'incubation, nous avons utilisé un tube indépendant pour chaque intervalle de temps (Figure 6).



**Figure 6 :** Schémas illustrant la méthode de détermination de l'effet du pH gastrique.

**- Dénombrement des cellules viables dans les solutions de pH acide**

Pour dénombrer les cellules viables dans chacune des solutions acides, 1 ml de chaque tube est prélevé après le temps d'incubation prédéterminé et ensemencé en surface sur la gélose MRS cystéine. Les boîtes de Pétri ainsi préparées sont incubées à 37°C pendant 72 heures. L'expérience est indépendamment répétée deux fois.

### **3.5.2. Etude de l'activité antibactérienne**

Il s'agit d'étudier l'activité inhibitrice des bifidobactéries analysés vis-à-vis des bactéries pathogènes. Pour mettre en évidence cette activité, nous avons utilisé la méthode de diffusion sur disque décrite par (Schillinger et Lucke, 1989 et Thirabunyanon et *al.*, 2009).

Les étapes de cette technique sont comme suit :

- **Préparation de culture jeune de bactéries pathogènes**

*E.coli*, *Klesbiella sp* et *Salmonella sp* ont été rajeunies sur des boîtes de Pétri coulées par la gélose nutritive (GN), ces boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24h.

- **Préparation des cultures indicatrices**

Le milieu Hektoen est coulé en boîte de Pétri pour ensemencer en surface 15µl d'une souche de bactérie pathogène dans chaque boîte gélosée.

- **Application**

Chaque disque de papier Wattman stérile (de 5 mm de diamètre) est imbibé par 20 µl d'une culture rajeunie de la souche de bifidobactéries isolée, et déposé à la surface de la gélose contenant la souche indicatrice.

Après incubation des boîtes à 37°C pendant 72 h, on mesure le diamètre des zones d'inhibition avec une règle. L'expérience est indépendamment répétée trois fois.

# Résultats et Discussion

## 1. Résultats

### 1.1. Isolement

Une seule souche de bifidobactéries a été isolée, du yaourt « ACTIVIA actiregularis » du groupe DANONE, sur milieu MRScystéine gélosé pendant 72 heures d'incubation à 37°C dans des conditions d'anaérobiose.

### 1.2. Identification

#### 1.2.1. Caractérisation morphologiques

##### a/ Examen macroscopique

L'observation macroscopique des colonies de la souche de bifidobactéries isolée sur milieu MRScystéine gélosé en conditions d'anaérobiose, a révélé qu'elles sont de petite taille avec un contour régulier et dont le diamètre varie de 0,1 à 0,5 mm, d'un aspect lisse, luisant et caractérisées par une couleur blanchâtre à crème (Figure 7).

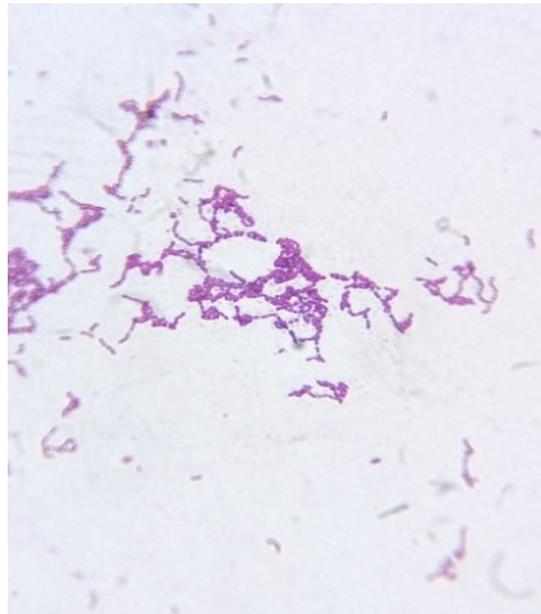


**Figure 7:** Aspect macroscopique de la souche de bifidobactéries isolée.

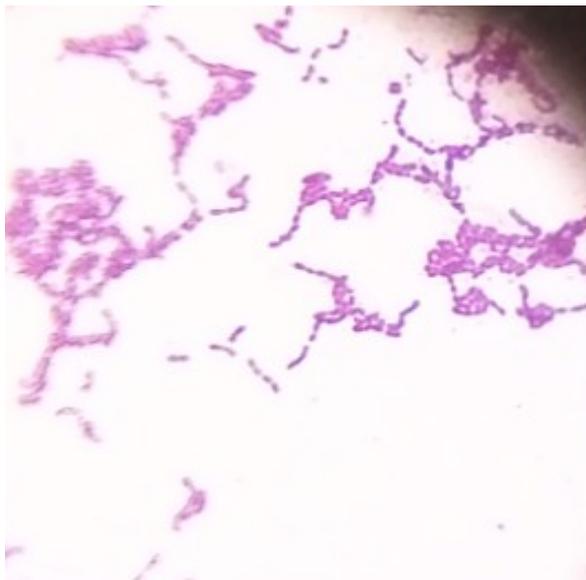
##### b/ Examen microscopique

L'aspect microscopique après une coloration de Gram réalisé à partir des colonies apparues a montré que ce sont des bacilles à Gram positif, isolées ou regroupés en amas en forme Y et V avec des extrémités bifurqués. Un changement de forme des cellules après

plusieurs repiquages a été observé, ce polymorphisme cellulaire est typique aux bifidobactéries (Figure 8).



(A)



(B)



(C)

**Figure 8:** Observation microscopique (X100) après coloration de Gram des différentes formes cellulaires de la souche de bifidobactéries isolée.

- (A) : bâtonnets sous forme d'Y et V, isolés et en amas, Gram positif  
 (B) : bâtonnets sous forme d'Y, Gram positif  
 (C) : bâtonnets sous forme d'Y et V, en amas et isolées, Gram positif

### 1.2.2. Caractérisation biochimique

Les résultats de la caractérisation biochimique de la souche étudiée sont mentionnés dans le tableau 6.

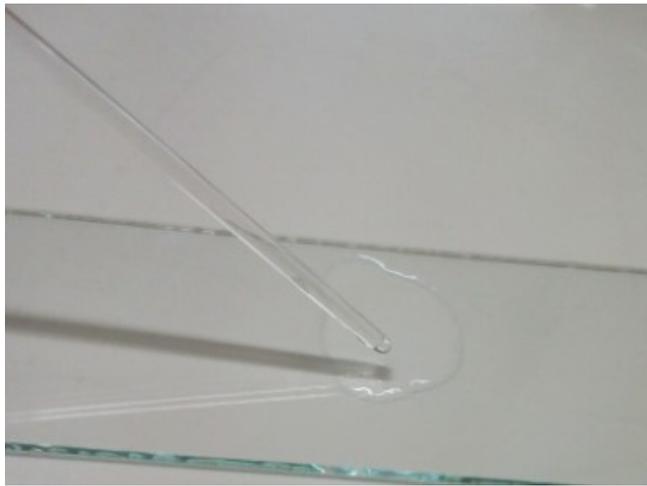
**Tableau 6:** Résultats de la caractérisation biochimique de la souche de bifidobactéries isolée.

Test	Résultat
Catalase	-
Oxydase	-
Croissance en anaérobiose	+
Production de Gaz à partir du glucose	-
Production d'Indole	-
Fermentation de glucose	+
Fermentation du lactose	+
Fermentation de saccharose	+
Production de H <sub>2</sub> S (le noircissement)	-
Production de gaz	-

(+) : résultat positif, (-) : résultat négatif.

Le résultat de la recherche de l'enzyme catalase indique l'absence du dégagement de bulles d'air ce qui signifie que la souche de bifidobactéries est catalase négative (Figure 9).

Il ressort du tableau 6 également, que le test de la recherche de l'oxydase s'est avéré négatif suite à l'absence de virage de couleur du disque oxydase utilisé. Ce résultat montre clairement l'incapacité de la souche isolée à oxyder le réactif PDA (NN-diméthyl-paraphénylène diamine) (Figure 10).



