

<i>Résumé</i>	<i>i</i>
<i>Abstract</i>	<i>ii</i>
<i>Résumé en Arab</i>	<i>iii</i>
<i>Sommaire</i>	<i>iv</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>vi</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>viii</i>
<i>Abréviations</i>	<i>xi</i>
<i>Introduction</i>	<i>x</i>

Chapitre I: Rappels bibliographique

1. Écosystème gastro-intestinal: composition et evolution.....	5
1.1 Description générale.....	5
1.2 La microflore intestinale.....	5
2. Développement normal de la flore intestinale	5
2.1. Modification de la flore intestinale	10
2.2. Propriété de barrière de la muqueuse en relation avec les pathologies	11
2.3. Microbiote intestinal, évolution au cours du temps	13
3. L'écosystème intestinal de la naissance à l'âge adulte	14
3.1. Facteurs influençant la composition de la flore	14
4.1 Les probiotiques.....	15
4.1.2 Historique de l'utilisation des probiotiques.....	15
4.2 L'intérêt des probiotiques durant l'enfance	17
4.3. Probiotiques / prébiotiques et déséquilibres / dysbioses chez l'adulte.....	18
4.3.1 Les probiotiques et le stress	20
4.3.2 Guide pour l'évaluation des probiotiques en utilisation alimentaire.....	22
4.4 Utilisation clinique des probiotiques	24
4.5 Effets probiotiques des bifidobactéries	25
4.5.1 Les bifidobactéries comme probiotiques	26
4.5.2.1 Activité des bifidobactéries contre les infections entériques	26
4.5.2.2 Le maintien du pH intercellulaire.....	29
5. Caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des bifidobactéries	
5.1.1 Morphologie	29
5.1.2 Structure de la paroi et de la membrane cellulaire des bifidobactéries.....	30
5.2. Physiologies des bifidobacteries.....	32
5.2.1 Température.....	32
5.2.2 L'Oxygène	33
5.2.3 Le pH	33
5.2.4 la sensibilité aux antibiotiques	33
5.3 Les caractéristiques des principales espèces utilisées dans les aliments.....	33
5.4 Les besoins nutritionnels des bifidobacteries	36
5.5 Facteurs Bifidogènes	37

5.6 Facteurs Protéiques	38
7. Biochimie des bifidobacteries	39
7.1 Le Métabolisme.....	39
7.2 Métabolisme des vitamines	41
8. Génétique des bifidobactéries	41
9. Production des substances antimicrobiennes	42
9.1 Effet anti microbien.....	43
9.2 Substances antimicrobiennes des <i>bifidobactéries</i>	43
9.3 Bactériocines	44
9.3.1 La Biologie des bactériocines.....	45
9.3.2 Classification des bactériocines des BAL.....	46
9.3.3 Biosynthèse des bactériocines.....	47
9.3.4 Mode d'action.....	47
9.4 Ecologie des bactériocines.....	48
9.5 Effets immuno –modulateurs.....	49
9.6 Effet anti cancérogènes.....	50
9.7 Diminution du taux de cholestérol	50
9.8 Les bifidobactéries en tant qu'agents aromatisants.....	51
10. Pouvoir pathogène.....	52

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Conditions des cultures	54
1.2 L'échantillonnage.....	54
1.3 L'origine de l'échantillon.....	54
2. Milieux de Cultures.....	54
2.1. Milieux de cultures pour les bifidobactéries	54
2.2. Milieux de culture pour les souches pathogènes	55
3. L'isolement et purification des bifidobactéries.....	55
3.1 Pré-identification des souches.....	55
3.2 Recherche de type fermentaire.....	56
4. Tests enzymatiques.....	56
4.1 Test du nitrate réductase	56
4.2 Test de la gélatinase, test de production d'indole et test d'uréase.....	56
4.3 Recherche du citrate perméase sur milieu Kempler et Mc Kay	57
4.4 Test de croissance sur bile	57
4.5 Test thermorésistance	57
4.6 Test de croissance en milieu hypersalé.....	57
5. Influence de certains facteurs exogènes sur la croissance des souches bifidobactéries	58
5.1 Influence du pH.....	58
5.2 Influence de la température d'incubation	58
6. Test de croissance en aérobiose.....	58
7. l'antibiogramme.....	58
8. Détermination de l'espèce.....	59
9. Conservation des souches.....	59

10. Aptitude technologique des bifidobactéries.....	60
10.1 Etude de la cinétique de croissance.....	60
10.2 Détermination de l'acidité titrable.....	60
10.3 Préparation de lait reconstitué écrémé.....	61
10.4 Préparation d'inoculum.....	61
10.5 Inoculum des bifidobactéries.....	61
10.6 Détermination du taux de croissance de bifidobactérie.....	61
10.7 Détermination du pH au cours de la fermentation.....	61
12. Antagonisme <i>in vitro</i>	61
12.1 Provenance des souches.....	62
12.1.1 Recherche des interactions entre les différentes espèces de <i>Bifidobacterium</i> et de les entéropathogènes.....	62
12.1.2 Méthode directe.....	62
12.1.3 Méthode indirecte.....	62
12.2 Recherche sur la nature de l'agent inhibiteur.....	63
12.2.1 inhibition due aux acides.....	63
12.2.2 inhibition due au peroxyde d'hydrogène.....	63
12.3.1 recherche de la nature protéique de la substance antimicrobienne.....	63
12.3.2 effet de température.....	63
12.3.3 Recherche de bactériocines.....	63
13. Etude de l'évolution de la cinétique de croissance et de production.....	64
13.1 Détermination de l'acidité titrable.....	64
13.2 Etude de la cinétique de croissance en culture mixte (avec les souches pathogènes).....	65

Chapitre III

1. La flore du rat.....	66
I.1 Etablissement de la flore.....	66
I.2 Animaux et aliments.....	67
I.2.1 Animaux.....	67
I.2.2 Condition d'élevage.....	67
I.2.3 Régimes.....	67
2. Antagonisme <i>in vivo</i>	67
2.1 Les souches testées.....	67
2.2 Préparation du lait.....	68
2.3 Préparation du lait fermenté.....	68
3. Analyses bactériologiques la flore fécale des rats.....	68
3.1 Milieu pour le dénombrement des bifidobactéries.....	68
3.2 Méthode de dénombrement des bactéries.....	68
4. Etude de la flore intestinale après dissection des rats.....	70
4.1 Test histologique - sélection des échantillons.....	70
4.2 Préparation des coupes histologiques.....	70

Chapitre IV : Résultats

1. Pré-Identification des souches.....	72
2. Les différentes caractères biochimiques et physiologiques des souches des bifidobactéries.....	73
2.1 Recherche de type fermentaire.....	75
3. Résistance aux antibiotiques.....	75
4. Effet des facteurs exogènes sur la croissance des souches de <i>Bifidobacterium</i>	77
4.1. Effet du pH.....	77
4.2. Effets de températures.....	78
5. Aptitudes technologiques des bifidobactéries.....	80
5.1 Cinétique de croissance des cultures pures dans le lait écrémé	80
6. Antagonisme <i>in vitro</i>	81
6.1 Recherche de la nature de l'agent inhibiteur.....	81
6.1.1 l'inhibition due aux acides organiques	81
Inhibition de la souche <i>Salmonella.sp</i>	82
Inhibition de la souche <i>Enterobacter claoqui 335</i>	82
6. 1.2 inhibition due au peroxyde d'hydrogène.....	82
7. Recherche de la nature protéique de la substance antimicrobienne.....	83
7.1 Action des enzymes protéolytiques sur l'activité de la bactériocine issue de la souche....	83
7.2 Effet de la température de bactériocine	84
8. Recherche de bactériocines	84
9. L'étude de la cinétique de croissance en culture mixte (avec des souches pathogènes).....	85
10. Effets antagonisme	87
10.1. Antagonisme <i>in vitro</i>	87
10.2. Antagonisme <i>in vivo</i>	89
10.2.1 Etude macroscopique.....	89
10.2.2 Etude microscopique.....	90
Discussion	94
Conclusion générale et perspectives	103
Références bibliographique	
<i>Annexe</i>	
Publication scientifique	
Communication	

Liste des tableaux :

Tableau 01: Études cliniques concernant l'efficacité de souches probiotiques commerciales lors d'infections entériques, p 24.

Tableau 02 : représente les espèces connues de bifidobactéries et leur habitat, p 31.

Tableau 03 : La distribution des différentes espèces de *Bifidobacterium* dans le tractus digestif de l'homme en fonction de l'âge, p 32.

Tableau 04: les niveaux Quantitative et Incidence de Predominance des *Bifidobacterium* Species dans la microflore entérique des enfants et leurs mères ($M \pm m$), p 32.

Tableau 05: profile fermentaire des différentes espèces de *Bifidobactérium* (Scardovi, 1986), p 35.

Tableau 06 : les références des souches cibles, p 61

Tableau 07: les différents caractères biochimiques et physiologiques des souches des bifidobactéries ; (Bbf1, fB2, B3, BV, B4, et RBL8), p 73

Tableau 08 : l'antibiogramme des six souches de *Bifidobactérium* isolés à partir des différentes origines, p 75

Tableau 09 : Spectre d'activité antimicrobienne des souches de *Bifidobactérium* par la méthode de diffusion des puits sur MRS pH (6,8) par la méthode indirecte (en mm), p 81

Tableau 10: présente l'action des enzymes protéolytiques sur l'activité de la bactériocine issue de la souche, avec Bbf1 et B3 avec 02 bactéries enteropathogenes (*S.aureus* ATCC 29213 et *E.Coli* ATCC 8739 respectivement), P 83

Tableau 11 : récapitulatif résumé l'activité de souches étudiées, p 84

Tableau 12 : Détermination de la thermorésistance de la bactériocine issue de la souche *B.bifidum* (Bf1), p 84

La liste des figures

Figure 1 : le microbiote intestinal au fil du tractus digestif, p10

Figure 2 : la flore fécale cultivable, p11

Figure 3 : Changement du microbiote intestinal en fonction de l'âge, p13.

Figure 4 : Principales espèces utilisées comme probiotiques et exemples des souches commercialisées. Source photos Scimat, p17

Figure 5 : Guide pour l'évaluation des probiotiques en utilisation alimentaire, p 23

Figure 6 : Résumé des effets sur la santé des probiotiques, p 25

Figure 7 : Souche de *B.longum* observé par un Microscopie électronique à balayage, p 29

Figure 8 : Modèle pariétal d'une bactérie Gram positive, p 31

Figure 9: schéma général de la voie bifide F6PPK (Bifid-Shunt), p 40

Figure 10 : schéma de la production des acides aminés à partir de la voie bifide F6PPK, p 40

Figure 11: arbre phylogénétique des bifidobactéries et *Gardnerilla vaginalis* obtenue par l'analyse du gène codant pour L'ARN ribosomal 16S, p 42

Figure 12 : Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique à deux peptides (Lacticine), p 46

Figure 13 : Vue schématique d'un possible système de production d'une bactériocine : système de régulation à trois composants, synthèse, maturation et immunité, P 47

Figure 14 : Mode d'action des bactériocines des bactéries lactiques, P 48

Figure 15 : Vue d'ensemble des applications potentielles des bactériocines, p49

Figure 16: Antagonisme *in vivo* de *B. bifidum* envers *E. coli* entéropathogène lors d'un traitement préventif et thérapeutique, p 70

Figure18 : Caractéristiques des colonies (A) et morphologie des cellules (B) après coloration de Gram de *Bifidobacterium (longum, breve et bifidum)* avec Gx100x10, p 73

Figure 19 : Quelques résultats du test de l'étude de la sensibilité des souches *Bifidobacterium* aux antibiotiques, p76

Figure 20: la croissance de *Bifidobacterium bifidum* (Bbf1, BV) , *Bifidobacterium breve* (B2,B4) , *Bifidobacterium longum* (B3, BRL8), dans le milieu MRS à pH 5 (A), pH 6 (B) et pH 8 (C), p 78

Figure 21 : la croissance de *Bifidobacterium bifidum* [Bbf1 ,BV] , *Bifidobacterium breve* (B2,B4) *Bifidobacterium longum* [B3, BRL8], dans milieu MRS à 25°C (A), 30°C (B),37C° (C), et 45C° (D), p 79

Figure 22: cinétique de croissance (A), production d'acidité (B) et évolution de pH (C) de: *Bifidobacterium bifidum* (Bbf1, BV), *Bifidobacterium breve* (B2, B4), *Bifidobacterium longum* (B3, BRL8), dans le lait écémé à 37C°, p 81

Figure 23: Test d'inhibition de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 par les souches *Bifidobacterium*, (a) sur MRS tamponné à pH 7 et (b) sur MRS pH 6,8, P 82

Figure 24: Action de catalase sur l'activité de la peroxyde d'hydrogène issue de la différentes souche de *Bifidobacterium* 03 souches of *Bifidobacterium* avec *E.coli* ATCC 8739 par la méthode de diffusion des puits, p 83

Figure 25 : Représente l'action des enzymes protéolytiques sur l'activité de la bactériocine issue de la souche avec (A) Bbf1 et *S.aureus* ATCC 29213 et (B) B3 avec *E.Coli* ATCC 8739, p 83

Figure 26: (A) la croissance d'*E.coli* ATCC 8739 en presence de bactériocin like produite par la souche B3 and (B) la croissance de *S.aureus* ATCC 29213 en présence de bactériocin like produite Bbf1, p 85

Figure 27 : La croissance de bifidobacteria (Log UFC/ml) (A) , la cinétique d'acidification (B), durant la croissance des souches *Bf.breve*(B2), *Bf.bifidum* (Bbf1), *Bf.longum* (B3) en culture seul et culture mixte et *P.aeruginosa* (ATCC 27853 27853), dans le lait écrémé 37 °C, p 86

Figure 28: la croissance de bifidobacteria (Log UFC/ml) (A) , la cinétique d'acidification (B), durant la croissance des souches (B2), *Bf.bifidum* (Bbf1), *Bf.longum* (B3) en culture seul et culture mixte et *E.coli* ATCC 8739), dans le lait écrémé à 37 °C, p 87.

Figure 29 :la croissance de bifidobacteria (Log UFC/ml) (A) , la cinétique d'acidification (B), durant la croissance des souches *Bf.breve*(B2), *Bf.bifidum* (Bbf1), *Bf.longum* (B3) en culture seul et culture mixte et *S.aureus* ATCC 29213), dans le lait écrémé 37 °C, p 87

Figure 30 : représente l'évolution des comptes fécaux d'*E. coli* au niveau des lots 1, 2 et 3, (A et B), p 88.

Figure 31 : Les observations macroscopiques du lot 1,2 et 3 après dissection à la fin des expériences (après arrêt du traitement), P 90

Figure 32 : Les observations microscopiques de coupes histologiques de l'intestin grêle de rats dans le lot 1 qui présentaient une atrophie intestinale et la dégénérescence de l' muqueuse membrane. (infection aigue), p 91

Figure 33 : Les observations microscopiques de coupes histologiques de l'intestin grêle de rats dans le lot 01, et après la 2ème dissection. (Taille d'image 870x653 µm), (objectif x 10). P 92

Figure 34 : Les observations microscopiques de coupes histologiques de l'intestin grêle de rats dans le lot 2 qui ne présente aucune pathologie. (Taille d'image 870x653 μm), (objectif x 10), p 92

Figure 35 : Les observations microscopiques de coupes histologiques de l'intestin grêle des rats dans le lot 3 qui présentaient une atrophie intestinale et la dégénérescence de la muqueuse membrane, p 92

Figure 36 : Les observations microscopiques de coupes histologiques de l'intestin grêle de rats dans le lot Témoin, P 93.

Abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique.

ADNr /ARNr : ADN ou ARN ribosomal.

ARN: acide ribonucléique.

ATCC : American Type Culture Collection.

ATP : Adénosine Tri Phosphate

B. : *Bifidobacterium*

BCP : Pourpre de bromocrésol

CO₂ : Dioxyde de carbone

DO: densité optique.

F6PPK : Fructose 6 Phosphate phospho kétolase

g : gramme

h: heure

H₂O₂ ; **eau oxygéné**

HCl : chlorure d'hydrogène

i.e : c'est-à-dire.

Ig : Immunoglobuline

IFN : Interferon

IL : Interleukine

kDa : Kilodalton

LDH : le lactate déhydrogénase

G+C : le ratio guanine + cytosine.

Mb : Mega base.

mg : milligramme.

min : minute

ml : millilitre

mM : milli-molaire

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

MRS_c : milieu MRS contient cystéine-chloridrique.

MRS-BCP : milieu MRS additionné de Pourpre de Bromocrésol.

MRSBCP-EV : milieu MRS sans extrait de viande, additionné de Pourpre de Bromocrésol.

NaCl : Chlorure de sodium.

NaOH : hydroxyde de sodium

O₂ : Oxygène

nm: nanomètre.

p : page.

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH: potentiel d'hydrogène

p/v : poids/volume

PM : poids moléculaire

sp. : espèce indéterminée

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

Subsp : sous espèce

UFC : unité formant colonie

UI : Unité Internationale

UV: ultraviolet

μ : micron

μg : microgramme

Vol : volume

% : pour cent.

°C : degré celsius.

°D : degré dornique.

Introduction

L'Homme à l'instar des animaux vit continuellement en association avec la population de microorganismes complexe habitant son tractus gastro-intestinal. L'un des principaux effets bénéfiques émanant de leur alliance est la protection et l'amélioration de la résistance aux maladies infectieuses de l'organisme-hôte. Cependant, la composition de cette flore peut être altérée par divers facteurs alimentaires et environnementaux, qui rendent l'organisme-hôte susceptible aux maladies ou aux désordres digestifs.

Les travaux de Metchnikoff (1907) ont démontré que la consommation d'aliments fermentés permet de rétablir la flore intestinale en générant des effets bénéfiques sur la santé de l'homme et des animaux. Les investigations ont mis en évidence le rôle crucial que jouent la microflore intestinale dans le maintien et l'amélioration de la santé. Certains de ces travaux ont montré que les animaux conventionnels pourvus d'une microflore intestinale complète sont plus résistants aux infections que les animaux axéniques (germ-free) dépourvus de microflore.

En effet, de nombreuses études scientifiques ont rapporté les propriétés prophylactiques et thérapeutiques de certains microorganismes présents dans les aliments fermentés. Ces microorganismes favorables pour la santé de l'homme et de l'animal ont reçu le nom de « Probiotiques ». Ce concept a été développé tout particulièrement après l'émergence, ces dernières décennies, des bactéries résistantes aux antibiotiques et l'intérêt suscité par les agents naturels d'inhibition pour le contrôle des germes pathogènes.

Des études récentes ont montré que la consommation de produits alimentaires enrichis en probiotiques produit plusieurs effets favorables sur l'organisme tels que l'amélioration des mécanismes de la réponse immunitaire, le rétablissement de l'équilibre microbien dans le colon, le traitement de certaines infections intestinales et uro-génitales, la réduction des risques d'allergie, de cancer, d'ulcère, etc.

Les microorganismes probiotiques sélectionnés en alimentation humaine sont représentés essentiellement par les bactéries lactiques, particulièrement celles appartenant au genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Aujourd'hui, ces deux genres bactériens sont largement utilisés dans la fabrication de produits laitiers fermentés. A titre d'exemple, aux États Unis, près de 60 % des yogourts réfrigérés contiennent des cultures probiotiques tels que *Lactobacillus acidophilus* et / ou *Bifidobacterium sp.* La consommation de yogourt dans ce pays est passée de 0.5 à 2 kg/ personne/an (Blum *et al.*, 1999). En Europe, le marché des probiotiques destinés à la consommation humaine a été évalué à près de 12.9 millions \$ US en

2003, ce marché augmente actuellement d'environ de 14 % par an (Anderson, 2004). La perception des propriétés prophylactiques et thérapeutiques des probiotiques est à l'origine de la consommation accrue des produits laitiers fermentés notamment le yogourt. Cependant, l'effet probiotique des bifidobactéries dépend de leur taux de survie non seulement dans les aliments mais également dans le tractus gastro-intestinal (Shah, 2000; Marteau *et al.*, 2003; Gagnon *et al.*, 2004).

La problématique :

Les infections entériques constituent actuellement un des problèmes majeurs dans le domaine de la santé au niveau mondial, pour contrôler ces infections. Des études cliniques récentes ont fourni des évidences sans équivoque que la consommation de certaines souches probiotiques peut être efficace dans la prévention en diminuant l'incidence des diarrhées lors d'infections entériques.

Ce travail aura donc permis d'améliorer nos connaissances sur le rôle des probiotiques dans la prévention des infections entériques et de mieux comprendre les mécanismes impliqués. Toutefois, d'autres travaux *in vivo* ainsi que des études cliniques seront nécessaires afin de compléter la démonstration de l'efficacité des traitements probiotiques. L'utilisation des bifidobactéries à fort potentiel probiotique constituera alors un moyen peu coûteux et sans effet secondaire pour lutter contre les infections entériques chez les populations sensibles telles que les nourrissons, les enfants et les personnes âgées.

De nombreuses études ont été réalisées sur les bactéries utilisées comme probiotiques dans le but de mieux maîtriser leur effets bénéfiques, mais on ne sait pratiquement que peu de leur devenir après ingestion et de leur mécanisme d'action, et la question qui se pose, est ce que les bifidobactéries qui traversent les barrières physiologiques et atteignent le les intestins sont métaboliquement active ? Dans ce contexte, s'inscrit notre étude dont les objectifs visés sont les suivants :

Les objectifs :

Ce travail de doctorat avait pour objectif principal d'évaluer le potentiel de souches de bifidobactéries d'origine humaine à prévenir et à contrôler les infections entériques bactériennes. Pour atteindre cet objectif, nous avons adopté une démarche intégrant :

- Sélection, *in vitro*, des souches de *Bifidobactérium* (résistantes aux barrières physiologiques du tube digestif qui sont représentées par l'acidité corrosive de l'estomac, les sels biliaires et les espèces de la flore intestinale) ;
- Évaluer l'activité *in vitro* des bifidobactéries humaines contre les souches entéropathogène (*E. coli*, *salmonella*,...).
- Etude préliminaire des substances responsables de l'interaction.
- Valider l'effet anti-pathogène de la souche *Bifidobactérium* à l'aide d'un modèle d'infection *in vivo* aux bactéries entéropathogènes, développé chez les rats. Ce modèle a été choisi pour deux raisons :
 - i) l'anatomie du tractus digestif ressemble à celui de l'homme.

ii) Les paramètres suivants : poids, analyse de la prise alimentaire, analyse microbiologique des prélèvements fécaux, suivis avant, pendant et après infection des souris.

Ces modèles sont des approches logiques permettant d'évaluer le rôle qu'ont ces bactéries probiotiques contre des entéro-pathogènes bactériens et viraux. Cette démarche tient compte également des lignes directrices proposées par la FAO/WHO pour l'évaluation des probiotiques et de leurs effets bénéfiques sur la santé. Ainsi, modèle d'infection a été utilisé: à *E. coli*, Cette étude visait également à identifier et caractériser les mécanismes d'action par lesquels les probiotiques peuvent contribuer à la défense antimicrobienne de l'hôte.

L'originalité de ce travail, réside dans l'utilisation des souches de bifidobactéries isolées chez des nouveaux-nés contre des entéro-pathogènes fréquemment en cause chez l'humain. En effet, cette thèse représente l'étude sur l'efficacité de souches de bifidobactéries humaines contre les infections. Les résultats de ce projet de doctorat contribuent de façon significative à l'avancée du rôle positif des bifidobactéries en apportant de nouvelles connaissances sur leur action antimicrobienne contre des entéro-pathogènes et sur leurs mécanismes d'action.

1. Écosystème gastro-intestinal : composition et évolution

1.1 Description générale

Le tractus gastro-intestinal est un écosystème complexe et ouvert aux microorganismes exogènes. De par sa surface totale (muqueuse) estimée à 200-300 m², il représente la plus grande surface du corps en contact avec l'environnement (Holzapfel *et al.*, 1998). L'écosystème gastro-intestinal est généré par une alliance stable entre l'épithélium gastro-intestinal, le système immunitaire et une importante flore microbienne. Ces trois composants sont continuellement liés entre eux et évoluent ensemble en assurant une fonction et une activité normales de l'écosystème. Si l'un des trois composants de l'écosystème est défaillant, l'alliance est altérée et par conséquent diverses pathologies s'y installent (McCracken *et al.*, 2001). La Figure 01 montre les principaux compartiments constituant le tractus gastro-intestinal de l'homme. Les interactions entre les microorganismes et l'hôte peuvent être de trois types: symbiose, commensalisme et pathogénicité (Hooper *et al.*, 2001). L'hôte est protégé contre la microflore intestinale pathogène par les barrières chimiques et physiques formées par l'épithélium gastro-intestinal (Kagnoff *et al.*, 1997).

1.2 La microflore intestinale

Selon la définition d'Isolauri *et al.*, (2002), la flore intestinale normale est une collection complexe et en équilibre de microorganismes qui habitent normalement le tractus gastro-intestinal et remplissant un rôle dans la nutrition, la physiologie et le contrôle du système immunitaire de l'hôte. Après une colonisation complète, la microflore intestinale est considérée comme un organe acquis après la naissance. Il est constitué d'une grande diversité d'espèces microbiennes assurant différentes fonctions pour l'hôte. La microflore du tractus gastro-intestinal a été estimée à près de 10¹³-10¹⁴ cellules microbiennes représentant 400 à 500 espèces et sous espèces. Cette microflore représente environ 10 fois le nombre total de cellules du corps humain (Moore *et al.*, 1974; Bjorksten, 2004).

2. Développement normal de la flore intestinale :

Lorsque la naissance se passe de façon naturelle, le profil de colonisation bactérienne intestinale du nouveau-né est assez stéréotypé. On peut le diviser en 4 phases durant la première année chez l'enfant allaité (Orrhage *et al.*, 1999). Au-delà, le profil bactérien de la flore intestinale se rapproche de celui de l'adulte avec 10¹⁰⁻¹¹ Unités formant colonies (UFC) par gramme de contenu colique.

2.1. Phase 1

Les premières bactéries qui s'installent sont des germes anaérobies facultatifs, notamment des streptocoques, des entérobactéries et des staphylocoques. Peu de germes anaérobies stricts sont trouvés à ce stade. La flore vaginale et surtout fécale de la mère est le déterminant essentiel de la nature des germes rencontrés. L'écologie bactérienne de l'environnement immédiat du lieu de la naissance est également importante. Après 48 heures, le nombre de germes est déjà de l'ordre de 10^4 – 10^6 UFC/ml de contenu intestinal. Cette première phase est indépendante du type d'alimentation de l'enfant, mais certains éléments, comme une antibiothérapie maternelle, peuvent l'influencer.

2.2. Phase 2

Dans les jours qui suivent, la concentration des germes anaérobies stricts (bifidobactéries et lactobacilles) augmente jusqu'à avoisiner 10^9 UFC/ml au dixième jour. Par ailleurs, le profil bactérien se diversifie avec augmentation en nombre d'*Escherichia coli*, *Bacteroides spp.* et pour une moindre part de *Clostridiaes*. Le groupe des staphylocoques diminue parallèlement. Cette deuxième phase est clairement influencée par l'alimentation. Dès la fin de la première semaine, mais surtout à 1 mois de vie, les enfants nourris exclusivement au sein ont un contenu intestinal nettement plus riche en bactéries anaérobies strictes notamment en bifidobactéries et, dans une moindre mesure, en lactobacilles. Ce phénomène est lié à l'existence dans le lait maternel de facteurs dits « bifidogènes ». Parmi les protéines, la lactoferrine et la caséine- κ jouent un rôle particulier. Cette dernière est une protéine soluble hautement glycolysée dont la fraction C-terminale, et surtout les produits de protéolyse, constituent des facteurs très bifidogènes.

La haute teneur en hydrates de carbone est également importante, particulièrement par la présence de monooligosaccharides, de galacto-oligosaccharides, de fucose et d'autres unités glucidiques plus complexes associées au lactose présent en grande concentration. C'est l'ensemble de ces facteurs, complémentaires, qui fait la force bifidogène du lait maternel. Sa haute concentration en lactose ainsi que sa faible teneur en protéines et en phosphates sont probablement les éléments bifidogènes les plus déterminants. Ils concourent au maintien d'un pouvoir tampon faible favorable à la croissance des bifidobactéries. Grâce à leur métabolisme anaérobie strict qui entraîne la formation d'acides lactique et acétique, ces bactéries maintiennent un pH luminal acide, favorisant leur propre développement aux dépens des germes anaérobies facultatifs potentiellement pathogènes. Paradoxalement, des résultats contradictoires ont été publiés quant au pouvoir bifidogène du lait maternel. Cela est lié à des différences de méthodologies, parfois inadéquates, à l'hétérogénéité des populations étudiées

et surtout aux différences de facteurs environnementaux, comme le mode de naissance (voie basse ou césarienne) ou l'hygiène locale.

2.3. Phase 3

La troisième phase démarre avec le début de la diversification alimentaire. Les différences entre l'enfant nourri au sein et celui nourri au lait artificiel s'estompent. Les entérobactéries augmentent en nombre de même que les streptocoques et les *Clostridiae*. La flore anaérobie stricte plus diversifiée augmente également durant cette phase, au profit de variétés microbiennes très spécifiques du côlon (*Fusobacterium*, *Eubacterium*, etc.).

2.4. Phase 4

À la fin de la première année, la composition de la flore intestinale se rapproche de celle de l'adulte. Cette quatrième phase est marquée par la très grande augmentation de la flore anaérobie stricte dans la partie distale du côlon. Des différences peuvent persister entre enfant et adulte. Si la flore intestinale d'enfants provenant de régions éloignées montre des différences, cela tient probablement aux habitudes alimentaires et à l'hygiène. Les différences observées entre les enfants normaux et allergiques, constantes quelle que soit la région, sont en revanche plus intrigantes (Björkstén, 1999). Cela suggère que la flore anaérobie stricte, surtout composée de bifidobactéries et de lactobacilles, et majoritaire chez les enfants non allergiques, soit la mieux à même de contrôler la réponse immunitaire innée du chorion sous-muqueux, étape fondamentale de l'initiation ultérieure de l'immunité adaptative. (Langhendries *et al.*, (2006))

2.1.3 La flore intestinale, son rôle, les méthodes d'études :

Le nombre de cellules bactériennes associées à l'organisme humain est évalué à 10^{14} , recouvrant environ 400 espèces, dépassant ainsi d'environ 10 fois le nombre de cellules eucaryotes. La flore subit des variations importantes quantitatives et qualitatives tout au long du tube digestif. C'est au niveau du côlon que la population est la plus abondante, avec environ 10^{11} bactéries/g de contenu, constitué de façon dominante de genres anaérobies stricts. Les fonctions de la flore sont multiples. Une des fonctions majeures est son rôle métabolique par la fermentation au niveau colique des substrats d'origine endogène ou exogène et non absorbés dans l'intestin grêle (Bernalier *et al.*, 2004). Les métabolites produits à partir de la fermentation des glucides sont principalement des acides gras à chaîne courte (AGCC). Ces métabolites sont en grande partie absorbés et ont des effets physiologiques bénéfiques.

À côté de ce rôle métabolique, la microflore intestinale joue un rôle majeur dans la résistance à la colonisation des bactéries exogènes qu'elles soient à potentialité pathogène ou non. Cette fonction de barrière est essentielle car elle maintient un équilibre relativement stable

dans la microflore du tube digestif. Enfin, il est maintenant reconnu que la flore a une influence considérable sur le système immunitaire intestinal (SII). (Moreau *et al.*, 2004., Forchielli *et al.*, 2005). Pour des raisons évidentes de simplicité de prélèvements la flore intestinale est principalement connue au travers de l'analyse de la flore fécale. Cependant, ce n'en est qu'un reflet imparfait, des différences ayant été mises en évidence entre les flores cécales et fécales (Marteau, 2001). Jusqu'à il y a quelques années l'analyse de la flore n'était basée que sur des techniques de culture avec isolement sur différents milieux non sélectifs et sélectifs et identification des micro-organismes basée sur des caractères morphologiques et biochimiques. Les techniques moléculaires basées sur l'analyse moléculaire de l'ARN ribosomal 16S (ARN16S) ou de son gène codant (ADNr16S) ont été récemment appliquées à l'écologie microbienne (Zoetendal *et al.*, 2004). Ces techniques ont mis en évidence, chez l'adulte, l'importance de la part non cultivable de la flore. Cependant, la comparaison entre les analyses moléculaires et classiques de la flore est délicate, l'identification bactérienne étant faite sur des critères phénotypiques et métaboliques dans les techniques de culture et sur des critères phylogénétiques pour les techniques de biologie moléculaire. De plus, l'approche moléculaire détecte les groupes bactériens dominants, la culture, grâce à l'utilisation de milieux sélectifs permettant l'identification de genres bactériens sous dominants. Cependant, l'utilisation de PCR avec des amorces spécifiques peut permettre d'étudier isolément un genre bactérien voire une espèce bactérienne, et de descendre ainsi le seuil de détection, permettant de suivre la colonisation digestive d'une espèce voire d'une souche. D'autre part, les résultats sont en général exprimés en valeur relative (Pourcentage par rapport aux bactéries totales) pour les études utilisant des méthodes moléculaires, alors qu'ils sont exprimés en mesure absolue du nombre de micro-organismes avec les techniques de culture. Ces deux approches de l'étude de la flore sont donc complémentaires. Établissement de la flore digestive chez le nouveau-né. La séquence d'établissement de la flore digestive, quoique maintenant relativement bien connue, reste un phénomène complexe. Le nouveau-né, stérile *in utero*, se trouve à la naissance brutalement plongé dans un univers bactérien riche et se colonise rapidement avec une flore simple à partir des flores de sa mère et de l'environnement proche. Un « tri » apparaît effectué par l'enfant, toutes les bactéries auxquelles il est exposé ne s'implantant pas. La colonisation par les bactéries des flores vaginale (Mandar et al, 1996) et fécale (Tannock *et al.*, 1990) de la mère a été clairement montrée. Cependant, la flore fécale maternelle apparaît être le déterminant essentiel des premières bactéries s'implantant chez l'enfant, les nouveau-nés étant colonisés plutôt par les entérobactéries et bifidobactéries d'origine fécale que par les lactobacilles d'origine vaginale (Tannock *et al.*, 1990). Le nouveau-né est ensuite continuellement exposé à

de nouvelles bactéries provenant de l'environnement, de la nourriture et des bactéries cutanées des adultes via les tétées, les caresses ou les baisers. Une flore complexe et stable, proche de celle de l'adulte, ne semble être obtenue qu'entre 2 et 4 ans (Kleessen *et al.*, 2000). Les facteurs bactériens permettant l'implantation d'une souche donnée sont peu connus. Une étude sur le suivi de l'implantation d'*Escherichia coli* a montré que les souches résidentes, contrairement aux souches transitoires, avaient certaines caractéristiques pouvant favoriser leur colonisation comme des gènes codant des *fimbriae* ou des hémolysines (Nowrouzian *et al.*, 2003). Des études chez l'animal ont montré que les premières bactéries colonisant le tube digestif étaient capables d'induire des glycosylations spécifiques du glycocalyx et de moduler l'expression des gènes des entérocytes, montrant l'avantage écologique de ces premières colonisatrices (Hooper *et al.*, 2001). Malgré les différences observées entre les études, liées aussi bien aux techniques bactériologiques mises en oeuvre qu'aux variations individuelles ou géographiques, un schéma général d'implantation se dégage. Chez l'enfant à terme, les premières bactéries implantées sont des organismes aérobies-anaérobies facultatifs : les entérobactéries (principalement l'espèce *E. coli*), les entérocoques et les staphylocoques (Ducluzeau *et al.*, 1993). Les bactéries aérobies- anaérobies facultatives, dont le niveau atteint rapidement 10^9 à 10^{10} ufc/g de contenu colique, consomment l'oxygène, diminuant ainsi le potentiel redox de la lumière du tube digestif, ce qui permet l'implantation des genres anaérobies stricts (*Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*) ainsi que celle des lactobacilles, microaérophiles. Les méthodes moléculaires ont confirmé cette séquence d'implantation (Harmsen *et al.*, 2000., Favier *et al.*, 2003) . Ces techniques ont permis également de compléter les données en mettant en évidence les genres bactériens jusqu'alors difficilement ou non cultivables. Ainsi, Harmsen *et al.*, après la mise au point de sondes spécifiques, ont observé 2 genres non identifiés par culture : le genre *Coriobacterium* pour lequel un taux plus élevé a été retrouvé chez les nouveau-nés nourris artificiellement par rapport à des nouveau-nés allaités, et le cluster *Atopobium* pour lequel une diversité augmentant avec l'âge a été décrite (Harmsen *et al.*, 2000). Facteurs influençant la cinétique d'implantation de la flore digestive du nouveau-né. De nombreux éléments vont influencer cette cinétique d'implantation et la composition de la flore intestinale du nouveau-né parmi lesquels le mode d'accouchement, l'environnement, le type d'alimentation, l'âge gestationnel et l'antibiothérapie (Maïlys *et al.*, 2010).

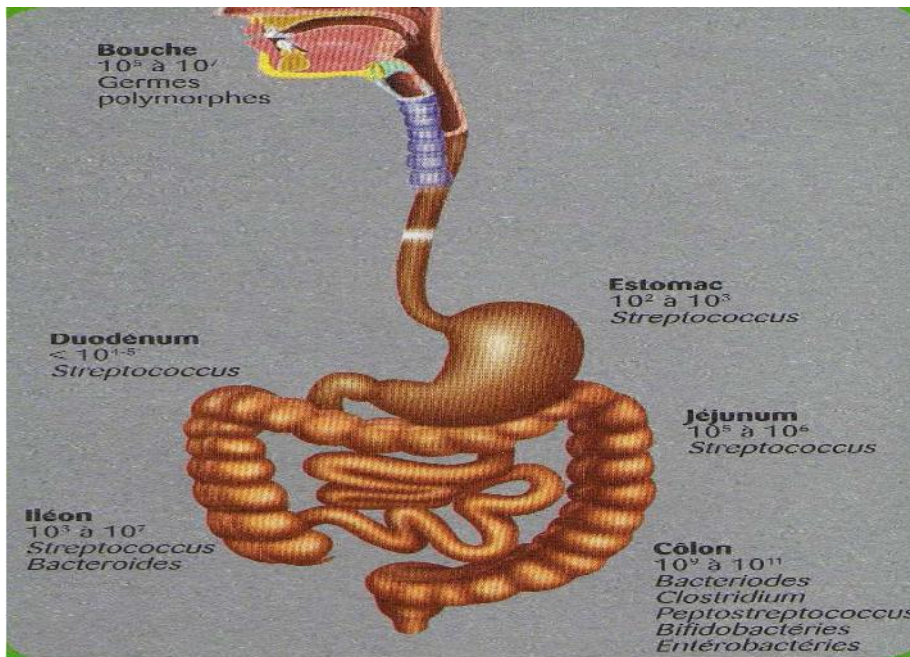


Figure 1 : le microbiote intestinal au fil du tractus digestif. (Mouton, 2007)

1.1.2 Modification de la flore intestinale :

Il est assez difficile de modifier la flore intestinale compte tenu de l'effet barrière. Par contre, il existe un intérêt de plus en plus grand à vouloir modifier cette flore. En effet, la découverte de propriétés bénéfiques sur la santé de certaines espèces bactériennes dites probiotiques provoque un vif intérêt. Ces bactéries, une fois intégrées à la flore intestinale, peuvent améliorer l'ensemble de cette dernière et ainsi bonifier ses propriétés. Par contre, comme mentionné plus haut, la flore intestinale possède plusieurs moyens pour résister à l'implantation de ces nouvelles souches dans l'intestin. De nombreux facteurs peuvent modifier la composition de la flore de façon positive ou négative. Parmi ces facteurs, les plus importants sont l'alimentation, l'âge, la présence de pathologie (VIH, cancer, pathologie intestinale, etc.) ou d'être sous traitement (antibiotique, chimiothérapie, radiothérapie, etc.) contre certaines maladies. En effet, la flore intestinale d'un nouveau-né est très différente de celle de l'adulte. À la naissance, le nouveau-né ne possède pas de flore intestinale et l'implantation de certaines espèces dépend essentiellement de son alimentation. Un enfant allaité aura une flore intestinale composée principalement de bactéries du genre *Bifidobacterium*, alors qu'un enfant nourri aux préparations laitières aura une flore plus diversifiée composée des genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* et *Fusobacterium* (Hagiage, 1994; Hill *et al.*, 1990). Au sevrage, la composition de la flore se transforme graduellement vers celle de l'adulte et restera stable pendant plusieurs années. La composition de la flore change encore chez les personnes âgées avec une diminution significative des *Bifidobacterium*. De plus, l'alimentation peut aussi

favoriser certaines espèces bactériennes de la flore au détriment d'autres. La consommation de certaines substances non digestibles comme les fructooligosaccharides ou l'inuline favorise la croissance des bifidobactéries (Schrezenmeir et De Vrese, 2001). Finalement, la prise d'antibiotiques peut détruire une partie de la flore dominante ou sous-dominante et ainsi permettre à des bactéries opportunistes de s'implanter. Malgré tous les facteurs pouvant altérer la flore intestinale, les bactéries probiotiques peuvent aider à la stabiliser lorsque certaines conditions défavorables sont rencontrées chez un individu. C'est principalement pour cette raison, mais aussi pour leur nombreuses allégations santé que les probiotiques attirent de plus en plus l'intérêt (Moroni, 2007).