**Avant**



**Après**

**Figure 9:** Résultat du test de la recherche de catalase pour la souche de bifidobactéries isolée.



**Avant**



**Après**

**Figure 10:** Résultat du test de la recherche d'oxydase pour la souche de bifidobactéries isolée.

D'après le tableau 6, il apparaît clairement que la souche de bifidobactérie isolée est capable de se développer dans des conditions d'anaérobioses, utilisant le glucose sans production de gaz mais incapable de dégrader le tryptophane en indole. Concernant l'utilisation des sucres glucose, saccharose, lactose, les résultats obtenus montrent que la souche isolée est capable de dégrader les trois sucres. Cependant, aucun dégagement de gaz ni production d' $H_2S$  n'ont été observés (Figure 11).



**Figure 11:** Résultat du test de l'utilisation des sucres glucose, galactose, saccharose sur milieu TSI.

(A): Tube avant ensemencement, (B): Tube après ensemencement.

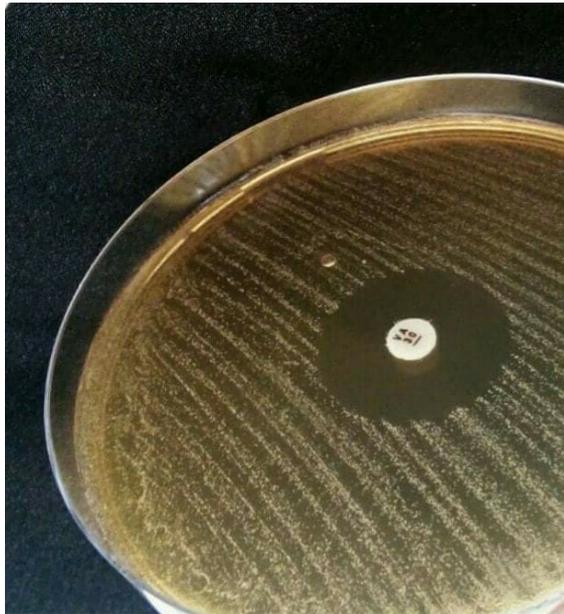
- **Etude de la sensibilité et de la résistance aux antibiotiques (Antibiogramme)**

Les résultats de l'antibiogramme montrent clairement la sensibilité de la souche isolée à la Pénicilline, la Vancomycine et la Gentamicine. Cependant, elle exprimait une résistance à l'Acide Nalidixique (Tableau 7 et Figure 12).

**Tableau 7 :** Résultat de la sensibilité de la souche isolée vis-à-vis certains antibiotiques.

Nom d'antibiotique	Dose de l'antibiotique en $\mu\text{g}$	R/S	Diamètre de la zone d'inhibition en mm
Acide Nalidixique (NA)	30	R	0
Gentamicine (GM)	10	S	13
Pénicilline (P)	10	S	26
Vancomycine (VA)	30	S	25

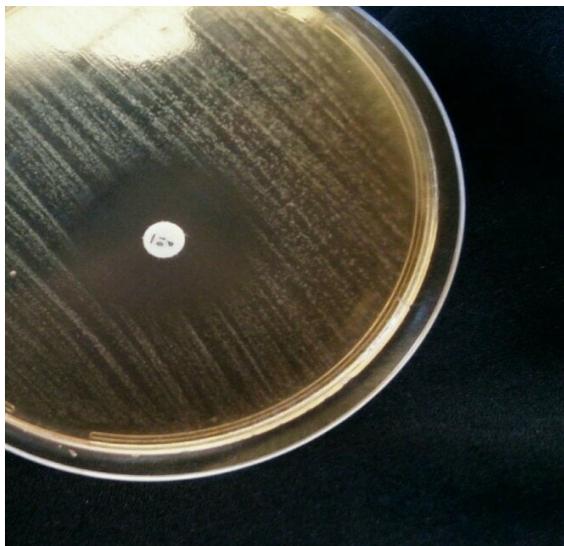
R : résistante, S : sensible,  $\mu\text{g}$ : microgramme, mm : millimètre.



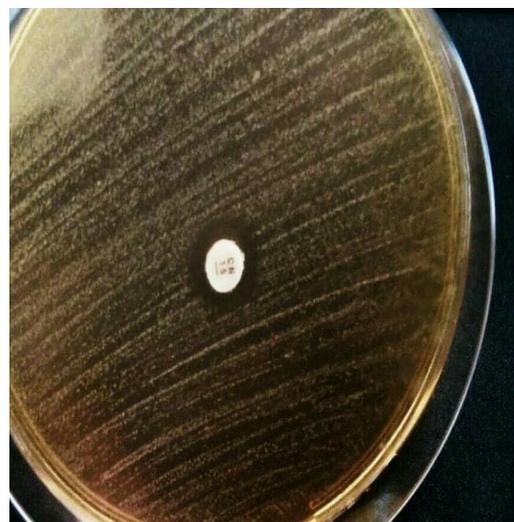
(A)



(B)



(C)



(D)

**Figure 12** : Résultat de l'antibiogramme de la souche de bifidobactéries isolée.

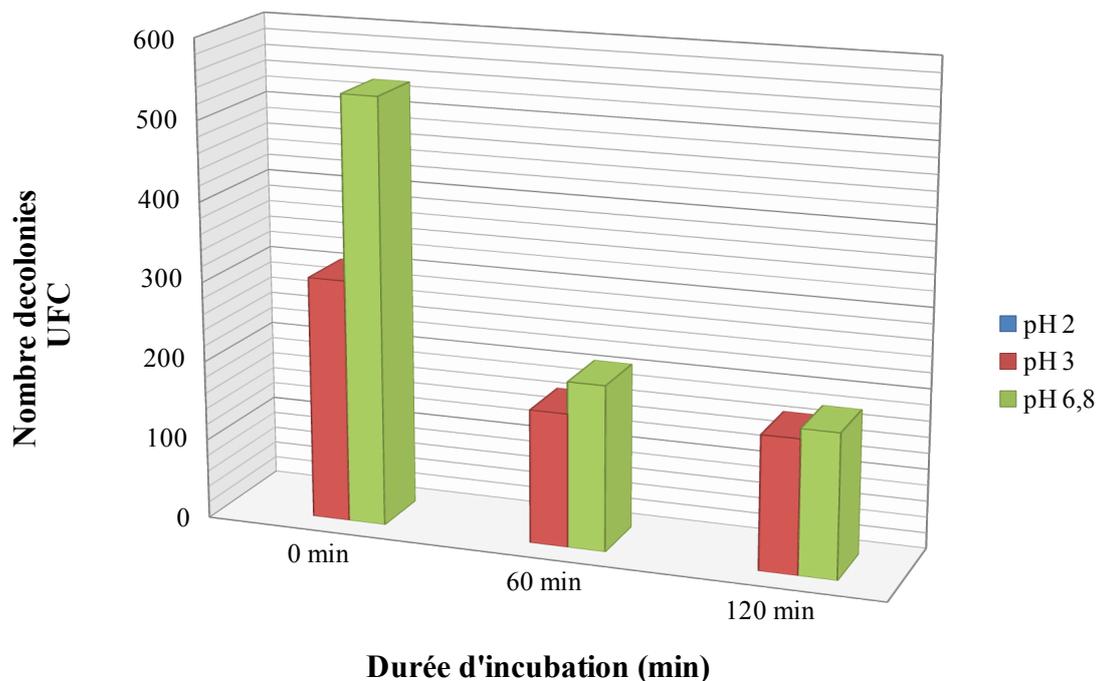
(A) : Vancomycine (VA), (B) : Acide nalidixique (NA), (C) : Pénicilline (P),

(D) : Gentamicine (GM).

### 1.3. Mise en évidence de quelques propriétés probiotiques

### 1.3.1. Résistance aux conditions gastriques de l'estomac

Etre viable de la production à la consommation et pendant le transit gastro-intestinal est l'une des conditions principales pour qu'une souche puisse répondre à la définition de « Probiotique ». Avant de pouvoir adhérer et s'installer, même de façon transitoire, les bactéries probiotiques doivent survivre au passage par l'estomac.



**Figure 13:** Résultat de la résistance aux pH acides (2 et 3) de la souche de bifidobactéries isolées comparés à un contrôle à pH 6,8.