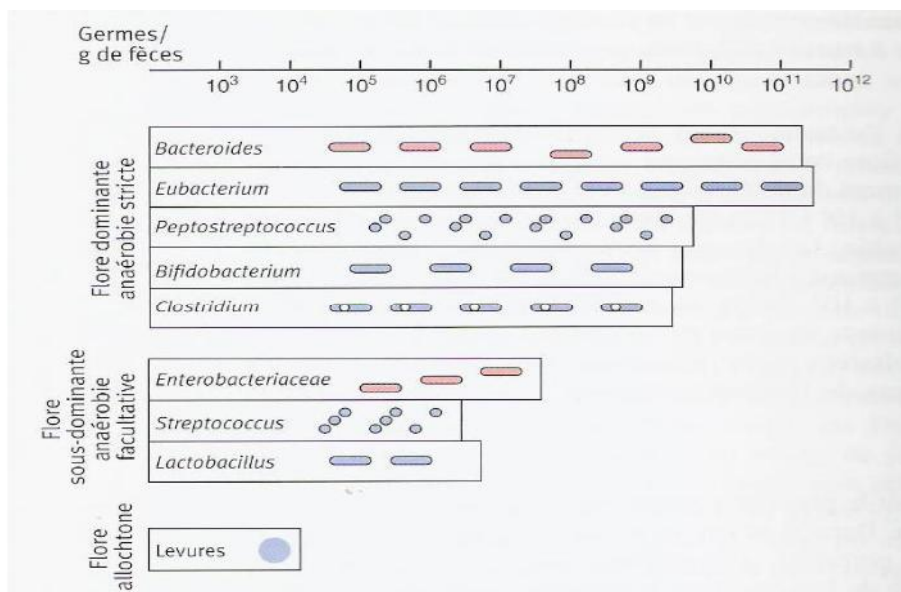


Figure 2 : la flore fécale cultivable (Rambaud *et al.*, 2004).

2.2. Propriété de barrière de la muqueuse en relation avec les pathologies :

La muqueuse intestinale assure beaucoup de fonctions spécifiques tout au long du tractus gastro-intestinal pour permettre à la nourriture ingérée d'être digérée, absorbée et transformée avant excréation. Ces processus doivent coexister avec la nécessité de fournir une barrière efficace, à la fois contre les microorganismes commensaux qui fermentent les matières alimentaires non digérées dans la lumière de l'intestin, et contre les pathogènes potentiels (virus, bactéries...). Il existe trois niveaux de protection de la barrière « muqueuse » : le mucus sécrété, la couche recouvrant l'épithélium et les jonctions serrées des cellules épithéliales (McGuckin, *et al.*, 2011).

Le gel très hydraté et visqueux de mucus est nécessaire pour permettre la diffusion de macromolécules qui sont nécessaires à la sécrétion et l'absorption gastro-intestinale

(le processus le plus important ayant lieu dans l'intestin grêle), mais il fournit également une barrière physique efficace contre les particules, y compris les microorganismes. Les particules virales (taille < 500 nm) peuvent *a priori* facilement diffuser au travers du mucus cervical tandis que les bactéries (taille de l'ordre de 1-2 µm) sont, elles, stoppées (Lai, *et al.*, 2007 ; Lai, *et al.*, 2009). Toutefois, il faut souligner que, lorsque de petites particules, y compris les virus, interagissent avec les composants du mucus (mucines, anticorps...), elles peuvent être piégées (Lai, *et al.*, 2007). L'importance de cette barrière « mucus » est soulignée par des études récentes. Il a ainsi été démontré sur un modèle murin de souris que des animaux déficients en Muc2 développent des infections sévères, potentiellement mortelles, lorsqu'ils sont infectés par un pathogène de type *Escherichia coli* ou *Citrobacter rodentium* (Bergstrom, *et al.*, 2010). Ces mêmes animaux montrent, par ailleurs, une clairance retardée du parasite nématode *Trichuris muris* (Hasnain, *et al.*, 2010) et développent une inflammation intestinale spontanée (Van der Sluis, *et al.*, 2006) lors de l'exposition de l'épithélium intestinal au microbiote commensal dans des conditions où l'altération et l'absence de la couche barrière de mucus se produisent (Johansson, *et al.*, 2008). Les caractéristiques physiques du mucus, la forte dépendance de ses propriétés physico-chimiques à l'égard de facteurs environnementaux tels que la force ionique et le pH, ainsi que le changement dans la sécrétion de mucines, jouent un rôle important dans de nombreuses pathologies. De nombreuses bactéries pathogènes (*Pseudomonas*, streptocoques, pneumocoques...) possèdent des adhésines qui se lient spécifiquement au mucus, leur permettant de s'implanter dans le tractus intestinal (Scharfman, *et al.*, 1995) *Helicobacter pylori*, en particulier grâce à ses adhésines et à sa capacité à résister aux bas pH, peut migrer à travers la couche de mucus de l'estomac et attaquer l'épithélium : il est ainsi la cause majeure d'ulcères au niveau gastro-duodéal (Slomiany *et al.*, 1991). Quelques organismes parasitaires produisent leurs propres structures de mucus pour échapper au système immunitaire (Jain, *et al.*, 2001). Par ailleurs, la surproduction de mucus pulmonaire est impliquée dans la mucoviscidose (Boucher, 2004), la bronchite, l'asthme et les infections de l'oreille moyenne. La sous-production de mucus est également caractéristique du syndrome des yeux secs (Argüeso *et al.*, 2001) et présente dans certaines formes de maladies ulcéreuses. A noter, enfin, que l'expression et la composition du mucus sont altérées dans les cancers d'origine épithéliale (Hollingsworth *et al.*, 2004).

Vu le rôle central joué par la couche de mucus dans ces pathologies, de nombreux travaux portent aujourd'hui sur la mise au point de méthodes basées sur l'optimisation de la muco-adhésion pour une meilleure biodisponibilité des médicaments. Diverses interactions moléculaires sont ainsi exploitées comme, par exemple, les interactions poly-électrolytiques

(chitosane, polyacide acrylique, etc.), les liaisons hydrogène (hydrogels) (Harding, *et al.*, 1999) ou encore les ponts disulfures (« thiomers ») (Leitner, *et al.*, 2003). La mucine peut également être utilisée comme additif à haut poids moléculaire pour améliorer l'adhésion des larmes artificielles dans le traitement du syndrome de sécheresse oculaire (Khanvilkar, *et al.*, 2001). Les applications visant à développer des nanoparticules pour de nouveaux vaccins et la thérapie génique sont également à l'étude (Michelle, *et al.*, 2004). L'anomalie des sucres dans la membrane cellulaire, liée aux mucines des cellules cancéreuses, est également étudiée comme cible potentielle de développement d'un vaccin contre le cancer (Ren & Somasundaran, 1993, Doan-Thanh *et al.*, 2011) Dans le microbiote intestinal humain, les bifidobactéries coexistent avec une large variété de bactéries (Biavati *et al.*, 2000). Leur établissement dans le tractus digestif se fait initialement au contact de la flore vaginale et fécale de la mère ainsi que de l'environnement (Cibik *et al.*, 2004). Elles représentent environ 80% des bactéries dominantes du microbiote intestinal durant l'enfance et jusqu'à 25% chez l'adulte (Picard *et al.*, 2005). Ainsi, chez l'enfant en bonne santé ces bactéries sont majoritaires alors qu'en vieillissant, une diminution de leur nombre s'effectue au profit d'autres genres bactériens tels que les *Bacteroides*, Eubactéries et Peptocoques (Figure 3).

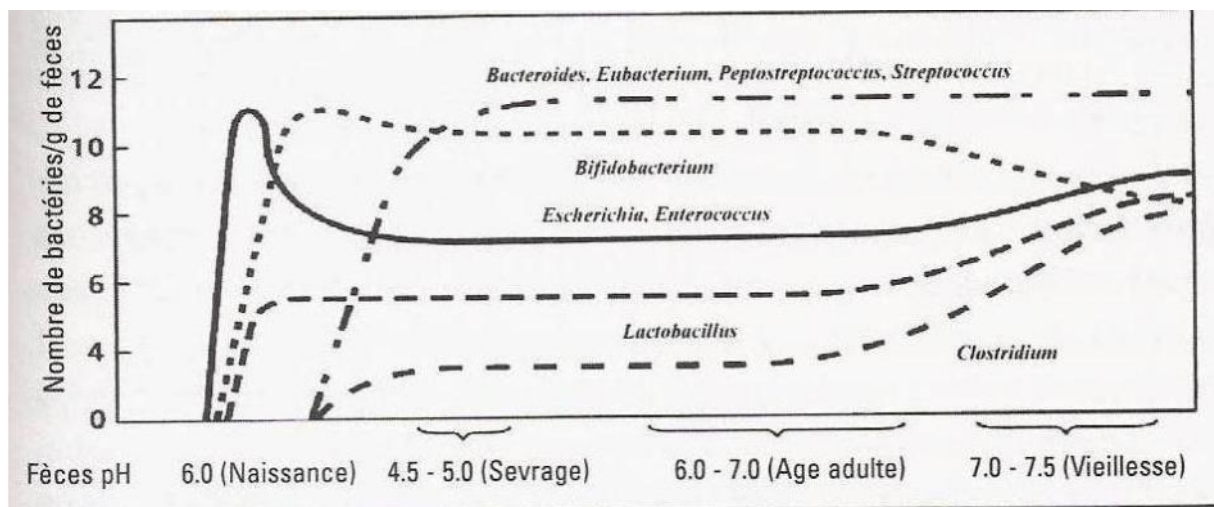


Figure 3 : Changement du microbiote intestinal en fonction de l'âge (Ballongue *et al.*, 1998).

2.3. Microbiote intestinal, évolution au cours du temps :

Outre la proportion en bifidobactéries qui varie au cours de la vie, différentes espèces se succèdent (Moal *et al.*, 2006). De façon générale, les espèces *B. infantis*, *B. breve*, *B. longum*, *B. bifidum* sont le plus souvent rencontrées chez les enfants alors que les espèces *B. adolescentis* et *B. longum* prédominent chez l'adulte (Ballongue, 1998). Il est intéressant de noter que toutes

ces espèces de bifidobactéries constituant le microbiote humain peuvent être considérées comme probiotiques (figure 03). (Mouton, 2007)

3. L'écosystème intestinal de la naissance à l'âge adulte : évolution, équilibre et perturbations :

Mode général d'implantation :

Chez les bébés nés à terme, la colonisation se fait dans un ordre établi, indépendant de l'alimentation les premières 48 h. Des micro-organismes se succèdent : aérobies/anaérobies d'abord, qui vont permettre, au 3^{ème} jour, l'installation des anaérobies strictes dont majoritairement Bifidobactéries et Lactobacilles, Bacteroïdes et Clostridies dans une moindre mesure (Parracho *et al.*, 2007).

3.1. Facteurs influençant la composition de la flore :

De nombreux facteurs influencent la composition de la flore et sa vitesse d'implantation :

3.1.2 Le mode d'accouchement :

Chez les enfants nés par césarienne, la flore anaérobie (particulièrement *Bifidobacterium et Bacteroïdes*), s'implante plus tardivement. Ce retard reste significatif pendant 1 à 6 mois.

3.1.3 La prématurité :

Chez les enfants nés avant terme, on note un retard de colonisation important de la flore protectrice (en particulier les Bifidobactéries) en lien avec un séjour plus ou moins long dans un environnement aseptisé et souvent une antibiothérapie prophylactique à cause de la plus grande perméabilité intestinale de ces nourrissons (Westerbeek *et al.*, 2006) . Ainsi, naissance prématurée et accouchement par césarienne représentent les premiers risques de dysbiose.

Le mode d'alimentation :

A la fin du 1^{er} mois, des différences nettes existent dans la composition de la flore selon l'alimentation reçue. Le lait maternel contient des oligosaccharides bifidogènes à l'origine de la colonisation dominante par le genre *Bifidobacterium*, dont les espèces *breve*, *infantis* et *longum*, chez le nouveau né allaité. Le lait maternisé favorise l'implantation d'une plus grande diversité bactérienne mais moins protectrice. L'absence d'allaitement représente donc un deuxième risque de dysbiose.

3.1.4 L'antibiothérapie :

Administrée à l'enfant ou à sa mère *per partum*, favorise un retard et une diminution de la colonisation par des Bifidobactéries. L'antibiothérapie représente un troisième risque de dysbiose.

3.1.5 Les vaccinations précoces :

Un lien a été montré entre la prévalence de l'asthme et la vaccination précoce (1 à 2 mois). Dans certaines circonstances, la vaccination pourrait avoir une incidence sur la flore intestinale et l'orientation du système immunitaire vers une voie pro-inflammatoire et « proallergie » Th2. (l'A.F.M.O ,2010)

3.2 Effet barrière chez le nourrisson :

Les enfants prématurés à flore protectrice retardée peuvent être colonisés précocement à haut niveau par le *Clostridium*, impliqué dans l'entéro-colite ulcéro-nécrosante du nourrisson (ECUN). Un enfant allaité plus de 4 mois présente moins de risque d'infections (diarrhées aiguës - 70%, otites - 30%, infections respiratoires sévères - 12%).

3.3 Allergie :

La flore intestinale est un stimulus important pour la maturation du système immunitaire : activation des lymphocytes T (LT), stimulation des Th pour établir l'équilibre Th1 / Th2 (le nouveau-né ayant un profil Th2 pro-inflammatoire), protection vis à vis des pathogènes, développement de la tolérance orale. Or les allergies dans leur forme atopique (eczéma, rhinite allergique, asthme) sont des maladies en pleine expansion dans les pays développés. La flore qui colonise l'enfant dans les 1res semaines de vie a une importance fondamentale. Modifiée quant à sa composition par de nouvelles pratiques hygiénistes, elle pourrait être responsable d'une flore de barrière moins efficace et d'une mauvaise stimulation du système immunitaire.

4.1 Les probiotiques

4.1.2 Historique de l'utilisation des probiotiques

Selon la définition actuellement recommandée par l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'organisation mondiale de la santé (OMS), les probiotics sont des micro-organismes de phase de `de `qui une fois administrés dans à montants proportionnés confèrent une prestation-maladie au centre serveur" (FAO/OMS 2001). Les contraintes des genres lactobacille et Bifidobacterium sont les bactéries probiotic les plus employées couramment (Garrigues *et al.*, 2010)

4.1.2 Définitions

Le terme probiotique provient de la langue grecque et veut dire « pour la vie ». La définition du terme probiotique a évolué au cours des ans et au fil des nouvelles découvertes scientifiques dans le domaine. La première définition spécifiait qu'un probiotique était simplement un organisme ou une substance qui influence la balance de la microflore intestinale (Parker, 1974). C'est avec la définition de Fuller (1989) que se précise le concept de probiotique. Ce dernier a défini les probiotiques comme : « Un supplément alimentaire composé de micro-

organismes vivants ayant des effets bénéfiques sur l'hôte par l'amélioration de la balance de sa flore intestinal ». Cette définition supprime le terme « substance » de la définition proposée par Parker et soulève l'importance de la viabilité des micro-organismes qui composent la préparation dite probiotique. Les bases amenées par Parker et Fuller ont conduit à une nouvelle définition: « Un supplément alimentaire composé de micro-organismes vivants ayant un effet bénéfique sur la santé le l'hôte » (Salminen *et al.*, 1998). Cette définition conserve la nécessité de la viabilité des micro-organismes, comme proposé par Fuller, mais modifie la cible des effets du probiotique. Au départ, la définition de probiotique mentionnait son activité sur l'équilibre de la flore intestinale. Cependant, Salminen et coll. (1998) porte l'effet des probiotiques à l'amélioration de la santé générale de l'hôte, ajustant ainsi la définition aux découvertes des effets des probiotiques sur d'autres cibles que la flore intestinale comme son impact sur le système immunitaire ou sur la prévention du cancer du côlon. Finalement, les probiotiques sont aujourd'hui définis comme : « Micro-organismes vivant qui, lorsque administré en quantité adéquate, procurent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte. » (FAO/WHO, 2003), en améliorant les propriétés de sa flore intestinale. Il s'agit le plus souvent de bactéries ou de levures présentes soit dans des aliments, notamment les produits laitiers fermentés, soit dans des compléments alimentaires sous forme lyophilisée. Les micro-organismes tués par la chaleur ne répondent pas à la définition des probiotiques, même si certains effets thérapeutiques leur ont été attribués.

Il existe 4 grands groupes de probiotiques :


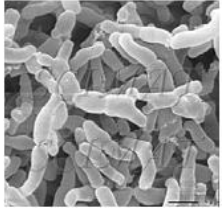
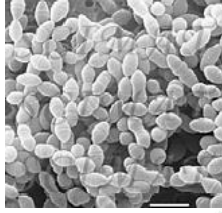
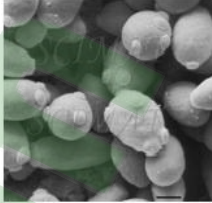
Espèces de lactobacilles	Espèces de bifidobactéries	Autres bactéries lactiques	Microorganismes « non-lactiques »
 <p><i>Lactobacillus bulgaricus</i></p> <p><i>L. acidophilus</i> La5 (Chr Hansen) <i>L. acidophilus</i> NCFM (Danisco) <i>L. casei</i> Shirota (Yakult) <i>L. casei</i> DN-114 001 (Danone) <i>L. reuteri</i> ATCC 55730 (Biogaia) <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> 2038 (Meiji Milk) <i>L. gasseri</i> K7 (ALP) <i>L. johnsonii</i> La1 (Nestlé) <i>L. paracasei</i> CRL431 (Chr. Hansen) <i>L. paracasei</i> F19 (Medipharm) <i>L. plantarum</i> 299V (Probi AB) <i>L. rhamnosus</i> GG (Valio) <i>L. crispatus</i> <i>L. gallinarum</i></p>	 <p><i>Bifidobacterium breve</i></p> <p><i>B. longum</i> BB536 (Morinaga) <i>B. breve</i> Yakult (Yakult) <i>B. lactis</i> Bb 12 (Chr. Hansen) <i>B. lactis</i> HN019 (Danisco) <i>B. animalis</i> DNI 73010 (Danone) <i>B. Infantis</i> 35264 (Procter & Gamble)</p>	 <p><i>Streptococcus thermophilus</i></p> <p><i>S. thermophilus</i> 1131 (Meiji Milk) <i>E. faecalis</i> Symbioflor (Symbiopharm) <i>E. faecium</i> SF68 (Cerbios) <i>P. acidilactici</i> Bactocell® (Lallemand)</p>	 <p><i>Saccharomyces</i> sp.</p> <p><i>S. boulardii</i> Ultra-levure® (Biocodex) <i>S. cerevisiae</i> <i>E. coli</i> Nissle 1917 (Ardeypharm) <i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i></p>

Figure 4 : Principales espèces utilisées comme probiotiques et exemples des souches commercialisées. Source photos Scimat. (Robin *et al.*, 2001)

4.2 L'intérêt des probiotiques durant l'enfance :

Définis comme des « micro-organismes vivants, qui lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, ont un bénéfice pour la santé de l'homme », ils peuvent apporter, chez le nourrisson, de nombreux effets favorables qui sont « souches et doses dépendants ».

01) *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) : a des bénéfices sur les problématiques rencontrées chez l'enfant :

- **prévention de l'eczéma atopique.** L'administration périnatale de LGG (pendant la grossesse et l'allaitement puis durant les 6 premiers mois de l'enfant) réduit l'incidence de dermatite atopique jusqu'à 4 ans après la naissance(Kalliomäki *et al.* 2003). L'administration de LGG induit aussi une diminution significative de la sévérité de la dermatite atopique chez des enfants allergiques au lait de vache par production de cytokines de type Th1 (Pohjavuori *et al.*, 2004).

- **diarrhées infectieuses** : Le LGG permet l'activation de la réponse sérologique spécifique de production d'anticorps IgM et IgA dirigés contre les rotavirus responsables de diarrhées aiguës, raccourcissant la durée et la sévérité des infections.

02) Le *Lactobacillus fermentum* : permet l'augmentation des cytokines Th1 et des IgA, signes d'une stimulation immunologique cellulaire. Il agit directement chez les enfants atteints de dermatite atopique (sur la sévérité et l'extension).

03) Le *Bifidobacterium infantis* : réduit douleurs et ballonnements, aurait vraisemblablement une action anti-inflammatoire. L'administration de Bifidobactéries chez des prématurés permet l'établissement d'une flore plus équilibrée.

04) L'association de Bifidobactéries et de Lactobacilles :

Conduit à une diminution significative des ECUN, associée à une sévérité moindre. (l'A.F.M.O., 2010)

4.3. Probiotiques / prébiotiques et déséquilibres / dysbioses chez l'adulte

Chez l'adulte, de nombreuses agressions peuvent provoquer des dysbioses et ainsi induire différents troubles allant de la simple diarrhée à des inflammations intestinales chroniques. Ces « attaques » peuvent être : alimentaires (excès de protéines entraînant une prédominance de la flore de putréfaction au détriment de la flore de fermentation ou carences en prébiotiques...), médicamenteuses (antibiotiques, anti-inflammatoires...), stress psychologique...

a. Les troubles du transit

Constipation

En fermentant les fibres non digérées, les probiotiques permettent d'augmenter la production d'AGCC (Acides Gras à Chaîne Courte) et d'acidifier le milieu, activant le péristaltisme intestinal et accélérant le transit. Une étude sur des patients âgés constipés a montré que le *L. plantarum* et le *B. longum* sont capables d'augmenter le nombre de selles et d'améliorer les symptômes de la constipation après 15 jours de supplémentation (Del Piano *et al.*, 2005).

Diarrhées

- Différentes souches de Lactobacilles (*rhamnosus* GG, caséi) permettent de réduire le risque de contracter une diarrhée infectieuse chez l'adulte. En ce qui concerne la diarrhée des voyageurs, des études ont démontré l'efficacité du LGG dans la prévention de ce désagrément (Hilton *et al.*, 1997).

- La prise d'antibiotiques peut modifier la composition de la flore intestinale permettant le développement de germes pathogènes comme *Clostridium difficile* à l'origine de diarrhée post-antibiotique. Les antibiotiques diminuent la formation d'AGCC dans le côlon. Aussi est-il important de rééquilibrer la flore avec des probiotiques. La souche LGG, en particulier, prévient ce type de diarrhées ou en diminue les effets secondaires (Siitonen *et al.*, 1990).

b. Le Syndrome de l'intestin irritable (ou colopathie fonctionnelle ou SII)

Le syndrome de l'intestin irritable représente un ensemble de désordres gastro-intestinaux chroniques caractérisés par les symptômes suivants : douleurs abdominales, ballonnements, troubles du transit intestinal allant de la constipation constipation à la diarrhée

occasionnelle et à l'alternance diarrhée – constipation. Le SII touche environ 15% de la population occidentale, en particulier les femmes, et affecte la qualité de vie. Le rôle de l'alimentation est reconnu dans l'entretien et le déclenchement des manifestations cliniques ainsi que le stress. La pathogénicité n'est pas encore complètement connue, mais la génétique, les facteurs psychosociaux et une hypersensibilité intestinale jouent un rôle dans la genèse de cette maladie. L'administration continue de probiotiques, en quantité suffisante, peut avoir un effet bénéfique sur les composantes douloureuses et la constipation mais aussi sur l'hypersensibilité intestinale par leur effet immunomodulateur. Ainsi, après 28 jours de supplémentation chez des patients atteints de SII, *L. plantarum* et *L. acidophilus* ont réduit la douleur de moitié et les symptômes de 55% (Bixquert *et al.*, 2009, Saggiaro *et al.*, 2004). *L. plantarum* et *B. longum* agissent en réduisant les gaz produits dans le côlon, en régulant le transit et en modulant l'immunité et l'inflammation.

c. Les MICI (inflammations de la muqueuse du côlon et du rectum)

Les deux principales MICI (Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin) sont la maladie de Crohn (MC) et la colite ulcéreuse (CU) qui évoluent par poussées. Ces maladies sont de plus en plus fréquentes. Elles sont caractérisées par une inflammation chronique, des ulcérations, des lésions. D'où des symptômes tels que douleurs abdominales, diarrhées, saignements. Les causes de ces maladies ne sont pas complètement élucidées. Toutefois la CU serait liée à une perturbation de l'assimilation des protéines soufrées. Des recherches très récentes montrent que chez les personnes atteintes par la maladie de Crohn, la muqueuse intestinale est anormalement colonisée par des bactéries *Escherichia coli*. L'adhésion de ces bactéries est possible grâce à l'expression d'une molécule (le récepteur CEACAM6) sur les cellules intestinales. L'interaction entre les *E.coli* et ce récepteur favorise la colonisation anormale induisant une inflammation chronique (Frédéric *et al.*, 2009).

Les MICI s'accompagnent d'une hyperperméabilité intestinale générant le passage de pathogènes, d'allergènes ou de toxiques dans le corps. Le cercle vicieux est alors enclenché puisque ce passage incontrôlé va générer une inflammation chronique favorisant d'autant plus les lésions de la barrière intestinale (fig. 4). Lors de MICI la diversité de la flore est réduite de moitié avec en particulier une perte de diverses espèces de Lactobacilles, Bactéroïdes et Eubactéries. Les probiotiques agissent à la fois sur la perméabilité et sur l'inflammation.

Ils augmentent la production d'AGCC dont le butyrate, assurant l'apport énergétique des colonocytes, ce qui permet de renforcer la barrière intestinale (Grangett *et al.*, 2007). Certains probiotiques dont le LGG ont montré une augmentation de la réponse IgA et une amélioration de la perméabilité intestinale (Heyman *et al.*, 2007).

d. Allergies et immunité

Les probiotiques permettent à l'adulte de rééquilibrer sa flore intestinale et donc de stimuler les défenses immunitaires tout en renforçant la barrière intestinale. Certains lactobacilles comme le LGG sont capables de stimuler l'immunité innée. Ce dernier permet la libération d'IgA sécrétoires dans la lumière intestinale pour empêcher l'entrée de bactéries ou virus infectieux dans la muqueuse. Les probiotiques permettent de diminuer les phénomènes allergiques. La souche *L. acidophilus* a un effet bénéfique chez des personnes souffrant de rhinite allergique (Gupta *et al.*, 2009).

e. Obésité et flore intestinale

Des études récentes montrent que les bactéries qui résident normalement dans l'intestin jouent un rôle dans l'assimilation de nutriments et le métabolisme énergétique. Chez l'homme, la flore des sujets obèses présente une moins grande diversité (avec diminution des Bifidobactéries) que chez les sujets minces. Il a été montré qu'un régime déséquilibré induit un changement de flore chez les sujets obèses et que cette flore, riche en lipo-polysaccharides (LPS) bactériens, favorise l'inflammation et la perméabilité intestinales. Chez des souris obèses, l'apport de prébiotiques, connus pour leur effet bifidogène, modifie la composition de la flore intestinale, diminuant l'inflammation et la perméabilité intestinale. (A.F.M.O ,2010).

4.3.1 Les probiotiques et le stress :

Tel que discuté dans la section précédente, nombreuses études sont réalisées concernant l'effet des probiotiques sur la modulation de la flore intestinale ainsi que leurs effets sur la réponse inflammatoire de l'hôte. Malgré que les résultats obtenus semblent démontrer que les probiotiques ont des effets positifs sur l'inflammation et la prévention de l'attachement de bactéries pathogéniques sur la muqueuse intestinale de l'hôte, il reste à déterminer si ces effets bénéfiques peuvent être reproduits dans d'autres désordres gastro-intestinaux durant lesquels l'intégrité de la barrière intestinale est compromise. En effet, l'influence du stress sur la microflore intestinale a été le sujet d'abondantes recherches réalisées tant chez l'humain que chez l'animal (Logan and Katzman, 2005). Dans un modèle animal, il a été observé qu'un stress psychologique chronique induit une dysfonction de la muqueuse intestinale (Zareie *et al.*, 2006). Cette dysfonction de la barrière provoque une diminution de la sécrétion d'ions (qui va conduire à une diminution de la sécrétion d'eau qui normalement « rince » la surface muqueuse des matériaux nocifs (Gareau *et al.*, 2007)), une augmentation de la perméabilité épithéliale et de l'attachement de pathogènes sur la surface épithéliale, ainsi que l'initiation de l'inflammation de la muqueuse (Soderholm *et al.*, 2001). En effet, le stress a un impact majeur sur la physiologie de l'intestin et peut, de cette façon, favoriser le développement de maladies

gastro-intestinales (Lutgendorff *et al.*, 2008). Des situations de stress peuvent prédisposer un individu à développer un désordre de l'intestin tel que le syndrome du côlon irritable (Mayer, 2000). De plus, des conditions de stress peuvent exacerber les symptômes et l'aboutissement clinique de maladies intestinales auto-immunes telles que la maladie de Crohn. Chez un modèle animal, il a été démontré que le stress peut réduire le nombre de Lactobacilles, augmenter le nombre de bactéries anaérobiques (Suzuki *et al.*, 1983) et favoriser l'incorporation, la croissance ainsi que l'adhérence épithéliale de bactéries à gram négatives pathogéniques. De plus, lors d'un stress, les bactéries opportunes pathogéniques peuvent ressentir cet état de faiblesse et augmenter leurs facteurs de virulence (Lutgendorff *et al.*, 2008). Des études effectuées chez l'homme ont démontré que le stress émotionnel peut mener à une diminution à court et à long terme du nombre de Lactobacilles et de Bifidobactéries (Lizko, 1987). De plus, une étude menée auprès de patients bénévoles souffrant de symptômes associés au stress a démontré que l'administration d'une combinaison de probiotiques (*Lactobacillus helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175) diminuait de manière significative deux symptômes gastro-intestinaux causés par le stress soit la douleur abdominale et la nausée/vomissement (Diop *et al.*, 2008a). Des études récentes suggèrent que des changements dans la fonction de l'axe hypothalamohypophyso- surrénalien (HPA) ainsi que des altérations au niveau des interactions entre les bactéries et la muqueuse intestinale soient induites suite à des modifications dans l'inflammation gastro-intestinale causées par le stress (Mawdsley *et al.*, 2005). Parallèlement, des changements dans la composition de la flore intestinale, définis par une diminution des Lactobacilles ainsi que des Bifidobactéries, observés chez les patients souffrant du syndrome du côlon irritable causerait une augmentation de l'activité de l'axe HPA (Dinan *et al.*, 2006). En effet, l'axe HPA est non seulement le système endocrinien affecté par le stress, mais ce dernier est aussi un lien important entre le système immunitaire de l'intestin et le cerveau (Dinan *et al.*, 2006). Zareie et coll. (Zareie *et al.*, 2006) ont démontré, dans un modèle de stress chronique chez le rat, que l'administration de probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus* R0011 et *Lactobacillus helveticus* R0052) en prophylaxie réduisait l'adhérence des bactéries ainsi que leur translocation dans les ganglions lymphatiques mésentériques. Il existe chez l'animal d'autres modèles de stress, entre autre la séparation néonatale. Ce modèle de séparation traumatique illustre les altérations dans la physiologie du côlon caractérisées par une augmentation de la motilité, une augmentation de la perméabilité moléculaire ainsi qu'une hyperalgésie viscérale (Gareau et al., 2007). Suite à ces changements particuliers, cette séparation néonatale est non seulement un modèle de stress mais aussi un modèle de syndrome du côlon irritable. Puisque les probiotiques ont été utilisés avec succès pour contrer la

dysfonction de la barrière épithéliale, Garcia-Rodenas et coll. (Garcia *et al.*, 2006) ont confirmé que, suite à la séparation néonatale, l'administration de probiotiques (*Lactobacillus paracasei* NCC2461) augmentait les fonctions gastro-intestinales.

4.3.2 Guide pour l'évaluation des probiotiques en utilisation alimentaire

L'organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture et l'Organisation Mondiale de la Santé a défini les étapes à suivre pour l'évaluation de l'efficacité des souches probiotiques en utilisation alimentaire (FAO/WHO, 2002). Cette action était rendue nécessaire afin d'encadrer au niveau international le nombre croissant d'études réalisées avec d'éventuelles souches probiotiques. La Figure 05 présente les principaux points à évaluer. Les premières étapes du guide concernent l'identification, la caractérisation fonctionnelle et l'évaluation de la sécurité de la souche probiotique. Ces résultats préliminaires obtenus *in vitro* (par exemple : résistance aux conditions gastro-intestinales, adhésion aux cellules intestinales, capacité d'inhibition des pathogènes) doivent ensuite être vérifiés à l'aide de modèles animaux. Parallèlement, la sécurité liée à l'utilisation de la souche probiotique doit être vérifiée de façon *in vivo* et lors d'une étude clinique phase 1. Lors de ces études, la FAO et le WHO recommande que les souches probiotiques soient testées entre autres pour leur résistance aux antibiotiques, leur infectivité dans des modèles animaux immunocompromis et leurs effets secondaires chez l'humain (Reid *et al.*, 2003). Par la suite, l'efficacité de la souche probiotique doit être évaluée lors d'une étude clinique phase 2 réalisée à double insu constituée d'un traitement probiotique et un placebo. Les résultats de cette étude doivent être statistiquement et biologiquement significatifs avec une amélioration des symptômes liés à l'infection, une réduction du risque de récurrence ou un rétablissement plus rapide (Reid *et al.*, 2003). Actuellement, des souches comme *L. rhamnosus* GG et *L. reuteri* ont accumulé de solides évidences cliniques, mais elles ne sont pas encore disponibles au Canada (Reid *et al.*, 2005). Avant la mise sur le marché du produit probiotique une étude phase 3 est nécessaire pour comparer l'effet de la souche probiotique à un traitement traditionnel (par exemple: antibiotiques) (Reid *et al.*, 2003). À la suite de cette dernière étude clinique, l'allégation santé associée à la souche probiotique testée peut être apposée sur l'étiquette selon la législation propre à chaque pays (FAO/WHO, 2002). Même si des centaines de publications sur les probiotiques sont documentées dans la littérature scientifique, seulement quelques souches agissant au niveau clinique peuvent avoir le statut de probiotique. Ce jugement n'est possible qu'après avoir considéré l'ensemble des évidences *in vitro*, animales et humaines supporté par un mécanisme d'action plausible (Sanders, 2003).

Actuellement, le développement de produits probiotiques est très actif dans les pays européens, le Japon, les États-Unis et l’Australie. Au Canada, très peu de produits probiotiques sont disponibles puisque la recherche dans ce domaine ne fait qu’émerger. Cependant, de plus en plus d’études rapportent des données démontrant l’efficacité de certaines souches et un guide de conformité concernant les produits de santé naturels (dont fait partie les probiotiques) a été élaboré afin de fournir aux principaux intéressés des renseignements clairs en ce qui a trait aux principaux règlements et lois régissant leur mise en marché (Santé Canada, 2007).

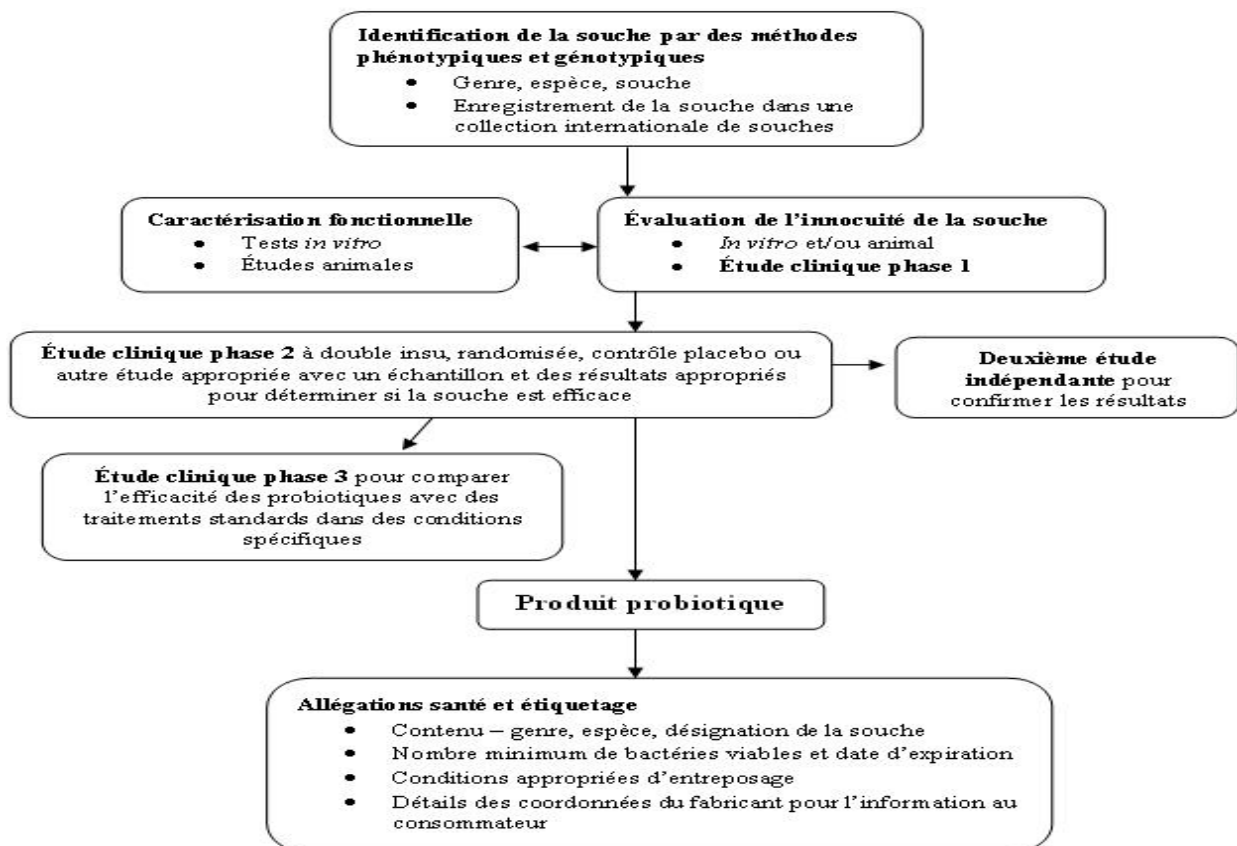


Figure 5 : Guide pour l’évaluation des probiotiques en utilisation alimentaire. Tiré et traduit de FAO/WHO(2002).

4.4. Utilisation clinique des probiotiques :

Dans plusieurs maladies inflammatoires, non seulement intestinales, les probiotiques les plus étudiés chez les patients présentant des diarrhées aiguës sont les genres *Lactobacillus sp*, et *Bifidobacterium sp*, utilisés seuls ou en culture mixte avec d’autres bactéries.

Tableau 1: Études cliniques concernant l'efficacité de souches probiotiques commerciales lors d'infections entériques (Arsenault, 2011).

Type d'infection entérique	Souches probiotiques	Producteur	Population à l'étude	Effet observé	Référence
Diarrhée infantile	<i>L. rhamnosus</i> GG	Valio, Finlande	Enfants	Diminution de la durée des diarrhées à rotavirus Augmentation de la réponse immunitaire humorale	Isolauri et al., 1991 Isolauri et al., 1994 Kaila et al., 1992 Majamaa et al., 1995
	<i>L. casei</i> DN-114 001 (<i>Immunitas</i>)	Danone, France	Enfants	Diminution de l'incidence des diarrhées	Pedone et al., 2000
	<i>L. reuteri</i> SD 2112 (<i>Protectis</i>)	BioGaia, Suède	Nourrissons	Diminution de l'incidence et de la durée de diarrhées à <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> et rotavirus	Weizman et al., 2005 Shornikova et al., 1997
	<i>B. lactis</i> Bb12	Chr. Hansen, États-Unis	Nourrissons	Prévention des diarrhées à rotavirus	Saavedra et al., 1994 Phuapradit et al., 1999
	<i>E. coli</i> Nissle 1917	Ardeypharm, Allemagne	Nourrissons et enfants	Diminution de la fréquence quotidienne de diarrhées à <i>Salmonella</i> , <i>Yersinia</i> , <i>E. coli</i> pathogénique, <i>Shigella</i> , rota-, adéno- et norovirus	Henker et al., 2007
Diarrhée associée aux pathogènes alimentaires	<i>B. breve</i> Yakult	Yakult, Japon	Nourrissons et enfants	Diminution de <i>Campylobacter jejuni</i> détectés dans les fèces	Tojo et al., 1987
	<i>Enterococcus faecium</i> SF68 (<i>Bioflorin</i>)	Giuliani, Suisse	Adultes	Diminution de la durée et de la sévérité des diarrhées dues à des pathogènes alimentaires	Buydens et al., 1996
	<i>L. rhamnosus</i> GG	Valio, Finlande	Enfants	Diminution des diarrhées à <i>Shigella</i>	Sepp et al., 1995
Diarrhée associée aux antibiotiques	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Biocodex, États-Unis	Adultes	Diminution de l'occurrence d'infection à <i>Clostridium difficile</i> liée à la prise d'antibiotiques	McFarland et al., 1994 McFarland et al., 1995 Elmer et al., 1996

Les patients qui doivent subir ou qui ont subi une chirurgie abdominale courent un risque accru d'une perturbation sévère de la flore intestinale ainsi qu'un facteur de risque élevé de translocation bactérienne (MacFie *et al.*, 2006). En effet, les antibiotiques administrés peuvent mener à la surcroissance de bactéries indésirables (Nieuwenhuijs *et al.*, 1998) et une perte des fonctions de la barrière intestinale peut survenir suite à la manipulation de l'intestin et à une alimentation parentérale (Deitch, 1995). De plus, le stress occasionné par la chirurgie et les produits dérivés du sang peuvent mener à une diminution importante du système immunitaire (Bengmark *et al.*, 1999., Arseneault, 2011) (Tableau 1, Figure 6).

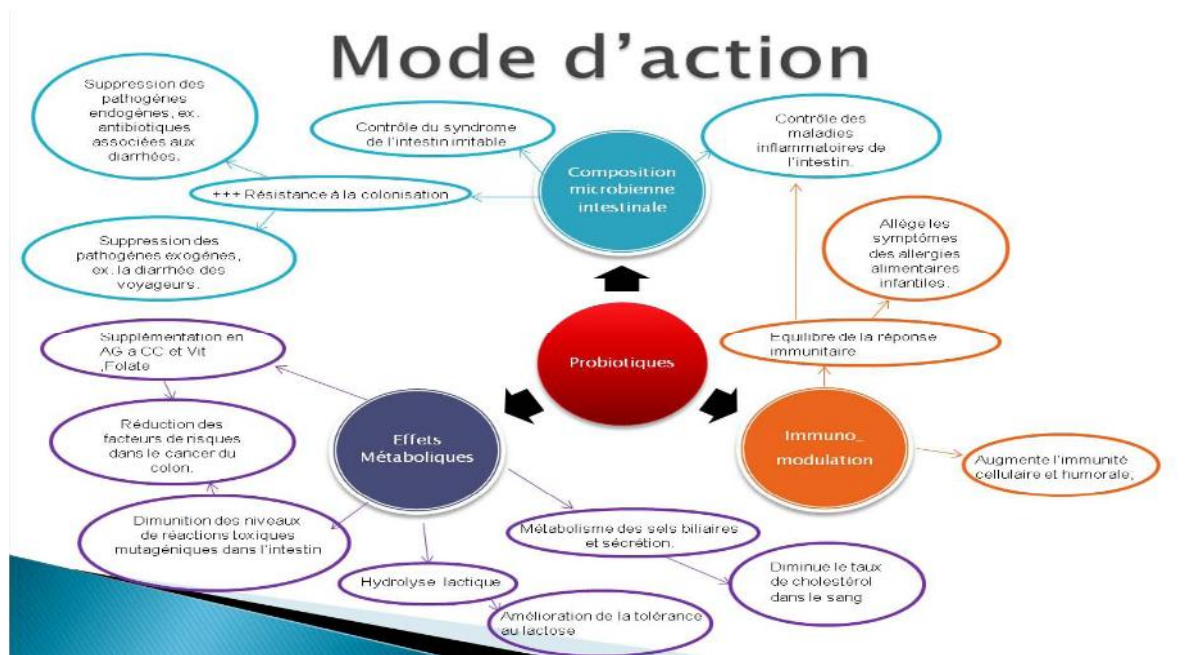


Figure 06 : Résumé des effets sur la santé des probiotiques.

4.5. Effets probiotiques des bifidobactéries :

Plusieurs rôles sont attribués à la présence des bifidobactéries. Un des rôles les plus importants des bifidobactéries, est l'adhésion de celles-ci aux cellules épithéliales de l'intestin ce qui permet de créer une niche écologique et ainsi d'empêcher l'invasion de bactéries pathogènes. Certaines études ont été faites sur l'effet de l'administration de comprimés de bifidobactéries à des gens ayant la diarrhée et il a été remarqué que l'ingestion de ces comprimés aidait à diminuer les symptômes.

L'équipe de Tojo *et al.*, (1987) avait remarqué que les personnes atteintes d'entérites causées par *Campylobacter* guérissaient plus vite lorsque des comprimés contenant *Bifidobacterium breve* leur étaient administrés. Romond, (1989) ont aussi constaté l'effet positif de l'administration d'un lait fermenté avec *B.longum* sur la disparition d'un rotavirus.

Il a aussi été remarqué que les bifidobactéries ont un rôle nutritionnel car elles produisent des vitamines du groupe B, des acides aminés tels que la valine, l'alanine, l'acide aspartique et la thréonine (Rasic *et al.*, 1983). IL est aussi reconnu que les bifidobactéries ont un effet probiotique qui est imputable à leur métabolisme. Ainsi, il a été reconnu que la présence de bifidobactéries chez l'humain diminuait l'intolérance au lactose puisque les bifidobactéries métabolisent le lactose. De plus, la teneur en lactose des produits laitiers fermentés par des bifidobactéries est moins importante que les produits fermentés sans bifidobactéries ce qui rend ces produits attrayants pour les gens souffrants d'intolérance au lactose. Ainsi, il a été remarqué par Blanchette *et al.*, (1996) que la teneur en lactose d'un fromage fait avec *B.infanti.s* était 40% moins importante que pour le fromage sans bifidobactéries, après une journée d'entreposage. Le même phénomène a été observé par l'équipe de Roy *et al.*, (1997) dans le cas de yaourts contenant des bifidobactéries et ceux sans bifidobactéries. La présence des bifidobactéries permet aussi de réduire le niveau de cholestérol sérique. Les bifidobactéries aident à la déconjugation des acides biliaires, la réduction des nitrosamides et l'inhibition de la réduction des nitrates (Nagengast *et al.*, 1988 ; Roberfroid, 2000). Plusieurs études ont aussi noté que les bifidobactéries pouvaient avoir un effet anticancérigène. Ainsi, certains auteurs ont suggéré que le risque du cancer pouvait être réduit en abaissant le pH de l'intestin car cet abaissement empêcherait la colonisation de l'intestin par les bactéries putréfiantes et aurait pour conséquence la réduction de composés potentiellement carcinogènes tels que les produits phénolés (Modler *et al.*, 1990). Or, comme les bifidobactéries produisent de l'acide acétique et de l'acide lactique, il y a un abaissement du pH intestinal (Modler *et al.*, 1990).

4.5.1 Les bifidobactéries comme probiotiques :

Plusieurs souches de bifidobactéries exercent certains effets probiotiques comme la réduction du cholestérol (Molder, 1994), l'amélioration de l'intolérance au lactose (Jiang *et al.*, 1996), la déconjugation des acides biliaires (Lankaputhra *et al.*, 1995) et la stimulation du système immunitaire (Amrouche, 2005; Simone *et al.*, 1992). Cependant, tout comme les probiotiques en général, la capacité des bifidobactéries à protéger contre les infections entériques demeure l'effet probiotique le plus étudié chez ce genre bactérien.

4.5.2.1 Activité des bifidobactéries contre les infections entériques :

Même si le nombre de rapports démontrant l'efficacité des bifidobactéries contre les infections intestinales est beaucoup moins nombreux que ceux impliquant des *Lactobacillus*, il n'en demeure pas moins que la capacité à limiter les infections soit le caractère probiotique des bifidobactéries le plus décrit dans la littérature. Plusieurs souches de bifidobactéries ont montré

leur efficacité à inhiber des pathogènes *in vitro* et à bloquer des infections entériques chez des modèles animaux et chez l'humain.

Plusieurs souches de bifidobactéries ont démontré la capacité de produire *in vitro* des composés actifs contre de nombreuses bactéries pathogènes comme *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, et *Clostridium difficile* (Anand *et al.*, 1984; Anand *et al.*, 1985; Gibson et Wang, 1994; Lee *et al.*, 2003; Meghrou *et al.*, 1990; Touré *et al.*, 2003; Yildirim *et al.*, 1998; Yildirim *et al.*, 1999). Parmi ces composés, certains sont apparentés à des bactériocines, alors que d'autres sont des substances protéiques ne s'apparentant pas à une bactériocine (Gibson *et al.*, 1994). Aussi, une simple réduction du pH par les produits métaboliques comme l'acide lactique ou l'acide acétique permet l'inhibition de pathogènes par les bifidobactéries (Bruno *et al.*, 2002). De plus, certains auteurs rapportent la combinaison de plusieurs facteurs (pH et protéines inhibitrices) pour expliquer l'action anti-pathogène de ces bactéries (Anand *et al.*, 1984; Anand *et al.*, 1985; Meghrou *et al.*, 1990). Les bifidobactéries ont aussi la capacité d'adhérer *in vitro* à des lignées cellulaires intestinales comme les Caco-2 et les HT-29. Cette aptitude leur permet de mieux coloniser le tapis cellulaire et ainsi augmenter leur compétitivité face aux bactéries pathogènes. Cette compétition entre les bifidobactéries et plusieurs pathogènes a été décrite dans la littérature. Bernet *et al.*, (1993) ont démontré que les souches *B. longum* 4 et *B. infantis* 1 diminuent l'adhésion sur des cellules Caco-2 de plusieurs souches de *E. coli* (ETEC, DAEC, et EPEC) ainsi que de *S. typhimurium*. Cette diminution de l'adhésion de ces pathogènes augmente en fonction de la dose de bifidobactéries qui est ajoutée sur le tapis cellulaire. De plus, ces auteurs ont observé que l'adhésion des bifidobactéries sur les cellules intestinales était favorisée par une substance protéique produite par la bifidobactérie dans son milieu de culture (Bernet *et al.*, 1993). D'autres études ont conclu que les bifidobactéries ont la capacité d'inhiber l'adhésion des pathogènes comme *E. coli* O157:H7, *S. enterica* serovar Typhimurium, *L. monocytogenes*, *Enterobacter sakazakii* et *C. difficile* (Collado *et al.*, 2005; Gagnon *et al.*, 2004; Gopal *et al.*, 2001; Liévin *et al.*, 2000).

Ces études proposent certains mécanismes pour expliquer cette compétition : l'encombrement stérique, Le blocage spécifique de récepteurs cellulaires ou la compétition entre les bifidobactéries et les bactéries pathogènes pour les mêmes sites d'adhésion. Cependant, les mécanismes précis permettant l'inhibition de l'adhésion par les bifidobactéries ne sont toujours pas identifiés avec certitude. L'activité des bifidobactéries contre les pathogènes intestinaux a aussi été démontrée *in vivo* chez la souris. Henriksson et Conway (2001) et Silva *et al.*, (2004) ont montré l'impact de l'administration orale de bifidobactéries sur une infection à *Salmonella enterica* serovar Typhimurium chez la souris. Henriksson et Conway ont remarqué

une diminution du compte de *S. typhimurium* dans les fèces des souris et une plus faible perte de poids chez les animaux ayant reçu la souche *B. longum* Lafti B22 comparé aux contrôles d'infection. De leur côté, Silva et coll. rapportent un taux de survie plus élevé chez le groupe de souris ayant reçu oralement la souche *B. longum* Bb46 comparé au groupe contrôle. De plus, les lésions intestinales et hépatiques étaient moins importantes chez le groupe traité avec le probiotique. Ces auteurs expliquent la protection anti-*Salmonella* apportée par le *B. longum* Bb46 par une stimulation du système immunitaire (réponse pro inflammatoire) de la souris par le probiotique. En effet, ils ont observé une augmentation de la production de nombreuses cytokines impliquées dans le processus d'inflammation chez les souris traitées avec le *Bifidobacterium*. Par contre, ils n'excluent pas la possibilité que d'autres mécanismes comme la compétition pour les nutriments ou la modulation de la production de toxines puissent avoir participé à la diminution de l'infection. En plus de *Salmonella*, d'autres souches de bifidobactéries se sont avérées efficaces à diminuer des infections causées par *E. coli* (Podoprigora *et al.*, 1999) et *L. monocytogenes* (Mahoney et Henriksson, 2003) chez la souris. Finalement, des essais chez l'humain mettent aussi en évidence l'efficacité des bifidobactéries à prévenir et à traiter les infections intestinales. Une étude effectuée chez des enfants fréquentant un hôpital a démontré que l'administration de façon préventive d'une formule lactée contenant *B. bifidum* réduisait l'incidence des diarrhées à rotavirus chez ce groupe, comparé au groupe ayant reçu la formule lactée non supplémentée en probiotiques (Saavedra *et al.*, 1994). Des auteurs ont aussi rapporté la prévention de diarrhées à rotavirus suite à l'administration de *Bifidobacterium breve* (Hotta *et al.*, 1987). Enfin, d'autres groupes ont observé l'efficacité des bifidobactéries contre les diarrhées associées à la prise d'antibiotiques (Fooks *et al.*, 2002) et contre les infections à *Helicobacter pylori* (Miller, 2003).

Toutes ces études, autant *in vitro* que *in vivo*, montrent bien la capacité des *Bifidobacterium* à prévenir, atténuer ou traiter les infections intestinales causées par de nombreux organismes pathogènes. Afin d'exercer cet effet, plusieurs mécanismes d'action ont été proposés : la compétition entre les bifidobactéries et les pathogènes pour les nutriments, l'inhibition de l'adhésion du pathogène, la stimulation du système immunitaire de l'hôte et la production par des bifidobactéries de substances inhibitrices comme les bactériocines. Parmi ces modes d'actions possibles, la production de bactériocines par les bifidobactéries n'est pas une voie qui a été beaucoup étudiée et la description dans la littérature de bactériocines de bifidobactéries demeure limitée.

4.5.2.2. Le maintien du pH intercellulaire :

Le maintien du pH intercellulaire est crucial pour le fonctionnement de la cellule. L'incidence des transporteurs cationiques est inconnue chez *Bifidobacterium*. La production de composés basiques est une autre forme de mécanisme qui pourrait favoriser l'homéostasie du pH interne chez les bactéries. La dégradation des acides aminés tels que le glutamate, l'arginine, la lysine et l'ornithine, pourrait contribuer à ce mécanisme où la réaction de décarboxylation consommerait des protons intracellulaires. Les bifidobactéries, malheureusement, sont reconnues pour leur faible activité de décarboxylation du glutamate (Park *et al.*, 2005). Le système de décarboxylation du glutamate nécessite un anti-porteur glutamate/ γ -amino butyrique (GABA) ainsi qu'une enzyme qui convertit le glutamate extracellulaire en acide GABA. Pour l'instant, aucun gène associé à ces activités n'a été identifié dans le génome de *B. longum*. En ce qui a trait à la dégradation de l'arginine, *B. longum* semble posséder les gènes associés à la synthèse de l'arginine, mais ne semble pas avoir les gènes qui encodent l'arginine désaminase (ADI, EC 3.5.3.6) et la carbamate kinase (CK, EC 2.7.2.2) nécessaire à sa dégradation. Ces deux systèmes ne semblent pas contribuer au maintien du pH intracellulaire lors d'un stress acide chez *B. longum*. (Audy, 2008).

5. Caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des bifidobactéries

5.1.1. Morphologie :

Les bifidobactéries sont des bâtonnets de morphologies variables dont la plus caractéristique est une forme en Y (Figure 07). Ce sont des bactéries à Gram-positif, non mobiles, catalases négatives et anaérobies strictes. Leurs conditions optimales de croissance se situent à des températures entre 37°C et 41°C et à des pH compris entre 6,5 et 7,0. Les bifidobactéries sont hétérofermentaires et dégradent les hexoses en produisant de l'acide lactique et acétique dans un ratio molaire de 2:3 (Scardovi, 1986).

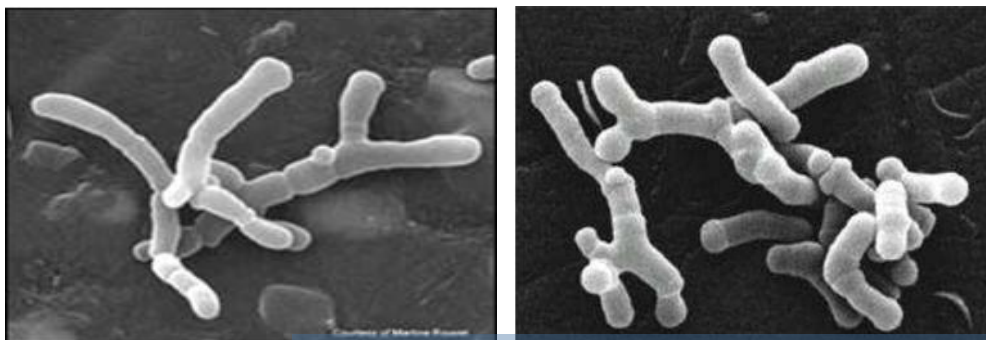


Figure 07: Souche de *B. longum* observé par un Microscopie électronique à balayage (Ventura *et al.*, 2004).

Une approche multiphasique est souvent utilisée pour identifier des bifidobactéries. Cette approche comprend la présence d'une activité fructose-6-phosphoketolase (F6PPK), une enzyme clé du genre *Bifidobacterium* (Ventura *et al.*, 2004). Elle fait également appel à l'identification par des techniques moléculaires via l'utilisation de sondes spécifiques à la région 16S ARNr de l'ADN du genre *Bifidobacterium* (Kaufmann *et al.*, 1997; Roy, 2005). Pour l'identification de l'espèce, la technique d'homologie ADN-ADN demeure la méthode la plus fiable (Biavati *et al.*, 2000).

Actuellement, plus de 33 espèces de bifidobactéries sont connues (Tableau 2, 3 et 4), dont 13 ont été isolées chez l'humain (Leahy *et al.*, 2005). Parmi ces espèces, *B. thermacidophilum* et *B. thermophilum* présentent des caractéristiques particulières. Elles se développent à des températures allant respectivement jusqu'à 49,5°C et 47°C et à des pH inférieurs à 4,5 (Biavati *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2000; Von, 2006).

5.2 Structure de la paroi et de la membrane cellulaire des bifidobactéries :

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 longues chaînes de polysaccharides ainsi que de protéines et d'acides lipoteichoïques (figure 8). La couche de muréine permet à ces bactéries de vivre dans un milieu ambiant qui est fréquemment hypotonique. Les protéines et les acides lipoteichoïques déterminent le caractère hydrophobe de la surface des bifidobactéries (Camp *et al.*, 1985). La structure du peptidoglycane des bifidobactéries est plus proche des *Lactobacillaceae* que des *Actinomycetaceae* (Scardovi, 1986). La composition en acides aminés de la muréine est variable selon les espèces et les souches d'une même espèce. Les acides aminés les plus fréquemment retrouvés sont la L-alanine, l'acide glutamique, la L-ornithine et la D-alanine. Pour certaines espèces et même certaines souches d'une même espèce, l'ornithine est remplacée par la lysine. Au niveau des composants polysaccharidiques de la paroi cellulaire, le glucose, le galactose et le rhamnose sont les plus fréquemment trouvés (Scardovi, 1986). Des différences qualitatives et quantitatives sont observées selon les espèces, les souches et les conditions de croissance. Les acides lipoteichoïques forment des liaisons avec les chaînes de polysaccharides et semblent importants pour l'adhésion cellulaire des bifidobactéries à la paroi intestinale. Plusieurs bifidobactéries ont des lipoglycans de structures variables.

Des études immunochimiques ont démontré que les acides lipoteichoïques portent un antigène commun aux différentes espèces du genre *Bifidobacterium*. La composition en

phospholipides de la membrane est un bon critère de différenciation. Seul *Bifidobacterium* contient des polyglycérolphospholipides et leurs lysodérivés, l'alanylphosphatidylglycerol et les lysodérivés du diphosphatidylglycérol. Des essais de réactions croisées avec des extraits phénoliques d'acides lipoteichoïques de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus* montrent que seuls les premiers réagissent. Il est, dès lors, intéressant d'envisager un sérogroupage avec, comme antigènes de groupe les acides lipoteichoïques (Camp *et al.*, 1985). Les effets des conditions de croissance sur la composition en lipides ont été étudiés par Veerkamp (1977).

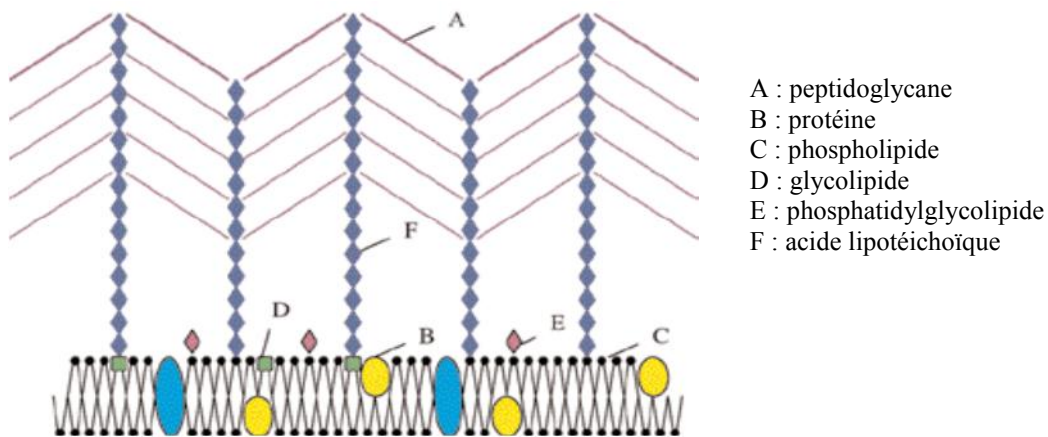


Figure 08 : Modèle pariétal d'une bactérie Gram positive.

Tableau 02 : représente les espèces connues de bifidobactéries et leur habitat.

Tableau 03. La distribution des différentes espèces de *Bifidobacterium* dans le tractus digestif de l'homme en fonction de l'âge (Amrouche, 2005).

Population	Espèces mineures	Espèces majeures
Jeunes enfants nourris au sein		<i>B. longum</i> <i>B. infantis</i> <i>B. breve</i>
Jeunes enfants nourris au biberon	<i>B. bifidum</i> biovar.b	<i>B. adolescentis</i>
Enfants et adolescents		<i>B. infantis</i> <i>B. breve</i> <i>B. bifidum</i> biovar.b <i>B. longum</i>
Adultes	<i>B. bifidum</i> biovar.a	<i>B. adolescentis</i> biovar.a et b
Personnes âgées		<i>B. adolescentis</i> biovar.b <i>B. longum</i>

Tableau 04: les niveaux Quantitative et incidence de Predominance des espèces de *Bifidobacterium* dans la microflore des enfants et leurs mères ($M \pm m$) (Kulagina *et al.*, 2010).

Espèce <i>Bifidobacterium</i>	Enfants	Mères
	log GFU/g	
<i>B. bifidum</i>	9.5± 0.7	8.9±0.6
<i>B. longum</i>	9.7±0.8	8.5±0.8
<i>B. breve</i>	9.5±1.0	8.6
<i>B. longum</i> bv. <i>infantis</i>	9.7±0.6	<8.0
<i>B. catenulatum</i>	<8.0	8.8±0.8
<i>B. adolescentis</i>	9.8±1.2	9.4±0.5
<i>B. dentium</i>	8.3	<8.0
<i>B. angulatum</i>	9.8	<8.0

5.2. Physiologies des bifidobacteries :

5.2.1 Température :

Les espèces de bifidobactéries d'origine humaine montre une croissance à une température varie entre 36° et 38°C par contre les espèces d'origine animales peuvent se croître a des températures plus élevée qui varie entre 41° et 43°C (Scardovi, 1986 ; Martin et chou, 1992). L'espèce *B.thermacidophilum* pousse a 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 avec l'exception de *B.psychroaerophilum* qui a une faible croissance a 8°C (Simpson *et al.*, 2003).

5.2.2. L'Oxygène :

Les bifidobactéries sont des microorganismes anaérobies stricts (Scardovi 1984), mais la sensibilité à l'oxygène varie entre les espèces (De Vries et Stouthamer 1967). Les espèces qui tolèrent l'oxygène (ex : *B. lactis*, *B. aerophilum* et *B. psychroaerophilum*) présentent une faible activité catalytique qui élimine les traces du super oxyde d'hydrogène formées (H₂O₂) ou par le fait que le NADH oxydase de ces souches ne forme pas de H₂O₂, alors l'accumulation d'HO₂ inhibe l'activité de F6PPK. Pour les souches extrêmement sensibles à l'oxygène, n'accumulent pas l'H₂O₂ et l'oxygène bloque la multiplication bactérienne par l'intermédiaire d'un potentiel d'oxydoréduction trop élevé (Scardovi, 1986 ; Romond *et al.*, 1992 ; Shimamura *et al.*, 1992, Ventura *et al.*, 2004).

5.2.3 Le pH :

Les bifidobactéries sont considérées comme des microorganismes acidophiles, mais elles ne supportent pas les pH trop bas > 4 et les pH basiques < 9 (Biaviti *et al.*, 1992). A l'exception l'espèce *B.animalis supp lactis* résiste à un pH =3.7 (Meile *et al.*, 1997). 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(Collins *et al.*, 1984 ; Scardovi , 1986).

5.2.4. La sensibilité aux antibiotiques :

Les bifidobacteries sont généralement sensible aux antibiotiques du spectre Gram positif (macrolides, bacitracine, erythromcine, lincomicine, novobicine et vancomicine) aussi aux beta-lactamine (penicilline, ampicicilline, amoxicilline, piperacilline et ticarcilline) (Delagdo *et al.*, 2005 ; Moubarek *et al.*, 2005 ; Zhou *et al.*, 2005 ; Masco *et al.*, 2006 ; Ammor *et al.*, 2007). La sensibilité des bifidobacteries au tetracycline est variables selon les espèces (Delagdo *et al.*, 2005; Masco *et al.*, 2006 ; Ammor *et al.*, 2007). Beaucoup d'espèces des bifidobactrie sont résistante aux antibiotiques du spectre Gram négatif (acide fusidique, acide nalidixique et polymixine) et les aminoglycosides (neomycine, gentamicine, kanamicine et streptomycine) (Charteris *et al.*, 1998 ; Delagdo *et al.*, 2005; Moubarek *et al.*, 2005 ; Zhou *et al.*, 2005 ; Masco *et al.*, 2006 ; Ammor *et al.*, 2007).

5.3. Les caractéristiques des principales espèces utilisées dans les aliments.

5.3.1. *Bifidobacterium longum*:

C'est une espèce dominante de la flore intestinale du nourrisson, elle a été isolée aussi chez les animaux (rats, cochon, et veaux). Les cellules de cette espèce sont très allongées, minces, formes irrégulières et leur Gram est variable (Ballongue, 1993). Les souches étudiées présentent des taux d'homologie de 50-76% (Scardovi, 1986). La nomenclature de

Bifidobacterium longum a été proposée en 1963. Cette espèce fermente les pentoses, sa température de croissance maximale est de 35 °C à 45°C (Buchanan *et al.*, 1974).

5.3.2. *Bifidobacterium bifidum* :

Il s'agit de l'espèce type du genre, découvert par (Tissier, 1900) dans les selles de bébés allaités au sein. Les bactéries en forme de bâtonnets ont des apparences très variables (0,5 à 0,7 μ \times 2 à 5 μ), la présence de Co₂ est indispensable à la croissance, leur température de croissance minimale est de 25°C 32°C et pas de croissance en dessous de 20°C et au delà de 45°C, le pH optimum est de 6-7. Leur taux d'homologie est inférieur à 30% avec les autres espèces.

5.3.3 *Bifidobacterium breve* :

Les cellules bactériennes ont une forme courte, fine ou épaisse en bâtonnets associés. Leur température de croissance est de 35 °C à 37°C et pas de croissance à 46.5. Elle est rencontrée chez le nourrisson allaité exclusivement au sein. Les souches présentent des taux d'homologie de 40-60 % (Gavini *et al.*., 1990).

5.3.4 *Bifidobacterium infantis* :

Elle prédomine les bifidobactéries retrouvées dans les selles de bébés allaités au sein, sa morphologie cellulaire ne présente pas de traits spécifiques au genre. C'est une espèce qui se rapproche de l'espèce *Bifidobacterium longum* avec un taux d'homologie de 50-70 %. Il produit l'uréase et synthétise la thiamine, l'acide nicotinique et l'acide folique.

5.3.5 *Bifidobacterium lactis*:

Elle peut être isolée à partir des selles de l'homme (nouveau-né et adulte), du lapin et du poulet et elle est retrouvée dans les eaux usées. Se sont des bacilles Gram positive, de forme très irrégulière et présentent souvent des branchements ou des extrémités bifides. Elle se caractérise par une température optimale entre 39 et 42°C, par une tolérance d'une faible tension d'oxygène et par sa croissance dans le lait et les milieux à base du lait et par la production d'acide lactique, d'acide acétique et surtout d'acide formique et leur survie à pH 3,5 (Matsumoto *et al.*, 2004). Les souches présentent un taux d'homologie de 61% (Masco *et al.*, 2004).

Tableau 5: profile fermentaire des différentes espèces de *Bifidobactérium* (Scardovi, 1986).

espèces	sucres									
	Xyl	Man	Fruc	Gal	Sucr	Treh	Mlb	Matol	Inul	Sali
<i>B bifidum</i>	-	-	+	D	-	-	D	-	-	-
<i>B. longum</i>	D	D	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>B. longum</i> <i>Biotype Infantis</i>		D	+	+	+	-	+	-	D	-
<i>B. breve</i>	D	+	+	+	+	D	+	D	D	+
<i>B.adolescentis</i>	-	D	+	+	+	D	+	D	D	+
<i>B. angulatum</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>B. catenulatum</i>	+	-	+	+	+	D	+	D	D	+
<i>B. Pseudocatenulatum</i>	+	+	+	+	+	D	+	-	-	+
<i>B. Dentium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>B. pseudolongum</i> <i>subsp. Globosum</i>	D	-	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i> <i>subsp. pseudolongum</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>B. cuniculli</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>B. choerinum</i>	D	-	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>B. Animalis</i>	+	D	+	+	+	D	+	-	-	+
<i>B. Thermophilum</i>	+	-	+	+	+	D	+	-	D	D
<i>B. boum</i>	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>B. magnum</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>B. pullorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>B. longum</i> <i>Biotype suis</i>	+	D	D	+	+	-	+	-	-	-
<i>B. minimum</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>B. subtile</i>	-	-	+	+	+	D	+	-	D	D
<i>B. coryneforme</i>	+	+	+	+	+	-	+	-		+
<i>B. asteroides</i>	+	-	+	+	D	-	+	-	-	+

<i>B. indicum</i>	-	D	+	+	D	-	+	-	-	+
-------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Xyl : Xylose, Man : Mannitol, Fruc : Fructose, Gal : Galactose, Sucr: Sucrose, Treh: Trehalose , Mlb: Melobiose , Malt: Maltose, Inul: Inulin, Sali: Salicin.

5.3.6. *B. Adolescentis* :

Ce sont des bâtonnets, courts, incurvés, anaérobies et ont des apparences variables; leur isolement se fait à partir de caries dentaires, du vagin humain et des selles de nourrissons (Scardovi., 1986). La croissance optimale est obtenue à la température optimale de 35°C à 37°C; la croissance est inhibée à 20°C et 46.5 °C (Bouchaman, *et al.*, 1974). La présence de l'acide et CO₂ stimule l'utilisation de la voie oxydative des hexoses mono phosphates qui fermentent le gluconate.

5.3.7 *B. Pseudo Longum* :

Ce sont des cellules bactériennes qui ont des formes coccoïde ou incurvées courtes souvent associées en deux et rarement en chaînes par fois isolées. Elles exigent pour leur croissance un pH optimale de 6.5 et 7; leur croissance est lente à p H: 6 et inhibée à pH: 8 (Buccheri, *et al.*, 1979). Elles ont été isolées à partir de selles de souris, de poulets, de bovins et d'ovins.

5.3.8. *B. Thermophilum* :

Leur association se fait en paires avec des jonctions entre deux cellules présentant un aspect irrégulier; pas de fermentation de ribose ni de xylose (Bensoltane, *et al.*, 1997). Leur température de croissance optimale est de 46°C avec un pH optimal de croissance de 6.5 à 7. Elles sont isolées à partir de selles de porc, de poulet et de rognons des bovins.

5.3.9. *B. Suis* :

Cette espèce a des cellules en forme de bâtonnets fins et font jusqu'à 6 mm de long avec des colonies lisses, blanches. Elles sont anaérobies et circulaires. Elles poussent dans des conditions optimums de température minimale de 20°C et la température maximale de 44°C, pas de croissance à 60°C (Bouchaman, *et al.*, 1974).

5.4. Les besoins nutritionnels des bifidobacteries :

En générale les bifidobactéries sont capables d'utiliser les sels d'ammonium comme seule source d'azote par contre d'autres espèces comme *B. magnum*, *B. cuniculi* et *B. choerinum* exigent la présence d'azote organique (Hassinen *et al.*, 1951). L'activité des enzymes comme

le glutamate déshydrogénase et le glutamine synthétase permet l'assimilation d'ammonium. Ces deux enzymes sont isolés et caractérisés à partir de *B. breve*, *B. pseudolongum* et *B. bifidum* (Ballongue, 1993).

Aussi la croissance des bifidobactéries est stimulée par la présence d'ions, vitamines et par d'autres facteurs qui sont métabolisés par l'hôte ou par les microorganismes du tractus gastro-intestinal comme la thréonine, extrait de levure, cystéine, dextrine, maltose et β -glycérophosphate et les facteurs bifidogènes qui sont des substances qui se trouvent dans le lait maternel. Ces facteurs incluent N-acétyl glycosamine, fructooligosaccharides, lactoferine, lactulose, lactitol, oligosaccharides et les polysaccharides (Modler *et al.*, 1997).

5.5. Facteurs Bifidogènes :

Le terme de facteur Bifidogène a été employé par Gyoigy en 1953 (Gibson *et al.*, 1995). Ces facteurs sont spécifiques à chaque espèce de Bifidobactérie; leurs origines sont diverses soit : le monde microbien (extrait de levure) soit le monde végétatif (extrait des végétaux) ainsi que le lait maternel. Ces facteurs jouent un rôle dans la stimulation de la croissance de *B. Bifidum*, *B. infantis*, *B. longum* et *B. brève* (Gibson *et al.*, 1995); ce sont des dérivés de N-Acétyle glucosamine lactose, des peptides ou des substances semblables aux peptides et aux vitamines ou bien des oligosaccharides dans le lait humain (Gyorgy, *et al.*, 1995). Dans le lait de vache et dans les laits modifiés, ces facteurs Bifidogènes sont absents.

En 1953 « Gyoigy » emploie pour la 1^{ère} fois le terme « facteur bifidogènes » pour désigner des substances inconnues indispensables à la croissance d'un mutant *bifidobacterium bifidum* var b. Les facteurs bifidogènes sont spécifiques à chaque espèce de *Bifidobacterium*, ils sont d'origine diverse (Tableau 2). Les végétaux et certains microorganismes constituent une source de nombreuses substances stimulant la croissance des espèces de *Bifidobacterium* (*bifidum*, *infantis*, *longum* et *breve*) (Gibson *et al.*, 1995). Ces facteurs bifidogènes sont surtout présents dans le lait maternel, il s'agit en effet des oligosaccharides ou des fructooligosaccharides. De ce fait il a été remarqué que le nombre de bifidobactéries est très important chez les bébés nourris au sein par rapport à ceux allaités aux laits maternisés.

Les facteurs bifidogènes retrouvés dans les végétaux sont communément appelés des fibres. Actuellement ces facteurs sont ajoutés aux aliments qui contiennent des souches de bifidobactéries.

5.5.1. Facteurs Bifidogène 1 :

Il se forme à partir de glucoprotéine dans la fraction et la N-Acétyle glucosamine, il est l'un des composés de lait (Ashoor, *et al.*, 1983).

5.5.2. Facteurs Bifidogène 2 :

C'est un peptide partiellement libéré après l'hydrolyse de la caséine par une peptidase et il est non glucoside (Gyorgy, 1999).

5.5.3 Facteurs Oligosaccharidiques

- **Fructo-oligosaccharides:**

Les Fructo-oligosaccharides sont composés d'une mixture d'oligosaccharides constitués à leur tour de glucose lié à des unités de fructose (Bouhinik, *et al.*, 1996). La production de B. fructosidase est due à la stimulation de la croissance de bifidobactéries en utilisant les fructo-oligosaccharides (Wang *et al.*, 1993). Il est certain que les fructo-oligosaccharides ont une importance dans la réduction de la production des substances toxiques dans le colon et arrête la constipation et même diminue le taux de cholestérol dans le sérum, la tension artérielle et le taux de glucose dans le sang chez les diabétiques (Hidaka, *et al.*, 1986).

- **Galacto- oligosaccharides :**

Ce sont des facteurs utilisés pour maintenir de bonnes conditions gastro- intestinales et une augmentation du taux du *Bifidobactéries* (Ito *et al.*, 1993); la qualité minimale augmentant le nombre de bifidobactéries est de 10g/jour est la qualité maximale et de 15 g/jour (Ito, *et al.*, 1997). Des symptômes tels que les douleurs abdominales, peuvent apparaître dès que les galacto-oligosaccharides sont fermentés dans le colon (Gibson *et al.*, 1995).

5.6. Facteurs Protéiques :

L'exigence des Bifidobactéries en facteurs protéiques est très variable selon les souches. En 1998 Gohes *et al.*, ont remarqué que l'absence de petits peptides et d'acides aminés libres cause la faible croissance de ces bactéries dans le lait; il a été prouvé que l'addition de fractions d'hydrolysats de lait obtenus par un traitement de ce dernier par la protéinase, ainsi que d'autres hydrolysats par un traitement à la neutrase, intensifie (le taux de B- lactis) la qualité d'acides aminés libres et des peptides jusqu'à un large rang de facteurs bifidogènes sous forme de peptides et d'aides aminés. Les Bifidobactéries possèdent des systèmes de transport des acides aminés et des peptides les aminopeptides, iminopeptides et dipeptides (Fox., 1982). L'action de

ces derniers détermine l'effet d'aide aminé pour la croissance (Gommes *et al.*, 1998). Les extraits des certaines s'antes d'aratoires peuvent respire eu stimulant la croissance de quelques espèces de *Bifidobactirum* dans le cas l'absence ou de la présence de source de carbone.

7. Biochimie des bifidobacteries :

7.1 Le Métabolisme :

La majorité des bifidobactéries utilisent le lactose, le glucose, le galactose, le sucrose et le fructose comme sources de carbone. 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 al.*, 1983). Une étude faite sur 22 souches de bifidobactéries d'origine humaine a démontré que toutes les souches testées possédaient les activités α et β galactosidases et une activité α -glucosidase (Desjardins *et al.*, 1990). La voie métabolique du fructose-6-phosphate phosphocétolase produit de l'acide lactique et de l'acide acétique comme métabolites primaires en proportion de 2/3 figure 09 (Scardovi *et al.*, 1965 ; DeVries *et al.*, 1967). 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 la suite, une partie de l'acide acétique est transformé en éthanol (DeVries *et al.*, 1968; Lauer *et al.*, 1976).

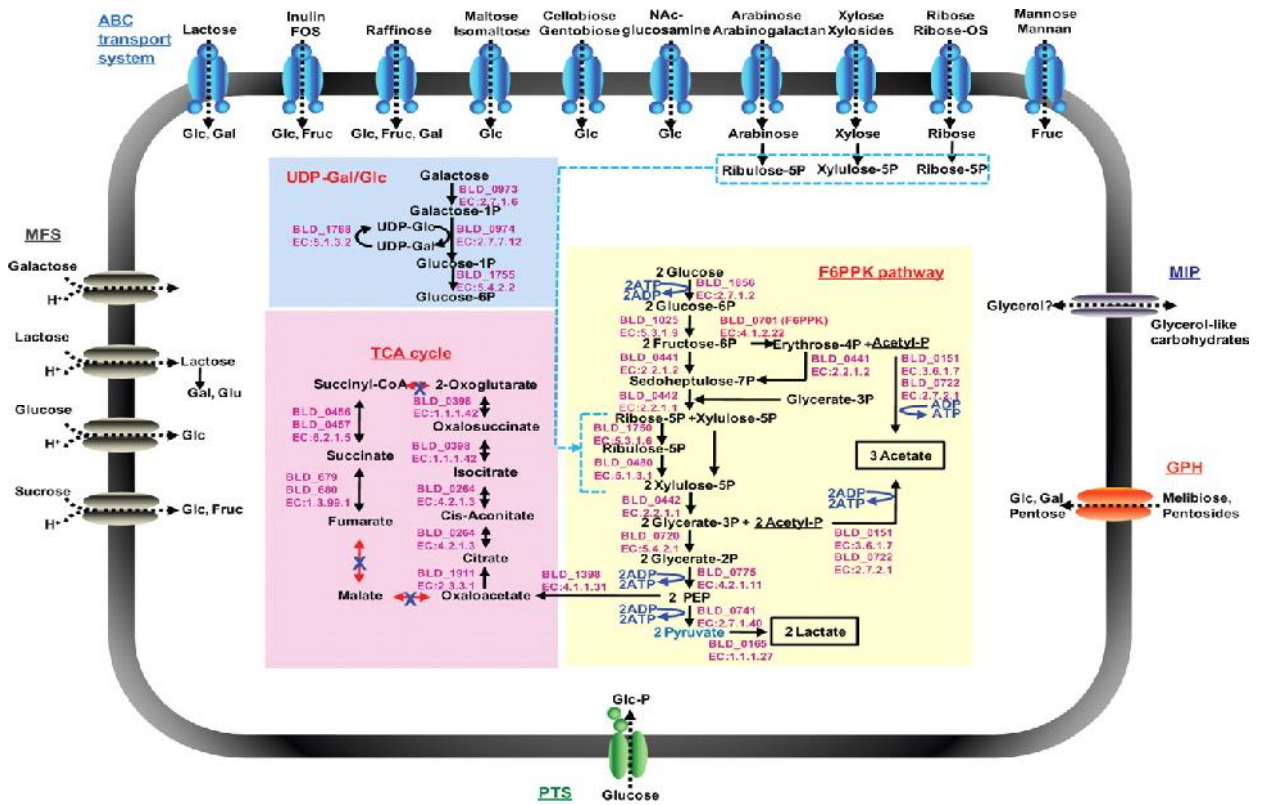


Figure 09: schéma général de la voie bifide F6PPK (Bifid-Shunt) (Lee *et al.*, 2012).