D'après les résultats de la figure, la souche isolée était incapable de croître sur milieu à pH 2 exprimant sa sensibilité vis-à-vis des conditions très acides. Contrairement aux résultats sur ce (milieu à pH 2), les bactéries se sont montrées résistantes sur milieu à pH 3 avec une croissance modérée comparativement à un optimum de croissance observé sur milieu à pH 6,8 (contrôle).

Les résultats obtenus permettent également de remarquer que le nombre de cellules viables initial pour le pH 3 était de log (257) UFC/ml et de log (168) UFC/ml après une durée d'incubation de 120min marquant une diminution de la capacité de croissance de 2,22 log. Par

rapport au contrôle (milieu à pH 6,8) qui enregistre la plus faible diminution avec une valeur de 2.40 log.

### 1.3.2. L'activité antibactérienne

La mise en évidence d'une activité antibactérienne des souches isolées a été étudié vis-à-vis trois souches cibles, à savoir *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* et *Salmonella sp*. Les résultats relatifs à ce test sont récapitulés dans le tableau 8 et illustrés par la Figure 14.

**Tableau 8:** Résultat du pouvoir antagoniste de la souche isolée contre des souches pathogènes cibles.

Souche pathogène	Résultat	Diamètre de la zone d'inhibition en (mm).
<i>E.coli</i>	+	13
<i>Klebsiella sp</i>	+	16
<i>Salmonella sp</i>	-	0

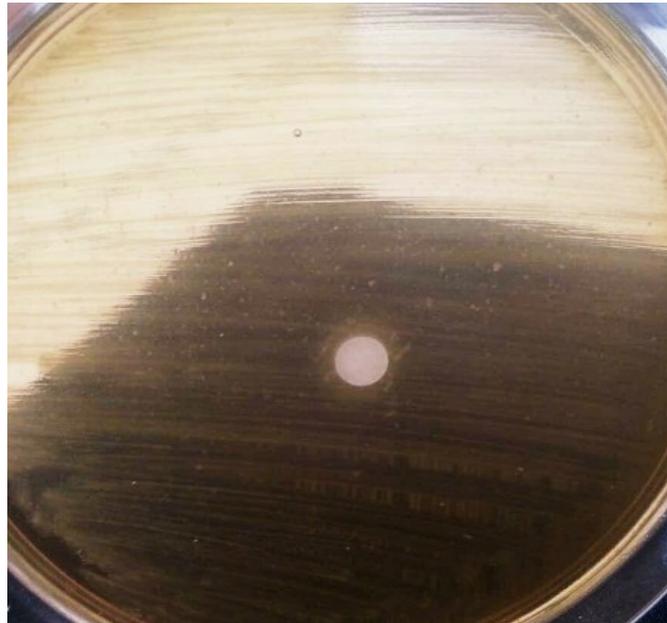
(+) : résultat positif, (-) : résultat négatif.



(A)



(B)



(C)

**Figure 14:** Résultat de l'activité antibactérienne de la souche isolée contre trois espèces pathogènes.

(A) : Activité contre *Escherichia coli*.

(B) : Activité contre *Klebsiella sp.*

(C) : Activité contre *Salmonella sp.*

Sur la base des résultats obtenus, il s'avère que la souche de bifidobactérie isolée possède une activité antibactérienne, se traduisant par la formation de zones claires autour des disques (Figure 14), dirigée contre *E.coli* et *Klebsiella sp* avec des diamètres de 13mm et 16mm respectivement. Cependant, une absence d'une zone d'inhibition autour du disque en contact avec *Salmonella sp* a été remarquée.

## 2. Discussion

Les probiotiques sont définis comme étant des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels » (FAO/OMS, 2001). Ce terme fait référence à des souches spécifiques de bactéries qui comprennent les bactéries lactiques telles que celles des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Ces souches sont largement utilisées dans la fermentation de produits laitiers comme le yoghourt et le fromage.

Les produits laitiers fermentés contenant des cultures bactériennes actives sont donc l'une des sources les plus courantes de probiotiques. Ces types de produits laitiers contenant des probiotiques seraient bénéfiques pour certains troubles gastro-intestinaux et digestifs (Balakrishnan M et Floch MH, 2012 ; Hosseini A et Coll, 2012). Dans cette optique, notre étude avait pour but d'évaluer quelques activités probiotiques *in vitro* de souches de bifidobactéries isolées à partir d'un yaourt commercialisé en Algérie sous le label « Yaourt Probiotique ».

Deux facteurs sont très importants lors de l'isolement des bifidobactéries, le premier de ces facteurs est l'obtention des conditions anaérobies et le second est un milieu de culture adéquat (Rasic et Sad, 1990). Les conditions d'anaérobies sont facilement obtenues depuis l'apparition des hottes anaérobies qui sont des atmosphères modifiées composées de 10% de CO<sub>2</sub> et de 90% de N<sub>2</sub>, ou l'utilisation des anaérocults ou les gas pack (Shah, 1997).

Dans cette étude, les conditions d'anaérobiose ont été assurées par l'utilisation d'une jarre contenant des anaérocults et l'isolement a été réalisé sur milieu de culture MRS contenant un supplément qui est la cystéine. Cette dernière permet de réduire le potentiel redox (Shah, 1997). En effet, la cystéine-Hcl joue un rôle d'un agent réducteurs du potentiel d'oxydoréduction (Tabasco et *al.*, 2007) dans le milieu de culture et permet de créer de meilleurs conditions d'anaérobiose.

Dans ces conditions, une seule souche de bifidobactérie a été isolé du yaourt « Activia actiregularis », du groupe DANONE, retenu pour cette étude.

Les résultats de l'identification morphologique montrent clairement que la souche isolée est à Gram positif de forme bifide, considérée comme typique aux bifidobactéries (Scardovi, 1986 ; Beerens, 1990 ; Tabak et *al.*, 2007 ; Tabasco et *al.*, 2007), présentant un polymorphisme après plusieurs repiquages. Ce phénomène observé chez les bifidobactéries

est souvent associé à la composition du milieu de culture et par la nature de la source de carbone (Tamime et *al.*, 1995 ; Bensoltane, 1997).

L'identification biochimique est également importante pour la confirmation du genre. Les résultats obtenus ont permis de rattacher la souche isolée au genre *Bifidobacterium* sur la base de l'absence d'enzymes respiratoires, la catalase et l'oxydase, l'incapacité à produire l'indole à partir de tryptophane et la capacité à utiliser les trois sucres glucose, galactose et lactose. Les résultats de la recherche des enzymes respiratoires catalase et oxydase sont similaires à ceux signalés dans les études faites par Bahloul et *al.*, (2012) et Mahmoudi et *al.*, (2013).

En se basant sur ce qui est déjà mentionné sur l'étiquetage du pot de yaourt retenu pour cette étude (*Bifidus ActiRegularis*) la souche isolée confirmée appartenant au genre *Bifidobacterium* est certainement l'espèce *Bifidobacterium lactis* (BB12).

Les bifidobactéries sont généralement sensibles aux antibiotiques de la famille des bêta-lactamines (Delagdo et *al.*, 2005 ; Moubarek et *al.*, 2005), parmi ces bêtalactamines nous avons testé la Penicilline la Vancomycine et la Gentamycine auxquels la souche isolée s'est montrée sensible. Cependant, elle était résistante à l'Acide Nalidixique. Cet antibiotique est utilisé comme agent sélectif dans les milieux synthétiques pour l'isolement et le dénombrement des bifidobactéries (Ventura, 2004).

*Bifidobacterium lactis* (BB12) résiste à l'Acide Nalidixique, et elle est sensible à la Vancamycine la Gentamycine. Cette propriété de sensibilité à la Gentamicine qui s'oppose avec ce qui a été rapporté dans certaines études (Ait Abdeslam, 2008) est probablement une caractéristique de l'espèce *Bifidobacterium lactis*.