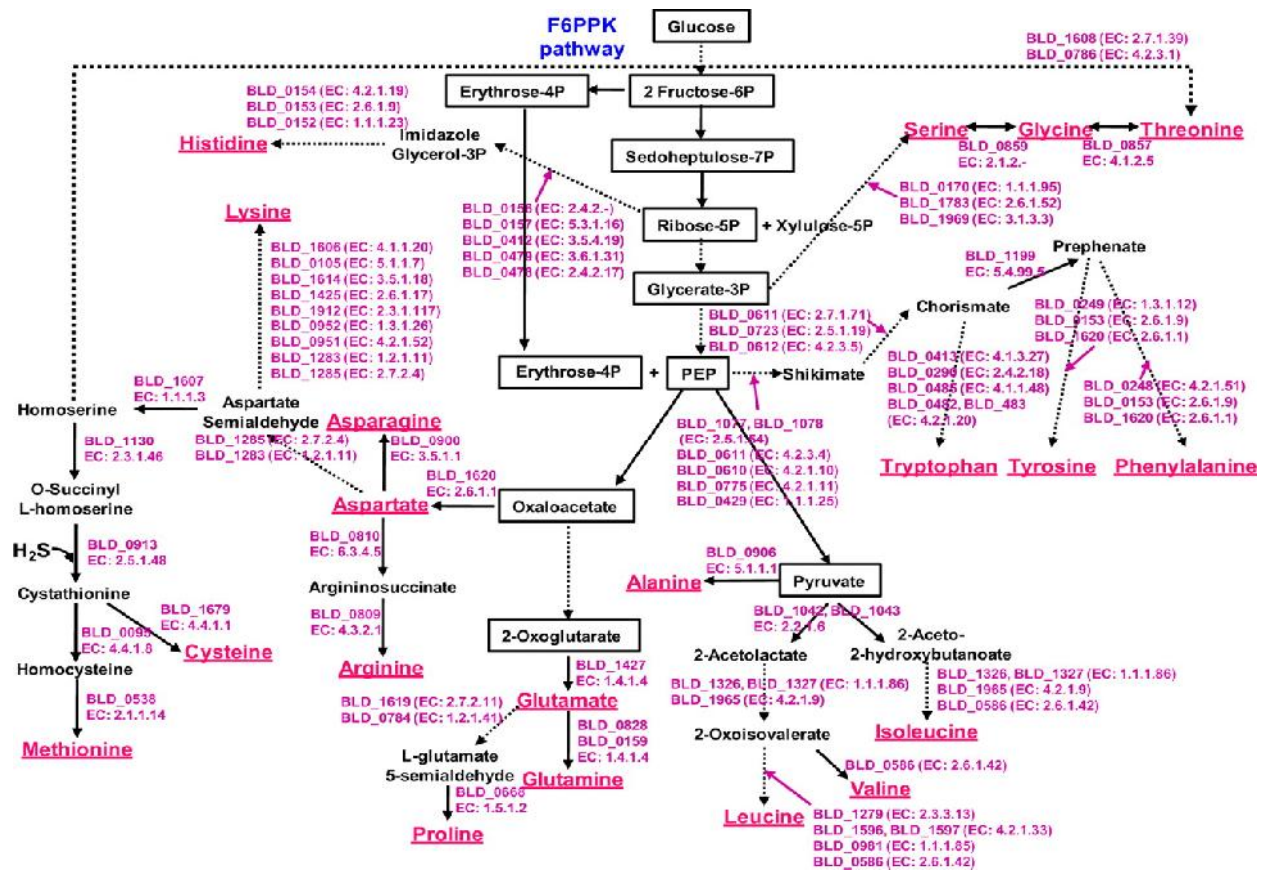


Figure 10: schéma de la production des acides aminés à partir de la voie bifide F6PPK (Daniel *et al.*, 2010).

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* excrète un taux trop élevé de l'acide nicotinique et le biotine, de même *B.bifidum* et *B.infantis* possèdent une bonne production des vitamines B1 et B9 (Tamura ,1983).

8. Génétique des bifidobactéries :

8.1. Pourcentage en base cytosine guanine de l'ADN :

Les bifidobactéries ont un pourcentage en base G+C plus élevé que la plupart des autres espèces bactériennes (Delcenserie *et al.*, 2002) . Ce taux est en générale supérieur à 55% par apport aux bases A+T. Les bifidobactéries sont classer en trois groupes : le premier regroupe les riches en G+C dont le pourcentage est de 55-67% , le deuxième regroupe les pauvre en G+C dont le pourcentage est de 45% et les bifidobacteries ayant un pourcentage de G+C intermédiaire 55% (Delcenserie *et al.*, 2002).

8.2. Les plasmides des bifidobactéries :

Les plasmides sont détectés chez cinq espèces de Bifidobacterium : *Bf longum*, *Bf breve*, *Bf. globosum*, *Bf. asteroïdes* et *Bf. indicum* (Lee *et al.*, 2006). Vingt pour cent des souches de bifidobactéries contenaient un ou plusieurs plasmides dans les 4 espèces concernées par une étude de Sgorbati *et al.* En 1982, à savoir, *Bf. longum*, *Bf.globosum*, *Bf. asteroïdes* et *Bf. indicum*. *Bf. longum* est la seule espèce d'origine humaine dont 70% des souches sont porteuse d'ADN extrachromosomique (Sgorbati *et al.*, 1982 ; Sgorbati *et al.*, 1986). L'étude réalisée par Iwata et Morishitat, 1989 sur *Bf breve* a révélée la présence des plasmides dans 77,6% des souches. L'intérêt pour les plasmides des bifidobactéries s'est manifesté en 1982, le groupe de Sgorbati a analysé 1 461 isolats représentant 24 différentes espèces du genre *Bifidobacterium* pour la présence d'ADN plasmidique. Environ 20% des isolats portaient des plasmides. Cependant, ces souches se regroupaient dans seulement 4 espèces : *B.longum*, *B. globosum*, *B. asteroïdes* et *B. indicum*. Plusieurs profils plasmidiques ont été établis mais aucun phénotype n'a pu être corrélé avec la présence des plasmides (Sgorbati *et al.*, 1982). Dans une autre étude, un total de 42 souches de *B. breve* ont été isolées de fèces humaines et la présence de plasmides a été observée chez 40% d'entre eux (Iwata *et al.*, 1989). Cinq profils plasmidiques différents ont été mis en évidence chez cette espèce bactérienne (Iwata *et al.*, 1989).

E.coli. Récemment d'autres études décrivent l'activité antagoniste ou l'activité antimicrobienne spécifique des bifidobactéries liées à la production des acides lactique et acétique ou à la production des bactériocines (Yildirim *et al.* 1999 ; Abd El-Salam *et al.* , 2004 ; Bevilacqua *et al.*, 2003 ; Cheikhoussef *et al.*, 2007 ; Cheikhoussef *et al.*, 2008).

9.1. Effet anti microbien :

De nombreuses études, *in vitro*, sur les *bifidobactéries* montrent sur leur effet antagoniste contre différentes bactéries pathogènes telles que *Shigella dysentrea* (Kirjavainem *et al.*, 1998), *E. coli* (Shah, 1997) et *Yersinia enterocolitica*. Une étude réalisée par Desmazeaud., (1996) a montré que les effets de la prolifération de certaines souches pathogènes peuvent être inhibés par l'ingestion de ferments lactiques par les mécanismes suivants :

- Sécrétions de certaines substances antimicrobiennes par *bifidobactéries* (H₂O₂ Acide lactique. Acide acétique).
- Abaissement du pH par les acides produits.
- Prévention de la synthèse d'amines toxiques.
- L'effet d'une barrière par compétition métabolique ou l'empêchement de la colonisation de bactéries pathogènes par la fixation sur le tube digestif.
- La dégradation des entérotoxines par une détoxification.

Certaines souches de bifidobactéries jouent un rôle de protecteur contre les entérocolites nécrotoques néonatales (NEC) en évitant le développement de ces dernières par l'inhibition de la croissance de bactéries potentiellement pathogènes tels que *Clostridium difficile* (Brutel, *et al.*, 1998).

9.2. Substances antimicrobiennes des *bifidobactéries* :

Acides organiques (acétique – lactique) :

L'action des acides (acétique et lactique) sur la membrane cytoplasmique bactérienne maintient le potentiel membranaire et inhibe le transport actif (Devuyest *et al.*, 1994).

-L'effet d'inhibition des levures, des moisissures et d'entérobactéries est plus observé avec l'acide acétique qu'avec l'acide lactique.

Peroxyde d'hydrogène :

L'accumulation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est souvent due à certaines souches de bifidobactéries sensibles à l'oxygène (O_2), et au même temps il est considéré comme un inhibiteur de quelques micro-organismes (Morris, 1976). Des études réalisées par Fontaine *et al.*, 1996 ont montré qu'à cause de l'aptitude des systèmes enzymatiques, telles que les Flavo protéines et les peroxydes, à scinder l' H_2O_2 , il n'est pas clair si n'importe qu'elle contribution d' H_2O_2 , *in vivo*, est une activité antimicrobienne.

9.3 Bactériocines :

La production d'autres agents antimicrobiens, tels que les bactériocines, ont aussi été rapportés principalement lors d'études *in vitro*. Les bactériocines sont définies comme des composés protéiques ayant une activité inhibitrice contre un large spectre de souches bactériennes (Klaenhammer, 1993). Elles agissent principalement sur la membrane externe des bactéries cibles en formant des pores qui mènent à la libération du contenu intracellulaire et à la mort de la bactérie affectée (Klaenhammer, 1993). Les lactobacilles sont souvent associés à la production de bactériocines (Fooks *et al.*, 2002). La production de bactériocines par les souches de bifidobactéries est moins documentée. Néanmoins, il a été rapporté que la souche *B. bifidum* NCFB 1454 produit une bactériocine active contre *Listeria monocytogenes* (Yildirim *et al.*, 1998). Un composé antimicrobien produit par des bifidobactéries humaines, *Bifidobacterium* spp CA1 et F9, a été identifié récemment et il consistait en une ou plusieurs molécules lipophiles avec une masse moléculaire de moins de 3,500 Da (Liévin *et al.*, 2000). Ces auteurs ont démontré que ces composés antimicrobiens étaient actifs contre *Salmonella typhimurium* SL1334 et qu'une diminution de 4 logarithmes de l'adhésion du pathogène aux cellules Caco-2 pouvait être obtenue. Ces auteurs ont également évalué cette activité antimicrobienne *in vivo* avec des souris axéniques C3/He/Oujco infectées par *S. typhimurium* C5. Les souris recevant les bifidobactéries CA1 et F9 étaient protégées de l'infection létale comparativement aux souris contrôles qui ne vivaient pas plus de 10 jours après l'infection. Cependant, même si certaines bactériocines présentent une forte activité *in vitro* et *in vivo* chez les souris contre certains pathogènes, la démonstration de la production et l'activité des bactériocines dans le tube digestif humain est à établir. Lors d'expérience *in vitro*, certains auteurs ont proposé une action synergétique entre les substances protéiques antimicrobiennes et l'acide organique pour expliquer l'action inhibitrice des bactéries probiotiques. Ainsi, Gopal *et al.*, 2001) ont mené une série d'expériences pour étudier l'inhibition *in vitro* d'une souche d'*E. coli* O157:H7 par *L. rhamnosus* DR20, *L. acidophilus* HN017 et *B. lactis* DR10.

Le pré-traitement d'*E. coli* O157:H7 avec les surnageants de culture des bactéries réduit l'association de ce pathogène avec les cellules Caco-2 et HT-29. Les molécules inhibitrices sécrétées dans les surnageants par ces bactéries sont partiellement affectées par des traitements avec le lactate déshydrogénase, trypsine et protéinase K laissant suggérer que les substances protéiques antibactériennes ne sont pas uniquement responsable de l'inhibition et qu'elles agissent de concert avec l'acide produit. Selon Servin *et al.*, (2004) ceci s'expliquerait par une diminution du pH qui provoque une perméabilisation de la membrane externe des bactéries Gram-négatif facilitant ainsi la pénétration d'autres substances antimicrobiennes telles que les bactériocines. Caplice *et al.*, 1999 ont suggéré que les bactériocines sont considérées comme des produits extra cellulaires libres de la synthèse ribosomale bactérienne et peuvent avoir un spectre relativement étroit d'activité bactéricide. Certaines souches de *Bifidobacterium* produisent ces bactériocines; leur destruction par les enzymes digestives est un avantage pour eux par rapport aux antibiotiques (Caplice, *et al.*, 1999). La cible des bactériocines est la membrane cytoplasmique et la barrière protectrice fournie par les LPS (Lipo-Poly-Saccharides) de la membrane externe des bactéries gram négatif.

9.3.1. La Biologie des bactériocines

Les bactériocines ont été identifiées pour la première fois il y a presque un siècle, comme des molécules sensibles à la chaleur, présents dans les cultures d'*E. coli* V et toxique pour *E. coli* S. Ces molécules ont été appelées colicines, en référence à l'espèce productrice. Frederiq a montré que les colicines étaient des protéines et qu'elles avaient une activité limitée dépendante de la présence de récepteurs spécifiques sur la membrane des souches sensibles (Frederiq *et al.*, 1946). Depuis ce temps, les bactériocines ont été trouvées dans les principaux lignages bactériens. (Klaenhammer, 1988), estime que 99% des bactéries pourraient produire au moins une bactériocine. En pratique, les proportions détectées sont généralement bien inférieures, ce qui peut être attribué au fait que l'activité des bactériocines concerne en général une gamme étroite de bactéries et est spécifique à la souche. Elle peut ainsi passer inaperçue si elle est testée sur un nombre faible de souches cible.

Ce spectre d'activité bactéricide spécifique distingue les bactériocines des BAL des antibiotiques classiques. L'activité de ces bactériocines est en effet souvent limitée à des espèces proches de la souche productrice, bien que certaines bactériocines identifiées contredisent cette définition en montrant un spectre d'activité plus large incluant des

9.3.3 Biosynthèse des bactériocines

La comparaison des clusters génétiques de plusieurs bactériocines révèle un certain nombre de gènes conservés codant pour des protéines avec des fonctionnalités similaires. Ces clusters constituent en effet des opérons qui peuvent être portés par un chromosome, par un plasmide ou par des transposons. L'organisation du locus impliqué dans la production d'une bactériocine consiste au minimum en un gène de structure, généralement Co-transcrit avec son gène d'immunité qui protège le producteur des effets de la bactériocine. Habituellement, un autre groupe de gènes comporte les éléments nécessaires au transport dédié et parfois un troisième locus correspond à un système régulation qui permet l'induction de la production de la bactériocine (Morisset *et al.*, 2005). Dans le cas des lantibiotiques on trouve aussi les gènes codant pour les enzymes responsables des modifications post-traductionnelles.

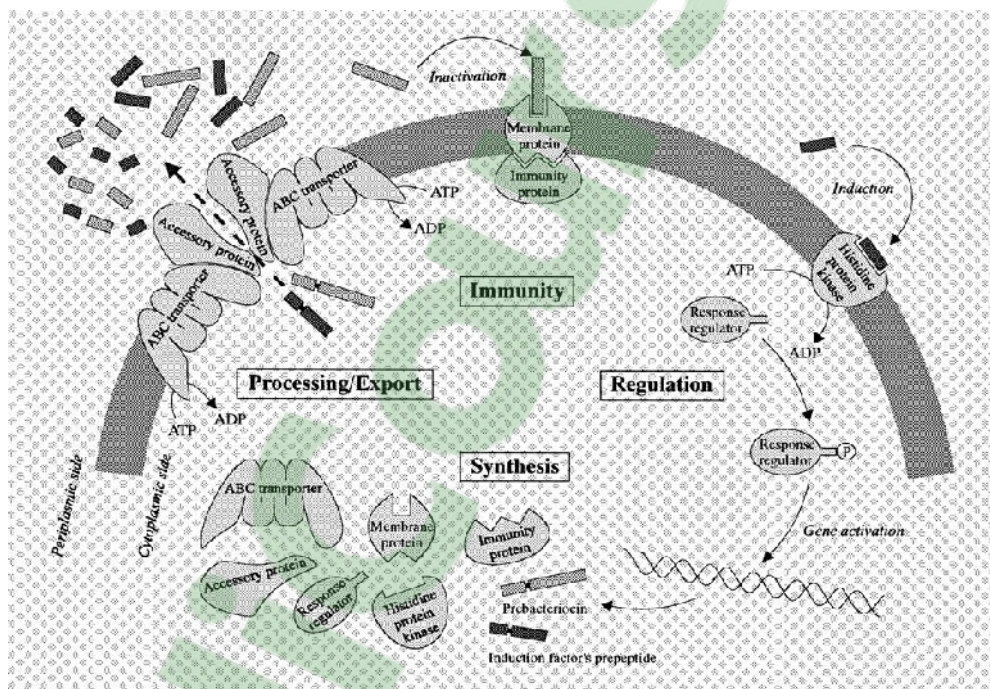


Figure 13 : Vue schématique d'un possible système de production d'une bactériocine : système de régulation à trois composants, synthèse, maturation et immunité. (Ennahar, 2000)

9.3.4. Mode d'action

Le mode d'action le plus connu et le plus répandu chez les bactériocines des BAL implique une action visant la fonction de barrière de la membrane, mais il existe des exceptions à ce mode général. Les bactériocines de la classe II représentent le cas typique de bactériocines agissant sur la membrane cytoplasmique des cellules sensibles en dissipant

la force proton motrice (PMF) par la formation de petits pores membranaires. Ceci est précédé par une interaction des résidus chargés positivement et des régions hydrophobes de structure hélicoïdale de la bactériocine avec les membranes cytoplasmiques, caractérisées par un potentiel transmembranaire élevé et des phospholipides chargés négativement (Chatterjee *et al.*, 2005). Deux étapes peuvent en réalité être distinguées : d'abord, les molécules de bactériocine se fixent à la surface de la membrane et quand la concentration locale est élevée, l'orientation des molécules change et elles sont insérées dans la membrane causant la déstabilisation de la structure de la bicouche et la formation de pores (Figure 14). Ceci résulte en un flux d'ions, d'acides aminés et d'ATP vers l'extérieur de la cellule et en la dissipation de la PMF, avec comme conséquence la mort de la cellule par annulation de toutes les réactions énergie- dépendantes. A concentrations proches de la concentration minimale inhibitrice, les bactériocines tuent les bactéries beaucoup plus rapidement que les antibiotiques conventionnels (Chatterjee *et al.*, 2005).

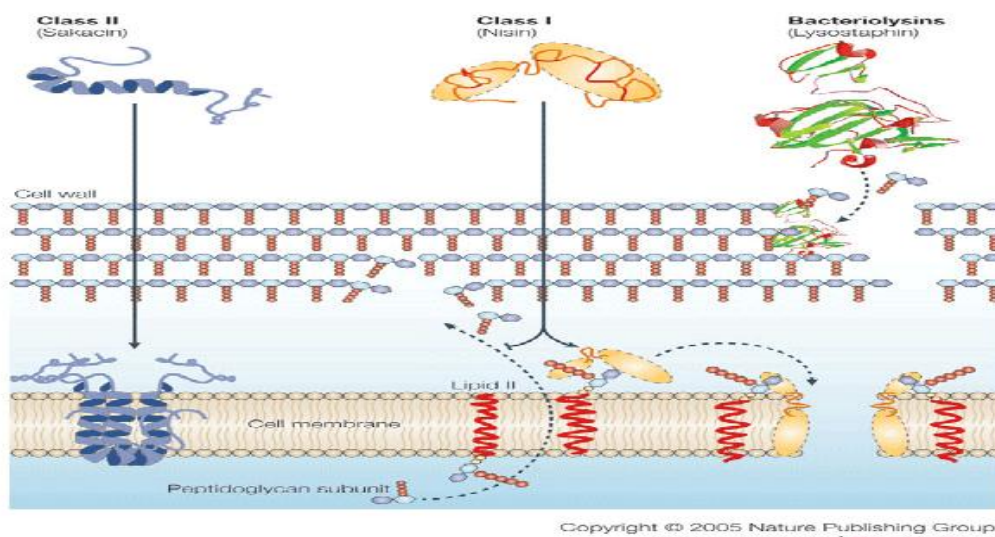


Figure 14 : Mode d'action des bactériocines des bactéries lactiques. Source (Cotter *et al.*, 2005).

9.4 Ecologie des bactériocines

La fonction naturelle des bactériocines est encore mal connue, ce qui est certain cependant c'est que la capacité d'une souche bactérienne à synthétiser une ou plusieurs bactériocines est une caractéristique fortement avantageuse. Cette caractéristique est en effet liée au pouvoir de survie et de prolifération d'un microorganisme par l'élimination des bactéries concurrentes dans une niche écologique où la concurrence peut être intense, étant donnée la diversité des espèces présentes et la compétition pour les nutriments (Figure 15).

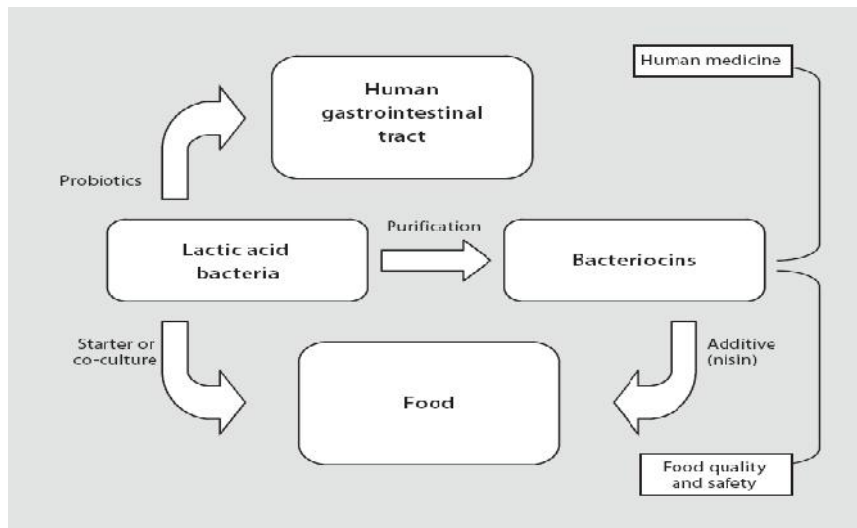


Figure 15 : Vue d'ensemble des applications potentielles des bactériocines. (De Vuyst *et al.*, 2007).

NH₂-Lys-Tyr-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Thr-Cys-Gly-Leu-His-Ser-Cys-Arg-Val-Ser-Arg-Gly-Lys-Ala-Thr-Cys-Gly-Ile-Ile-Asn-Asn-Gly-Gly-Met-Trp-Gly-Ser-Ile-Gly-COOH.

Figure 16 : représente la séquence en acides aminés de la bifidocin B.

9.5. Effets immuno -modulateurs :

Une étude de Hove *et al.*, 1994 a montré que les *B. bifidum* ajouté à un lait fermenté provoquent une augmentation de l'activité phagocytaire globale contre *E.coli* dans le sang périphérique.

Des échantillons de sang prélevé sur des sujets consommant un lait fermenté par différents ferments aux quels sont ajoutées des *bifidobactéries* et *L. acidophilus* présente une plus forte augmentation de la réponse hormonale en IgA, donc les *bifidobactéries* ont un rôle de modulateur par différents paramètres du système immunitaire.

La production d'interleukines (Il₆) (IL₁₆) et d'interférons dans des mononucléaires sanguins en présence des *bifidobactéries* a été démontré par une étude de Hove *et al.*, 1994.

Les *bifidobactéries* stimulent la production des anticorps produit par le système immunitaire (les immunoglobulines).

Les travaux de Park, *et al.*, 1999 ont démontré que l'augmentation de la production d'interleukines (IL₆) est due à une stimulation des macrophages par les lipopolysaccharides (LpS); toute fois elle diminue la production de tumeur nécrose facteur (TNF - α).

Les composants de la paroi cellulaires des bactéries ainsi que ceux des cytoplasmiques activent la réponse immunitaire.

9.6. Effet anti cancérogènes :

Une étude réalisée par Bouhink, 1996 a démontré que la consommation du lait fermenté par des bifidobactéries chez l'homme diminue la teneur dans les selles de certaines enzymes fécales telle que le β -Glucoromidase qui sont responsables de la conversion des procarcinogènes en carcinogènes.

Une étude a fait l'objet des chercheurs, c'est que le lait fermenté par les *bifidobactéries* inhibe et diminue la croissance d'une lignée cellulaire de cancer du sein (Biffi., 1997).

Selon Moore, 1995 plusieurs études épidémiologiques sont en accord avec l'hypothèse d'un facteur préventif du lait fermenté contre le cancer de colon, bien que les laits fermentés par les bifidobactéries n'aient pas été spécifiquement étudiés, autre indique que l'association de deux espèces de bifidobactéries fécales contre le risque du cancer du côlon.

Plusieurs études sur le rat ingérant des bifidobactéries ont démontrées la suppression de la formation de foyers glandulaires aberrants (début de lésions préneoplasiques) dans le colon et une diminution significative de la fréquence d'apparition d'une tumeur du colon et du nombre de cellules tueuses (Onone, *et al.*, 1997).

Selon ses mécanismes intracellulaires et non enzymatiques, les nitrates et les nitrosamines procarcinogènes sont inhibées par *bifidobactéries* (Bonhink *et al.*, 1996).

Orphage, *et al.*, 1994 ont découvert que les amines hétérocycliques produits au cours de la cuisson de la viande rouge sont fixées par les bifidobactéries peuvent alors être éliminés dans les selles.

9.7. Diminution du taux de cholestérol :

Les *bifidobactéries* participent dans la diminution du taux de cholestérol dans le sang. Les *B. lactis* contrôlent le taux cholestérol dans le cerveau (weerkamp, *et al.*, 1993).

Marteau, *et al.*, 1996 ont indiqué que les *bifidobactéries* ont un effet hypocholestérolémique, l'acide hydroxyde glutamique et oridique abaissent le cholestérol sérique et l'acide urique qui inhibe à son tour la synthèse du cholestérol ces acides organiques considérés sont comme des agents hypo cholestérolémiant.

Selon de nombreuses études réalisées par Tahri, *et al.*, 1997 ; Grill, *et al.*, 1995 ont montré que l'élimination du cholestérol d'un milieu de culture est due à une assimilation par les *bifidobactéries* et leur précipitation avec les sels biliaires dé conjugués.

9.8. Les bifidobactéries en tant qu'agents aromatisants :

Certaines études ont mis en évidence le rôle des bifidobactéries en tant qu'agents aromatisants. Dès 1968, l'équipe de Schuler avait déterminé que les produits laitiers contenant des bifidobactéries avaient un goût et un arôme typiques qui étaient distincts des saveurs habituellement produites par les bactéries lactiques (Rasic *et al.*, 1983). Depuis cette étude, grâce aux développements des technologies permettant d'identifier et de quantifier les composés volatils, certaines études ont été faites afin de déterminer quels composés aromatiques, résultant du métabolisme des bifidobactéries, étaient responsables du goût particulier des produits faits avec celles-ci. Ainsi, Yuguchi *et al.*, (1989), ont évalué la capacité, de cinq souches de *Bifidobacterium*, de *Lactobacillum delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ou de *Streptococcus thermophilus*, en monoculture ou en culture mixte, à produire des composés volatils. Il a été constaté que les espèces *Bifidobacterium longum*, *B. bifidum* et *B. breve* produisaient de petites quantités de composés aromatiques tels l'acétaldéhyde, le diacétyl, le 2- butanone et le sulfure de diméthyle. Dans la fermentation en monoculture, il est rapporté que la souche *B. breve* ATCC 15700 est la souche produisant la plus grande concentration d'acétaldéhyde alors que la souche *B. longum* BB-536 produisait de très grandes quantités d'éthanol. Pour ce qui est des fermentations faites en cultures mixtes, il a été remarqué que la production d'acétaldéhyde et de diacétyl étaient plus importantes qu'en monoculture alors que la production d'éthanol était moins importante.

Une étude menée par l'équipe de Roy *et al.*, 1997, sur la production de yaourts avec des bifidobactéries démontre que l'ajout de ces bactéries modifie la concentration de certains composés aromatiques au cours de l'entreposage du produit. En effet, la production d'éthanol était plus importante pour les yaourts contenant des bifidobactéries et la quantité produite était différente selon la souche utilisée. De plus, il n'y avait pas de différence significative, entre le yaourt contrôle (sans bifidobactéries) et les yaourts contenant des bifidobactéries, pour le dosage de l'acétaldéhyde, l'acétone et le diacétyl.

Une autre étude faite sur le yaourt a été réalisée par une équipe chinoise (Huang *et al.*, 1997). Dans cette étude, le yaourt était préparé avec une culture lactique composée de *Lactobacillus delbmeckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* et *Bifidobacterium spp.* Les principaux volatils qui ont été dosés sont le diacétyl, l'acétaldéhyde, l'acétone, le alcool 2-butylique et l'éthanol. Il a été constaté qu'à l'exception de l'acétaldéhyde et du diacétyl, les autres composés provenaient du lait ou encore du traitement thermique appliqué au lait. Lorsque les auteurs ont comparé la production des différents composés volatils entre le yaourt fait avec bifidobactéries et celui fait sans bifidobactéries, ils ont constaté qu'il n'y avait pas de différence entre les deux yaourts à l'exception de la concentration d'acide acétique qui était plus importante dans les yaourts contenant des bifidobactéries.

10. Pouvoir pathogène :

Les espèces du genre *Bifidobacterium* ne possèdent ni endotoxine (bactérie Gram positive), ni exotoxine. Ce genre n'est pas considéré comme pathogène. Cependant, son pouvoir acidogène est tellement intense qu'il peut provoquer des irritations locales (cystites hémorragiques) ou même des destructions : ainsi la présence de l'espèce *B. dentium* dans les dents cariées a incité de nombreux auteurs à l'incriminer comme agent de corrosion de la dentine et de l'émail. A ce jour, l'espèce *B. dentium* est considérée comme potentiellement pathogène, bien qu'on la trouve dans la flore intestinale humaine à des taux relativement bas ((Matsuki *et al.*, 1999) de matière fécale) (Crociani *et al.*, 1996 ; Civen *et al.*, 1993). *B. longum*, également, a été incriminé dans un cas de septicémie (Ha *et al.*, 1999). L'injection aux animaux de cultures ou de suspensions microbiennes ne provoque cependant aucune lésion ni aucun trouble. Bien au contraire, sa présence dans l'intestin est une cause ou un témoin de l'équilibre bactérien intestinal, et son implantation dans un intestin dont la microflore est déséquilibrée rétablit rapidement cet équilibre, d'où la thérapie possible des troubles intestinaux par l'ingestion ou l'implantation indirecte de la flore bifide. Ces microorganismes sont de plus en plus régulièrement incorporés à des denrées alimentaires dans l'espoir qu'un apport supplémentaire de cette bactérie dans l'alimentation ait un effet favorable sur la santé humaine.

Chapitre II

1. Conditions des cultures :

Les bifidobactéries sont des bactéries anaérobies strictes incapables de se cultiver en présence d'oxygène (O₂). Cette action toxique nous impose à suivre des conditions particulières de culture, qui sont :

Réductions des milieux :

Tous les milieux et solutions utilisées pour cultiver les souches de bifidobactérie sont additionnées de la cystéine chlorhydrique, qu'est un agent réducteur et non toxique pour la bactérie. La concentration finale utilisée est de 0.05% (p/v).

Réalisation d'une atmosphère anaérobie :

Toutes au long du travail, les cultures de bifidobactérie (soit en milieu liquide ou milieu solide) sont incubés dans des jarres d'anaérobiose qui sont des enceintes closes dans lesquelles il est possible de réaliser une atmosphère sans O₂. Elles contiennent des systèmes Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Germany), qui génère du CO₂ en fixant l'O₂.

1.2 L'échantillonnage :

1.3 L'origine de l'échantillon :

1- Les bifidobactéries proviennent des selles fraîches des nourrissons sains allaités au sein, et nées naturellement, âgés moins de 05 mois (titre privé), prélevées stérilement d'une couche jetable. Les selles sont émises dans des récipients stériles.

2- à partir d'une solution de réhydratation saline (Celia /Develop SRO) commercialisé contenant des bifidobactéries.

3- à partir des yaourts (Activia) de Danone produits et commercialisés en Algérie.

2. Milieux de Cultures

2.1. Milieux de cultures pour les bifidobactéries

L'isolement des bifidobactéries constitue l'étape la plus critique puisqu'il nécessite des conditions assez spécifiques, qui mettent en jeu des systèmes d'anaérobiose comme les anaerocults ou les gas-packs et des milieux très riches additionnés d'un agent réducteur la cystéine-chlorhydrique (Scardovi, 1986).

L'isolement des bifidobactéries à partir des selles de nourrisson a été réalisé sur le milieu MRS (annexe) additionné de 0,05 % cystéine-chlorhydrique (Scardovi, 1986 ; Hadadji *et al.*,

2006) et des agents sélectifs l'acide nalidixique (2 mg/l), néomycine sulfate (100ug/ml) et Chlorure de lithium (1,2g /l) .

2.2. Milieux de culture pour les souches pathogènes

La culture des souches pathogènes est réalisée sur la gélose nutritive et pour les interactions nous avons utilisé le milieu Mueller- Hinton (annexe).

3. L'isolement et purification des bifidobactéries :

L'isolement des bifidobactéries est réalisé en profondeur sur MRS cystéiné. A partir de chaque échantillon un gramme de selles a été mis dans un tube contenant 9 ml de l'eau physiologique (0,9 % de NaCl) et 0,2% de la cystéine-HCl. Chaque suspension a été homogénéisée pendant 2 mn. 0,1 ml des dilutions (10^9 10^{10} et 10^{11}), sont ensemencés sur milieu MRS. Trois boîtes pour chaque dilution sont incubées dans une jarre d'anaérobiose avec les Anaéroculs capable de produire H₂ et le CO₂ pendant 5 jours à 37°C (Beerns, 1990 ; Frank *et al.*, 1993), à 37°C. Après 72 h d'incubation, les colonies sont sélectionnées selon leur aspect morphologique (observées grâce à une loupe binoculaire) ainsi que sur la base de leur mobilité, de leur forme, de leur état frais et de la coloration de Gram. Les colonies des bifidobactéries sont repiquées sur le bouillon MRS cystéiné chloridrique, à pH 6,4 additionné de 2 mg/ ml d'acide nalidixique. Puis les tubes sont incubés en anaérobiose (en ajoutant de l'huile de paraffine stérile à la surface du tube) pendant 24 h à 37°C.

A partir des cultures des bouillons, MRSc on a effectué une série de repiquage pour but d'avoir des cultures pur. L'opération est renouvelée en prenant chaque fois une colonie isolée. Ceci conduit à obtenir une culture dont la pureté est estimée par observation microscopique après coloration de Gram.

3. Pré-identification des souches :

Après la purification par repiquage successif dans le milieu adéquat, à partir des boîtes contenant des colonies bactériennes, nous avons effectué les tests suivants :

3.1 Pré identification des bifidobactéries :

Etude macroscopique : Cette étude consiste à noter l'aspect des colonies bactériennes (contour, couleur, viscosité).

Etude microscopique : La pureté des souches est contrôlée par la coloration de Gram, (Après que les souches seront repiquées sur MRS cystéiné à pH 6,8)

3.2 Recherche de type fermentaire :

On a repiqué les souches sur MRSc liquide contenant la cloche du Durham. L'incubation s'effectue en anaérobiose à 37 C° pendant 24 h.

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

4. Tests enzymatiques :

4.1 Test du nitrate réductase :

Les souches de bifidobactérie ont étéensemencés en bouillon nitrate (1% de nitrate de potassium), après une incubation à 37°C en anaérobiose, on ajoute 5 goutte de réactif (Nit1) et 5 goutte de réactif (Nit2) (voire l'annexe).

Si le milieu reste incolore, on ajoute un peu de poudre de zinc. Le milieu devient rouge donc le zinc a réduit les nitrates de milieu et la bactérie est nitrate réductase négative. Le milieu est incolore la bactérie est nitrate réductase positive.

4.2 Test de la gélatinase, test de production d'indole et test d'uréase :

Pour réaliser les tests (gélatinase, indole et uréase) nous avons employés les galeries API20E (bioMérieux, France). Nous avons préparés une suspension dense d'une culture de bifidobactérie et on l'aensemencé dans des cupules des tests enzymatiques de la galerie API20E. La cupule GEL pour le test de la gélatinase, la cupule IND pour le test d'indole et la cupule URE pour le test d'uréase. L'incubation des galeries a été faite à 37°C en anaérobiose. Les résultats des tests sont comme suite :

Test de gélatinase : diffusion du pigment noir: Gélatinase (+), pas de diffusion gélatinase (-).

Test de l'indole : après l'incubation on ajoute quelques gouttes de réactif de Kovacs (voire l'annexe). La réaction positive se traduit par la formation d'une couleur rouge.

Test d'uréase : l'apparition de la couleur rouge ça signifié que le test est positive.

4.3 Recherche du citrate perméase sur milieu Kempler et Mc Kay 1980

Ce test permet de mettre en évidence le citrate perméase. Les souches de *Bifidobacterium* sontensemencé sur boîte de Pétri contenant le milieu KMK par la méthode des stries et

incubées à 37 C° pendant 24h en anaérobiose. Le résultat positif se traduit par l'apparition des colonies bactériennes de couleur bleue et le résultat négatif se traduit par l'apparition de colonies blanche.

4.4 Test de croissance sur bile :

40g de bile sont dissoutes dans 100 ml d'eau distillée (pour 2%) et autoclave 15 mn à 115 C°, 0.5 ml de cette solution sont ajoutée à 10 ml de MRSc liquide, puis incubée à 37 C°/ 48h en anaérobiose (Sebald *et al.*, 1997 ; Hadadji *et al.*, 2006).

4.5 Test thermorésistance :

Les souches de bifidobactéries sont ensemencé dans des tubes contenant du MRSc liquide, et misent dans un bain-marie à 46.5 C°/ 30 mn, puis incubés à 37 C° sous condition d'anaérobiose (Klein *et al.*, 1998).

4.6 Test de croissance en milieu hypersalé :

Ce test est réalisé pour éliminer les entérocoques, sur milieu MRS additionnée de 0.05 % cystéine chlorhydrique et 2 mg/l d'acide nalidixique, contenant 4%, 6.5% de NaCl. Les souches sont ensemencée dans des tubes contenant du MRS additionnée de 0.05 % cystéine chlorhydrique et 2 mg/l d'acide nalidixique à 4%, 6.5% de Na Cl puis incubé à 37 C°/ 24h, sous condition d'anaérobiose.

5. Influence de certains facteurs exogènes sur la croissance des souches de bifidobactéries :

5.1 Influence du pH :

Pour étudier influence du pH sur la croissance des souches retenues, on prépare un milieu MRS additionnée de 0.05 % cystéine chlorhydrique et 2 mg/l d'acide nalidixique à différents pH (4.5, 6.5, et 8.5) et on note s'il y a présence ou absence de croissance. Chaque milieu est inoculé avec une concentration finale de 1 % d'inoculum bactérien qui correspond à 10⁸ UFC/ml. Les cultures sont incubées à 37°C. La croissance des souches est suivie aussi par la mesure de la densité optique à 600 nm à un intervalle de 2 h. Les résultats de la croissance bactérienne seront exprimés en logarithmes décimaux.

5.2 Influence de la température d'incubation :

L'effet de la température étudié sur MRS additionnée de 0.05 % cystéine chlorhydrique et 2 mg/l d'acide nalidixique à pH 6,8. Les cultures préparées mise à incuber à différentes températures (25C°, 30C°, 37C°, 45C°) et on note s'il y a présence une absence de croissance, et la croissance est suivie également par la mesure de la densité optique à 600 nm à un intervalle de 2 h. Les résultats de la croissance bactérienne seront exprimés en logarithmes décimaux.

6. Test de croissance en aérobiose :

On a préparé une culture sur le milieu MRS gélosé pour les souches de bifidobactérie et ont été incubées à 37°C en aérobiose pendant 72 h.

7. l'antibiogramme:

L'antibiogramme des souches de bifidobactéries est déterminé par la technique standardisée de diffusion sur milieu gélose MRSc, à partir d'une culture jeune en milieu MRS et on ensemence toute la surface du milieu. Après le séchage, on dépose les disques d'antibiotiques sur la boîte et on les incube à 37C°. la sensibilité et la résistance des souches de bifidobactéries est réalisé par la méthode de diffusion dans le milieu MH, en utilisant les antibiotiques suivants (biomérieux); B lactamines (Pénicilline (10µg), Oxacilline (1µg), Ampicilline (10µg), Piperacilline, (75µg), Amoxicilline (25µg)), Metronidazol (acide fusidique (10 µg), acide nalidixique (30 µg)), Tetracycline (Tetracycline (30µg), Aminoglycoside (Néomycine (30µg), Gentamicine (10µg), Streptomycine (10µg) kanamycine (30µg)), MACROLID (Erythromycine (15µg), Spiramycine (100µg)), LINCOSAMIDE (Clindamycine (2µg), Lincomycine (15 µg)), CARBAPENEMES (Imipeneme (10µg)), CEPHALOSPORINES (Cefoxitine (30µg), Cefsulodine (30µg)), GLYCOPEPTIDES (Vancomycine (30µg), Divers; Chloramphenicole (30µg), Rifampicine (30µg), Paramomycine (30 µg), Fosfomycine (50µg), Teicoplanine (30µg)), ensuite incubé à 37°C pendant 24h en anaérobiose.

8. Determinacion de l'espèce

Profile fermentaire

L'identification des espèces nécessite d'autres tests en particulier la fermentation des différents sucres.

La fermentation des carbohydrates a été menée sur milieu MRS cystéine sans extrait de viande et additionné au pourpre de bromocrysol (BCP) comme indicateur de pH (MRSBCP-EV). (Scardovi, 1986) La source de carbone est représentée par l'un des sucres suivant : arabinose, cellobiose, fructose, galactose, glucose, maltose, inuline, mannose, melizitose,

melibiose, raffinose, ribose, salicine, sorbitol, sucrose, tréhalose, xylose (Sigma, France) (Tamime *et al.*, 1995 ; Hadadji *et al.*, 2005). Les solutions sucres sont préparées à 3% et stérilisées par autoclavage. Un millilitre de la solution sucrée est additionné à 10 ml de MRSBCP-EV. Vu le nombre important de souches étudiées ainsi que le nombre de tubes à essai à utiliser avec chaque souche, une mini préparation est réalisé au laboratoire. Une plaque d'Elisa est utilisée pour ses puits. Les puits de chaque ligne contiendront une source de carbone qui sera utilisée par différentes souches. Une solution bactérienne servant à ensemercer les puits contenant les différentes sources de Carbone à été préparée. Une culture de 18 heures de la souche appropriée est centrifugée à 8000 tr/mn pendant 15 min. Le culot ainsi récupéré est additionné de 2 ml de tampon phosphate puis recentrifugé aux mêmes conditions pour le débarrasser des restes du milieu de culture et obtenir un culot cellulaire pur. Dans ce culot, 5 ml de milieu MRSBCP-EV est additionné pour former la solution cellulaire servant à ensemercer les puits contenant différentes source de carbone ; 100 µl de cette solution bactérienne est déposée dans chaque puit. Les préparations sont recouvertes de 1 ml de l'huile de paraffine stérile pour obtenir l'anaérobiose. L'incubation s'effectue à 37°C pendant 24 à 48 h. La fermentation des sucres est révélée par le virement de l'indicateur le (BCP) du violet au jaune.

9. Conservation des souches à longue durée

A partir de jeunes cultures (18h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation sur le culot. Le milieu de conservation contient du lait écrémé, 0,2% d'extrait de levure et 20% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes eppendorfs à -20 °C. Accolas *et al.* (1977) indiquent que des suspensions très concentrées résistent mieux à la congélation. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans du lait écrémé à 0,5 % d'extrait de levure, avant utilisation (Bolduc *et al.*, 2006).

10. Aptitude technologique des bifidobactéries :

10.1 Etude de la cinétique de croissance :

En culture pure, la cinétique de croissance des souches de bifidobactéries a été réalisée par un dénombrement sur milieu MRS cystéine solide, au temps 0 h, 4 h, 8 h... et ceci en fonction du développement des souches.

10.2 Détermination de l'acidité titrable :

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

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

Nous avons noté alors le volume de la soude utilisée. Les résultats sont exprimés en degrés dornic selon la formule suivante : Acidité = $n \times 10$

Avec n: volume de la soude dornic.

1 degré dornic = $1^{\circ}D = 0,1$ g d'acide lactique dans un 1 l de lait.

En culture pure, l'acidité titrable juste après l'inoculation est soustraite aux valeurs de l'acidité mesurée au cours de la croissance pour obtenir l'acidité réellement produite (acidité acquise). Suivi du pH au cours de la croissance : L'acidité développée dans le lait est suivi aussi par une mesure de pH à l'aide d'un pH mètre type.

10.3 Préparation de lait reconstitué écrémé :

Du lait reconstitué écrémé a été préparé en diluant de la poudre du lait écrémé, dans l'eau distillé en adition 0,5 % d'extrait de levure et à 0,05 % de cysteine-HCL, puis autoclavé à 110°C pendant 10 min (Martin-Diana *et al.*, 2003).

10.4 Préparation d'inoculum :

10.5 Inoculum des bifidobactéries :

Des colonies isolées sur le milieu MRSc agar ont été inoculé sur le bouillon MRSc et incubé à 37°C pendant 24h. Deux millilitre de cette suspension a étéensemencé dans 10 ml de lait reconstitué écrémé à 10% (p/v) stérile additionné de 0,5 % (p/v) d'extrait de levure et de 0,05% (p/v) de cystéine-HCl (Frank *et al.*, 1993) et incubé à 37°C pendant 24.

10.6 Détermination du taux de croissance de bifidobactérie :

La cinétique de croissance de bifidobactérie a été étudiée dans le lait et le lait écrémé. Les prélèvements ont été effectués au moment d'inoculation et après 0, 4... 24 heures, en employant

des dilutions décimales préparées dans l'eau physiologique cystéiné. Cent microlitres des dilutions de 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} ont été ensemencé sur MRSc agar et incubé à 37°C pendant 72 h. Seul les boîtes qui contiennent entre 30 et 300 colonies sont retenues pour le dénombrement. Le taux de croissance (μ) a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\mu = (\log_{10} X_t - \log_{10} X_0) / (t_t - t_0)$$

Où X_t et X_0 sont le nombre des colonies (cfu.ml⁻¹) à temps t_t et t_0 .

10.7 Détermination du pH au cours de la fermentation :

Les niveaux de pH ont été mesurés pendant la fermentation à 0 h, 4h, 8h, 10h... 24h, à l'aide d'un pH-mètre (SCKOTT pH Digital).

11. Analyse statistique

Chaque valeur représente la moyenne \pm Erreurs Standard de 4 essais par souche. Après l'analyse de la variance la classification des moyennes est effectuée par le test T de Student.

12. Antagonisme in vitro :

La mise en évidence des interactions :

Tableau 06 : les références des souches cibles.

Germes cibles	Milieu d'incubation	Référence
Bactéries Gram positives		
<i>Staphylococcus aureus</i> IP		ATCC 6538
<i>Staphylococcus aureus</i> IP	gélose nutritif (liquide et solide)	ATCC 29213
Bactéries Gram négatives (les entérobactéries)		
<i>Escherichia coli</i> IP		ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i> IP		ATCC 8739
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 24853	Citrimide	ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	Citrimide	ATCC
<i>Salmonell .spp S 37</i>		
<i>Enterobacter cloacii 335</i>		

ATCC: American Type Culture Collection

I P : Institut Pasteur

12.1 Provenance des souches :

Les souches cibles utilisées pour l'étude de l'activité antimicrobienne proviennent de l'hôpital militaire régional d'Oran les collections fournies ; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC

24853, *E.coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, et *Salmonella* 37, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter cloacae* 335, et les souches *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 provient de l'institut Pasteur.

12.1.1 Recherche des interactions entre les différentes espèces de *Bifidobacterium* et de les entéropathogènes :

Les souches isolées sont testées pour leur activité antagoniste selon deux méthodes.

12.1.2 méthode directe

L'activité antimicrobienne de nos souches a été évaluée sur milieu MRSc solide selon la méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983). Le milieu MRS est ensemencé en couche par nos souches. Après 24 heures d'incubation une couche de gélosé moelle 7 ml ensemencée par la souche de *bifidobacterium* est coulée à la surface puis réincubée pour 24 à 48 heures supplémentaire. Les souches présentant une zone claire tout au tour sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes (Fleming *et al.*, 1975).

12.1.3 méthode indirecte

Cette méthode permet de mettre en contact le surnageant de la souche productrice de substance antimicrobienne avec la souche test. Les souches précédemment sélectionnées pour leur production de substances antimicrobiennes sont concernées par ce test.

Les souches sont cultivées dans du milieu MRSc liquide tamponné et incubées pendant 18 heures. Après incubation, le milieu est centrifugé (8000 tr/mn 10 min) et le surnageant est conservé. Dans une boîte de Pétri contenant du MRSc solide et ensemencé par la souche test, des puits sont réalisés avec un emporte pièce et remplis par 10 µl de gélose MRS. Les puits recevront 100 µl du surnageant de la souche à testée et les boîtes sont incubées pendant 24 à 48 heures. Les colonies entourées d'une zone claire dans la nappe de culture de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positives. (Tagg *et al.*, 1971 ; Barefoot *et al.*, 1983).

12.2 Recherche sur la nature de l'agent inhibiteur :

Afin de déterminer la nature de la substance inhibitrice produite par nos souches, il est impératif de réaliser une série de tests.

12.2.1 Inhibition due aux acides :

Afin d'éliminer l'effet des acides, nos souches sont cultivées dans du MRSc pH 7 et contenant 0,25% de glucose pour minimiser l'acidification du milieu tamponné, ainsi l'acide

lactique et l'acide acétique, produit par la souche sera neutralisé et seule la substance antimicrobienne si elle est produite exprime son action sur les souches pathogènes. La lecture des résultats consiste à comparer ceux obtenus en milieu tamponné et non tamponné. (Ruiz-Barba *et al.*, 1994 ; Scillinger *et al.*, 1996).

12.2.2 inhibition due au peroxyde d'hydrogène :

Pour écarter l'effet du peroxyde d'hydrogène dans l'inhibition d'*E.coli*, *Pseudomonas aerogenosae*, les surnageants des cultures de nos souches sont traités par 1 mg/ml de catalase puis incubée à 37°C pendant 1 heure. Le surnageant est filtré (0,22µm) et testé par la méthode des puits sur différentes souches pathogènes

12.3.1 Recherche de la nature protéique de la substance antimicrobienne

La recherche de la nature de cette substance qui si elle appartenait aux bactériocines devrait avoir une nature protéique.

Le filtrat de culture des souches (Bbf1, B3) est traité par différents types d'enzyme. Ainsi, 1 ml du filtrat de culture est traité par 1 mg/ml de trypsine ou chymotrypsine et incubé à 37°C pendant 1 heure. Le filtrat ainsi traité est stérilisé par filtration sur filtre millipore de 0,22 mm de diamètre. L'action de ce filtrat est testé par la méthode des puits sur gélose puis incubé à 37°C/ 24 à 48 heure. (Ruiz-Barba *et al.*, 1994 ; Scillinger *et al.*, 1996). (Alvarado *et al.*, 2005).

12.3.2 Effet de la température de surnageant

L'étude de la cinétique de croissance et d'excrétion des bactériocines a montré que leur sécrétion dans le milieu de culture MRS liquide se fait au fur et à mesure de la croissance de la souche. Sur la base des résultats obtenus sur l'activité antimicrobienne des souches sélectionnées, la souche *B.bifidum* (Bbf1), est considérée comme étant la souche la plus performante pour son activité antagoniste vis-à-vis des souches cible testées.

Toutefois les substances antimicrobiennes ont été testées pour leur résistance à la température et la conservation de leur activité vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Le surnageant de la culture de la souche bifidobactérie productrice (Bbf1) est traité par différentes températures à 80, 100, et 120 °C pour 10, 15 et 20 min (respectivement), puis testé sur *S.aureus* sur milieu gélosé par la méthode des puits.

12.3.3 Recherche de bactériocines

La recherche de bactériocines se fait en milieu liquide. Elle est réalisée seulement sur la souche bactérienne présentant le plus grand halo d'inhibition (*E.coli* ATCC 8739). Une culture jeune de 18 heures de la souche de *bifidobactérium* B3 est cultivée dans 50 ml de MRSc liquide à 37°C pendant 18 heures en anaérobiose (Kleanhammer, 1986). Après incubation, on centrifuge

à 8000 t/m pendant 10 mm et on récupère le surnageant. Le pH du surnageant est ajusté à 7 avec de la soude (NaOH à 5 N) pour éliminer l'effet de l'acidité. Nous avons préparé deux tubes contenant 10 ml de gélose nutritive liquideensemencée avec la souche (*E.coli*). Les tubes sont incubés à 37°C pendant 20 heures en micro aérobiose. La croissance bactérienne est suivie par la mesure de la densité optique toutes les deux heures. A la 6^{ème} heure après l'incubation le surnageant est ajouté à l'un des deux tubes, le même principe se réalise pour la souche *S.aureus* ATCC 29213 en présence de Bbf1, (Asperger., 1985 ; Condon., 1987) (Labioui *et al.*, 2005).

13 Etude de l'évolution de la cinétique de croissance et de production :

L'étude de l'évolution de la croissance des bifidobactéries sélectionnés est effectuée dans le milieu MRS cystéine à pH 6,8, incubation à 37 °C, en anaérobiose.

13.1 Détermination de l'acidité titrable :

Le dosage de l'acidité au cours de la croissance dans le lait écrémé est effectué selon la méthode décrite par (Accolas *et al.*, 1977), en utilisant le NaOH (N/9) en présence de l'indicateur Phénolphtaleine (à 1 % dans l'alcool). A partir des tubes incubés contenant les cultures en lait, en ajoutant 5 gouttes de phénolphtaléine. Le titrage s'effectue à l'aide d'une burette avec de la soude dornic sous agitation. On considère que le virage est atteint, quand la couleur blanche du lait vire au rose pale et persiste pendant un dizaine de secondes. Les résultats sont exprimés en degrés dornic selon la formule suivante : Acidité = n x 10 Avec n: volume de la soude dornic. 1 degré dornic = 1°D = 0,1 g d'acide lactique dans un l de lait (Hadadji *et al.*, 2006).

13.2 Etude de la cinétique de croissance en culture mixte (avec les souches pathogènes) :

L'étude de la cinétique de croissance des souches de références ; *E.coli*, *Pseudomonas aerogenosae*, *Staphylococcus aureus*, en présence de souche productrices de bifidobactéries qui montrent une forte activité antibactérienne. La première série de tubes contenant 10 ml de lait écrémé sont inoculés par chaque souche de bifidobactéries seule à concentration (1%), la deuxième série de tubeensemencée chacun avec une souche de *Bifidobacterium* associé avec une souche *ciblée* à la même concentration (1%). Les tubes ainsi inoculés sont incubés à 37°C le temps de la coagulation du lait et les caractéristiques des coagulums sont notées.

L'estimation de la concentration bactérienne se fait par un dénombrement sur milieu solide. Le dénombrement des bifidobactéries sur milieu MRS cystéine à pH 6,8, le dénombrement de *S.aureus* ATCC 29213 se fait sur milieu Chapman, la souche d'*E.coli* ATCC 8739 sur milieu GN, et *P.aerogenosae* ATCC 27853 se fait sur milieu Citrimide. L'ensemble est incubé selon leurs propres températures de 24 à 48 h.

I. La flore du rat :

Le rat est un des animaux de laboratoire les plus utilisés. La microflore du rat est caractérisée par une grande dominance des bactéroïdes dans le cæcum et le gros intestin (Schaedler *et al.*, 1962; Smith 1965; Spears *et al.*, 1967). La microflore autochtone de la souris est constituée essentiellement de *Lactobacillus* et streptocoques anaérobies (Dubos, Schaedler *et al.*, 1963; Schaedler *et al.*, 1965) qui apparaissent en premier après la naissance et persistent en plus grand nombre dans tout l'intestin et l'estomac (Dubos *et al.*, 1968; Tannock 1997; Li *et al.*, 2004). On trouve également des streptocoques, des microcoques et *Clostridium welchii*, et la présence de levures est souvent constatée (Schaedler *et al.*, 1962; Smith 1965; Savage *et al.*, 1967). *E. coli* est trouvé constamment, mais parfois en quantité proche de celui des lactobacilles et parfois en quantité bien plus faible (Smith, 1965). Enfin certaines espèces, par exemple les *Flavobacterium*, apparaissent très transitoirement et uniquement dans l'intestin grêle, puis disparaissent rapidement ensuite (Ducluzeau, 1969).

I.1 Etablissement de la flore

Le fœtus des mammifères évolue *in utero* dans un environnement stérile et la colonisation microbienne intervient au moment de la naissance. Le nouveau-né est dans un environnement bactérien essentiellement fourni par les flores vaginales et fécales de la mère. Pendant les 12-24 premières heures de la vie les premières bactéries colonisatrices apparaissent dans son tube digestif, ce sont des *Escherichia coli* et *Enterococcus* sp. Puis les souches anaérobies strictes apparaissent rapidement. Elles sont constituées de *Bifidobacterium* sp., accompagnées de quelques *Bacteroides* sp. si le nouveau-né est nourri au sein. Chez l'enfant nourri avec des formules infantiles, le genre *Bacteroides* sp est prédominante et les bifidobactéries sont présentes de façon aléatoire. L'équilibre de la microflore intestinale est proche de celui de l'adulte vers l'âge de 2 ans (Midtvedt *et al.*, 1992; Koletzko *et al.*, 2003). C'est également vers l'âge de 2 ans que les systèmes immunitaires périphérique et intestinal de l'enfant sont estimés matures. Ainsi du point de vue physiologique, la relation flore/immunité est particulièrement importante à considérer durant cette première période de vie. Une perturbation de l'équilibre microbien pendant cette période par divers facteurs comme les conditions de la naissance, la prise d'antibiotiques, une mauvaise alimentation, peut avoir des conséquences importantes à court, mais aussi à long terme (Rambaud *et al.*, 2004 ; Cuibai, 2008).

I.2 Animaux et aliments

I.2.1 Animaux

Les expériences sont réalisées sur des rats, fournies par institut pasteur. Ce sont des rats femelles âgées moins de 3 semaines et pèsent environ 150 g chacune au moment de la réception, acclimatées avant toute manipulation pendant une semaine sur le lieu de l'expérimentation. Les rats sont réparties aléatoirement en 4 groupes de 06 rats chacun. Chaque rat est identifié. Chaque groupe est soumis à un régime différent pendant 2 semaines.

I.2.2 Condition d'élevage

Les animaux sont hébergés dans une pièce convenablement aérée, à température de ($22\pm 1^\circ\text{C}$), humidité relative ($50\pm 20\%$). Elles sont logées dans des cages en acier inoxydable, dont les dimensions et la structure répondent aux recommandations de la Commission Nationale de l'Expérimentation Animale, et soumises à un cycle de 12 heures de lumière suivies de 12 heures d'obscurité. L'eau et la nourriture sont disponibles *ad libitum*. La nourriture est renouvelée tous les jours, la boisson est renouvelée chaque semaine.

I.2.3 Régimes

Tous les rats sont nourris avec des granules, pendant les 02 semaines. Les rats témoins reçoivent durant ces semaines un régime de base (*ad libitum*).

2. étude antagoniste *in vivo*:

Les résultats significatifs des effets antagonistes observés *in vitro* suscité une étude *in vivo* réalisée sur des rats.

2.1 Les souches testées :

La souche d'*Escherichia coli* entéro-pathogène étudié a été isolée à partir des selles d'un nourrisson diarrhéique de l'hôpital universitaire d'Oran. La pureté de cette souche est contrôlée par la coloration de Gram, test de la catalase, la galerie API 20 E, sont réalisées avant de procéder à un dernier repiquage sur gélose EMB. Le repiquage de ces colonies a été fait sur bouillon nutritif et puis incubation à $44^\circ\text{C}/24\text{ h}$.

La souche *B. bifidum a* été isolée à partir des selles d'un nourrisson âgé moins de 5 mois, on a choisi cette souche par son effet antagoniste envers la souche *E.coli* étudié, et sa résistance dans le tractus intestinal (Biavati *et al.*, 1992).

2.2 Préparation du lait :

Le lait adapté 1er âge (Gigoz) est utilisé comme milieu de culture pour le suivi de l'antagonisme *in vitro* et *in vivo* de *B. bifidum* seul et envers *E. coli* entéropathogène. Ce lait infantile est préparé stérilement en diluant 60 g de poudre de lait dans 400 ml d'eau distillée stérile (Doumandji, 2007).

2.3 Préparation du lait fermenté :

La souche d'*E. coli* entéropathogène, isolée et identifiée précédemment est utilisée comme souche cible. Cette dernière est repiquée sur gélose EMB, puis incubée à 37°C/24 h en aérobie. Après incubation deux colonies sont reprises dans 9 ml de bouillon nutritif et incubées à 37°C/ 18h. Une souche de *B. bifidum* est repiquée sur gélose MRSc puis incubée à 37°C / 24 h en anaérobiose. Deux colonies sont alors reprises dans 9 ml de lait pour enfants (Gigoz) et incubées à 37°C/ 18 h. A partir des deux inocula standards, on ensemence des tubes de lait de 8 ml avec 1 ml de *B. bifidum* (soit $4 \cdot 10^8$ *B. bifidum* / ml) et 1 ml d'*E. coli* (soit 10^8 *E. coli* / ml), l'ensemble est incubé selon leurs propres températures à 24 h.

3. Analyses bactériologiques la flore fécale des rats :

3.1 Milieu pour le dénombrement des bifidobactéries

Les bifidobactéries sont dénombrés par l'utilisation du milieu MRSc, à pH 6,8 additionné de 2 mg/ ml d'acide nalidixique, néomycine sulfate (100 µg/ml), Paronomycine sulfate (100 µg), chlorure de lithium (1,2 g) et l'addition de (0,1g) mupirocine, antibiotique auquel les bifidobactéries sont résistantes et de nombreux lactobacilles sont sensibles (Rada, Sirotek *et al.*, 1999). L'acide acétique est le second agent sélectif des bactéries à gram positif anaérobies.

3.2 Méthode de dénombrement des bactéries

Les selles ont été récupérées 4h après le traitement chaque jour pendant la période de l'ingestion du lait fermenté par les rats,

Des dilutions décimales des selles sont effectuées en milieu MRSc, on dilue 1 g de selle dans 9 ml d'eau physiologique (NaCl 9g /ml). Cent microlitres de chaque dilution sont ensemencés en profondeur. Les boîtes de Pétri ensemencées sont incubées dans des jarres, en anaérobiose créée par des systèmes Gaspac® H2-CO2 (Becton Dickinson and company). Et incubés 48 heures à 37°C. Après incubation. Milieu EMB (Eosine and Methylene blue), est utilisé pour le dénombrement d'*E.coli*, les colonies sur ce milieu apparaissent violet avec un éclat métallique, ensuite les boîtes de Pétri sont mises à l'étuve à 44 °C /24 h. Après incubation, les colonies sont dénombrées sur les boîtes présentant entre 30 et 300 colonies. Après avoir

réalisé une moyenne arithmétique pour chaque milieu de culture, les résultats sont rapportés au nombre d'unités formant colonies par gramme de fèces (UFC/g).

Les bactéries ont été comptées tous les jours à partir des selles des rats, avant pendant et après les différents traitements pour deux semaines. Le but de ces analyses était de déterminer le nombre de survie de *B. bifidum* et *E. coli*, et la durée de vie dans les intestins.

L'effet antagoniste *in vivo* de *B. bifidum* étudié sur une souche d'*E. coli* entéropathogène :

La 1ère partie: consiste au préalable en l'étude de la flore intestinale de rats.

La 2ème partie: concerne des rats qui sont soumises à différents traitements comportant les 02 espèces bactériennes seules ou associées afin de suivre leur évolution au niveau des selles.

Le lait adapté 1er âge est utilisé comme milieu de culture pour le suivi de l'antagonisme *in vitro* et *in vivo* de *B. bifidum* envers *E. coli* entéropathogène.

La 3ème partie : la dissection des rats afin d'observer l'installation des 02 espèces bactériennes ingérées par les rats (avant pendant et après l'arrêt du traitement). Pour cela il faut 04 lots de 6 rats chacun et 1 lot de 6 rats témoins. (Ces rats appartiennent à la race « wistar »).

Lot témoin : ces rats reçoivent un régime alimentaire de base, et sans aucun traitement

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

Lot 2 : On administre aux 06 rats 1 ml de lait fermenté avec 10^8 / ml de *B. bifidum* pendant une semaine puis 1 ml de laitensemencé avec 10^8 / ml d'*E. coli* durant la 2ème semaine.

Lot 3 : Les 6 rats reçoivent 1 ml de laitensemencé avec 10^8 / ml d'*E. coli* pendant 48 h, puis 1 ml de lait fermenté avec 10^9 / ml de *B. bifidum* durant une semaine (Doumandji, 2007).

L'implantation des ces souches et la modification de la flore microbienne ont été suivies au cours de cette étude. A la fin de l'expérimentation, des prélèvements des selles, et de tissus du tube digestif ont été prélevés pour subir des examens microbiologiques et des coupes histologiques.

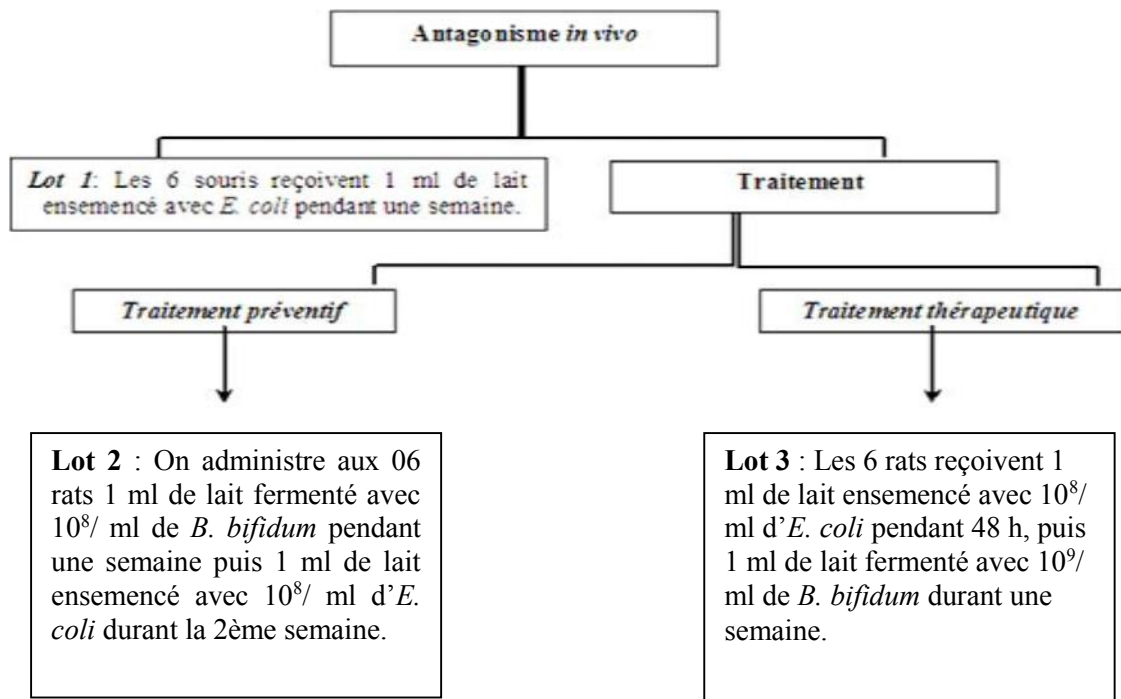


Figure 16: Antagonisme *in vivo* de *B. bifidum* envers *E. coli* entéropathogène lors d'un traitement préventif et thérapeutique.

Statistiques :

Les moyennes et les écarts-types ont été calculés pour chaque mesure réalisée. Une analyse est réalisée pour la comparaison de moyennes de plusieurs échantillons.

4. Etude de la flore intestinale après dissection des rats

4.1 Test histologique - sélection des échantillons

Pour étudier l'impact des différents traitements (*B.bifidum* et *E.coli*) sur la muqueuse intestinale, nous avons disséqué les rats après et la fin de chaque expérience. **La fixation** a pour buts la conservation des structures et le durcissement des tissus. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement, par immersion du matériel dans du liquide fixateur (formol).

4.2 Préparation des coupes histologiques

La préparation a été réalisée selon les étapes de réalisation suivantes recommandées par Hould (1998):

L'inclusion a pour but la réalisation de coupes histologiques. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation (par immersion dans des bains d'alcool), puis est immergé dans des bains de toluène (un solvant de la paraffine), puis est infiltré par la paraffine fondue par

chauffage avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue. Après refroidissement, on obtient d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse.

Les coupes du bloc de paraffine sont réalisées avec un **microtome** permettant d'obtenir des tranches de section (coupes histologiques) de 2 à 5 microns d'épaisseur. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre.

Les colorations des tissus réalisées sur lames, accentuent les contrastes pour pouvoir reconnaître différents éléments du tissu. La coloration par l'hématoxyline et l'éosine).

Le montage, les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre. Enfin, on passe par l'observation du tissu à l'aide d'un microscopique à caméra (Leica).

Certaines espèces du genre *Bifidobacterium* sont presque toujours présentes en nombre important (10^{11} UFC /g) dans les matières fécales des nourrissons allaités au sein. Ces bactéries jouent un rôle important dans le maintien de l'équilibre de la microflore intestinale, et apporter des bienfaits pour la santé, c'est la raison pour laquelle elles sont isolées, identifiées et sélectionnées pour être intégrées dans divers aliments et plus particulièrement dans les laits fermentés à caractère thérapeutique.

2. Pré- identification des souches :

a) Aspect macroscopique :

Les colonies de bifidobactéries développées sur le milieu MRS cystéine d'isolement sont d'apparence très variable. Après les séries de purification sur milieu solide et liquide (MRS cystéiné pH 6,8), les colonies des souches présentent les caractéristiques suivantes :

Elles sont punctiforme, luisante, de coloration blanchâtre et crème, de contour régulier et de diamètre variable (Figure 17) (Tableau 7). Cet aspect macroscopique est souvent rencontré chez les bifidobactéries.

b) Aspect microscopique

L'observation microscopique après la coloration de Gram effectuée sur les souches obtenues a révélé la présence de bacilles à Gram positif de forme bifide (Y, V), court bâtonnets à extrémité arrondis et souvent forme spatulées parfois sous forme de petits bacilles réguliers ou sous forme coccoïde (Figure 18 A, B, C, D, E, F), (tableau 7). Ce pléomorphisme cellulaire est en relation étroite avec la composition du milieu de culture et l'apparition des formes bifides peut être stimulée par l'addition de carbonates, d'acétate de sodium, de chlorures et de cations monovalents surtout pour les souches de *Bifidobacterium bifidum*. Le pléomorphisme est typique aux bifidobactéries, il est généralement pris comme un indice d'orientation dans l'identification du genre et des espèces.

La détermination des caractères morphologiques et biochimiques des souches isolées nous a permis d'identifier 06 souches, dont trois espèces appartiennent au genre *Bifidobactérium*.

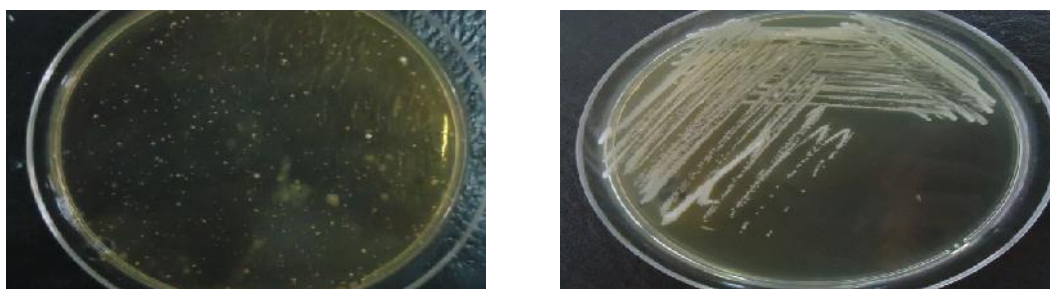


Figure17 : Caractéristiques des colonies (Observations macroscopique)



A. Observation microscopique
(*B.breve*)



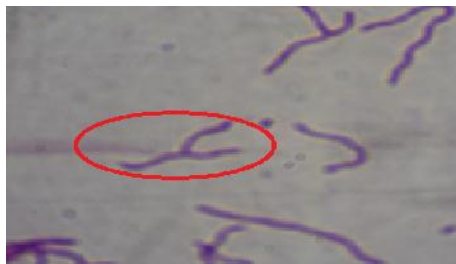
B. Observation microscopique
(*B.breve*)



C. observations microscopique
(*B.bifidum*)



D. observations microscopique
(*B.bifidum*)



E. observation microscopique
(*B.longum*)



F. observation microscopique
(*B.longum*)

Figure 18 : morphologie des cellules (A, B, C, D, E et F) après coloration de Gram de *Bifidobacterium* (*breve*, *bifidum* et *longum*) avec Gx100x10.

2. Les différents caractères biochimiques et physiologiques des souches des bifidobactéries :

Tableau 07: les différentes caractères biochimiques et physiologiques des souches des bifidobactéries ; (Bbf1, fB2, B3, BV, B4, et RBL8).

Souches						
	Bbf1	B2	B3	BV	B4	RBL8
Morphologie des colonies	Punctiformes, luisantes, blanche spatulé	Circulaire crémeuse spatulé	Circulaire creameuse	Circulaire blanche,cream spatulate	Circulaire blanche,cream spatulate	Circulaire Blanche et crémeuse spatulé, Forme bifide
morphologie des cellules	extremities ronde	extremities Ronde	Forme bifide	extremities ronde	extremities ronde	
Gram	+	+	+	+	+	+
Formation spores	-	-	-	-	-	-
Caractères biochimique						
Catalase	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-
Production d'indole	-	-	-	-	-	-
NH3 à partir d'arginine	-	-	-	-	-	-
Gélatinase	-	-	-	-	-	-
Citrate perméase	+	+	+	+	+	+
Caractères physique						
Test de thermorésistance 46,5°C	-	-	-	-	+/-	+/-
Croissance en présence :						
NaCl 4 %	+	+	+	+	+	+
NaCl 6,5 %	-	-	-	-	-	-
production de gaz à partir glucose	-	-	-	-	-	-
Resistance de sels biliaire de différents concentration	+	+/-	+	+	+	+
Coagulation de lait	+	+	+	+	+	+
Croissance en aérobic	-	-	-	-	-	-
Fermentation des sucres :						
Arabinose	-	-	+	-	-	+
Lactose	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	-	+	+	+
Sorbitol	-	+	-	-	+	-
Galactose	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+
Xylose	-	-	+/-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	+
Trehalose	-	+/-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-	+	+	-	+	+
Melibiose	+	+	+	+/-	+	+
Melizitose	-	-	+	-	-	+
Salicin	+	-	+	+	-	+
Inulin	-	+	-	-	+	-
Cellobiose	-	+	-	-	+	-
Mannose	-	+	-	-	+	-
Ribose	-	+	+	-	+	+
Mannitol	-	+/-	-	-	+	-
Gluconat	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	-	+	+	+	-

Mannitol	-	+-	-	-	+	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-
Species	<i>B.bifidum</i>	<i>B.bréve</i>	<i>B.longum</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>B.bréve</i>	<i>B.longum</i>

Les conditions anaerobique de 24h à 37C°

+ : fermentation. - : pas de fermentation. (+-) pas de virage franche.

2.1 Recherche de type fermentaire

Toutes les souches ensemencées dans le milieu MRSc renfermant la cloche de Durham ont montrées une bonne croissance au fond des tubes sans dégagement de gaz dans la cloche.

3. Resistance aux antibiotiques :

La plupart des souches isolées à partir de différents origines, sont généralement très sensibles aux antibiotiques comme (macrolide : érythromycine, la spiramycine), lincomycine, teicoplanine, des antibiotiques à large spectre (la rifampicine et le chloramphénicol) et bêta-lactamines (pénicilline, l'ampicilline, amoxicilline, pipéracilline, Oxacillin). La variabilité a été observé dans leur sensibilité à la tétracycline, la clindamycine et à la céphalosporine, triméthoprime-sulfaméthoxazole et imipénème. Par contre, toutes les espèces isolées sont résistantes aux antibiotiques métronidazole, (acide fusidique, l'acide nalidixique) et aminosides (néomycine, gentamicine, kanamycine et streptomycine), vancomycine et céfoxitine. Paramomycine (Tableau 08, (Figure 19)).

Tableau 08 : l'antibiogramme des six souches de *Bifidobactérium* isolés à partir des différentes origines

Antibiotiques	Les souches	Bbfl	B2	B3	Bv	B4	RBL8
	Dose µg						
B lactamine :							
Pénicilline	P 10	S	S	S	S	S	S
Amoxicilline	AMX 25	S	S	S	S	S	S
Piperacilline	PIP 75	S	S	S	S	S	S
Oxacilline	OXA 5	S	I	S	S	S	I
Ampicilline	AMP10	S	S	S	S	S	S
Metronidazole :							
Ac.fusidique	FA 10	R	R	R	R	R	R
Ac.nalidixique	NA 30	R	R	R	R	R	R
Aminoglycoside :							
Néomycine	N 30	R	R	R	R	R	R
Gentamicine	GM 10	R	R	R	I	I	R
Streptomycine	S 10	R	R	R	R	R	I
Kanamycine	K 30	R	R	R	R	R	R
Glycopeptide :							
Vamcomycine	VA 30	R	R	R	R	R	R
MACROLIDES							
Erythromycine	E 15	S	S	S	S	S	S
Spiramycine	SP 100	S	S	S	S	S	R
CEPHALOSPORINE							

Cefoxitine	CEF 30	R	R	R	R	R	R
Cefsulodine	CFS 30	S	S	I	S	I	I
Lincosamides							
Clindamycine	CM 2	S	S	S	S	S	S
Lincomycine	L15	S	S	S	S	S	I
DIVERS							
Chloramphénicol	C 30	S	S	S	S	S	S
Tétracycline	TE 30	S	S	S	S	S	S
Paramomycine	Par 30	R	R	R	R	R	R
Fosfomycine	FOS 50						
Teicoplanine	Tei 30	S	S	S	S	S	S
Rifampicine	RIF 30	S	S	S	S	S	S
Imipenème	Imp 10	S	S	S	I	I	S

S : sensible

R : résistant

I : Intermédiaire

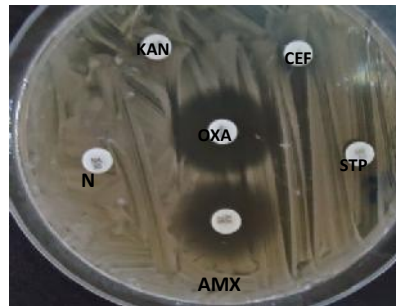
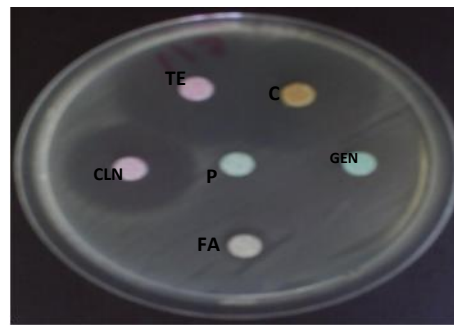
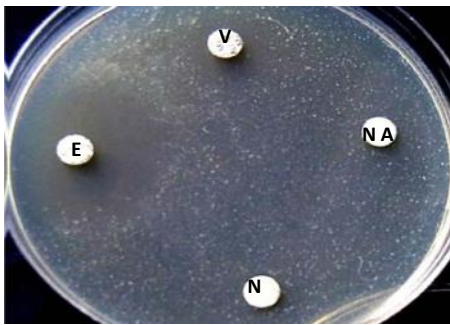


Figure 19 : Quelques résultats du test de l'étude de la sensibilité des souches *Bifidobacterium* aux antibiotiques.

4. Effet des facteurs exogènes sur la croissance des souches de *Bifidobacterium*

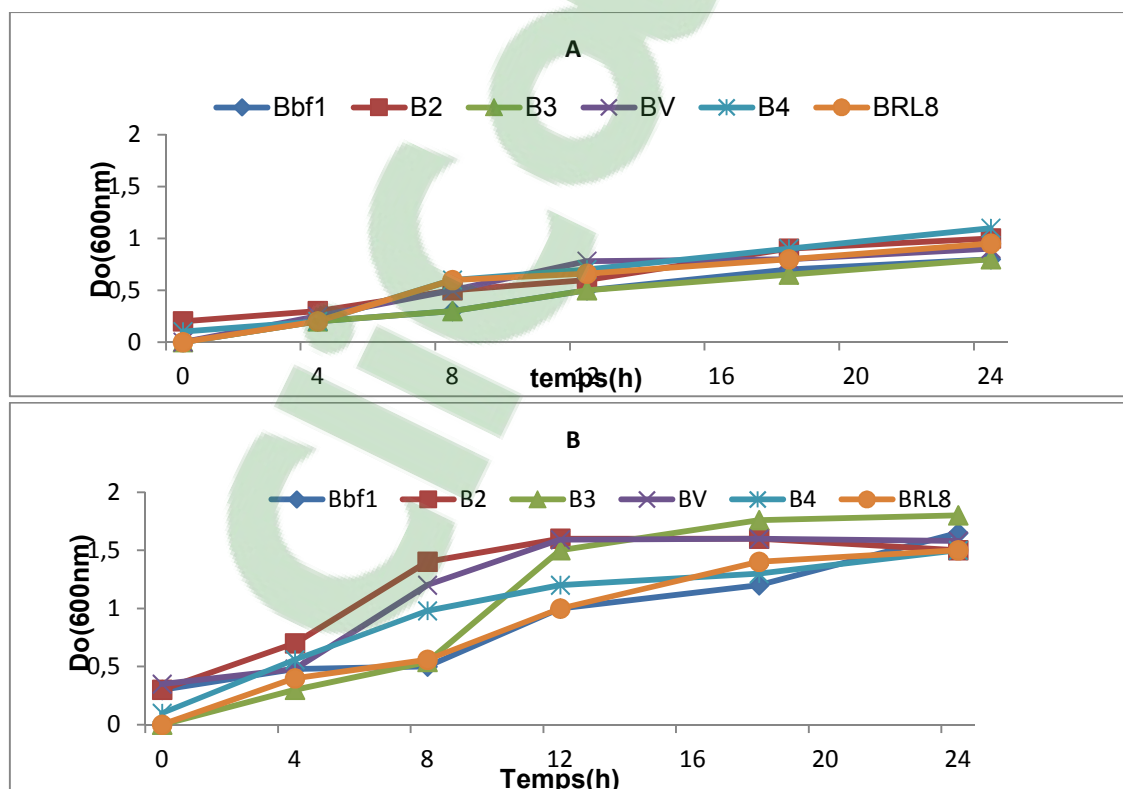
4.1. Effet du pH

La résistance à des pH acides est un des critères de sélection des souches probiotiques. Les résultats de la croissance des souches de *bifidobacterium* sont présentés par figure 20.

Les taux de croissance calculés montre que ces taux sont plus importants dans le milieu à pH 6,5 et pH 7 qu'en milieu a pH 5 et sont presque nuls à pH 8,5. La meilleure croissance de toutes les souches est obtenue dans le milieu à pH 6,5.

L'optimum de croissance dans le milieu a pH 6,5 est obtenue après 4 heures d'incubation et ceci presque pour toutes les souches. Le pH est un paramètre important qui définit la croissance des bifidobactéries. à pH 5 (figure 20 (A) la phase de latence est absente dans les souches BRL8, BV, B3, et les autres souches Bbf1, B4, B2 ont une la phase de latence de 2 à 3h, les taux de croissance calculé est de $0.03h^{-1}$, (BRL8) et $0,1 h^{-1}$ (BV), à pH 6,5 (figure 20 (B), la phase de la latence est absente dans BV et B4. la phase de latence est absente à BV et B4. Le taux de croissance est $0.35 h^{-1}$ (Bbf1), $0.33h^{-1}$ (B2), et $0.44 h^{-1}$ (B3 et BRL8), à pH 8 (Figure 20 (C), Les taux de croissance calculés est de $0.05h^{-1}$, (Bbf1) était $0.02h^{-1}$ à (B2, B3).

La croissance des souches a été complètement inhibée à pH 4 et pH 8,5. La Croissance optimale pour les différentes souches est obtenue dans le pH moyen de 6,5 et pH7 (figure 20 B). En revanche, un ralentissement significatif de la croissance de toutes les souches a été observé dans le milieu à pH 8.



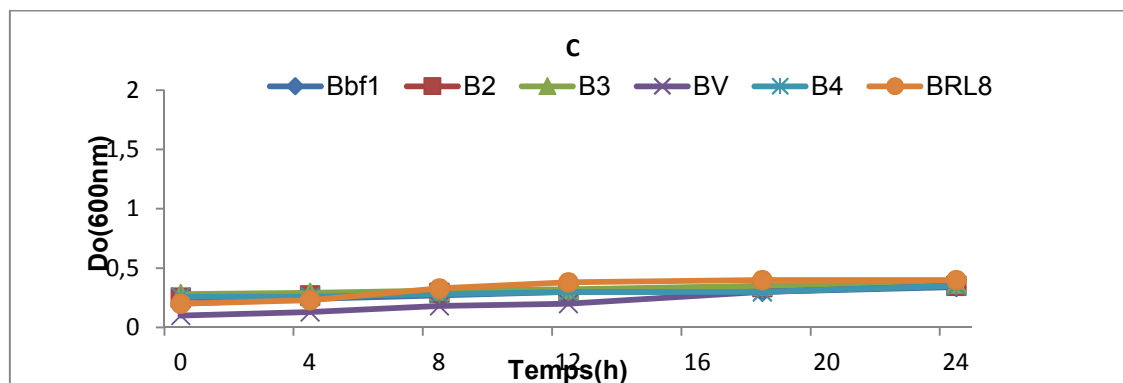


Figure 20: la croissance de *Bifidobacterium bifidum* (Bbf1, BV), *Bifidobacterium breve* (B2, B4), *Bifidobacterium longum* (B3, BRL8), dans le milieu MRS à pH 5 [A], pH 6 [B] et pH 8 [C].