Dans l'ensemble, les bifidobactéries sont sensibles à des pH inférieurs à 4,6 (Boylston et *al.*, 2004). Les bifidobactéries ont été rapportés pour être résistantes à l'acide gastrique, mais de grandes différences existent entre les souches (Shigeru et *al.*, 2001). Les espèces de *Bifidobacterium lactis* se montrent plus résistantes aux pH acides que d'autres espèces appartenant au genre *Bifidobacterium* (Jayamanne et Adams, 2006). Ceci a été confirmé par les résultats obtenus dans notre étude.

L'évaluation du pouvoir antagoniste de *Bifidobacterium lactis* étudiée vis-à-vis trois souches cibles : *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* et *Salmonella sp*, a dévoilé une activité inhibitrice envers *E. coli* et *Klebsiella sp*, et son absence envers *Salmonella sp*. Cette

inhibition est due à la capacité des bifidobactéries à produire des substances antimicrobiennes telles que des acides organiques (acide lactique et acétique), du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines (Shah, 2011).

# Conclusion

Certaines propriétés des bifidobactéries ont favorisé leur utilisation dans les produits alimentaires appelés probiotiques, tels que les laits fermentés les fromages et les laits en poudres. L'effet probiotique des bifidobactéries dépend de leur capacité de survie non seulement dans le produit mais également dans le tractus gastro-intestinal par la résistance aux conditions acides. Pour cette raison, nous nous sommes intéressés dans ce travail à étudier le pouvoir de résistance aux conditions acides simulées de l'estomac, afin de s'assurer d'un apport en probiotiques suffisant et d'évaluer l'activité antibactérienne de souches de bifidobactéries isolées du yaourt probiotique « Activia », pour obtenir les effets bénéfiques souhaités.

Dans notre étude nous avons pu isoler une seule souche de bifidobactéries à partir du lait fermenté probiotique « Activia actiregularis » arôme vanille, sur milieu MRScystéine gélosé en conditions d'anaérobiose

La souche isolée a fait l'objet d'une caractérisation morphologique et biochimique aboutissant à son affiliation au genre *Bifidobacterium*.

L'étude de la sensibilité de la souche bifidobactérie isolée aux antibiotiques a montré que ces souches sont résistantes à l'Acide Nalidixique, généralement utilisées comme agent sélectif pour l'isolement des bactéries du genre *Bifidobacterium*. Par contre, elle a montré une sensibilité aux antibiotiques : Vancomycine, Pénicilline et Gentamicine. La propriété de sensibilité à la Gentamicine qui s'oppose avec ce qui a été rapporté dans certaines études est probablement une caractéristique de l'espèce *Bifidobacterium lactis*, en se basant sur ce qui est déjà mentionné sur l'étiquetage du pot de yaourt retenu pour cette étude (*Bifidus ActiRegularis*) qui confirme l'appartenance de la souche isolée à l'espèce *Bifidobacterium lactis*.

L'étude de la résistance aux conditions gastro-intestinales simulées a révélé que la souche isolée s'est montrée résistante aux conditions acides de l'estomac, puisqu'elle était capable de croître sur milieu à pH 3.

L'étude du pouvoir antagoniste de l'espèce isolée vis-à-vis des souches pathogènes, a permis d'observer des zones claires seulement autour des souches cibles *E. coli* et *Klebsiella* sp témoignant la présence d'une activité antibactérienne et son absence contre *Salmonella* sp.

L'ensemble des résultats de cette étude permet de conclure que l'espèce *Bifidobacterium lactis* isolée, du yaourt « Activia » est dotée de propriétés probiotiques souhaitables en termes de résistance à l'acidité et la présence d'activité antimicrobienne.

# Références Bibliographiques

## A

**Abd El-Salam M H., Saleh F A., Kholif A M., El-Sayed E M., Abdou SM. and El Shibiny S. (2004).** Isolation and characterization of bacteriocins produced by *Bifidobacterium lactis* BB12 and *Bifidobacterium longum* BB-46. 9<sup>th</sup> Egyptian conference dor dairy science and technology, Cairo, Egypt, 9-11.

**Abid Z. (2015).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées d'un produit laitier traditionnel Algerien « Jben » mémoire de Magistère : biologie et sciences des aliments, Faculté es Sciences de la nature et de la vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Abou Bekr Belkaid-Telmcen.

**Afssa. (2005).** Agence française de sécuritésanitaire des aliments, effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte.

**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..

**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

**Anonyme(2008).**

[www.ebablyone.com/encyclopedia Image:Bifidobacterium adolescentis Gram.jpg](http://www.ebablyone.com/encyclopedia/Image:Bifidobacterium_adolescentis_Gram.jpg)

**Arvola T., Sutas Y., Moilanen E., and Salminen S. (2000).** Probiotic in the management of atopic eczema. Clinical and Experimental Allergy.30.1604-1610.

**B**

**Bahloul Halima Auras, Hadadji Miloud, Guessas bettache, Saidi Noureddine and Kihel mebrouk. (2012).** Characterization and Technological Properties of *Bifidobacterium* Strains Isolated from Breast-fed Infants, *Journal of Food Science and Engineering* 2 (2012) : 576-582.

**Balakrishnan M et Floch MH. (2012).** [Prebiotics, probiotics and digestive health](#). *Curr Opin. Clin. Nutr.r Metab. Care*; 15(6):580-5.

**Ballongue J. (2004).** Bifidobacteria and probiotic action. In Salminen, S., von Wright, A. and Ouwehand, A. Eds., *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and function Aspects*. Marcel Dekker, New York, pp 67-123.

**Béal C.& Corrieu G. (1991).** Influence of pH, temperature, and inoculum composition on mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Biotechnol. Bioeng*, 38: 90-98

**Béal C. & Sodini I. (2003).** Fabrication des yaourts et des laits fermentés. *Techniques de l'Ingénieur, traité Agroalimentaire, Doc. F6 315*.

**Beerens H., Gavini F. and Neut C. (2000).** Effect to exposure to air on 84 strains of bifidobacteria. *Anaerobe*, 6 :65-67.

**Beerens H., Romond C. and Neut C. (1980).** Influence of breast feeding on the bifid flora of new born intestine. *American Journal Clinical. Nutrition* 2434-2439.

**Begley M., Hill C., Gahan CGM. (2006).** Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Appl. Env. Microbiol.* 72(3):1729-1738.

**Belarbi F. (2011).** Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes, Magistère : Microbiologie alimentaire et industrielle, Faculté des Sciences, université d'Oran.

**Bell LN. (2001).** Stability testing of nutraceuticals and functional foods. In «Handbook of 106 nutraceuticals and functional foods». R.E.C. Wildman, éd, CRC, Press. New York. pp 501-516.

- 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.
- Bergamaier D. (2002).** Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lactobacillus rhamnosus* RW-959M dans un milieu à base de permeat de lactosérum. Thèse de doctorat, Université de Laval, Canada.
- Bergonzelli G E., Blum S., Briisow H, et Corthésy-Theulaz I. (2005).** Probiotics as a treatment strategy for gastrointestinal diseases *Digestion*. 72:57-68.
- Bevilacqua L., Ovidi M., Mattia E D., Trovatelli L D., Canganella F. (2003).** Screening of *Bifidobacterium* strains isolated from human faeces for antagonistic activities against potentially bacterial pathogens. *Microbiological Research*, 158 :179-185.
- Bezkorovainy A. and Topouzian N. (1981).** The effect of metal chelators and other metabolic inhibitors on the growth of *B. bifidum* var. penn. *Clin. Biochem.*, 14 :135-141.
- Biavati B., Vescovo M., Torriani S. and Bottazzi V. (2000).** Bifidobacteria : history, ecology, physiology and applications. *Ann. Microbiol.*, 50 :117-131.
- Biavati Bruno and Paola Mattarelli, (2006).** The Family Bifidobacteriaceae. CHAPTER 1.1.2, Prokaryotes (2006) 3 :322-382.
- Biaviti B., Scardovi V and Moore W E C. (1982).** Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32 :368-373.
- Boccignone M. Brigidi R. Sarra. C (1984).** Études réalisées sur la composition des triglycérides et des acides gras libres dans les yaourts préparés à partir de lait de vache, pecorino et fromage de chèvre. *Ann Fac Med Vet (Turin)* 28: 223-233.
- Bracquard P. (1985).** Thèse Université Nancy I. In : Bactéries lactiques Vol. II, De
- Breed R S., Murray E G D. and Smith N R. (1957).** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th edn., Williams & Wilkins, Baltimore.

**Bruno Ebel. (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. Université de Bourgogne, France, p1.

**Bruno F. and Shah N P. (2002).** Inhibition of pathogenic and putrefactive microorganisms by *Bifidobacterium* sp. *milchwissenschaft* ; 57 :617-621.

## C

**Castellani A. and Chalmers A J. (1919).** Manuel of tropical medicine, 3rd ed. William Wood end Co., New York.

**Cheikhyoussef A., Cheikhyoussef N., Chen H., Zhao J., Tang J. and Zhang H. (2010).** Bifidon I---a new bacteriocin produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602 : purification and partial amino acid sequence. *Food Control* ; 21 :746-753.

**Codex Alimentarius. (1975).** Normes n°A 11(A).- Rome: FAO/OMS.p : 86 ;FAO. (1975). Norme FAO II.

**Collins E B. and Hall B J. (1984).** Growth of bifidobacteria milk and preparation of *B.infantis* for a dietary adjunct. *Journal of Dairy Sciences* 67(7) :1376-1380.

**Collins J.K., Thornton G. and O'Sullivan G.O. (1998).** Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.*, 8: 487-490; Morelli L. (2000). In vitro selection of probiotic lactobacilli: A critical appraisal. *Curr Issues Intestinal Microbiol.*, 1:59-67.

**Commins C S., Glendenning M. and Harris H. (1957).** Composition of the cell wall of *Lactobacillus bifidus*. *Nature* (London), 180 :337-338.

Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur [l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes](#). Cordoba, Argentine : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et Organisation mondiale de la Santé; 2001.

**Crociani F., Biaviti B., Alessandrini A., Chizzini C, et Scardovi V. (1996).** *Bifidobacterium inopatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp nov., two new species isolated from human dental caries. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46 :564-571

**Crociani J., Grill J.P., Huppert M. and 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.

## D

**Da Cruz AG., Adriano Gomes C., Jose de Assis F. and Susana Marta IS. (2010).** High pressure processing and pulsed electric fields: potential use in probiotic dairy foods processing. *Trends in Food Science and Technology* pp: 1-11.

**De Felip G. Croci L. Gizzarelli S (1977).** Ricerche su alcune idrolasi e vitamine del gruppo B nello yogurt in relazione al trattamento termico. *Ig Mod* 70. 288-297.

**De Varies W. et Stouthamer A.H. (1968).** Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol and xylose by bifidobacteria. *Journal of Bacteriology*, 96(2) :472-478.

**De Vreese LP., Neri M., Fioravanti M., Belloi L., & Zanetti O. (2001).** Memory rehabilitation in Alzheimer's disease: A review of progress. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 16, 794-809.

**De Vries W., Gerbrandy S J. and Stouthamer A H. (1967).** Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 136 :415-425.

**Deeth H.C et Tamime, A.Y. (1981).** Yogurt: Nutritive and therapeutic aspects. *Journal of Food Protection*. 44(1): 78-86.

**Deguchi Y., Morishita T. and Mutai M. (1985).** Comparative studies on synthesis of water soluble vitamins among human species of bifidobacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49 :13-19.

**Dehnert J. (1957).** Enquêtes sur la flore mammaire Gram positive des enfants du lait maternel. *Zentrabl. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg, Abt, I Orig., Série A*, 169: 66-79.

**Delcenserie V., China B., Gavini F., Beerens H. et 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.

**Delgado S., Florez A.B. and Mayo B. (2005).** Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Curr. Microbiol.*, 50 : 202-207.

**Dellaglio F., De Rossart H., Torriani S., Curik M. & Janssens D. (1994).** Caractérisation générale des bactéries lactiques. Techniques et Documentation. Lorica (Ed.), 1 : 25- 116.

**Dial E J and Lichtenberger L M. (2002).** Effect of laetolerrin on *Helicobacter felidis* induced gastritis. *Biochem Cell Biol.*, 80(1) pp: 113-117.

**Dong X., Xin Y., Jian W., Liu X. and Ling D. (2000).** *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *Int. J. Syst. Evol Microbiol.* 50Pt 1 :119-25.

**Draser BS., Shiner M., McLeod GM. (1969).** Studies on the intestinal flora. I. The bacterial flora of the gastrointestinal tract in healthy and achlorhydric persons. *Gastroenterology*, 56:71-79.

**Drouault S., Corthier G., Ehrlich DS ET Renault P. (1999).** Survival physiology and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 4881-4886.

**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.

**Dupin H (1992).** Apports nutritionnels conseillés pour la population française. In: Tech & Doc. Lavoisier, Paris, France. Édition, Tec et Doc, Lavoisier, 2 p.

## E

**Euzéby J P. (2007).** List of prokaryotic names with standing in nomenclatures, list of genera included in families. Update :September 04, 2007.

## F

**FAO /OMS. (2001).** Report of a joint FAO/OMS Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional properties of Probiotics in food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Cordoba, ARGENTINE

**FAO/OMS. (2002).** Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS). Working Group Report. London, Ontario, Canada.

**Fava F, Lovegrove JA, Gitau R. (2006).** The gut microbiota and lipid metabolism: implications for human, health and coronary heart disease. *Curr Med Chem* 13: 3004-3021.  
Fermented milks. *J.Dairy Res.*50 (3): 375.

**Fogh J., Fogh JM., Orfeo T. (1977).** One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer. Inst.* 59: 221–226.

**Fuller,R.(1989).** Probiotics in man and animals. *JAppl Bacteriol.*66(5),365-378.

## G

**Gardiner G., O’Sullivan E., Kelly J., Auty MAE., Fitzgerald GF., Collins JK., Ross RP., and Stanton C. (2000).** Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salvarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2605-2616.

**Gill,HS. (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.

**Goktepe I., Juneja VK., and Ahmedna M. (2006).** Probiotics in food safety and human health. Boca Raton, FL: Taylor and Francis group: 494.

**Gu C. G. M., Hornberger J. S., Herman and A. L. Mills .(2008).** Effect of freshets on the flux of groundwater nitrate through streambed sediments, *Water Resour. Res.*, 44, W05415, doi:10.1029/2007WR006488.

**Guarneu F., Khan AG., Garisch J., Eliakim R., Gangal A., Thomson A., Krabshuis J., et LE MAIR T. (2008).** Recommandation que: Probiotiques et Prébiotiques. WGO Practice Guidelines. 3.

**Gueimonde M., and Salminen S. (2006).**New methods for selecting and evaluating probiotics. *Dig Liver Dis.* 38: S242-S247.

**Guillaume P.Y. (2004).** La microbiologie : les tests enzymatiques, antibiotiques et immunologiques, (en ligne).Lyon, France. Disponible sur :

**Guiraud JP, (2003).** Microbiologie Alimentaire. Agro-alimentaire. Edition : Dunod. Paris,

**Gyorgy P., Jeanloz R.W., Von Nicolai H., et Zilliken F. (1974).** *eur. j. bioch.* 29-43.

## H

**Hadadji M. (2007).** Caractérisation technologique des bifidobactéries à thérapeutiques. Thèse de doctorat d'état. Université d'Oran. Algérie. 173p.

**Hadadji M., Benaama R., Saidi N., Henni D. E. and Kihal M. (2005).** Identification of cultivable *Bifidobacterium* species isolated from breast-fed infants feces in west-Algeria. *African journal of biotechnology* vol. 4(5) :422-430.

**Hansen E.B. (2002).** Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int.J,Food Microbiol.*78: 119-131; Leroy F. et De Vuyst L., (2004).Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentationindustry. *Trends Food Science and Technology*, 15:67–7.

**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.

**Hidvegi E, Arato A, Cserhati E, Hovath C, Szabo A .(2003).** Slight decrease In bone mineralization in cow milk sensitive children. *Journal pediatric gastroenlogy nutrition.*36:449.

**Hollande D F. (1920).** Generic index of the commoner forms of bacteria. *J. Bacteriol.*, 5 (215-22).

**Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth, Schillinger U. (2001).**Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 365–37.