4.2. Effets de températures :

La température est un facteur limitant la croissance des microorganismes. Les résultats de la croissance des souches de *Bifidobacterium* à des différentes températures d'incubation sont présentés par les figures 21.

Nous observons une similitude de croissance des différentes souches à des températures d'incubation de 25°C et 45°C, avec une phase d'adaptation de presque une heure pour toutes les souches. Cette phase est absente lorsque les souches sont incubées à des températures de 30°C et 37°C. La souche B2, s'adapte plus rapidement à la température de 30°C qu'à 25°C.

La variabilité a été observée dans la croissance des souches isolées. Une phase de latence plus de 4h de croissance a été observée dans toutes les souches (figure 21 A). A 25 ° C, le taux de croissance a atteint 0,46h⁻¹ (Bbf1, B4) et de 0,3h⁻¹ (B2), à 30C ° de la phase de latence est absente dans BRL8, BV, à 37C° la phase de croissance exponentielle a été obtenue dans l'intervalle de 6 à 10 h, le taux de croissance calculé est de 0,38h⁻¹ (Bbf1) et 0,4 h⁻¹ (B3). Par ailleurs, la croissance des souches est préférable de température d'incubation de 30 ° C et 37 ° C (figure 21 (B), 21 (C)).

En revanche, un ralentissement significatif de la croissance de toutes les souches a été observée dans un milieu MRS à 45 ° C (figure 21 D) Cependant des souches B2, B3 et BRL8 ont une phase de latence de 4 h, avec un taux de croissance était de 0,02h⁻¹ (BV). A 45°C, on a observé un ralentissement de la croissance avec une période d'adaptation de 4 heures.

La croissance est meilleure à 30°C et 37°C qu'à 25°C et 45°C. Le taux de croissance est en moyenne de 0,33h⁻¹ à 30°C, et est moins important à 25°C et 45°C (figure 21).

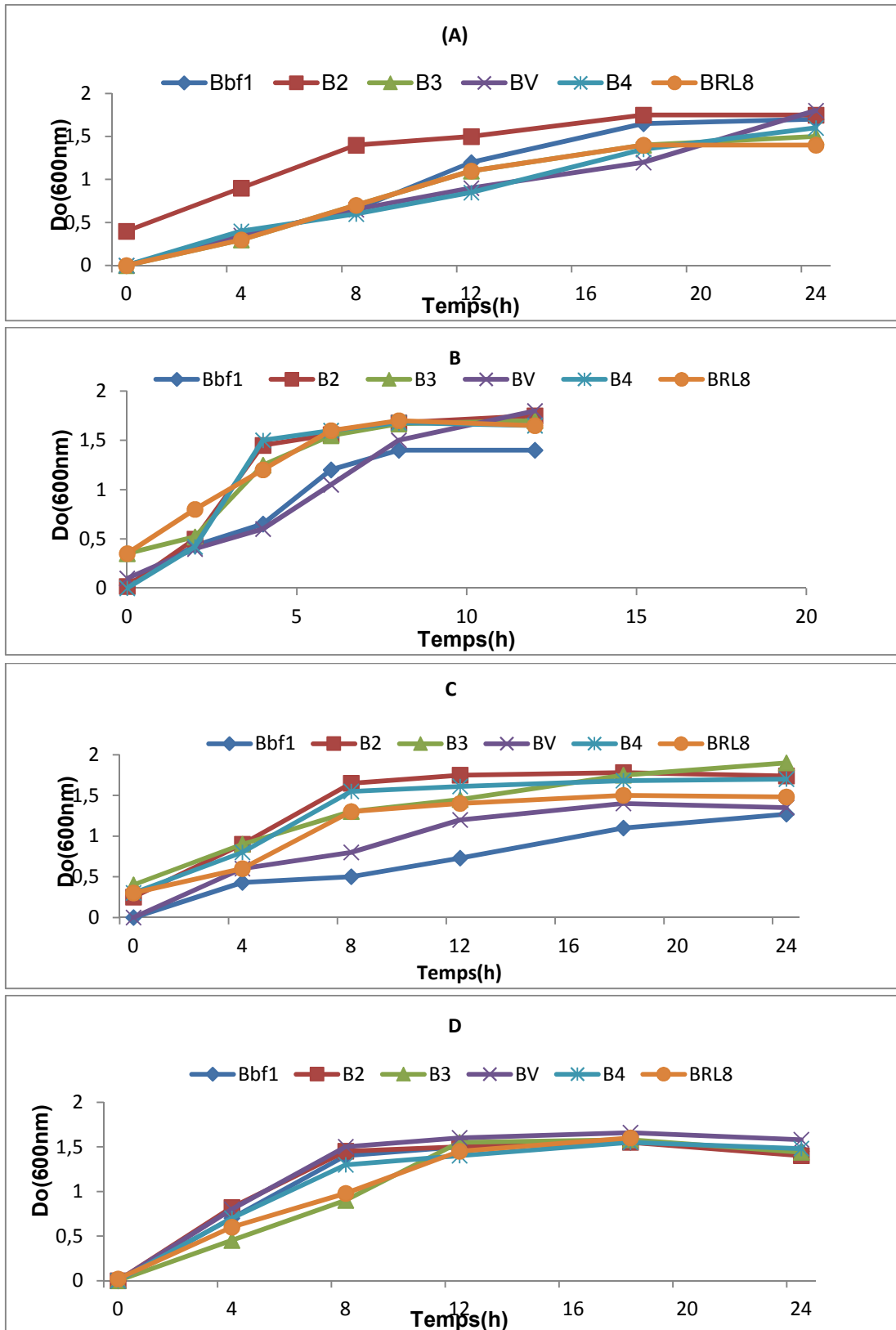


Figure 21 : la croissance de *Bifidobacterium bifidum* (Bbf, BV) , *Bifidobacterium breve* (B2, B4) *Bifidobacterium longum* (B3, BRL8), dans milieu MRS à 25°C [A], 30°C [B], 37°C [C], et 45°C [D].

5. Aptitudes technologiques des bifidobactéries

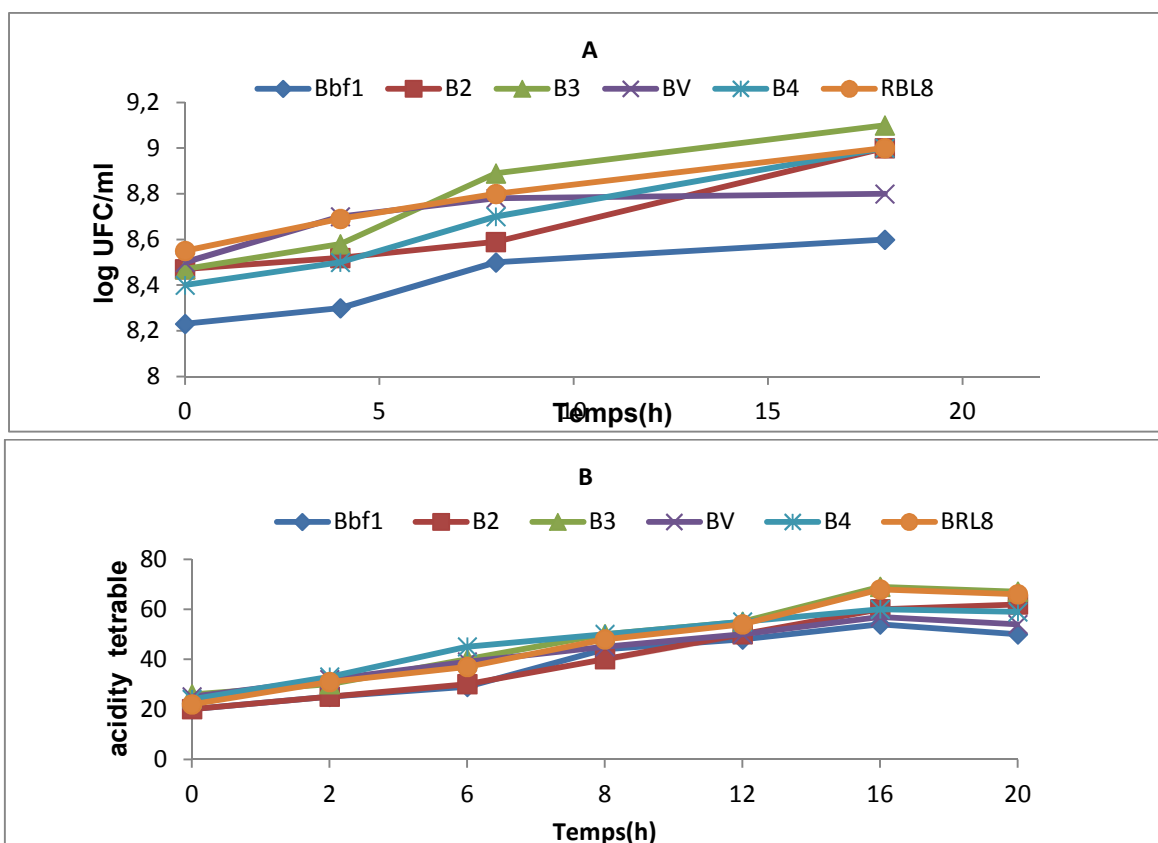
5.1 Cinétique de croissance des cultures pures dans le lait écrémé

L'évolution de la croissance des bifidobactéries et les bifidobactéries en culture pure est exprimée en log ufc/ml, les résultats sont représentés dans la figure 22 (A) et (B). Le dénombrement effectué dans les milieux appropriés révèle un nombre de 10^9 ufc/ml pour les bactéries lactiques avec des taux de croissance calculés varient entre 0,7 et 0,9 h.

Les résultats de l'évolution du pH au cours de la fermentation du lait par nos souches ont montré que le pH est proportionnel à l'acidité. Le lait inoculé avec le *Bifidobacterium sp.* Les souches coagulent entre 8 et 10 heures d'incubation. Le nombre de bifidobactéries obtenu était de 8,5 Log ufc / ml dans la souche Bbf1, 9 Log ufc / ml dans (B2) et de 9,1 Log ufc / ml dans (B3), avec un taux de croissance $0,39 \text{ h}^{-1}$ (Bbf1), $0,31 \text{ h}^{-1}$ à (B4), et $0,26 \text{ h}^{-1}$ dans (B2), (figure 22 (A)).

Cependant, la croissance de toutes les souches progresse lentement. L'activité acidifiante le plus faible est notée pour le Bbf1 de déformation avec un taux d'acidification de 7,47

La cinétique de croissance des souches de *Bifidobacterium* et l'évolution du pH sur la MRS est montré dans (figure 22 (C)). Le pH de la culture diminue progressivement de 6,8 à 4 après 20 h d'incubation à 37°C en MRS. En outre, le pH final atteint une valeur de 5. Les souches de bifidobactéries révèlent également l'existence d'une activité acidifiante significative. Après 18 h, l'acidité atteint une des valeurs comprises entre 50° et 66°D (figure 22B).



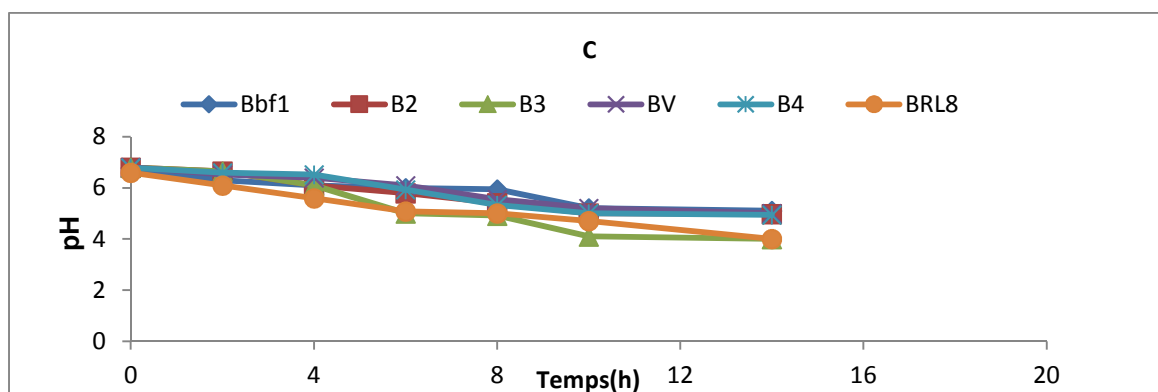


Figure 22: cinétique de croissance [A], production d'acidité [B] et évolution de pH [C] de: *Bifidobacterium bifidum* (Bbf1, BV), *Bifidobacterium breve* (B2, B4), *Bifidobacterium longum* (B3, BRL8), dans le lait écémé à 37C °.

6. Antagonisme *in vitro* :

Recherche des interactions entre les différentes espèces de *Bifidobactérium* et de les entéropathogènes :

Les résultats des interactions des souches de *Bifidobacterium* avec les bactéries entéropathogènes dans le milieu MRSc non tamponné et tamponné sont représentés par (les figures 23, 24 et 25, (tableau 09 et 10)).

6.1 Recherche de la nature de l'agent inhibiteur :

6. 1.1. Inhibition due aux acides organiques :

Les souches de *bifidobacterium* testées montrent une variabilité de comportement envers les bactéries entéropathogènes. On a étudié la capacité des souches *Bifidobactérium* à inhiber les 08 souches entérobactéries. Sur milieu MRS cystéine non tamponné (pH 6,8), ces bactéries ont été inhibées par nos souches *Bifidobactérium* testées. Par contre, sur milieu MRS cystéine tamponné (pH 7), seule la souche *B.longum* B3 montre une forte activité antibactérienne envers *Staphylococcus aureus*, mais les autres souches montrent une très faible activité ou bien aucune activité envers ces entérobactéries, alors on peut dire que les inhibitions des entérobactéries par les autres souches de *bifidobacterium* ne peuvent être dues qu'à la production des acides organiques.

Tableau 09 : cinétique d'activité antimicrobienne des souches de *Bifidobactérium* par la méthode de diffusion des puits sur MRS pH (6,8) par la méthode indirecte (en mm).

Souches	Bbf1	B2	B3	RBL8
<i>Escherichia coli</i> 25922	14±0	14,28±1,01	13,77±1,73	10,5±0,7
<i>E.coli</i> 8739	13±1,4	15,62±0,88	10,5±0,7	9±1,41
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	13,37±0,88	16±1,41	10,37±0,88	10±0
<i>Staphylococcus aureus</i> 29213	20±0,14	16±1,15	22,25±0,38	10,5±0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 24853	10,01±1,01	11±1,4	4±1,1	3,5±0,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	13±1,41	15,5±0,7	14,62±0,53	15±0

Les résultats sont exprimés en mm, par mesure de la distance entre la limite de la colonie bactérienne et le début de la zone de non inhibition de la souche indicatrice. Les souches présentant une zone claire d'extension latérale supérieure à 0,5 mm sont considérées comme productrices de substances antibactériennes (Fleming *et al.*, 1975).

Inhibition de la souche *Salmonella.sp* :

La souche *bifidobactérium*, ne possèdent pas une activité inhibitrice contre *Salmonella.sp*, que ce soit sur milieu MRS normal ou tamponné, sauf la souche B2 possédé cette activité avec $6\pm 2,8$ mm, Sur milieu MRS tamponné (pH 7), aucune souche n'a inhibé la souche *Salmonella.sp*

Inhibition de la souche *Enterobacter cloaqui* 335:

Sur le milieu MRS normal (pH 6,8), (Après l'application du test statistique de *Student*), les souches B2, B3 ont presque la même activité aux alentours de $2,05\pm 0,45$ mm.

Les autres souches ne possèdent pas une activité d'inhibition dans ces conditions. Sur milieu MRS tamponné (pH 7), les souches montrent une très faible activité ou bien aucune activité envers *Enterobacter cloaqui* sur ce milieu.

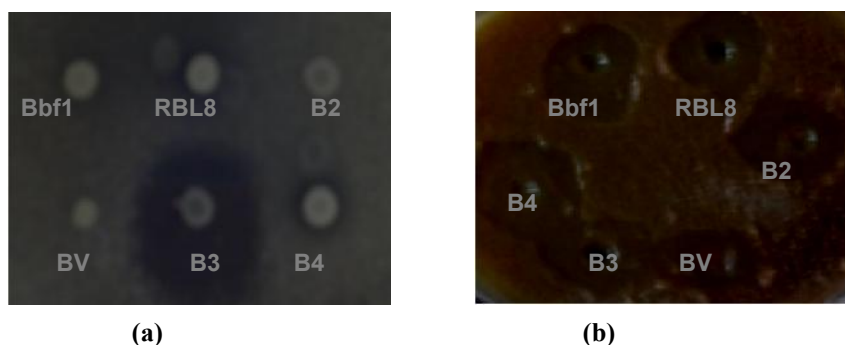


Figure 23: Test d'inhibition de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 par les souches *Bifidobacterium* testées, (a) sur MRS tamponné à pH 7 et (b) sur MRS pH 6,8.

6.1.2. Inhibition due au peroxyde d'hydrogène :

La substance anti-bactérienne contenue dans le surnageant de la souche *B.longum* (RBL8) a été inactivée en présence de la catalase, ce qui exclue une inhibition par le peroxyde d'hydrogène. Par contre les autres souches étaient actives en présence de catalase, ce qui explique l'absence de peroxyde d'hydrogène.

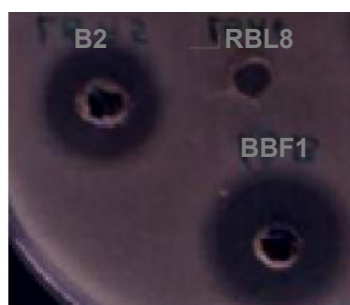


Figure 24: Action de catalase sur l'activité de la peroxyde d'hydrogène issue de la différentes souche de *Bifidobacterium* 03 souches of *Bifidobacterium* avec *E.coli* ATCC 8739 par la méthode de diffusion des puits.

7. Recherche de la nature de la substance antimicrobienne

7.1 Action des enzymes protéolytiques sur l'activité de la bactériocine issue de la souche :

Aucune inhibition n'était observée après le traitement par la trypsine, pepsine (titre 100) et la α -chymotrypsine, A partir de ces résultats, on peut dire que les souches *Bifidobacterium* étudiés possèdent une activité antibactérienne, qui est due à l'acide lactique, et à un agent de nature protéique, peut être bactériocin like.

L'activité antimicrobienne est entièrement détruite sous l'action des enzymes protéolytiques, ceci suggère que la partie biologiquement active de la bactériocine est de nature protéique (tableau 10). Ces propriétés de la bactériocine sont très importantes à déterminer, mais il serait intéressant de confirmer ces résultats *in vitro*.

Tableau 10 : présente l'action des enzymes protéolytiques sur l'activité de la bactériocine issue de la souche, avec Bbfl et B3 avec 02 bactéries enteropathogenes (*S.aureus* ATCC 29213 et *E.Coli* ATCC 8739 respectivement).

Traitement	diamètre of inhibition (mm)	
	<i>E.Coli</i>	<i>S.aureus</i>
Enzymes protéolytiques		
α -Chymotrypsine	-	-
Trypsine	-	-
Pepsine	-	-

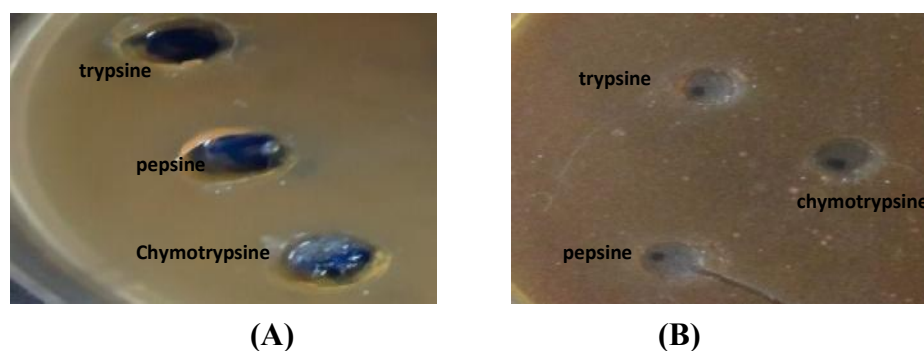


Figure 25 : Action des enzymes protéolytiques sur l'activité de la bactériocine issue des souches, (A) Bbfl et *S.aureus* ATCC 29213 et (B) B3 avec *E.Coli* ATCC 8739.

Tableau 11 : récapitulatif résumé l'activité des souches de bifidobactéries étudiées envers les souches entéropathogènes.

	BbF1	B2	B3	B4	BV	RBL8
Acidité	-	+	-	+	+	-
catalase	-	-	-	-	-	+
bactériocine	+	-	+	-	-	-

7.2 Effet de la température de surnageant

Les substances antimicrobiennes ont été testées pour leur résistance à la température et la conservation de leur activité vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

La souche (Bbfl) à été retenue pour sa forte activité comme envers les souches entéropathogènes. Toutefois, Les tests de caractérisation préliminaires révèlent que la bactériocine présente une faible thermorésistance (tableau 12). Le surnageant de la culture a été traité par différentes température 80°C, 100°C, et 120°C. Il y avait une réduction remarquable de l'activité antibactérienne après chauffage à 100°C pendant 10 minutes. Son activité est totalement détruite après un cycle d'autoclavage à 120 °C pendant 20 mn.

Tableau 12 : Détermination de la thermorésistance de la bactériocine issue de la souche *B.bifidum* (Bbfl)

Traitement	diamètre d'inhibition (mm)
Température	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
Témoin	20
80°C/ 10 mn	12
100° C/ 10 mn	2
121 °C/ 20 mn	00

8. Recherche de bactériocines :

Après une incubation à 37°C pendant 16 heures en anaérobose, la croissance bactérienne est suivie par la mesure de la densité optique. Nous avons calculé la croissance bactérienne à l'aide des valeurs de la densité (DO) afin de connaître l'existence de bactériocine et son effet sur la croissance *Pseudomonas aerogenosae*, *Staphylococcus aureus* et *E.coli* en présence de *Bifidobacterium*, Les résultats sont traduits par une courbe qui montre une décroissance de ces entéropathogènes, dès qu'on ajoute le surnageant, (Figure 26 (A, B)).

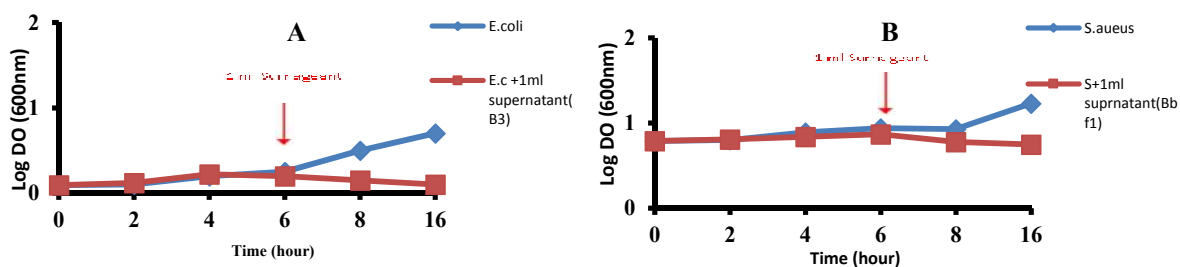


Figure 26: (A) la croissance d'*E.coli* ATCC 8739 en presence de bactériocin like produite par la souche B3 and (B) la croissance de *S.aureus* ATCC 29213 en presence de bactériocine like produite par Bb f1.

9. L'étude de la cinétique de croissance en culture mixte (avec des souches pathogènes) :

Dans la culture mixte de Bb f1 avec *P.aerugenosa*, Le nombre de cellules viables par millilitre a diminué de 7,55 log UFC / ml à 5,5 log UFC / ml, après 18 heures d'incubation (Figure 27 (A)), et en dessous de 1 log UFC / ml, après 48 heures, l'inhibition de *P.aerugenosa* par la souche B3 a diminué que l'inhibition par Bb f1.

L'acidité produite par la souche *P.aerugenosa* dans le lait écrémé exprimée en degré Dornic, montrent une production de 40 ° D après 8 h de culture. La production a augmenté pour atteindre 56 ° D, après 24 h de culture et de diminution après 48h a été noté, d'autre part, en culture mixte, l'inhibition d'une culture de plus en plus de *P.aerugenosa* par la souche Bb f1 dans le lait a été examiné et comparé avec le croissance de *P.aerugenosa* (figure 27 (B)).

L'inhibition d'*E. coli* par la souche Bb f1, en culture mixte est parvenu à 0,5 cellules par ml après 48h d'incubation dans du lait écrémé. Cependant Bb f1 et B3 a diminué de 7 UFC / ml, 7,8 UFC / ml à 2 et 3 UFC / ml respectivement. Dans la culture seule, la croissance d'*E. coli* augmente de 6,99 logUFC / ml à 7,6 logUFC / ml après 18 h, cette croissance a diminué jusqu'à 6,8 logUFC / ml après 48 heures d'incubation, (Figure 28 (A)).

L'acidité produite par *E. coli* dans le lait écrémé a augmenté pour atteindre 20 °D après 4h et à 60°D après 48h de culture (Figure 28 (B)).

L'inhibition de *S. aureus* par les souches inhibitrices dans le lait a été examinée et comparé avec la croissance de *Staphylococcus aureus* dans le lait écrémé. Après 24 h, la diminution de la croissance de *S. aureus* a été considérable continuer par les trois souches (figure 29 (A)). Une diminution du nombre de *S. aureus* a été remarqué après 10h (en culture mixte), d'autre part, dans la culture seule, la croissance de *S. aureus* a augmenté après 4 à 8h.

En culture mixte B3 avec *S.aueus*, le nombre de cellules viables par millilitre est passée de 6 logUFC / ml à 4 après 18 heures d'incubation (Figure 29 (B)) et en dessous de 0,8 log UFC / ml cellules par ml après 48 heures, et les cellules ne repousse dans les 72 h. L'acidité produite par la souche B3 dans le lait écrémé évaluée par la quantité de l'acide libéré et exprimée en degrés Dornic correspond à une production de 40 ° D Après 8 h de culture. La production a augmenté pour atteindre 59 ° D après 24 h de culture.

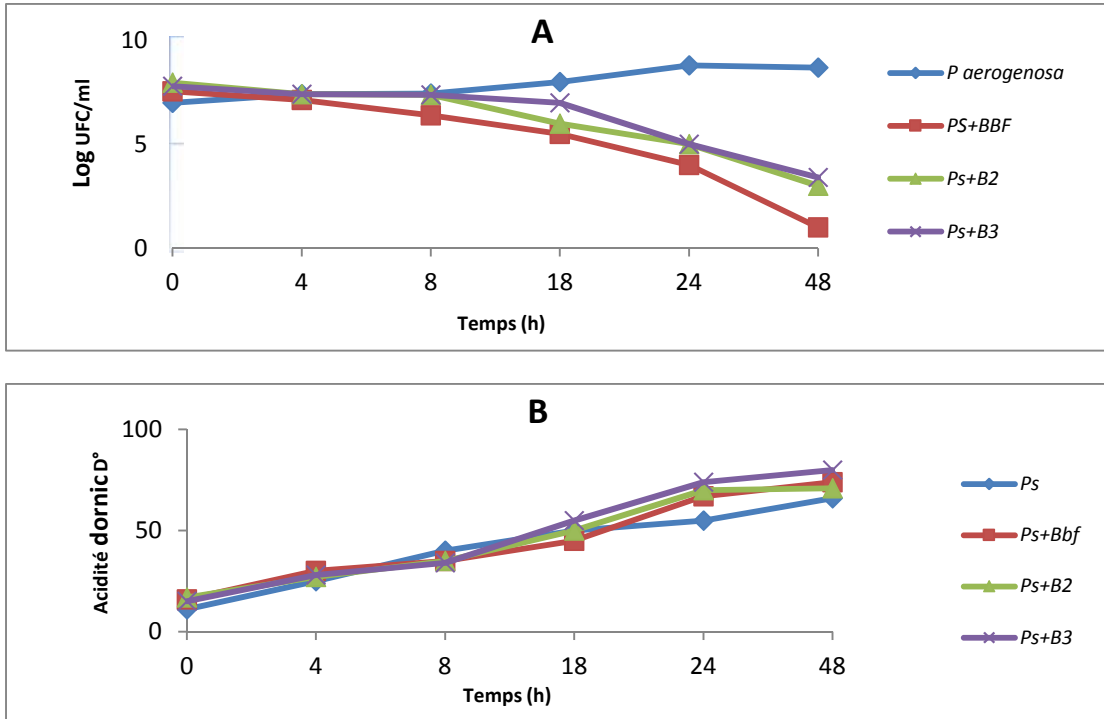


Figure 27 : la croissance de bifidobacteries (Log UFC/ml) (A) , la cinétique d'acidification (B), durant la croissance des souches, *Bf.bifidum* (Bbf1), *B.bréve* (B2), *Bf.longum* (B3) en monoculture et culture mixte avec *P.aerugenosa* (ATCC 27853), dans le lait écrémé à 37 °C.

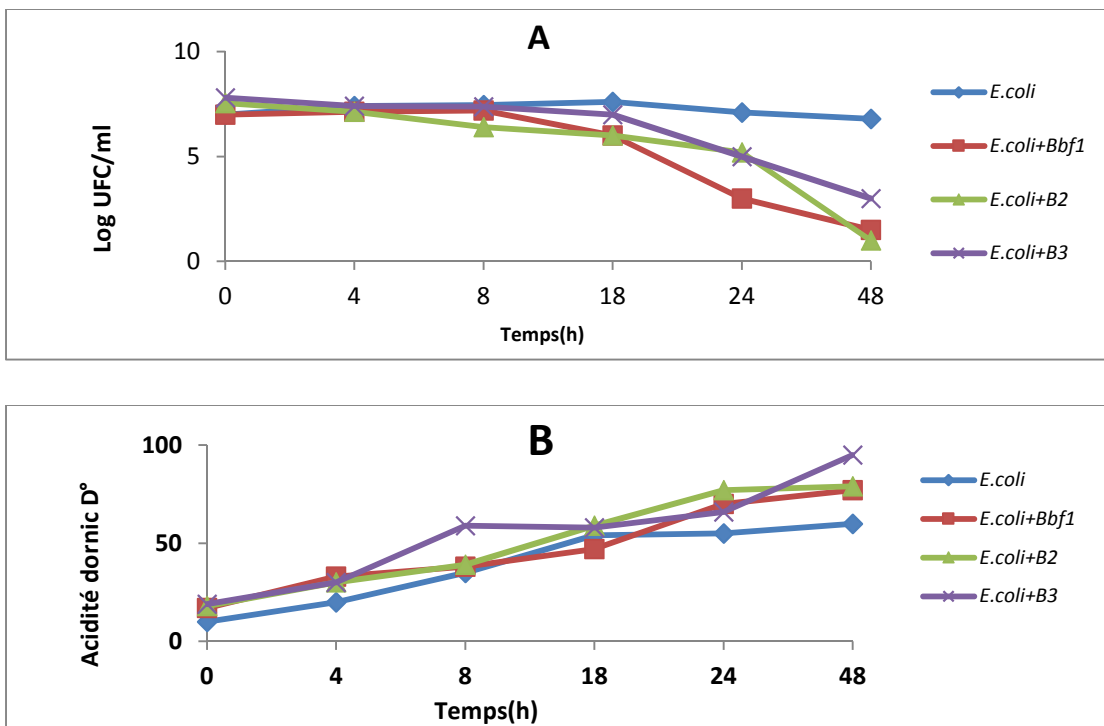


Figure 28: la croissance de bifidobacteria (Log UFC/ml) (A) , la cinétique d'acidification (B), Durant la croissance des souches (*B2*), *Bf.bifidum* (Bbf1), *Bf.longum* (B3) en monoculture et culture mixte et *E.coli* ATCC 8739), dans le lait écrémé à 37 °C.

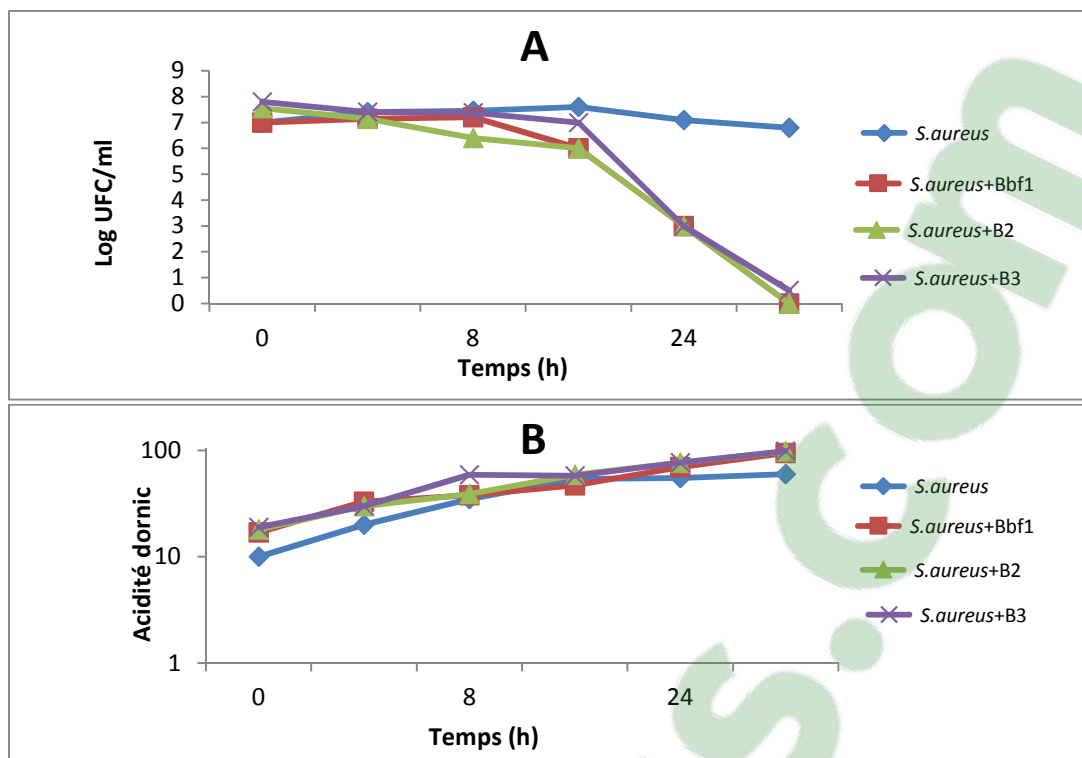


Figure 29 : la croissance de bifidobactéries (Log UFC/ml) (A), la cinétique d'acidification (B), durant la croissance des souches *B.brève* (B2), *B.bifidum* (Bbf1), *B.longum* (B3) en monoculture et mixte avec (*S.aureus* ATCC 29213), dans le lait écrémé à 37 °C.

10. Effet antagonisme :

10.1. Antagonisme *in vitro*:

Dans ce travail, deux populations bactériennes différentes ont été suivies dans les différents lots des rats, tout au long du protocole : les bifidobactéries sont absorbés par voie orale (gavage). Ce protocole ne nous permet pas de calculer le taux de survie des bactéries ingérées avec les régimes puisqu'il est difficile de connaître les quantités exactes de nourriture consommées par chaque rat.

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

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

La compétition vis à vis des nutriments essentiels pour le développement bactérien conduit à l'épuisement du milieu de culture et donc à la diminution de la croissance des souches bactériennes. Les bifidobactéries libèrent une substance inhibitrice de la croissance des germes pathogènes (bactériocine) à la fin de la phase exponentielle de la croissance (au delà de 6 h de fermentation) (Doumandji, 2007).

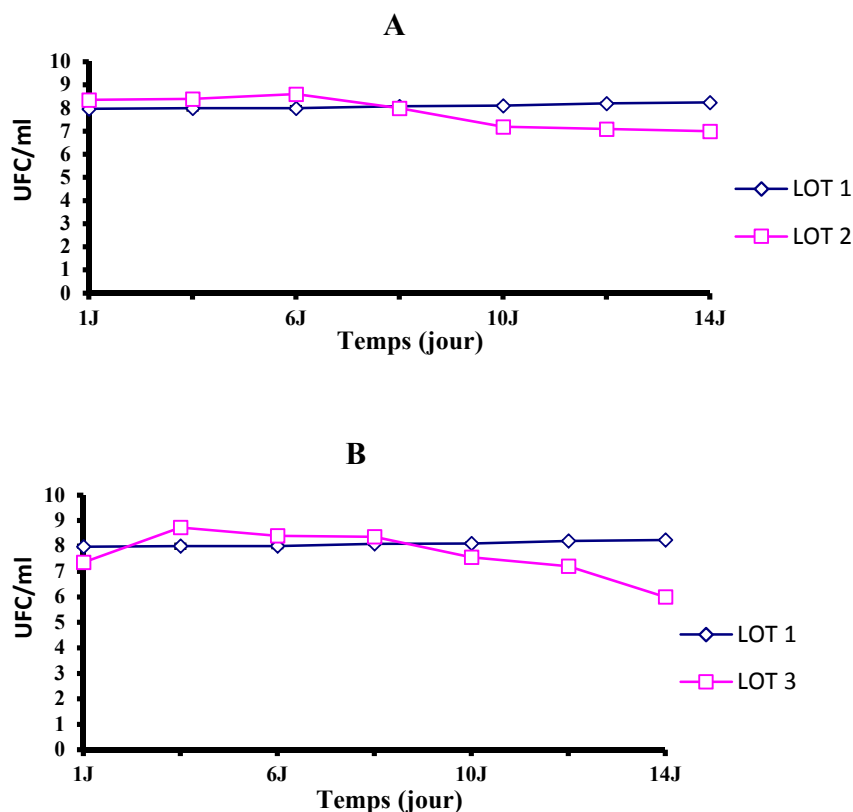


Figure 30 : L'évolution des taux fécaux d'*E. coli* au niveau des lots 1, 2 et 3. (A et B).

A partir de ces courbes tracées, qui représentent l'évolution des taux d'*E. coli* entéropathogène au niveau des trois lots, on note que dans le lot 1, le nombre d'*E. coli* est suivi pendant les 02 semaines.

Cependant, après le traitement préventif avec *B. bifidum* (Bbf1), et dans le lot 2 (fig 30 (A)) le nombre d'*E. coli* jusqu'à le 8^{ème} jour, puis il commence à se diminuer de 10^8 UFC/l pour atteindre 10^7 UFC/ml pendant les 14 jours de traitement.

Après le traitement thérapeutique de lot 3 (fig 30(A)), le nombre EPEC augmente de 10^7 UFC/ml jusqu'à 10^9 UFC/ml au 4^{ème} jour, ce nombre diminue pour atteindre 10^6 UFC/ml (arrêt de traitement).

Nos résultats montrent que les *Bifidobacterium* consommées, se retrouvent viables et cultivables dans les fèces. Le contenu des fèces en bifidobactéries passe d'un niveau non détectable (chez les rats qui ne consomment pas de bifidobactéries) à des concentrations de l'ordre de 10^8 à 10^9 UFC/g. Ceci montre que ces bactéries peuvent transiter tout au long du tube digestif et demeurer viables au moins pendant les jours de leur consommation, sans que toutefois nous puissions préjuger de leur persistance après l'arrêt du protocole.

En résumé, le contenu fécal en bifidobactéries se maintient à un niveau élevé (plus que 10^8 UFC/g) chez les rats des groupes ayant consommé des bifidobactéries. Certaines de ces bactéries ingérées peuvent persister dans l'intestin et avoir la potentialité de moduler de nombreuses fonctions qui pourraient se révéler positives pour l'hôte.

10.2. Antagonisme *in vivo*:

Les résultats significatifs des effets antagonistes observés *in vitro* suscité une étude *in vivo* réalisée sur des rats.

L'effet antagoniste *in vivo* de *B. bifidum* (Bbf1) étudié sur une souche d'*E. coli* entéropathogène. L'implantation de ces souches et la modification de la flore microbienne ont été suivies au cours de cette étude. A la fin de l'expérimentation, des prélèvements des selles, et de tissus du tube digestif ont été prélevés pour subir des examens microbiologiques et des coupes histologiques.

10.2.1 Etude macroscopique après dissection des rats :

Lot 1 :

Les intestins grêles (GI) étaient de couleur sombres brun, accompagné par une mauvaise odeur pendant la dissection de ces rats, avec une contraction des organes (en particulier les intestins grêles) avec 0,2 cm de diamètre, par rapport à celles observé aux rats témoins (0,52) cm de diamètre (figure 31).

Lot 02 :

L'observation macroscopique n'a révélé aucun changement de couleur, l'apparence ou le diamètre par rapport aux rats témoins. les intestins grêles (GI) ont les mêmes caractéristiques que celles observées dans les témoins (0,4 cm de diamètre).

Lot 3 :

L'apparence (forme et couleur) et contraction étaient moins importantes que celles observé dans les rats de lot 02, et après la 2^{ème} dissection. Ces observations ont révélé que non seulement l'infection réussi à développer, mais aussi que les intestins ont retrouvé leur aspect normal après le post infection.

Les résultats de l'étude macroscopique ont montré que les rats de lots 1 qui n'ont pas reçu aucun traitement, montrent des signes d'infection importante accompagnée par une contraction marquée de la muqueuse intestinale (atrophie intestinale) par rapports aux rats témoins, probablement en raison de la contamination par EPEC.

Ces symptômes ont été disparu (lot 3), et après l'administration des bifidobactéries (2^{ème} dissection), ou n'apparaissait même pas (lots 2) chez les rats qui ont reçu *B.bifidum* (lot 1) (Figure 31).



Figure 31 : Les observations macroscopiques du lot 1,2 et 3 après les dissections, (après arrêt du traitement).