**Holzapfel W. H. (2002).** Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 75, pp. 197– 212.

**Hosseini A et coll. (2012).** [Probiotics use to treat irritable bowel syndrome](#). *Expert. Opin. Biol. Ther*; 12(10):1323-1334.

**Hoyles L., Inganas E., Falsen E., Drancourt M., Weiss N., McCartney A.L. and Collins M.D. (2002).***Bifidobacterium scardovii* sp. Nov., from human sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52 :995-999.

<http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/testsmicrobiologie2.htm>.

## I

**ian W., Zhu L. and Dong X. (2001).** New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51 :1633-1638.

**Izquierdo Alegre,E. (2009).** Les proteines bactériennes en tant que biomarqueur de l’activité probiotique. Thèse de doctorat en chimie Analytique, Strasbourg.

## J

**Jayamanne V.S., & Adams M.R. (2006).**Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bioyoghurts. *Letters in Applied Microbiology*, 42 : 189-194.

**Jeantet R., Croguenc T., Mahaut M., Shuck P., Brule G. (2008).**Les produits Laitiers 2eme ed. Ed. Tec & Doc. Paris. pp. 22-32.

**Jones, (2004).** Melle BOUCHEFRA Amina. Yaourts probiotiques algériens et ferments commerciaux utilisés dans leur fabrication : contrôle de qualité et de l'étiquetage.

**Journal officiel de la république algérienne. (2004).** Arrêté du 4 Rabie Ethani 1425 Correspondant au 24 mai 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des microorganismes caractéristiques par une technique de comptage des colonies à 37 °C.

## K

**Kalliomaki M., Salminen S., Arvilommi HK.ero.p., koskinin P., and Isolauri E. (2001).** Probiotic in primary prevention of atopic disease: A symbiotic placebo controlled trial. *Lancet*, 357 pp;1076-1079.

**klaenhammer T R. (2000).** Probiotic Bacteria : Today and Tomorrow. *Journal of nutrition* (130).pp.415S-416S.

**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 chaine de production du lait local a Abidjan. Thèse de doctorat, Université Nangui Abrogoua.

**Kovacs N.(1928).** Eine vereinfachte methode zum nachweis der indolbihdungdurch bakterien. *Z. Immunitats. Frosch. Exp. Ther* . 55 :311-315.

## L

**Labell F.(1989).** Yogurt cultures offer health benefits (1989). *Biotechnology to transform the yogurt of the future. Food Processing*. 50: 130-138.

**Labioui H., Elmoualdi L., yachioui M., Ouhssine M. (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull.Sac,Pharm. Bardeaux*.pp.237-250

**Lamoureux,L .(2000).** Exploitation de l'activité  $\beta$ -galactosidase de cultures de bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides. *National Library of Canda*.23-47

**Larpent J. P., e Llarpent MG. (1990).** Méthode de technique de microbiologie. *Second Ed. Technique et Documentaire Lavoisier*. 417p.

**Lauer E. and Kandler O. (1976).** Mechanismus der Variation der Verhältnisses Acetal VLactat bei der Verqarunq von Glucose durch Bifidobakterien. *Arch Mikrobiol*, 10 :271-277.

**Lehmann K B.and Neumann R. (1927)..** Bactériologie, en particulier bactériologie Diagnostics, chapitre 7. Bactériologie générale et spéciale, vol. 2

**Leveau, J.Y. et BOUIX, M. (1993).** Les levures. Dans : Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel. Eds.Tech. et Doc. Lavoisier. Paris, pp : 2-39.

**Liong MT. and Shah N P. (2005).**Bile salt deconjugation and BSH activity of five bifidobacterial strains and their cholesterol co precipitating properties. *Food Research International* 38:135-142.

**Loones A. (1994).** Laits fermentés par les bactéries lactiques. In Bactéries lactiques. pp.37-151.ed. De Roissart, H. et Luquet,F.M ,II ,Lorica,paris.

## M

**Mahaut M., Jeantet R., Brulé G. & Schuck P. (2000).** Les produits industriels laitiers. Techniques et documentation. Lavoisier (Ed.), Paris. 26-40.

**Mahmoudi Fatima, Hadadji miloud, Guessas Bettache and Kihel Mebrouk. (2013).** Identification and physiological Properties of Bifidobacterium Strains Isolated From Different Origin. *Journal of Food Science Engineering* 3(2013) : 196-206.

**Mangin I., Bourget N. and Decaris B. (1996).** Ribosomal DNA polymorphism in the genus *Bifidobacterium*. *Res.Microbiol.*, 147 :183-192.

**Marchal N., Bourdon J. L., et Richard C.L. (1991).** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Ed.Doin. P.* 65-149.

**Marshall V.M.E. (1987).** Lactic acid bacteria: starters for flavor, *FEMS Microbiology Review*, 46, 327.

**Marshall VM., Cole W.M. (1983).** Threonine aldolase and alcohol dehydrogenase

**Marteanu P. B., Flourie P., Pochart C., Chastang JF., Desjeux and JC., 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. 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. R., De Vrese Mo, Cellier C. Jo, and Schrezenmeir J., (2001).** Protection from gastrointestinal Diseases with the use of probiotics. *Am. J. Clin. Nutri.* ,73,430-436.
- 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.
- Marteau, P,R,De Vrese Mo, Cellier C. Jo, and Schrezenmeir J.(2001).** Protection from gastrointestinal Diseases with the use of probiotics. *Am. J. Clin. Nutri.* ,37, 430-436.
- Martin J.H., et Chou K.M. (1992).** Selection des bidicobacteria for use as Dietary adjuncts in cultured dairy food : I-Tolerance to pH of yaghurt Cultured. *Dairy productJ* 27(4) : 21-26.
- Marty-Teyssset C., De La Torre F. & Garel J.R. (2000).** Increased production of hydrogen peroxyde by lactobacillus delbruekii ssp bulgaricus upon aeration: involvement. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (1), 262-267.
- Masco L., Ventura M., Zink R., Huys G. and Swings 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* subsp .nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54 :1137-1143.
- 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., and Benno Y. (2004).** H<sup>+</sup>-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *Internationnal Journal of Food Microbiology* 93(1) :109-113.
- Mattarelli P. and Biavati B. (2014).** The genera *Bifidobacterium*, *Parascardovia* and *Scardovia*. *Lactis Acid Bacteria, biodiversity and taxonomy.* John Wiley & Sons, Ltd, The Atrium Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, UK : 510-541.

**Meile L., Ludwig W., Rueger U., Gut C., Kaufmann P., Dasen G., Wenger S. and Teuber M. (1997).** *Bifidobacterium lactis* sp.nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *System. Appl. Microbiol.*, 20 :57-64.

**Melton, L.J. Crowson,CS, O'Fallon,WM, Wahner, HW and Riggs, BL. (2003).** Relative contributions of bone density, bone turnover and clinical Risk factors to long-term fracture prediction. *Journal Bone and Mineral Research*.18:p312-318.

**Millette M., Luquet F.M. et Ruiz M.T. (2008).** Characterization of probiotic properties of Lactobacillus strains, *Dairy Sci. Technol.* 88: 695-705.

**Mitsuoka T. and Kaneuchi C. (1977).** Ecology of the bifidobacteria. *Am J Clin Nutr* 30 :1799-1810.

**Miyake T., Watanabe K., Watanabe T. and Oyiazu H. (1998).** Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16SrDNA sequences. *Microbiol. Immunol.*, 42 :661-667.

**Modler, H.W. (1994).** Bifidogenic Factors-Sources, Metabolism and Application. *Int. Dairy J.*, 4 :383-407.

**Moubareck C., Gavini F., Vaugien L., Butel M.J. and Doucet-Populaire F. (2005).** Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 55 : 38-44.

## N

**Naiimi,S. (2014)** .maitrise microbiologie agroalimentaire.

**Nannizzi R. (1934).** Répertoire systématique des infections fongiques humaines et animales. Pollacci G. (ed), Section de la Mytopathologie Humaine (Sienna) 4: 13.