10.2.2 Etude microscopique (coupes histologique) :

Les coupes histologiques des organes (intestin grêle) et après la dissection des jeunes rats, ont été observé par un microscope à caméra (Leica DFC 450), (objectif x10).

Lot 1 :

Après l'observation microscopique des intestins grêles des rats dans le lot 1, était très affecté.

La totalité de la muqueuse est disparu et (Figure 32), où les cellules muqueuses prévalu chez les témoins (sans aucun traitement) (Figure 36), la lamina propria a été complètement détruits. Ces observations ont révélé que ces rats souffrent de diarrhée aiguë, (la diarrhée est un état qui indique que l'intestin est irrité).

Lot 02 :(traitement préventif)

En ce qui concerne les rats qui ont reçu du lait fermenté avec *B. bifidum*, et après la première dissection (la 1ère semaine), l'observation microscopique des coupes histologiques n'a révélé aucune modification importante de la muqueuse intestinale par rapport aux rats témoins, les mêmes résultats ont été trouvés après la deuxième dissection (après l'arrêt du traitement) (Figure 34).

Ces résultats confirment la preuve de l'effet barrière des bifidobactéries, et / ou de protection exercée par *B. bifidum* contre l'infection due par la contamination avec EPEC.

Lot 03 : (traitement thérapeutique)

Chez les rats dans le lot 3 et après la première dissection, les signes d'infection étaient moins graves mais néanmoins significative, et l'intestin grêle était moins affectée, et la muqueuse semble moins touchée.

L'effet *in vivo* sur la croissance et l'implantation de souches testées dans le tube digestif des rats a été étudié. Des rats ont reçu une dose journalière de monoculture de deux souches testés pendant 2 semaines. Les résultats obtenus révèlent un effet probiotique sur l'implantation des souches étudiées. Cette colonisation par les germes bénéfiques contribue significativement à la modification du microbiote intestinal.

Hermendez-Manjarrez *et al.*, 2000 ont montré que EPEC pourrait induire des lésions A / E (fixation / effacement) dans le épithélium intestinal. Cependant après l'arrêt du traitement (15 jours après la première dissection), on a observé la récupération complète de la muqueuse, avec un revenir à son apparence normale (observations macroscopiques), la récupération de la membrane muqueuse du l'intestin grêle, dont les rats (lot 3) qui ont reçu la souche *B. bifidum* (Figure 35). Cette nous mène à la conclusion que la présence de *B. bifidum* dans les intestins pour une période donnée facilite la régénération de tissus intestinaux.

L'étude *in vitro* et *in vivo* montrent que la prise de probiotiques (*Lactobacillus* ou *Bifidobacterium*) réduit la colonisation du tractus digestif par bactéries pathogènes et stimule l'immunité spécifique réponse de défense de l'hôte en activant les lymphocytes, la stimulation de l'activité anti-tumorale et de réduire l'infections comme la colonisation vaginale de coliformes et levures (Amrouche, 2005).

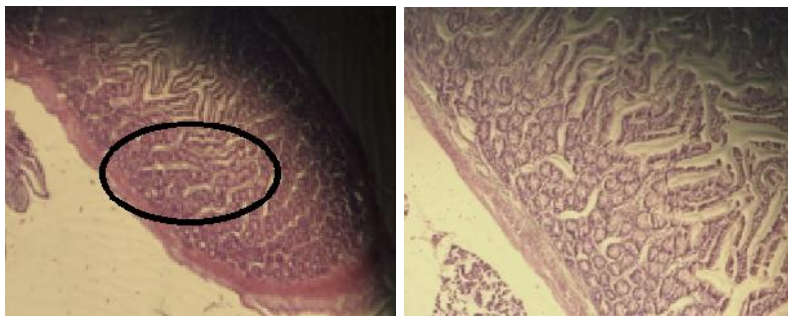


Figure 32 : Les observations microscopiques de coupes histologiques de l'intestin grêle de rats dans le lot 1 (Taille d'image 870x653 µm) (Objectif x 10).

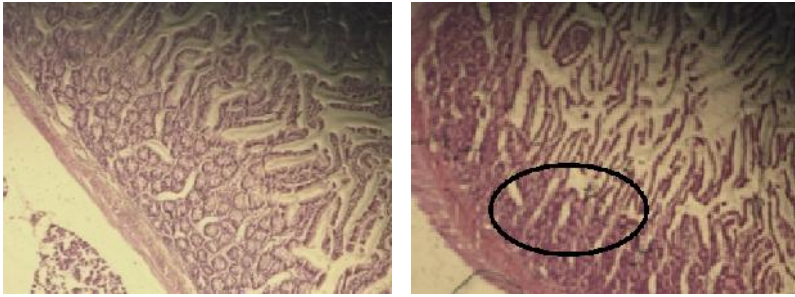


Figure 33 : Les observations microscopiques de coupes histologiques de l'intestin grêle de rats dans le lot 01, et après la 2^{ème} dissection. (Taille d'image 870x653 μ m) (Objectif x 10).



Figure 34 : Les observations microscopiques de coupes histologiques de l'intestin grêle de rats dans le lot 2 (1^{ère} et 2^{ème} dissection) (Objectif x 10).

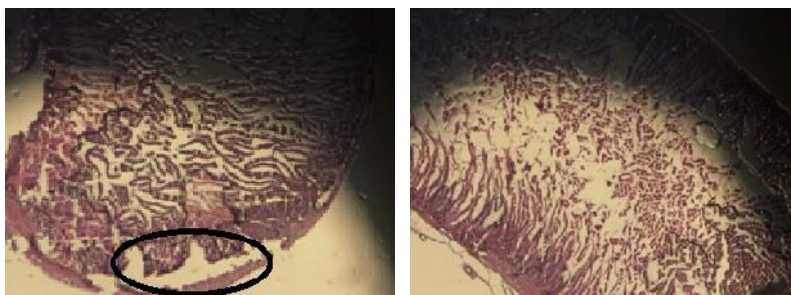


Figure 35 : Les observations microscopiques de coupes histologiques de l'intestin grêle des rats dans le lot 3 (après la 1^{ère} et 2^{ème} dissection) (Objectif x 10).

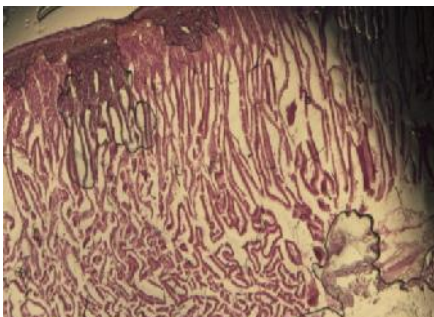


Figure 36 : Les observations microscopiques de coupes histologiques de l'intestin grêle des rats de lot Témoin (Objectif x 10).

Les bifidobactéries sont des bactéries commensales de l'homme, elles sont également retrouvées chez les animaux (Biavati *et al.*, 2000). Leur isolement nécessite des conditions assez spécifiques, qui mettent en jeu des systèmes d'anaérobiose comme les anaerocult ou les gas-pack et des milieux de cultures très riches tel que TPY, milieu Beerens, MRS cystéine, milieu Columbia modifié (Scardovi, 1986 ; Payne *et al.*, 1999; Hadadji *et al.*, 2005).

Les résultats de l'identification du genre, montrent que les six souches étudiées appartiennent au genre *Bifidobacterium*. Les résultats d'analyses ont permis d'identifier dix souches de *Bifidobacterium* appartenant aux espèces suivantes appartenant aux espèces suivantes: *Bifidobacterium.Bifidum*, *B.Longum*, *B.Brève*. nous avons isolé et identifié des souches de *Bifidobacterium* à partir des selles de nourrissons frais et le yaourt commercialisé (activia) .Notre étude a montré également qu'il a un polymorphisme cellulaire (Bonaprite, *et al.*, (2001). Hadadji *et al.*, (2006)), Les cellules formant les colonies sont Gram positive, caractérisées par des formes variables, mais souvent des formes bifides qui sont typiques aux bifidobactéries (Mahmoudi *et al.*, (2013). Le pléomorphisme observé chez les bifidobactéries est souvent associé à la composition du milieu de culture. Des études ont démontré que la morphologie cellulaire des bifidobactéries est influencée par la nature de la source de carbone présente dans le milieu de culture (Biavati *et al.*, 2001 ; Vlkova *et al.*, 2005). D'autres formes sont rencontrés : des bâtonnets fins, plus au moins longs et épais ces caractéristiques ont été déjà citées par plusieurs auteurs (Beerens, 1990, Gomes *et al.*, 1999 ; Leahy *et al.* 2005).

La pré-identification des souches des bifidobactéries développait sur le milieu MRS Additionné de 0.05% cystéine chlorhydrique et de 2 mg/l d'acide nalidixique a montré un aspect de petites colonies à contour régulier et aspect variable.

Le résultat de dénombrement a révélé un taux élevé des bifidobactéries, de 10^{10} ufc/g de selles dans certains échantillons. Des taux similaires ont été trouvés par plusieurs auteurs (Molder *et al.*, 1990 ; Salminen *et al.*, 1995 ; Anne *et al.*, 1996 ; Ducluzeau, 1997 ; Juha *et al.*, 2003 ; Hadadji *et al.*, 2005). Ces taux élevés des bifidobactéries dans les selles peuvent être expliqué par la présence des facteurs bifidogènes essentiels au développement de ce genre bactérien dans le lait maternel.

Elles sont catalase et oxydase négatives ces caractéristiques ont été déjà citées par plusieurs auteurs (Beerens, 1990, Gomes et malta, 1999 ; Leahy *et al.* 2005). Toutes les

souches appartenant au genre *Bifidobacterium* sont nitrate réductase négative, elle ne forme pas de l'indole, ne possède pas une activité uréasique et ne liquéfie pas la gélatine, et citrate permease est positif. Selon Cogan 1981, le citrate en présence de citrate perméase à l'intérieur de la cellule ou il sera dégradé en pyruvate et CO₂ en présence d'oxaloacétate décarboxylase. La deuxième étape de décarboxylation conduit à la formation d'acétaldéhyde pyrophosphate et thiamine. Ce caractère est pris comme un critère dans la sélection des espèces à intérêt probiotique (Grill *et al.*, 1995). Ces caractères biochimiques complémentaires concordent avec les caractéristiques spécifiques au genre, rapporté par (Mitsuoka, 1984).

Les souches de bifidobactéries montrent une bonne croissance en milieu additionné de sels biliaries (2 et 3%), sauf que la souche B2 a montré une faible croissance. L'acquisition de résistance stable ou même l'exposition transitoire à des sels biliaries provoque chez *Bifidobacterium* des modifications physiologiques irréversibles tel que la résistance à des pH acides, et que l'adaptation à des concentrations de sels biliaries entraîne une augmentation d'adhésion au mucus intestinal (Margolles *et al.*, 2003 ; Noriega *et al.*, 2004).

Les mécanismes adaptatifs de tolérance aux sels biliaries pourraient conduire à une meilleure adaptation à l'environnement colique et aux sources de carbone disponibles ainsi qu'à une augmentation de la viabilité persistance de *Bifidobacterium* dans l'environnement intestinal (DelosReyes-Gavilan *et al.*, 2005 ; Gueimonde *et al.*, 2007).

La comparaison du profil fermentaire de ces isolats avec la table des profils biochimiques des *Bifidobacterium sp.* (Larpen, 1996) et avec la souche de référence nous a permis de La différenciation des espèces de bifidobactéries repose sur la fermentation des carbohydrates. En effet, (Schell *et al.*, 2002) a démontré que la souche NCC 2705 de *bifidobacterium longum* possède des gènes codant pour des enzymes (fumarase, oxoglutarate déhydrogénase, et le malate déhydrogénase) qui permettent la dégradation de plusieurs sucres (arabinose, xylose, ribose, cellobiose, melibiose, maltose, raffinose et mannose). Les souches (Bbf1, BV et B4) ne fermentent pas l'arabinose, l'uniline, le sucrose, tréhalose et la xylose contrairement aux autres souches qui fermentent ces sucres. le glucose est le substrat le plus utilisé dans les milieux sélectifs pour l'isolement et l'identification des bifidobactéries (Bonaparte *et al.*, 2001). De plus le genre *Bifidobacterium* possède les enzymes de la voie « Bifid shunt » qui le rend assimilable par ce genre bactérien.

Les souches isolées à partir des selles de nourrissons résistent à l'acide nalidixique, la néomycine, rifampicine, streptomycine et la vancomycine. Ces antibiotiques sont utilisés comme agents sélectifs dans les milieux synthétiques pour l'isolement et le dénombrement des bifidobactéries (Ventura, 2004). Ce critère d'antibiorésistance est utilisé comme marqueur de sélection. La sensibilité des bifidobactéries à la chloramphénicol a été signalée par plusieurs auteurs (Kurmann, 1984 ; Scardovi, 1986 ; Delcenserie *et al.*, 2002).

La croissance optimum pour les différentes souches est obtenue dans le milieu à pH 6,5. En revanche, un ralentissement significatif de la croissance de toutes les souches est observé en milieu à pH 8. Ces observations confirment que les bifidobactéries préfèrent les milieux neutres ou légèrement acides à des pH compris entre 5 et 8 comme a été signalé par plusieurs auteurs (Romond *et al.*, 1992 ; Wang et Gibson, 1993; Collado *et al.*, 2006 ; Mahmoudi *et al.*, 2013).

À la température de 45°C les souches de *bifidobacterium* observent un ralentissement de croissance avec un temps d'adaptation d'une heure, En comparant avec plusieurs auteurs (Scardovi, 1986 ; Dong *et al.*, 2000). Rasic, (1983) a apporté que des souches de bifidobactéries d'origine humaine peuvent se développer à une température de 42°C. Par ailleurs, la croissance des souches est meilleure à la température d'incubation de 30°C, Ces résultats sont en accord avec les résultats d'identification

La production de l'acidité titrable par les souches de bifidobactéries soit en culture pure est suivie dans le lait écrémé. En effet, l'évolution de l'acidité titrable, du pH et le nombre de bactérie produit au cours de la croissance des souches en culture pure révèlent l'existence de différences significatives des souches de bifidobactéries. De plus, les souches (B3, RBL8) *Bifidobacterium longum* sont plus acidifiantes que les souches appartenant au *bifidobacterium breve* (B1, BV) les souches *Bifidobacterium bifidum* (Bbf1 et Bv) et *Bifidobacterium breve* (B2, B4) sont les moins acidifiantes. Des résultats semblables ont été rapportés Martinez-Villaluenga *et al.*, (2007). Plusieurs auteurs ont constaté que le lait et ses dérivés ne constituent pas un milieu optimal de croissance pour les bifidobactéries (Murti *et al.*, 1992; Zbikowski *et al.*, 1986; Rasic et Kurmann, 1983), stimulée par (0,5%) de l'extrait de levure et de (0,05%) de la cystéine auparavant additionnées au lait. L'extrait de levure est considéré comme un facteur bifidogène qui stimule la croissance des bifidobactéries (Roy *et al.*, 1990). La cystéine est un agent réducteur et est un acide aminé essentiel exigé pour la croissance des bifidobactéries (Ravula *et al.*, 1998). Cet ingrédient peut être utilisé dans la

production des laits fermentés probiotiques. Guler-Akin *et al.*, (2007). Le suivi de l'évolution de l'acidité titrable a montré une vitesse d'acidification très lente dans les deux laits fermentés. Cette faible acidification par les *Bifidobacterium* en culture pure a été signalée par plusieurs auteurs (Bennama, 1999; Samona *et al.*, 1996 ; Mahi *et al.*, 2006; Chekroune *et al.*, 2006 ; Hadadji *et al.*, 2006). Ceci peut être attribué au fait que les bifidobactéries produisent deux molécules d'acides lactiques et trois molécules d'acides acétiques à partir de deux molécules de glucose (De Vries *et al.*, 1968). Il arrive même que le pyruvate soit clivé en acide formique et en acétyl-1-phosphate plutôt qu'en acide lactique (Ruas-Madiedo *et al.*, 2005). donc *Bifidobactéries* étudiés est considérée comme une bactérie acidophile (Dinarkar *et al.*, 1994).

La microflore bifide a été particulièrement étudiée pour son pouvoir de protection contre les diarrhées et les diverses affections (Akao *et al.*, 1994). En effet, les bifidobactéries ont un effet antagoniste vis à vis des germes pathogènes (Bertazzoni *et al.*, 1994). Plusieurs chercheurs ont montré qu'en administrant des lyophilisats de *Bifidobacterium bifidum* à des enfants présentant des infections entériques à *Escherichia coli* entéropathogène, il était possible d'éliminer le germe pathogène dans 60 % des cas. Plus récemment, les probiotiques ont été définis comme des organismes vivants qui, après ingestion par voie *per os* en certaines quantités, exercent des effets bénéfiques pour la santé. Les bifidobactéries, hôtes naturels des intestins de l'homme ont des propriétés nutritionnelles et thérapeutiques aujourd'hui reconnues. Wang *et al.*, (2004) ont rapporté que la consommation régulière de yogourt additionné de *Lactobacillus acidophilus* La5 ou de *Bifidobacterium lactis* Bb12 induit une suppression effective de l'infection due à *H. pylori*. Plusieurs auteurs ont rapportés qu'il y a une évidence pour les propriétés bénéfiques des bifidobactéries (Salminen *et al.*, 1996 ; Ballongue, 1998 ; Gomes *et al.*, 1999).

Dans ce travail on a étudié aussi l'interaction des souches *Bifidobacterium* avec six souches pathogènes.

Les souches de *bifidobacterium* testées montrent une variabilité de comportement envers les bactéries entéropathogènes (*E.coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* *enterobacter*. Dans le milieu MRSc non taponné, les souches appartenant à l'espèce *B. longum* montrent une forte activité antibactérienne. Les autres souches montrent une très faible activité ou bien aucune activité envers ces bactéries pathogènes. Alors on peut dire que les inhibitions de ces bactéries pathogènes par souches (B3, RBL8) peuvent être dues à la production des acides organiques (acide acétique, acide

lactique). Ces résultats sont semblables avec ceux trouvés par Markas *et al.*, (2006), qui ont testés 10 souches de bifidobactéries appartenant aux différentes espèces envers *E. coli* 1845 et *Salmonella enterica* ser *typhimurium* SL 1344. Ces mêmes auteurs ont remarqués que les fortes activités antibactériennes sont dues à l'acidité.

Tandis que, plusieurs souches de bifidobactéries ont démontré la capacité de produire *in vitro* des composés actifs contre de nombreuses bactéries pathogènes comme *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, et *Clostridium difficile* (Anand *et al.*, 1984; Anand *et al.*, 1985; Gibson et Wang, 1994; Lee *et al.*, 2003; Meghrous *et al.*, 1990; Touré *et al.*, 2003; Yildirim *et al.*, 1998; Yildirim *et al.*, 1999). Parmi ces composés, certains sont apparentés à des bactériocines, alors que d'autres sont des substances protéiques ne s'apparentant pas à une bactériocine (Gibson *et al.*, 1994). Aussi, une simple réduction du pH par les produits métaboliques comme l'acide lactique ou l'acide acétique permet l'inhibition de pathogènes par les bifidobactéries (Bruno *et al.*, 2002).

L'examen de l'antagonisme explique l'action des acides, en général sur la membrane cytoplasmique des bactéries ; ces acides touchent à la maintenance du potentiel membranaire et inhibent le transfert actif (Bouvier *et al.*, 1994) l'effet antimicrobienne des acides diffère selon les concentrations molaires des acides produites par les bifidobactéries.

L'acide acétique est plus inhibiteur que l'acide lactique ; il peut inhiber les levures, les moisissures et les bactéries pathogènes (Caplice *et al.*, 1999 ; Gerald *et al.*, 1999)

Après le traitement avec des enzymes protéolytiques, α -chymotrypsine et la pepsine, trypsine, l'inhibition disparaît. Ce qui suggère que les souches *Bifidobacterium* étudiées produisent des agents de nature protéique, qui causent l'inhibition des autres bactéries. C'est substances ont été caractérisées par d'autres chercheurs comme étant des molécules de nature protéique (Delvis-Broughton, 1990) et sont donc sensibles à l'action des enzymes protéolytiques variées ou possédant une partie protéique et par conséquent, elles sont inactivées par ces enzymes (Devuyest *et al.*, 1994). La souche de *B. bifidum* peut naturellement produire plus qu'un bactériocine. Des études ont été réalisées sur le mode d'action des bactériocines, ce mode d'action se situe au niveau membranaire et modifie le potentiel de la membrane grâce à une structure alternante hydrophile et hydrophobe (Stil, *et al.*, 1997). Ces bactériocines peuvent s'insérer dans la membrane des bactéries sensibles et y former des pores ce qui entraîne des fuites d'ATP et d'ions K^+ et par conséquent l'impossibilité pour les cellules de maintenir leur pH intracellulaire (Desmazeaud, 1983).

Par ailleurs, aux Etats-Unis plusieurs chercheurs ont mis en évidence l'action conjuguée d'un chélateur alimentaire (citrates, phosphate, EDTA, EGTA) et la nisine pour inhiber des bactéries à Gram négatives (Vanema, *et al.*, 1995). De nombreuses études réalisées, *in vitro*, ont montrées l'effet antagoniste des bifidobactéries contre différents pathogènes tel que *Shigella dysenteriae*, (Kirjavainem *et al.*, 1998) *E. coli* (Shah., 1997) et *Yersinia enterocolitica*.

Une étude réalisée par Desmazeaud (1996) a montré que les effets de la prolifération de certaines souches pathogènes peuvent être inhibés par l'ingestion de ferments lactiques, par les mécanismes sont les suivants :

- Sécrétions de certaines substances antimicrobiennes par Bifidobactéries (H₂O₂, Acide lactique. Acide acétique)
- Abaissement du pH par les acides produits.
- Prévention de la synthèse d'amines toxiques.
- L'effet d'une barrière par compétition métabolique ou l'empêchement de la colonisation de pathogènes par la fixation sur le tube digestif.
- La dégradation des entérotoxines par une détoxification.

Certaines souches de *Bifidobactéries* jouent un rôle de protecteur contre les entérocolites nécrotiques néonatales (NEC) en évitant le développement de ces derniers par l'inhibition de leur croissance tel que *Clostridium difficile* (Brutel, *et al.*, 1998).

La croissance des souches de *bifidobactérium* avec les 03 souches pathogènes étudiés en culture mixte, a été évaluée sur milieu lait. Après 4 h d'incubation la croissance de *Staphylococcus aureus* commence avec B3 à diminuer, En revanche, aucune croissance n'a été décelée après 72 h d'incubation.

La comparaison entre les courbes du pH et celui de l'acidité montre que le taux d'acidité augmente avec la diminution du pH, la production des acides organiques à pour effet l'inhibition de la croissance des souches de *pathogènes* qui ne peut pas survivre à pH bas (Shen *et al.*, 1994 ; Des masean, 1983). La présence des zones d'inhibition ne signifie pas forcément production de bactériocine (Kleanhammer. 1986) des tests supplémentaires sont nécessaires pour connaître la nature exacte de l'agent inhibiteur.

Afin de connaître l'existence de bactériocine et son effet sur la croissance *Pseudomona aeruginosa*, *Staphulococcus aureus*, *E.coli*. Les résultats sont traduits par des

différentes courbes une fois qu'on ajoute le surnageant on observe une décroissance de ces dernières. Ces résultats s'expliquent par la présence de bactériocines produites par *Bbfl*.

Des résultats similaires ont été trouvés (Carmen *et al.*, 2000) qui confirment la présence de bactériocine inhibitrice de *H. pylori*. Ces substances ont été caractérisées par d'autres chercheurs comme étant des molécules de nature protéique (Delvis-Broughton, 1990). Les résultats de ces tests nous ont permis de constater la présence des bactériocines produites par *B. bifidum* qui ont provoqué une nette diminution de la densité optique après leurs adjonctions directes dans le milieu de culture.

Le surnageant de la souche testée a été traité par différentes températures 80°C, 100°C, et 120°C, (envers *S.aureus*), l'activité antibactérienne est totalement détruite après un cycle d'autoclavage à 120 °C pendant 20 mn.

Des travaux sur la diarrhée chez l'adulte et l'enfant ont montré que la survie et un taux important de probiotiques sont des paramètres nécessaires à l'obtention d'un effet sur le métabolisme digestif et la flore intestinale (Bezkorovainy 2001).

De plus, une étude menée auprès de patients bénévoles souffrant de symptômes associés au stress a démontré que l'administration d'une combinaison de probiotiques (*Lactobacillus helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175) diminuait de manière significative deux symptômes gastro-intestinaux causés par le stress soit la douleur abdominale et la nausée/vomissement (Diop *et al.*, 2008a)

Dans ce travail, il s'avère que le milieu utilisé comme étant spécifique, pour le dénombrement de la souche testée.

Les bifidobactéries sont détectées par l'utilisation du milieu MRSc. La sélectivité est due à la présence de mupirocine, antibiotique auquel les bifidobactéries sont résistantes et de nombreux lactobacilles sensibles (Rada 1997) et autres antibiotiques. Ce milieu a déjà été utilisé pour l'isolement et la numération des bifidobactéries dans les selles de lapin et de volailles (Rada, Sirotek *et al.*, 1999). Cependant l'augmentation considérable du nombre des bifidobactéries suggère que, la souche a résisté au passage gastro-intestinal. De même, il se peut que l'administration de cette dernière favorise la multiplication des autres souches lactiques. Dans ce travail, on enregistre aussi que l'administration des souches de bifidobactéries, cause une diminution considérable du taux de souches entéropathogènes dans la matière fécale. Ce test n'a été réalisé qu'à titre d'essai sur un seul rat, d'autres essais s'avèrent nécessaires pour valider les conclusions obtenues. Amrouche (2005) a clairement démontré que les souches

B. thermacidophilum RBL71 et *B. thermophilum* RBL67 ont participé à l'augmentation de la défense de l'hôte face aux infections entériques bactérienne. De plus, ils ont trouvé que leur action antimicrobienne était significativement supérieure lorsque ces bifidobactéries étaient données avant l'infection.

L'importance de la niche écologique des probiotiques a été montrée. Celle-ci joue un rôle dans l'immunomodulation observée au niveau de l'intestin grêle et du côlon (Vitini, Alvarez *et al.*, 2000). Bezkorovainy suppose que non seulement les probiotiques exogènes consommés (surtout *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*) peuvent survivre à leur passage par l'estomac et l'intestin grêle, mais qu'ils influencent la microflore de l'intestin grêle d'une façon significative, et peuvent affecter l'écologie bactérienne et le métabolisme dans le côlon (Bezkorovainy, 2001).

L'étude de la résistance au passage gastro-intestinal des souches *bifidobactérium in vivo*, a été recommandée par plusieurs auteurs (Frece *et al.*, 2005, Foligné *et al.*, 2006).

En résumé, le contenu fécal en bifidobactéries se maintient à un niveau élevé (plus que 10^8 UFC/g) chez les rats des groupes ayant consommé des probiotiques. Certaines de ces bactéries ingérées peuvent persister dans l'intestin et avoir la potentialité de moduler de nombreuses fonctions qui pourraient se révéler positives pour l'hôte.

L'étude clinique de Mastrandrea *et al.*, (2004), réalisée sur des sujets humains (âgés de 6 à 48 ans) qui montrent symptômes cliniques du syndrome de l'intestin irrité a démontré l'effet positif des probiotiques dans leur traitement.

Liévin *et al.*, (2000), ont démontré que ces composés antimicrobiens étaient actifs contre *Salmonella typhimurium* SL1334 et qu'une diminution de 4 logarithmes de l'adhésion du pathogène aux cellules Caco-2 pouvait être obtenue. Ces auteurs ont également évalué cette activité antimicrobienne *in vivo* avec des souris axéniques C3/He/Oujco infectées par *S. typhimurium* C5. Les souris recevant les bifidobactéries CA1 et F9 étaient protégées de l'infection létale comparativement aux souris contrôles qui ne vivaient pas plus de 10 jours après l'infection. Cependant, même si certaines bactériocines présentent une forte activité *in vitro* et *in vivo* chez les souris contre certains pathogènes, la démonstration de la production et l'activité des bactériocines dans le tube digestif humain est à établir. Lors d'expérience *in vitro*, certains auteurs ont proposé une action synergétique entre les substances protéiques antimicrobiennes et l'acide organique pour expliquer l'action inhibitrice des bactéries probiotiques. Ainsi, Gopal *et al.*, (2001) ont mené une série d'expériences pour étudier

l'inhibition *in vitro* d'une souche d'*E. coli* O157:H7 par *L. rhamnosus* DR20, *L. acidophilus* HN017 et *B. lactis* DR10. Le pré-traitement d'*E. coli* O157:H7 avec les surnageants de culture des bactéries réduit l'association de ce pathogène avec les cellules Caco-2 et HT-29.

Selon Amrouche, 2005, l'étude *in vitro* et *in vivo* montrent que la prise de probiotiques (*B. bifidum*), réduit la colonisation du tractus digestif par bactéries pathogènes et stimule l'immunité spécifique réponse de défense de l'hôte en activant les lymphocytes, la stimulation de l'activité anti-tumorale et de réduire l'infections comme la colonisation vaginale de coliformes et levures.

Conclusion générale et perspectives

Dans ce travail, nous avons suivi le comportement des souches de bifidobactéries isolées à partir des selles de nourrissons allaités au sein et à partir de yaourt (Activia) et de solution de réhydratation saline (Celia), les souches de bifidobactéries isolés appartenant aux espèces suivant : *B.bifidum*, *B.longum*, et *B breve*. L'évaluation des inhibitions de certaines bactéries pathogènes par les souches de bifidobactéries, Dans l'objectif d'évaluer le potentiel de souches de bifidobactéries à prévenir et à contrôler les infections entériques bactériennes. Cette approche est effectuée par les étapes suivantes :

L'isolement des souches de bifidobactéries, la purification, l'identification phénotypique des souches isolées par les tests usuels : Gram, catalase et la résistance à certains nombre d'antibiotiques utilisés dans les milieux sélectifs pour les bifidobactéries confirme l'appartenance de nos souches au genre *Bifidobacterium*. Les résultats obtenus de la détermination des profils de sensibilité aux antibiotiques, montrent que les souches étaient sensibles aux antibiotiques suivants : Penicillin, Ampicillin, Amoxicillin Oxacillin. Clindamycin. Par contre elles étaient résistantes aux : Neomycin, kanamycin streptomycin), vancomycin Cefoxitin. Paramomycin, Gentamicin et Streptomycin. Pour les autres antibiotiques les résultats étaient variables entre les souches.

La fermentation des différents carbohydrates révèle leur appartenance aux espèces de *bifidum*, *longum* et *breve* retrouvés couramment dans les selles de nourrissons allaités au sein. La croissance des souches de bifidobactéries identifiées en milieu a 2 et 3% de sels biliaries montre leur effet probiotique.

L'étude des caractères physiologiques des souches de bifidobactéries montre qu'elles préfèrent des pH légèrement neutre, La meilleure température de croissance pour la souche (presque pour la plupart des souches) est à 37°C, sont mésophiles, mais elles tolèrent des températures élevées (45°C).

Les résultats technologiques des souches sont satisfaisants pour une utilisation industrielle des souches étudiées. Les souches isolées ont une cinétique de croissance et d'acidification, dans le milieu MRS et dans le lait écrémé à 37°C, presque identique. Cependant la souche *B.longum* a une cinétique de croissance et d'acidification différente. Le suivie de l'évolution de l'acidité et du pH au cours de la fermentation du lait par les souches de bifidobactéries révèle que la production d'acidité titrable et par conséquent

l'abaissement du pH diffère d'une souche à l'autre. Les résultats fournissent une évidence que les bifidobactéries exercent une activité antagonistique contre les bactéries pathogènes *in vitro* et *in vivo*.

Plusieurs études montrent l'activité anti-microbienne de différentes souches probiotiques contre plusieurs pathogènes. Cependant il est impossible d'extrapoler des résultats obtenus chez une souche à une autre. Nous avons isolé, des souches de bifidobactéries capables de produire des composés protéiques actifs contre de certains pathogènes dont *E.coli*.

Plusieurs rôles sont attribués à la présence des bifidobactéries. Un des rôles les plus importants des bifidobactéries, est l'adhésion de celles-ci aux cellules épithéliales de l'intestin ce qui permet de créer une niche écologique et ainsi d'empêcher l'invasion de bactéries pathogènes. Certaines études ont été faites sur l'effet de l'administration de comprimés de bifidobactéries à des gens ayant la diarrhée et il a été remarqué que l'ingestion de ces comprimés aidait à diminuer les symptômes.

Enfin, nous avons voulu confirmer *in vivo* l'activité *anti-E.coli* des bifidobactéries bactériocinogènes observée *in vitro* à l'aide d'un modèle d'infection chez le rat. Ainsi des infections à *E.coli* ont été provoquées par voie orale chez des rats de type wistar et la souche Bbfl a été administrée de manière préventive et sous forme de traitement toujours par voie orale. Les souris ayant reçu le traitement préventif avec la souche Bbfl montraient des signes d'infection moins importants que celles qui n'avaient reçu aucun traitement.

D'une part, il serait aussi intéressant de caractériser et de comprendre, au niveau cellulaire et moléculaire, le(s) mécanisme(s) par lequel(s) les souches de bifidobactéries bloquent l'invasion des cellules intestinales par *E.coli*. Pour cela, il faudrait mener des études sur les molécules impliquées dans l'adhésion des bifidobactéries sur les cellules intestinales. Aussi, il faudrait vérifier si cette adhésion provoquerait des transformations physiologiques chez les entérocytes et constater l'impact que ces changements pourraient avoir sur le cycle d'infection d'*E.coli*. Il serait important de confirmer la capacité de ces souches de bifidobactéries productrices à prévenir efficacement des infections chez l'homme. Pour ce faire, des études cliniques randomisées, à double insu, avec contrôle placebo devraient être effectuées chez un nombre adéquat de sujets afin de mettre en évidence la propriété protectrice de ces souches.

Finalement il serait intéressant aussi de réaliser les points suivants :

-Etude approfondie sur les caractéristiques probiotiques des souches.

- Etude du gène responsable de la production des bactériocines.
- Application du génie génétique pour la sélection des souches améliorées afin de produire des cultures probiotiques à usage thérapeutiques.

A.F.M.O., (2010). (Association Française de Médecine Orthomoléculaire), L'écosystème intestinal de la naissance à l'âge adulte, évolution, équilibre et perturbations, N° 31, France

Alvarado. C, Garcea-Almendrez. B. E, Martin. S. E, et Regalado. C., (2005). Anti-*Listeria monocytogenes* Bacteriocin-Like Inhibitory Substances From *Enterococcus faecium* UQ31 Isolated from Artisan Mexican-Style Cheese. *Current Microbiology* Vol. 51, pp. 110–115.

Amrouche, T., (2005). Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries: analyse *in vitro* et étude *ex vivo* des mécanismes moléculaires impliqués. *Thèse, Université Laval*, 175p.

Anand, S. K., Srinivasan, R. A., et Rao, L. L. ,(1985). Antimicrobial activity associated with *Bifidobacterium bifidum* - II. *Cultured Dairy Products journal*. 20:21-23.

Anand, S. K., Srinivasan, R. A., et Rao, L. K. ,(1984). Antimicrobial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*. *Cultured Dairy Products journal*. 19:6-8.

Anderson N., (2004). Probiotics market face EU challenge. *Breaking News on Supplements, Nutrition & Healthy Foods.*, p.1

Arboleya S , Ruas-Madiedo P , Margolles A , Solís G , Salminen S , de los Reyes-Gavilán C., (2011). Gueimonde M, Characterization and *in vitro* properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk, *International Journal of Food Microbiology* 149 .28–36

Ariane K. S. Martins ,Flaviano S. Martins, Danielle A. Gomes, Samir D. A. Elian , Ange´lica T. Vieira ,Mauro M. Teixeira ,Denise C. Cara, Regina M. D. Nardi ,Jacques R. Nicoli., (2010) . Evaluation of *in vitro* antagonism and of *in vivo* immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* var. *lactis*, *Arch Microbiol* .192:995–1003

Arikado, E., H. Ishihara, T. Ehara, C. Shibata, H. Saito, T. Kakegawa, K.Igarashi, and H. Kobayashi., (1999). Enzyme level of enterococcal FJFo-ATPase is regulated by pH at the step of assembly. *Eur J Biochem* **259**:262-8.

Arseneault.J-Bréard., (2011). Effet des probiotiques *Lactobacillus helveticus* RO052 et bifidobactérium.longum RO175 sur la dépression post-infarctus du myocarde chez le rat, 48-50, Canada, thèse de Doctorat

Asahara T., Nomoto K., Shimizu K., Watanuki M., & Tanaka R., (2001a). Increased resistance of mice to *Salmonella enterolitica* serovar *Typhimurium* infection by symbiotic administration of *Bifidobacteria* and transgalactosylated oligosaccharides. *Journal of*

Applied Microbiology, 91, 985-996.

Asahara T., Shimizu K., Nomoto K., Hamabata T., Ozawa A., & Takeda Y., (2004). Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity*, 7, 2240-2247.

Asahara T., Nomoto K., Shimizu K., Watanuki M., & Tanaka R., (2001a). Increased resistance of mice to *Salmonella enterolitica* serovar *Typhimurium* infection by symbiotic administration of Bifidobacteria and transgalactosylated oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 985-996.

Asahara T., Shimizu K., Nomoto K., Hamabata T., Ozawa A., & Takeda Y., (2004). Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity*, 7, 2240-2247.

Ashoor , H et Heute, W. C., (1983). Bacteries lactiques in food, J of association official analytical chimistes 66- 135- 139.

Audy. J., (2008). approche transcriptionnelle pour l'étude de gènes chez *bifidobactérium.longum* CRC 002, thèse de Doctorat. université Laval

Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*;307:1915–20.

Bach JF.(2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* ;347:911–20.

Behloul H, Hadadji M, Guessas B, Saidi N and Kihal M. Characterization and Technological Properties of *Bifidobacterium* Strains Isolated from Breast-fed Infants, *Journal of Food Science and Engineering* 2 (2012) 576-582

Ballongue, J. (1998). Bifidobacteria and probiotic action. In Salminen,S, and Von wright A,(Eds), *Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects.* (2nd ed) pp. 519-587, NY, USA: Marcel Dekker, inc.

Ballongue j., Grill J.P. et Baratte-euloge P., (1993)., Action sur la flore intestinale de laits fermentés au Bifidobacterium . *Lait* 73 : 249-256.

Barefoot. S. F et Klaenhammer. T. R. (1983). Detection and Activity of Lactacin B, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 45, No. 6, p. 1808-1815.

Beerens H (1990). Year elective and selective insulation medium for *Bifidobacterium* sp. *Letl. Appl. Microbiol.* 11: 155-157.

- Bengmark, S.(1999)** Gut microenvironment and immune function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*,. 2(1): p. 83-5.
- Bernalier-Donadille A. (2004).** Principales fonctions métaboliques de la flore intestinale de l'homme. In: Rambaud JC, Buts JP, Corthier G, Flourié B, eds. *Flore microbienne intestinale*. Montrouge: John Libbey Eurotext :61-80.
- 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. (2001).** "Probiotics: determinants of survival and growth in the gut." *Am J Clin Nutr* 73(2 Suppl): 399S-405S.
- Biavati.B , Mattarelli.P , (2006).** The Family Bifidobacteriaceae, , *Prokaryotes* ; 3:322–382
- Biffi, A ; coradini, D ; larsen, R ; riva, L ; and di frenzo, G (1997).**Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of Human breast cancer cell, line notr cancer 28, 93-99
- Bixquert J. (2009).**Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics. An etiopathogenic approach at last, *Rev. Esp. enferm. Dig.*;101(8):553-64.
- Björkstén B, Naaber P, Sepp E.,(1999).** The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy* 1999;29: 342–6.
- Bjorksten B., (2004).** Effects of intestinal microflora and the environment on the development of asthma and allergy. *Springer Seminras in Immunopathology*, 25, 257-270.
- Blaut M., (2002).** Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European Journal of Nutrition*, 41, 11- 16.
- Blum S., Delneste Y., Alvarez S., Haller D., Perez P. F., Bode Ch. Hammes W. P., Pfeir A.M. A., & Schiffrin E. J.,(1999).** Interactions between commensal bacteria and mucosal immunocompetent cells. *International Dairy Journal*, 9, 63-68.
- Bonapart, C., Klein, G., Kneifel, W and Reuter, G (2001).** Developpement d'u milieu selectif pour le dénombrement des bifidobactéries dans les laits fermentés. *Lait*. 81: 227-235.
- Borovská D., Reháková Z., Šinkora J., Hofmana J., Drastich P., & Kokešová A., (2004).** Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters*, 93, 97-108.
- Borriello S. P., Hammes W. P, Holzapfel W., Marteau P., Schrezenmeir J., Vaara M., & Valtonen V., (2003).** Safety of probiotics that contain Lactobacilli or Bifidobacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 36, 775-780.
- Bouhnik, Y ; Flonirce B ; Andrieux, C, Bisetti, N ; Brief fend Ramband J, C, (1996).** Effects of Bifidobacterium S.P. fermented with ingested with or witout insulin on colonial bifidocteries and enzymatic activities in healthy humans, *Eur,J.Chi Nutr*.50 :269-273

Bourlioux, P., B. Koletzko, et al. (2003). "The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002." *Am J Clin Nutr* **78**(4): 675-83.

Braun, V., H. Pils, and P. Gross. (1994). Colicins: Structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. *Archives of Microbiology* 161:199-206.

Brandtzaeg P.(1996). Development of the mucosal immune system in humans. In: Bindels JG, Goedhart AC, Visser HKA, editors. Recent developments in Infant Nutrition. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers; p. 349-76.

Breukink, E., I. Wiedemann, C. Van Kraaij, O. P. Kuipers, H. G. Sahl, and B. De Kruijff. (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* ,286:2361-2364.

Brutel M.J. ; roland, N ; hibert, A ; Papot, F ; Farre, A ; Tessedre, A.C ; bensâada, M ; Rimbault, A ; Szylit, O (1998).Clostridia pathogenicity in experimental necrotising enterocolitis in antibiotic quails and protective role of bifido bacteria.J.Med. microbiol, 47 :391-399.