**Nousiainen J.,Javanainen P., Setala J. et Wright A.V.(2004).**Lactic acid bacteria as animal probiotics. In: Lactic acid bacteria: microbiological and lactic acid bacteria as animal probiotics. In: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V.et Ouwehand A.).3eEd, Marel ,Dekker.Inc, NewYork.547-560.

## O

**Olsen E. (1949).** Studies on the intestinal flora of infants. *Ejnar Munksgaard*, Copenhagen.

**Orla-Jensen. (1919), Rogosa & Hansen.(1971). Weiss et al.,(1984)**  
<https://doi.org/10.1601/nm.5322>

Orla-Jensen.(1919). Classification de *Streptococcus thermophilus* :  
<http://dictionnaire.sensagent.leparisien.fr/Streptococcus%20thermophilus/fr-fr/>

**Orla-Jenson, S. (1924).** « La classification des bactéries lactiques. ». Lait 4(468 474).

## P

**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.

**Percival M. (1997).**Choosing a probiotic supplement Clin,Nutr,Insights. 6(1):9-100.

**Pereira D I A. and Gibson GR. (2002).**Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 37:259-281.

**Pinto M., Robine-Leon S., Appay MD., Kedinger M., Triadou N., Dussaulx E., Lacroix B., Simon-Assmann P., Haffen K., Fogh J., Zweibaum A. (1983).** Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. Biol. Cell. 47:323–330.

**Piquet M.-A, R. Gloro, A.-M. Justum , J.-M. Reimund .(2007).**Les probiotiques, des outils thérapeutiques pour moduler les effets biologiques de la flore intestinale : une introduction. Springer Obes . 2: 227–233.  
pp291.

**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 :247-262.

**Pribram E. (1929).** A contribution to the classification of microorganisms. *J. Bacteriol.*, 18(361-394).

**Puntonin V. (1937).** Sur les relations entre *b. bifido gali actinomiceti anaerobi typi* Wolff. Ann. Ig. Sper., 24: 157-168.

## R

**Rasic J, Curcic R, Stojsavljevic T, Obradovic B (1971).** A study on the amino acids of yoghurt. *Milchwissenschaft* 26:496-499.

**Rasic JL j. et Kurmann JA. (1983).** Bifidobacteria and their role. Microbiological, nutritional physiological, medical and technological aspects and bibliography. Birkhauser Verlag, Basel, Suisse.

**Rautava S., Kirjavainen P. and Salminen S. (2002).** Role of probiotics in food hypersensitivity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 2 pp: 263-271.

**Reuter G. (1963).** Études comparatives sur la flore bifidus chez les nourrissons et les adultes. *Centralbl. Bacteriol. Parasitenk. Hyg. Dept. Orig.*, 191: 486-507.

**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.

**Roberfroid MB (2000).** Prebiotics and probiotics: are they functional foods. *Am J Clin Nutr* 71(suppl): S16-S27.

**Rogosa M. (1974).** Genus III, *Bifidobacterium* Orla-Jensen. In :Buchanan R.E., Gibbons N.E., eds, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edn., Williams & Wilkins, Baltimore, pp.669-676.

**Roissart H., Luquet F.M. Ed. Lorica. Paris**

**Romain J, Thomas C, Michel M, Pierre S, Gérard B. (2008).** Les produits laitiers, 2ème

**Romond M.B., et Romond C. (1990).** Bifidobactéries et facteurs bifidogènes : rôle en santé humaine. *Actualité de recherche. ARBBAID 2*, Nancy. 87-92.

**Rousseau M. (2005).** La fabrication du yaourt, les connaissances. INRA.

**Roy D. (2011).** Comprehensive Biotechnology (Second Edition), Volume 4, 91-602.

## S

**Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J. and Mattila-Sandholm T. (2000).** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol.* 84: 197-215.

**Scardovi V. (1986).** Genus *Bifidobacterium*. In Bergey's Manuel of systematic Bcateriology, Vol.2 ed. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. pp. 1418-1434. Baltimore, MD : Williams and Wilkins.

**Scardovi V. and Crociani F. (1974).***Bifidobacterium catenulatum, Bifidobacterium dentium,* and *Bifidobacterium angulatum* : three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24 :6-20.

**Scardovi V. and Trovatelli L D. (1965).** The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*.*Ann. Microbiol. Enzimol.* , 15 :19-29.

**Scardovi V., (1986).** Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen, 1924, 472.In : Bergey's Manuel of systematic Bacteriology, IXs Edition. William and Wilkins. Baltimore.

**Scardovi V., Zani G. and Trovatelli L D. (1970).** Deoxyribonucleic acid homology among the species of the genus *Bifidobacterium* isolated from animals. *Arch. Mikrobiol.*, 72 :318-325.

**Schaafsma G., Meuling W.J.A., Van Dokkum.W. Et Bouley C. (1998).** Effects of a milk product, fermented by *Lactobacillus acidophilus* and with fructooligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition.* 52(6): 436-440.

**SchmidtJ.L., Tourneur C. & Lenoir J. (1994).** Fonction et choix des bactéries lactiques laitières. In bactéries lactiques. pp. 37-46. ed. De Roissart, H. et Luquet, F.M., II, Lorica,

**Seppo Salminen, Atte Vonne Wright, Arthur Ouwehand. (2004).** Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects, *Third Edition, Revised and Expanded.*

**Servin AL., Coconnier MH. (2003).** Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens.*Best, Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17(5): 741-754.

- Sgorbati B., Scardovi V. and Leblanc D.J. (1982).** Plasmid in the genus *Bifidobacterium*. *J. Gen. Microbiol.* 128 : 2121-2131.
- 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.
- Shah N.P. and Lankaputhra W.E.V. (2002).** *Bifidobacterium* spp. Morphology and Physiology. *Elsevier Sci. Ltd*, 141-146.
- Simons LA, Amansec SG, Conway P (2006).** Effect of *Lactobacillus fermentum* on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16: 531-535.
- Simpson P J., Stanton C., Fitzgerald G F. and Rosse R P. (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.
- Simpson P.J., Rosse R.P., Fitzgerald G.F. and Stanton C. (2004).** *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54 :401-406.
- Simpson P.J., Stanton C., Fitzgerald G.F. and Ross R.P. (2003).** Genomic diversity and relatedness of bifidobacteria isolated from a porcine cecum. *J. Bacteriol.* 185 :2571-2581.
- Singh SudheerK., Ahmed Syed U. & Ashkor P. (2006).** Yogurt science and technology, 2nd Ed. Cambridge, woodhead Publishing.
- Siuta-Cruce P. and Goulet J. (2001).** Improving probiotic survival rates, *Food Technology*, 55(10): 36–42.
- Stackebrandt E., Rainey F A. and Ward-Rainey N L. (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47 :4479-4491.
- Sutra L., Federighi M. et Jouve J L. (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire. Ed : POLYTECHNICA, Paris, 308(6) : 31-249.
- Syndifrais Mission scientifique (1997).** Yaourts, laits fermentés, *Lait* 77, 321-358.
- 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.

## T

**Talwalker A. and Kailasapathy K. (2003).** Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen. *Journal of Dairy Science* 86(8) :2537-2546.

**Tamime A. Y. & Robinson R.K. (1985).** Background to manufacturing practice. In *Yoghurt Science and technology*. pp.7-90. Ed. Tamime, A.Y ET Robinson, R.K., Pergamon Press, Paris.

**Tamime A.Y. & Robinson R.K. (1999).** *Yogurt science and technology*, 2nd Ed. Cambridge , woodhead Publishing.

**Tamime A.Y. & Deeth H.C. (1980).** Yoghurt: technology and biochemistry. *Journal of Food Protection*, 43 (12), 939-977.

**Tamura Z. (1983).** Nutriology of bifidobacteria. *Bifidobacteria and Microflora.*, 2(1) :3-16.

**Tissier H. (1990).** Recherches sur la flore intestinales des nourrissons (Etat normal et pathologique). Paris, université de Paris : 253.

**Titiek FD., Endang SR., Djoko W., Slamet S. (1996).** Antimicrobial substance produced by lactobacillus sp. TGR-2 isolated from Growol. *Indonesian, Food Nutrition Prog* 3: 29-34.

**Toba, T., Tomita, Y., Itoh, T. et Adachi, S. (1981).** B-galactosidase of lactic acid bacteria: Characterization by oligosaccharides formed during hydrolysis of lactose. *Journal of Dairy Science*. 64(2): 185-192.

**Trojanova I., Vlkova E., Rada V. and Marounek M. (2006).** Different utilization of glucose and raffinose in *Bifidobacterium breve* and *Bifidobacterium animalis*. *Folia Microbiol.*, 51(4) :230-324.

## V

**Vasiljevic T & Shah N. P. (2008).** Probiotics from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18(7), 714-728. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.004>.

**Ventura M., O'Connell-Motherway M., Leahy S., Moreno-Munoz J A., Fitzgerald G F. and Van Sinderen D. (2007).** From bacteria genome to functionality ; case bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 120 :2-12.

**Ventura Marco., Douwe vab Sinderen., Gerald Fitzgerald., and Ralf Zink. (2004).** Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86 : 205-223.

**Vesterlund S., Paltta J., Karp M., Ouwehand AC. (2005).** Measurement of bacterial adhesion: in vitro evaluation of different methods. *J. Microbiol.Meth.* 60: 225-233;  
Gueimonde M, and Salminen, S. (2006).New methods for selecting and evaluating probiotics. *Dig Liver Dis.* 38: S242-S247.

**Vidal-Valverde C, Martin-Villa C, Herranz j (1984).**determination of soluble carbohydrates in yogurts by high performance liquid chromatography. *J Dairy Sci* 67:759-763.

**Vignola C. I. (2002).** Science et technologie du lait : transformation du lait. Lavoisier (Ed.), Paris.

**Vuillemin P. (1931).** Les champions parasites et les mycoses de l'homme. Lechevalier, Paris.

## W

**Wang M F., Lin HC., Wang YY and Hsu CH. (2004).**Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria *Paed. Aller. Immun.*, 15 pp: 152-158.

## Y

**Yaeshima T., Fujisawa T. and Mitsuoka T. (1992).***Bifidobacterium globosum*, subjective synonym of *Bifidobacterium pseudolongum*, and description of *Bifidobacterium pseudolongum* ssp. *Pseudolongum* comb. Nov and *Bifidobacterium pseudolongum* subs. *Globosum* comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 15 :380-385.

**Yoshika Y. (1971).** Growth responses of bifidobacteria.

## Z

**ZubillagaM., Weill R., Postaire E., Goldman C., Caro R. and Boccio JB.(2001).**Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases.*Nutr. Res*, 21 pp: 569-579.

# Annexes

## Annexes

**Annexe 1 :** Composition du milieu d'isolement.

### Milieu MRS (De Man Rogosa et Sharpe, 1960) (Bouillon et gélose)

Polypeptone .....	10g
Extrait de levure .....	4g
Extrait de viande .....	8g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate de sodium.....	2g
Glucose .....	20g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O.....	0,05g
Tween 80.....	1 ml
Eau distillée.....	1000 ml
Agar (dans le cas de la gélose).....	20g

Avec un pH de 6.8 + 0,5 % Chlohydrate de cystéine

Autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.

**Annexe 2 :** Composition des milieux de culture pour les souches pathogènes.

### La gélose nutritive (GN)

Extrait de levure.....	2g
Extrait de viande.....	1g
Peptone .....	5g
NaCl .....	5g
Agar .....	15g
Eau distillée .....	1000 ml

Avec un pH de 7.4

Autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.

**Annexe 3** : Composition de milieu de culture pour l'étude de l'activité antibactérienne.

**Milieu Hektoen**

Peptone.....	12g
Extrait de levure.....	3g
NaCl.....	5g
Sels biliaires.....	9g
Thiosulfate de sodium.....	5g
Citrate de fer ammoniacal.....	1,5g
Lactose.....	12g
Salicine.....	2g
Saccharose.....	12g
BBT.....	0.002g
Fuchsine acide.....	0,1g
Agar.....	14g
Eau distillée.....	1000 ml

Avec un pH de 7,5

Autoclavage à 120° C pendant 20 minutes

**Annexe 4** : Composition des milieux utilisés pour l'identification biochimique.

**Eau péptonée exempte d'indole**

Peptone exempte d'indole.....	10g
Chlorure de sodium.....	5g
Eau distillée.....	1000ml

pH = 7,2

Autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes

### Milieu T.S.I (Triple Sugar Iron)

Peptone.....	20g
Extrait de viande.....	3g
Extrait de levure.....	3g
Glucose.....	1g
Lactose.....	10g
Saccharose.....	10g
NaCl.....	5g
Citrate ferrique.....	0,3g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	0,3g
Rouge de phénol.....	0,025g
Agar.....	12g
Eau distillée.....	1000 ml

pH = 7,4

Autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes

### Réactif de Kovacs

P-diméthylamino-benzaldéhyde.....	5g
Alcool iso-amylque.....	75 ml
Acide chlorhydrique pur.....	25 ml

### Annexe 5 :

- **Etapas de la coloration de Gram**

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de cristal ; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par une solution de Lugol, et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec de l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique : la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 2 à 3 secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à

l'eau courante. A ce stade les cellules Gram – seront incolores, les cellules Gram + violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la fushine pour colorer les cellules Gram – présentes. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif à immersion (grossissement X100) (Singleton, 1999).

Cette coloration permet la distinction de deux majeurs groupes 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).

- **Composition des colorants de la coloration de Gram**

**fushine**

Fushine basique.....	1g
Alcool éthylique à 90%.....	10 ml
Phénol.....	5g
Eau distillée.....	100 ml

**Lugol**

Iode.....	1g
Iodure de potassium.....	2g
Eau distillée.....	300 ml

**Violet de gentiane**

Violet de gentiane.....	1g
Ethanol à 90%.....	10 ml
Phénol.....	2g
Eau distillée.....	100 ml

**Etude *in vitro* de quelques propriétés probiotiques de souches de bifidobactéries utilisées dans la fabrication d'un yaourt commercialisé en Algérie.**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Ecologie Microbienne.

**Résumé**

Depuis quelques années, les produits laitiers contenant des bactéries probiotiques ont connus un gain de popularité auprès des consommateurs. Ces produits probiotiques contiennent des souches spécifiques de bactéries vivantes telles que les bifidobactéries possédant des effets potentiellement favorables sur la santé.

Dans cette optique, notre étude a pour but d'évaluer quelques activités probiotiques *in vitro* de souches de bifidobactéries isolées à partir d'un yaourt commercialisé en Algérie.

Une seule souche de bifidobactérie a été isolée du yaourt probiotique « Activia actiregularis » (aromatisé) sur milieu sélectif le MRS cystéine gélosé.

L'identification basée sur l'étude des caractères morphologiques et biochimiques a permis de rattacher la souche isolée au genre *Bifidobacterium*.

Le résultat du test de la sensibilité de la souche isolée aux antibiotiques a montré une résistance à l'Acide Nalidixique et une sensibilité à quelques antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines : la Vancomycine, la Pénicilline et la Gentamicine. Ce résultat est probablement une caractéristique de l'espèce *Bifidobacterium lactis* (mentionnée sur l'étiquetage du pot de yaourt), utilisée dans la fabrication du yaourt retenu pour cette étude.

L'étude *in vitro* de certaines propriétés probiotiques de l'espèce *Bifidobacterium lactis* (BB12) isolée, nous a permis de constater que cette dernière est dotée de propriétés probiotiques souhaitables en termes de résistance à l'acidité et la présence d'activité antimicrobienne.

**Mots clés :** Yaourt probiotique, bifidobactéries, activité antibactérienne, tolérance aux conditions acides de l'estomac.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de microbiologie- UFM Constantine.

Jury d'évaluation :

**Présidente du jury :** MERGOUD L. (M.A.A - UFM Constantine),

**Rapporteur :** BOULTIFAT L. (M.A.A - UFM Constantine),

**Examineur :** MEZIANI M. (M.A.A- UFM Constantine).

**Date de soutenance :** 24/06/2018