Buchanan R., Gibson N. E., Cohen S., Holt J. G and Staner R. Y., (1974). bergey's manual of determinative bacteriology. *Eighth edition. Ed. Williams and willins company 1246*

Campeotto.F, Waligora-Dupriet.AJ.(2007). Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né. *Gastroenterol Clin Biol*;31:533-542.

Candela, M., Macaferri, S., Turroni, S., Carnevali, P., & Brigidi, P. (2010). Functional intestinal microbiome, new frontiers in prebiotic design. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 93-101.

Caplice, E ; Gerald, F ;fitzerald, (1999). Food fermentations relook of micro organisms in food production and préservation. *International journal of food microbiology*, 50 :131-149.

Carmen, M ; Jan Kok, EH ; Pelaez, C ; requena, T et Buist G. (2000). Applied and Environmental Microbiology, Aug., Page : 3174-3179.

Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. and Collins, J.K.(1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journ Appl Microbiol* 84, 759-768.

Chatterjee, C., M. Paul, L. Xie, and W. A. van der Donk. (2005). Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemical Reviews* 105:633-683.

Cheikhoussef, A., Pogori, N., Zhang, H., (2007). Study of the inhibition effects of *Bifidobacterium* supernatants towards growth of *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *International Journal of Dairy Science* 2, 116-125.

Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Havarstein, P. E. Hernandez, and I. F. Nes. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and environmental microbiology* 63:4321-4330.

Coconier, M. H., Bernet M F., Kernéis S., Chauvière G., Fourniat J., & Servin A. L., (1993). Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiology Letters*, 110, 299-306.

Cotch MF, Hillier SL, Gibbs RS, et al.(1998), Epidemiology and outcomes associated with moderate to heavy *Candida* colonization during pregnancy. Infections and prematurity study group. *Am J Obstet Gynecol*;178:374—80.

Cronin M , Ventura M, Fitzgerald G F , Sinderen D, (2011). Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria, *International Journal of Food Microbiology* 149 (2011) 4–18

Cotter, P. D., C. Hill, and R. P. Ross. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3:777-788

Cuibai F, (2008). L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris, thèse de Doctorat. P 188

Deitch, E.A., (1995). Elemental diet and IV-TPN-induced bacterial translocation is associated with loss of intestinal mucosal barrier function against bacteria. *Ann Surg.* 221(3): p. 299-307. 257.

Delves-Broughton, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 69:193-202.1.

Delcenserie V., China B., Gavini F., Beerens H., Daube G., (2002). Proposition pour un nouveau standard indicateur de la contamination d'origine fécale dans les aliments : le genre *Bifidobacterium*. *Ann. Méd. Vét.*, 146: 279-293

Delvis-Broughton. J.(1990). Nisine an dits uses a food preservative. *Food Technol.* 44: 100-117.

Del Piano M., Montino F., Carmagnola S., Anderloni A. et al. (2005). *The use of probiotics in the treatment of constipation in the elderly.* *Cibus.*;1(1):23-30.

- Desjardins ML., Roy D, and Goulet J. (1990).** Growth of Bifidobacteria and their enzyme profiles. *J. Dairy. Sci.* 73: 299-307.
- Desmazeaud M.J.(1983)** L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le Lait.*, , 63, 267-316.
- DeVuyst L, Avonts L and Makras L, (2004).** Probiotics, prebiotics and gut health. In Remacle C and Reusens (Eds), *Functional foods, ageing and degenerative disease Cambridge UK: Woodhead publishing Ltd*, pp 416-482
- DeVuyst L, Markas, L (2006).** The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *Int. Dairy. J.*, 16: 1049-1057.
- DeVuyst, L. and F. Leroy. (2007).** Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 13:194-199.
- Devuyest, L ; Vandamme, E.J. (1994)** Bacteriocines of latic acid bacterie Devuyest and van damme London: blatic academic and professional.pp.91-146.
- Diep, D. B. and I. F. Nes. (2002).** Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Current Drug Targets* 3:107-122.
- Diep, D. B., M. Skaugen, Z. Salehian, H. Holo, and I. F. Nes. (2007).** Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:2384-2389.
- Dinan, T. G., Quigley, E. M., (2006).** Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology*, 130, 304-11.
- Diop, L., Guillou, S. & Durand, H. (2008a)** .Probiotic food supplement reduces stress-induced gastrointestinal symptoms in volunteers: a double-blind, placebocontrolled, randomized trial. *Nutr Res*, 28, 1-5.
- Diop L., Guillou, S. & DURAND, H. (2008b)** Probiotic food supplement reduces stress-induced gastrointestinal symptoms in volunteers: a double-blind, placebocontrolled, randomized trial. *Nutrition Research*, 28, 1-5

Doan-Thanh-Lam LE , (2011). Identification et caractérisation des déterminants physico-chimiques et biologiques mis en jeu dans l'adhésion de *Lactococcus lactis* à la mucine modèle PGM, Thèse Doctorat ,France

Dong X., Cheng G., & Jian W., (2000). Simultaneous identification of five *Bifidobacterium* species isolated from human beings using multiple PCR primers. *Systematic and Applied Microbiology*, 23, 386-390.

Doré.J, Corthier.G . (2010).le microbiote intestinal humain . Gastroentérologie Clinique et Biologique . 34, 7—16

Dortu, C. and P. Thonart. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 13:143-154.

Doumandji ,A. Bousbia , A. Hellaleffet,(2010), anti-*listeria* de *bifidobacterium infantis* isolé a partir de selles de nourrisson allaité au sein , *sciences & technologie c – n°31* , pp.14-21.

Doumandji.A ., (2007). Effet de l'association de *B.bifidum* avec *S.thermophilus* sur l'activité antagniste envers *E.coli* enteropathogène. *Sciences & Technologie C – N°25*, pp.65-70. Constantine, Algérie.

Draper, L. A., R. P. Ross, C. Hill, and P. D. Cotter. (2008). Lantibiotic immunity. *Current protein &peptide science* 9:39-49.

Duarte R, Silva AM, Vieira LQ, Afonso LC, Nicoli JR .(2004). Influence of normal microbiota on some aspects of the immune response during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in mice. *J Med Microbiol*;53:741-8.

Ducluzeau R. (1993). Installation, équilibre et rôle de la flore microbienne chez le nouveau-né. *Ann Pédiatr*;40:13-22.

Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G, Johnstone AM, Flint HJ, Lobley GE. (2007). Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl Environ Microbiol*;73:1073-8.

Dubos, R., R. W. Schaedler, et al. (1965). "Indigenous, Normal, and Autochthonous Flora of the Gastrointestinal Tract." *J Exp Med* 122: 67-76.

Duobos, R., R. W. Schaedler, et al. (1963). "Composition, Alteration, and Effects of the Intestinal Flora." *Fed Proc* 22: 1322-9.

Ducluzeau, R. (1969). "[Influence of the zoological species on the microflora of the gastrointestinal tract]." *Rev Immunol Ther Antimicrob* 33(6): 345-83.

Dykes, G. A. (1995). Bacteriocins: Ecological and evolutionary significance. *Trends in Ecology and Evolution* 10:186-189.

Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson, and D. A. Relman. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308:1635-8. 118. Palmer, C , E. M. Bik, D. B. Digiulio, D. A. Relman, and P. O. Brown. 2007. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol* 5: e 1 7 7

Edwards RK, Locksmith GJ, Duff P. (2000). Expanded-spectrum antibiotics with preterm premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol*;96:60—4.

Edwards RK, Clark P, Sstrom CL, (2002). Intrapartum antibiotic prophylaxis 1: relative effects of recommended antibiotics on gram-negative pathogens. *Am J Obstet Gynecol* 2002;100: 534—9.

Ekaterina A, (2011). Development of Bifidobacterium spp. in infants, Age dependent patterns and correlating factors .Thèse Doctorat.

Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto, and A. Ishizaki. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews* 24:85-106.

FAO/WHO Working group. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London

Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD. (2005). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol*;68:219-26.

Ferraris L, Aires J, Waligora-Dupriet A J, Butel M R, (2010) .New selective medium for selection of bifidobacteria from human feces, *Anaerobe* 16 469-471

Fleming T.P., Nahilik M.S, et McIntosh M.A., (1983). Regulation of enterobactin iron transport in *Escheichia coli* : characterization of ent : Mud (Aplac) open fusions. *J.Bacteriol.* 156: 1171-1174.

Fleming, H.P., Herchells, J.L et Caslilow, E.N. (1975). Microbiol inhibition on isolate *Pedicoccus* from cucumber bunc. *Applied Environmental Microbiology.* 30: 1040-1042

Fleury, Y., M. A. Dayem, J. J. Montagne, E. Chaboisseau, J. P. Le Caer, P. Nicolas, and A. Delfour. (1996). Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 10537, a defensive peptide from gram-positive bacteria *leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Biological Chemistry* 271:14421-14429.

Franz, C. M. A. P., M. J. van Belkum, W. H. Holzappel, H. Abriouel, and A. Galvez. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification

scheme. *FEMS Microbiology Reviews* 31:293-310.

Frédéric A. Carvalho, Nicolas Barnich, Adeline Sivignon, Claude Darcha, Carlos H.F. Chan, Clifford P. Stanners, and Arlette Darfeuille-Michaud .(2009). *Crohn's disease adherent-invasive Escherichia coli colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM.* *J. Exp. Med.*, vol. 206: 2179-2189.

Frederiq, P. (1946). Sur la pluralité des récepteurs d'antibiose d'*E. coli*. *CR Soc.Biol.(Paris)* 140:1189-1194.

Frees, D., and H. Ingmer. (1999). ClpP participâtes in the dégradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* 31:79-87.

Frees, D., F. K. Vogensen, and H. Ingmer. (2003). Identification of proteins induced at low pH in *Lactococcus lactis*. *Int J Food Microbiol* 87:293-300

Frece. J, Kos. B, Beganovic. J, Vukovic. S et Suskovic. J. (2005). In vivo testing of functional properties of three selected probiotic strains. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21:1401–1408.

Floch, M.H., et al., (2008). Recommendations for probiotic . *J Clin Gastroenterol.*, 42 Suppl 2: p. S104-8.

Foligne. B, Nutten. S, Steidler. L, Dennin. V, Goudercourt. D, Mercenier. A, et Pot. B. (2006). Recommendations for Improved Use of the Murine TNBS-Induced Colitis Model in Evaluating Anti-inflammatory Properties of Lactic Acid Bacteria: Technical and Microbiological Aspects. *Digestive Diseases and Sciences.* Vol. 51, No. 2, pp. 390–400.

Forchielli ML, Walker WA. (2005).The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr*;93 (Suppl):S41-S48.

Freter R. (1983). Mechanisms that control the microflora in the large intestine. Hentges DJ, ed. *Human intestinal microflora in health and disease.* New York: Academic press,;33-54.

Fuller R., & Perdigon G., (2000). Probiotics 3: Immunomodulation by the gut microflora and probiotics. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Fuller R., (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378.

Furrie E. (2005) Probiotics and allergy. *Proc. Nutr. Soc.* 64:465-469.

Gagnon M., Kheadr E. E., Le Blaya G., & Flissa I., (2004). In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 69-78

Galask RP. (1988). Vaginal colonization by bacteria and yeast. *Am J Obstet Gynecol* .158:993—5.

Garneau, S., N. I. Martin, and J. C. Vederas. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84:577-592.

Gareau, M. G., Jury, J., Macqueen, G., Sherman, P. M. & Perdue, M. H. (2007). Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. *Gut*, 56, 1522-8.

Garrigues C ,Johansen E, Pedersen MB. (2010). Complete genome sequence of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, a widely consumed probiotic strain. *J Bacteriol*, p 192:2467–2468

Gavini F., Pourcher A.M., Bahaka D., Freney J., Romond C., & Izard D. (1990). Le genre *Bifidobacterium*. Classification, identification, aspects critiques. *Méd. Mal. Infect.* 20 : 53-62.

Gerald F ; Fitzgerald (1999) Food fermentations. Role of micro organisms in food production and préservation international journal of food microbiology 50:131-149.

Gibson G. R., & Fuller R.,(2000). Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *Journal of Nutrition*, 130, 391-395.

Gibson G. R., et Roberfroid M.B., (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota : introducing the concept of prébiotics. *J. Nutr.* 125. 6 : 1401-1412.

Gill C and Rowland I. (2004). Probiotic, prebiotics and colorectal cancer. *Agro. Food Industry Hi-Tech.* 15: 37-39.

Gionchetti, P., et al., (2007). High-dose probiotics for the treatment of active pouchitis. *Dis Colon Rectum.* 50(12): p. 2075-82; discussion 2082-4.

Glasgow TS, Young PC, Wallin J, et al.(2005). Association of intrapartum antibiotic exposure and late-onset serious bacterial infections in infants. *Pediatrics*;116:696—702

Gomes A.M.P and Malcata F.X, (1999). *Bifidobacterium* spp and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food. Sci. Technol* 10: 139-157.

Gommes, AMP ;Malkata, FX ; Klaver, FAM (1998) .Growth enhancement of bifidobacterium lactis bo and lactobacillus acidophilus Ki by milk lydolsats j, Dairy;Sci 81 :533-539.

Goplerud CP, Ohm MJ, Galask RP. (1976) .Aerobic and anaerobic flora of the cervix during pregnancy and the puerperium. Am J Obstet Gynecol;126:858—68.

Gournier-château N., Larpent J. P., Castillanos M. I., & Larpent J. L., (1994). Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Édition Technologie et documentation Lavoisier pp. 1-192, Paris, France.

Grangette C. (2007). *Probiotiques et immunité. Probiotiques et régulation de la réponse immune allergique et infl ammatoire.* Cah. Nutr. Diet ;42(2):2S76-85.

Grill, JP ; Grociani J ; Ballongue, j (1995). Effects of bifidobacteria on nitrites and nitrosamines letters, appl, microbiol .20 :328+330.

Gueimonde, M., S. Tolkko, T. Korpimaki, and S. Salminen. (2004). New real-time quantitative PCR procédure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. Appl Environ Microbiol 70:4165-9.

Guessas. B. and Kihal.M, (2004). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats milk. Afr. J. Biotechnol., 3: 339-342.

Guessas.B, Adjoudj. F, Hadadji .M and Kihal.M, (2012). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan, a Traditional Butter and Their Major Technological Traits, World Applied Sciences Journal 17 (4): 480-488.

Gupta V., Garg R. (2009). *Probiotics.* Indian Journal of Medical Microbiology, 27(3): 202-9.

Gyorgy, P, (1995). Effects of “panax ginseng“extracts on growth of human intestinal bacteria and bacterial metabolism Korean. J ginseng, Sci, Vol 14 ,N°2 : 253-264.

Hadadji M., Benaama R., Saidi N., Henni D. E., et 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

Hadadji, M and Bensoltane, A ,(2006). Growth and lactic acid production by Bifidobacterium longum and Lactobacillus acidophilus in goat’s milk. African journal of biotechnology.Vol. 5: (6): 505-509.

Hagiage, M. (1994). La flore intestinale: de l'équilibre au déséquilibre, éd. Vigot, Paris, France. 120 p.

Hamma S, Nicoletti C and Sadoun D ,(2008). The effect of fermented milk with *Bifidobacterium infantis* on intestinal disorders in the case of antibiotherapy with amoxicillin and contamination with enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), African Journal of Biotechnology Vol. 7 (22), pp. 4181-4191.

Harmsen HJ, Gibson GR, Elfferich P, Raangs GC, Wildeboer-Veloo AC, Argaziz A, et al. (2000). Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. FEMS Microbiol Lett;183:125-9.

Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Grijpstra J, Knol J, Degener JE, Welling GW. (2000). Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human feces from volunteers of different age groups. Appl Environ Microbiol;66:452

Ha G., Yang C., Kim H., Chong Y., (1999). Case of sepsis caused by *Bifidobacterium longum*. J. clin. Microbiol., 37: 1227-1228.

Hartke, A., S. Bouche, J. C. Giard, A. Benachour, P. Boutibonnes, and Y. Auffray. (1996). The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Curr Microbiol 33:194-9.

Heyman M. (2007). Probiotiques et immunité. Effets des probiotiques sur le système immunitaire : mécanisme d'action potentiel. Cah. Nutr. Diet.;42(2):2S67-75.

Hidaka, H : Elda, T ; Takinzawa, T ; Takunaga, T ; et Tashiro, Y, (1986). Effects in fructo ; digo saccharises ou intestinal flora, and human health. Bifidobacteries microflora, 5(1):37-50.

Hill, M. J., et Marsh, P. D. (1990) Human Microbial Ecology. CRC Press, Boca Raton. P. 89-110.

Hilton E. et al , (1997). Efficacy of *Lactobacillus GG* as a Diarrheal Preventive in Travelers. J Travel Med. 4(1):41-43.

Hillier SL, Krohn MA, Klebanoff SJ, et al, (1992). The relationship of hydrogen peroxide-producing Lactobacilli to bacterial vaginosis and genital microflora in pregnant women. Obstet Gynecol;79:369—73.

Hirayama K., Rafter J., (2000). The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and Infection*, 2, 681-686.

Huang, ChienJung et Huang, C. J. (1997). Production of yoghurt by Bifidobacteria- (m) flavor components ofyoghurt. J. TaiwanLives. Res.; 30:135-141.

Holst E, Goffeng Rossel A, Andersch B, (1994). Bacterial vaginosis and vaginal microorganisms in idiopathic premature labor and association with pregnancy outcome. *J Clin Microbiol*;32: 176—86.

Holzappel W. H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., & Huis in't Veld J. H. J., (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 85-101.

Hooper L. V., & Gordon J. I., (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292, 1115-1118.

Ingram, L. C. (1969). Synthesis of the antibiotic, nisin: formation of lanthionine and b-methylanthionine. *Biochimica et Biophysica Acta* 184:216-219

Isolauri E., Kirjavainen P. V., & Salminen S., (2002). Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut*, 50, 54-59.

Ito, M ; Ohno, T ; Tanaka, R ; (1993). A spécifique DNA probe for identification of bif breve microbiol ecol health, *Dis*, 5 : 185-192.

Ito, M ; Kimura, M ; Deguschi, Y ; Kan, T, (1997). Les effets de trasglactosilaste disaccharides sur les intestinaux humains et leur métabolisme. *nutr Sci.vitaminé* (Tokyo) ; 39(3) : 279-288.

Iwata M and Morishita . (1989). The presence of plasmids in Bifidobacterium breve. *Letter. Appl. Microbiol.* 9: 165-168

Johnsen, L., G. Fimland, and J. Nissen-Meyer. (2005). The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *Journal of Biological Chemistry* 280:9243-9250.

Jung, G. (1991). Lantibiotics - Ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and α,β -didehydroamino acids. *Angewandte Chemie - International Edition in English* 30:1051-1068

Kagnoff, M. F., Eckmann L., (1997). Epithelial cells as sensors for microbial infection. *Journal of Clinical Investigation*, 100, 6-10.

Kailasapathy K., Chin J., (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*, 78, 80-88.

Kaplan H., & Hutkins R., (2000). Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2682-2684.

Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 12:39-85.

Kailasapathy K., & Chin J., (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*, 78, 80-88.

Kleessen B, Bezirtzoglou E, Mättö J., (2000). Culture-based knowledge on biodiversity, development, and stability of human gastrointestinal microflora. *Microbiol Ecol Health Dis*;12(Suppl 2):53-63.

Kindt, T.J., et al., (2008). *Immunologie : le cours de Janis Kuby : avec questions de révision.* Sciences sup., Paris: Dunod. xx, 684

Kuzela, L., M. Kascak, and A. Vavrecka, (2001). Induction and maintenance of remission with nonpathogenic *Escherichia coli* in patients with pouchitis. *Am J Gastroenterol*, 2001. 96(11): p. 3218-9.

Koletzko B, von Haunersches Kinderspital, (2009). Recommandations concernant les pré- et probiotiques dans les aliments de départ pour nourrissons, (Empfehlungen / Recommendations), Vol. 20 N° 03, Allemagne

Kulagina E.V, Shkoporov A.N, Kafarskaia. L, Khokhlova E.V, N. N. Volodin, E. E. Donskikh, O. V. Korshunova, and B. A. Efimov, (2010): Molecular Genetic Study of Species and Strain Variability in *Bifidobacteria* Population in Intestinal Microflora of Breast-Fed Infants and Their Mothers). *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, Vol. 150, No. 1, (IMMUNOLOGY AND MICROBIOLOGY,

Koumans EH, Markowitz LE, Hogan V, et al. (2002). Indications for therapy and treatment recommendations for bacterial vaginosis in non-pregnant and pregnant women: a synthesis of data. *Clin Infect Dis*;35:S152—72.

Kumar JV . Somesh S. et Neerja S ., (2006). Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolated of Natural Lactic acid fermentation of vegetables. *Food technology and Biotechnology*, 44 (3): 435- 439.

Kalliomäki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P., Isolauri E. (2001). *Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebocontrolled trial.* *Lancet*;357:1076-79

Kalliomäki M., Salminen S., Poussa T., Arvilommi H., Isolauri E. (2003). *Probiotics and prevention of atopic diseases: 4-year follow-up of a randomized placebo-controlled trial.* Lancet;361:1869-71

Kalliomäki M., Salminen S., Poussa T., Isolauri E. (2007). *Probiotics during the first 7 years of life: A cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial.* Allergy Clin Immunol. 6.

Kullen, M. J., and T. R. Klaenhammer. (1999). Identification of the pH-inducible, proton-translocating *FiFo-ATPase* (*a/pBEFHAGDC*) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization. Mol Microbiol **33**:1152-61.

Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, et al. (2001). Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. Lancet;357:1076–9.

Kelsall B, Strober W. (1999). Gut-associated Lymphoid Tissue: Antigen Handling and T Lymphocyte Responses. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, editors. Mucosal Immunology 2nd ed. New-York: Academic press;

Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70:337-349.

Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12:39-85.

Kleerebezem, M. (2004). Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides* 25:1405-1414.

Kleerebezem, M. and L. E. Quadri. (2001). Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: A case of multicellular behavior. *Peptides* 22:1579-1596.

Kirjavainem A ; Hand, AC ; Isolauri, E (1998). The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus Fems -microbiol lett, 167 : 185 ; 189.

Laake, K.O., et al., (2005). Outcome of four weeks' intervention with probiotics on symptoms and endoscopic appearance after surgical reconstruction with a J-configured ileal-pouch-anal-anastomosis in ulcerative colitis. Scand J Gastroenterol, 2005. **40**(1): p. 43-51.

Langhendries J.-P.,(2006). Archives de pédiatrie 13 ;1526–1534

Langhendries.JP, Liège, Belgique, (2008), Microflore de la mère et du nouveau-né : quelques aspects périnataux Journal de pédiatrie et de puériculture 21, 339—343

Leahy SC., Higgins DG., Fitzgerald GF and Van Sinderen D, (2005). Getting better with bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol*, 98: 1303-1315.

Lubelski, J., R. Rink, R. Khusainov, G. N. Moll, and O. P. Kuipers. (2008). Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65:455-476.

Lilly D. M., & Stillwell R. H., (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747-748.

Lammers, K.M., et al., (2005). Probiotic therapy in the prevention of pouchitis onset: decreased interleukin-1beta, interleukin-8, and interferon-gamma gene expression. *Inflamm Bowel Dis.* 11(5): p. 447-54. 266.

Lima-Filho J. V., Vieira L.Q., Arantes R. M., & Nicoli J. R., 2004. Effect of the *Escherichia coli* EMO strain on experimental infection by *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in gnotobiotic mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37, 1005-1013.

Lutgendorff, F., Akkermans, L. M. & Soderholm, J. D. (2008). The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastro-intestinal damage. *Curr Mol Med*, 8, 282-98.

Lin H. C., Su B. H., Chen A. C., Lin T. W., Tsai C. H., Yeh T. F., & Oh W., (2005). Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics*, 115, 1-4.

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

Len, A. C., D. W. Harty, and N. A. Jacques. (2004). Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance. *Microbiology* 150:1339-51.

Lim, E. M., S. D. Ehrlich, and E. Maguin. (2000). Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Electrophoresis* 21:2557- 61.

Lizko, N. N. (1987) Stress and intestinal microflora. *Nahrung*, 31, 443-7.

Logan, A. C. & Kzman, M. (2005). Major depressive disorder: probiotics may be an adjuvant therapy. *Med Hypotheses*, 64, 533-8.

Lee Y H., O'Sullivan DJ. (2006). Sequence analysis of cryptic plasmids from *Bifidobacterium* DJO10A and construction of a shuttle cloning vector. *App. Environ. Microbiol.* 72 (1): 527-535.

Lee Y.H, Kim C.J, et Kunz, B. (2006). Identification of lactic acid bacteria from kimchi and studies of their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages. *Meat Sci*, 72: 347-445.

- Lee JH and Daniel J. O'Sullivan, (2012).** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012, 74(3):378
Genomic Insights into Bifidobacteria
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. (2006).** Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006;124:837-48.
- Lilly D. M., & Stillwell R. H., (1965).** Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747-748.
- Lin H. C., Su B. H., Chen A. C., Lin T. W., Tsai C. H., Yeh T. F., & Oh W., (2005).** Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics*, 115, 1-4.
- Mahmoudi F, Hadadji M, Guessas B, Kihal M (2013).** Identification and Physiological Properties of *Bifidobacterium* Strains Isolated from Different Origin. *J.F.S.E.* 3:196-206.
- Mahmoudi F, Hadadji M, Guessas B, Kihal M (2013).** Evaluation of *in vitro* antagonism and protection against enteropathogenic experimental challenge of different strains of *Bifidobacterium*. *A.J.M.R.*, vol 7
- Marelli G., Papaleo E., & Ferrari A., (2004).** Lactobacilli for prevention of urogenital infections: a review. *European Review of Medicine and Pharmacology Sciences*, 8, 87-95.
- Marteau P., & Shanahan F., (2003).** Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side effects. *Best Practices & Research Clinical Gastroenterology*, 17, 725-740.
- Mandar R, (1996).** Mikelsaar M. Transmission of mother's microflora to the newborn at birth. *Biol Neonate* ;69:30-5.
- Mastrandrea F., Coradduzza G., Serio G., Minardi A., Manelli M., Ardito S., & Muratore L., (2004).** Probiotics reduce the CD34 + hemopoietic precursor cell increased traffic in allergic subjects. *Allergy and Immunology (Paris)*, 36, 118-122.
- Moreau MC. (2004).** Influence de la microbiologie intestinale sur l'immunité de l'hôte : conditions physiologiques. In : Rambaud JC, Buts JP, Corthier G, Flourié B, eds. Flore microbienne intestinale. Montrouge : John Libbey Eurotext :131-49.
- Marteau P, Pochart P, Dore J, Bera-Maillet C, Bernalier A, Corthier G. (2001).** Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol*;67:4939-42.
- McCracken V. J., & Lorenz R. G., (2001).** The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cellular Microbiology*, 3, 1-11

- McAuliffe, O., R. P. Ross, and C. Hill. (2001).** Lantibiotics: Structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews* 25:285-308.
- Mercenier A., Pavan S., & Pot B., (2002).** Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 8, 99-110.
- Metchnikoff E., (1907).** The prolongation of life. In *Optimistic Studies* (Heinemann W., Ed.), pp. 1-100. G. P. Putnam and Sons, London, UK.
- Moore W. E. C., & Holdeman L. V., (1974).** Human faecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Applied Microbiology*, 27, 961-979.
- Mortensen P. B., & Clausen M. R., (1996).** Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 216, 132-148.
- Morisset, D., J. M. Berjeaud, J. Frère, M. Hickson, and Y. Héchard. (2005).** Bactériocines de bactéries lactiques, p. 113-194. In *Bactéries lactiques et probiotiques*. Lavoisier, Paris.
- Mathara, J.M, Schillinger, U, Kutima, P.M, Mbugua, S.K et Holzapfel, W.H. (2004).** Isolation , identification, characterization of the dominant microorganisms of kule nato; the maasai traditional milk in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 269-278.
- Matsumoto M., Ohishi H, and Hand Benno Y, (2004).** H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *Int. J. Food. Microbiol.* 93: 109-113
- MacFie, J., et al., (2006).** *Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years.* Br J Surg., 93(1): p. 87-93. 257.
- Matsumoto, M., H. Ohishi, and Y. Benno. (2004).** H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with spécial référence to acid tolérance. *Int J Food Microbiol* 93:109-13
- Matsuki, T., K. Watanabe, J. Fujimoto, Y. Kado, T. Takada, K. Matsumoto, and R. Tanaka. (2004).** Quantitative PCR with 16S rRNA-Gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* 70:167-73.
- Martine B., (1998).** Étude de l'impact de l'ajout des bifidobactéries sur les cinétiques de fermentation des bactéries lactiques mésophiles utilisées dans la production de fromage frais, canada, 10 ,11 ,12
- Mändar R, Mikelsaar M. (1996).** Transmission of mother's microflora to the newborn at birth. *Biol Neonate* ;86:557—63.

Marco Ventura, Abelardo Margolles, Francesca Turrone, Aldert Zomer, Clara G. de los Reyes-Gavilán, and Douwe van Sinderen, (2011). Stress Responses of Bifidobacteria, DOI 10.1007/978-0-387-92771-8_14,

Matsuki, T., K. Watanabe, R. Tanaka, M. Fukuda, and H. Oyaizu. (1999). Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl Environ Microbiol* **65**:4506-12.

Majamaa H., Isolauri E.,(1997). *Probiotics: a novel approach in the management of food allergy.* *J Allergy Clin Immunol.*;99:179-185.

Marelli G., Papaleo E., & Ferrari A., (2004). Lactobacilli for prevention of urogenital infections: a review. *European Review of Medicine and Pharmacology Sciences*, *8*, 87-95.

Marteau P., & Shanahan F., (2003). Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side effects. *Best Practices & Research Clinical Gastroenterology*, *17*, 725-740

Mayer, E. A., (2000). The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut*, *47*, 861-9.

Mawdsley, J. E. & Rampton, D. S. (2005) Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*, *54*, 1481-91.

Mercer BM, Carr TL, Beazley DD, et al.(1999). Antibiotic use in pregnancy and drug-resistant infant sepsis. *Am J Obstet Gynecol*;181:816—21.

Meghrou, J., Euloge, P., Junelles, A. M., Ballongue, J., et Petitdemange, H. (1990) Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocin production. *Biotechnology Letters*. *12*:575-580.

Mercenier A., Pavan S., & Pot B., (2002). Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*, *8*, 99-110.

Metchnikoff E., (1907). The prolongation of life. In *Optimistic Studies* (Heinemann W., Ed.), pp. 1-100. G. P. Putnam and Sons, London, UK.

Midtvedt, A. C. and T. Midtvedt (1992). "Production of short chain fatty acids by the intestinal microflora during the first 2 years of human life." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **15**(4): 395-403.

Moore W. E. C., Holdeman L. V., (1974). Human faecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Applied Microbiology*, *27*, 961-979.

Metlef S, Dilmi-Bouras A. (2009), effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente, (Revue Nature et Technologie), N° 01, Algérie, , Pages 33 – 44

Mortensen P. B., Clausen M. R., (1996). Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 216, 132-148.

Moroni.O, (2007) :contribution à l'étude du role des probiotiques dans le contrôle et laprévention des infections entériques à *Listéria* .monocytogènes : analyse in vitro et étude in vivo des mécanismes d'action antimicrobien (thèse de Doctorat), université Laval, Canada.

Morris J.G ., (1976). Oxygen and the obligate anaerobic *J.Appl Bacteria*: 40 : 229-244 ;

Murch SH. (2001), Toll of allergy reduced by probiotics. *Lancet*;357:1057– 9.

Nowrouzian F, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard IL, Aberg N,Wold AE, et al. (2003). *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatr Res*; 54:8-14.

Neumann E, Oliveira MA, Cabral CM, Moura LN, Nicoli JR, Vieira EC, et al. (1998). Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. *Braz J Med Biol Res*;31:1565-73.

Nilsen, T., I. F. Nes, and H. Holo. (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental .Microbiology* 69:2975-2984.

Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Havarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink, and H. Holo. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70:113-128.

Otto, M., A. Peschel, and F. tz. (1998). Producer self-protection against the lantibiotic epidermin by the ABC transporter EpiFEG of *Staphylococcus epidermidis* Tu 3298. *FEMS Microbiology Letters* 166:203-211.

Ouwehand A., Isolauri E., & Salminen S., (2002). The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. *European of Journal Nutrition*, 41, 32- 37.

Ovalle A, Levancini M., (2001). Urinary tract infections in pregnancy. *Curr Opin Urol*;11:55—9.

- Onone, M ; Kado,S ; Uchida, K ;Morotomi, M., (1997).** Species of intestinal bacteria influence the induction of aberrant crypt foci by 1.2 dimethyl hydrazine in rats. *Letters* 113:179-186.
- Orphage, K ; gustafsson, JA ; Nord CE ; Rafter, G .,(1994).** Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutation. Res* 311 :239-248.
- Oliveira MR, Tafuri WL, Afonso LC, Oliveira MA, Nicoli JR, Vieira EC, et al. ,(2005).** Germ-free mice produce high levels of interferon-gamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions. *Parasitology* 2005;131:477-88.
- O'Sullivan.DJ., Ju-Hoon Lee and Daniel J. O'Sullivan,,(2005).** Production des substances antimicrobiennes , *Microbiol. Mol. Biol. Rev. Genomic Insights into Bifidobacteria* ,vol. 74 no. 3 378-416 ,
- Ouwehand. A. C. and Vesterlund. S. (2004).** Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria in Lactic acid bacteria, *Microbiological and Functional Aspect*. Third Edition. Marcel Dekker.
- Parker R. B., (1974).** Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*, 29, 4-8.
- Palmer, C , E. M. Bik, D. B. DiGiulio, D. A. Relman, and P. O. Brown. (2007).** Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol* 5: e177.
- Park, K. B., G. E. Ji, M. S. Park, and S. H. Oh. (2005).** Expression of rice glutamate decarboxylase in *Bifidobacterium longum* enhances gamma-aminobutyric acid production. *Biotechnol Lett* 27:1681-4.
- Parracho H., Mc Cartney A.L., Gibson G.R. (2007).** *Probiotics and prebiotics in infant nutrition*. *Proceedings of the Nutrition Society*;66:405-411.
- Pena, J. A., S. Y. Li, et al. (2004).** "Genotypic and phenotypic studies of murine intestinal lactobacilli: species differences in mice with and without colitis." *Appl Environ Microbiol* 70(1): 558-68.
- Peschel, A. and F. tz. (1996).** Analysis of the *Staphylococcus epidermidis* genes *epiF*, *-E*, and *-G* involved in epidermin immunity. *Journal of Bacteriology* 178:531-536.
- Perdigon G., Fuller R., & Raya R., (2001).** Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Current Issues Intestinal Microbiology*, 2, 17-42.

- Pohjavuori E., Viljanen M., Korpela R., Kuitunen M., Tiittanen M., Vaarala O., Savilahti E. (2004).** *Lactobacillus GG effect in increasing IFN-gamma production in infants with cow's milk allergy.* J Allergy Clin Immunol.
- Pickard KM, Bremner AR, Gordon JN, et al. ,(2004).**Microbiol-gut interactions in health and diseases. Immune responses. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2004;18:271–85
- Peter LM, Flemming J, Olec H, Soren M, Peter S .,(2001).** Intra-and extracellular B Galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium infantis*: Molecular (cloning) Heterologous expression, and comparative characterization. Appl. Environ. Microbiol. 67
- Rada, V. (1997).** "Effect of *Kluyveromyces marxianus* on the growth and survival of bifidobacteria in milk." Folia Microbiol (Praha) **42**(2): 145-8.
- Rada, V., K. Sirotek, et al. (1999).** "Evaluation of selective media for bifidobacteria in poultry and rabbit caecal samples." Zentralbl Veterinarmed B **46**(6): 369-73.
- Rambaud, J.-C., J.-P. Buts, et al. (2004).** "Flore microbienne intestinale." (ISBN:2-7420 0512-9).
- Ramiro E., (2008).** Puig *et al* - *The bowel: A key component of the immune system.* Rev Esp Enferm Dig. 100(1):29-34.
- Rasic, J. Lj. et Kurmann, J. A. (1983).**Bifidobacteria and their role. Microbiological, nutritional-physiological, medical and technological aspects and bibliography. Birkhauser Verlag ed. Basel, Boston, Stuttgart.
- Reid G., & Burton J., (2002).** Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*, 4, 319-324.
- Reid G., Charbonneau D., Erb J., Kochanowski B., Beuerman D., Poehner R., & Bruce A. W., (2003).** Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35, 131-134.
- Reid G.(2001).** Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. Am J Clin Nutr;73:437S—43S.
- Reimann S , Grattepanche F , Rezzonico E, Lacroix C, (2010) .** Development of a real-time RT-PCR method for enumeration of viable *Bifidobacterium longum* cells in different morphologies, Food Microbiology 27 236-242

Report of FAO/WHO, (2002). Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada, April 30 and May 1, pp 1-11.

Richoux.R , RENNES.Rennes J.R,Kerjean I .,(2006). Propriétés probiotiques des bactéries propioniques laitières , programme nutrition santé en Bretagne

Rincé, A., A. Dufour, P. Uguen, J. P. Le Pennec, and D. Haras., (1997). Characterization of the lactacin 481 operon: The *Lactococcus lactis* genes lctF, lctE, and lctG encode a putative ABC transporter involved in bacteriocin immunity. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4252-4260.

Riley, M. A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. 32, 255-278.

Rodri'guez E, Arque J , Rodri'guez R , Peirote A., Landete J, Medina M .,(2012). Antimicrobial properties of probiotic strains isolated from breast-fed infants, *Journal of functional foods* 4542-551

Rodenas, C. L., Bergonzelli, G. E., Nutten, S., Schumann, A., Cherbutte, C., Turini , M., Ornstein, K., Rochat, F. & Corthesytheulaz, I. (2006) .Nutritional approach to restore impaired intestinal barrier function and growth after neonatal stress in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 43,16-24.

Roy, D., Mainville, I., et Mondou, F., (1996). Bifidobacteria and their role in yoghurt-related products. Proceedings of the Symposium on Probiotics in **man and animal**; Jun 20-1996.

Roy, D., Mainville, I., et Mondou, F.(1998). Selective enumeration and survival of bifidobacteria in fiesh cheese. *Int. Dajr J.*; 7:785-793.

Roy, D. et Ward, P.(1992). Rapid detection of *Bifidobacteriwn dentium* by enzymatic hydrolysis of B-glucuronide substrates. *J. Food Prot.* 55:29 1-295

Roy,D. (2005).Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products, *Lait* ;85: 39–56.

Roy D (2001). Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 69:167–182.

Rochat.F. (2004). Effets biologiques des modificateurs de la flore intestinaleBiological effects of pre and probiotics ,*Suisse 2004*,

Robin JM, Rouchy A., (2001). Centre d'étude de dévelopemrnt et de la nutrihérapie des probiotiques 01.

Ruseler-van Embden, J.G., W.R. Schouten, and L.M. van Lieshout. (1994). Pouchitis: result of microbial imbalance, *Gut*, **35**(5): p. 658-64.

Rudi, K., M. Zimonja, B. Kvenshagen, J. Rugtveit, T. Midtvedt, and M. Eggesbo. (2007). Alignment-independent comparisons of human gastrointestinal tract microbial communities in a multidimensional 16S rRNA gene evolutionary space. *Appl Environ Microbiol* **73**:2727-34

Rui-Xia Gu a,, Zhen-Quan Yang a, Zheng-Hua Li b, Shun-Li Chen b, Zhen-Lan Luo , (2008), Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi China,; p 313–317, chine

Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Warner, P.J et JimenezDiaz, R. (1994).Use of *Lactobacillus plantarum* LPC010, a bacteriocin producer, as a starter culture of spanish-style green olive fermentation. *App. Environ. Microbiol*, **60**: 2059-2064.

Saad N , Delattre C , Urdaci M , Schmitter J , Bressollier P, (2012) . An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field, *LWT - Food Science and Technology* **50** .1-16

Salminen S., Isolauri E and Salminen E ., (1996). Clinical uses of probiotics for stabilization the gut mucosal barrier: Successful strains and future challenges. *Antonie van Leewenhoek*, **70**: 347-358.

Savage, D. C. and R. J. Dubos (1967). "Localization of Indigenous Yeast in the Murine Stomach." *J Bacteriol* **94**(6): 1811-1816.

Scardovi V. (1986). Genus *Bifidobacterium* Orla Jensen, 472.In: *Bergey's Manual of systematic Bacteriology, IXe Edition. Williams and Wilkins. Baltimore*

Schillinger, U., Geisen, R., et Holzappel, W.H. (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci.Technol*, **7** : 158-164.

Servin A. L., (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* **28**: 405 .440

Shu Q, Gill HS, (2001) .A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* 0157:H7 infection in mice. *Med Microbiol Immunol*, **189** 147–52.

Saavedra J. M, & Tschernia A., (2002). Human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications. *British Journal of Nutrition*, **87**, 241-246.

Saito T., (2004). Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to functional foods. *Animal Science Journal*, **75**, 1-13.

Sanders M. E., (2000). Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *Journal of Nutrition*, 130, 384-390.

Stanton C., Gardiner G., Meehan H., Collins K., Fitzgerald G., Lynch P. B., & Ross R. P., (2001). Market potential for probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 476-483.

Sullivan A., & Nord C. E., (2002). The place of probiotics in human intestinal infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20, 313-319.

Sullivan A., & Nord C. E., (2005). Probiotics and gastrointestinal diseases. *Journal of Internal Medicine*, 257, 78-92.

Sgorbati B., Scardovi V., Leblanc D., (1986). Related structures in the plasmid profiles of *B. longum*. *Microbiologica*. 9: 415-422.

Souza DG, Vieira AT, Soares AC, Pinho V, Nicoli JR, Vieira LQ, et al.(2004). The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. *J Immunol*;173:4137-46.

Schrezenmeir, J., et De Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a définition. *American journal of Clinical Nutrition*. 73 Suppl.:361S- 364S.

Siitonen S. et al - Effect of Lactobacillus GG yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. *Ann Med*. 1990 Feb;22(1):57-9.

Saggiaro A. ,(2004). *Probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome.* *J. Clin. Gastroenterol*. Jul 2004;38 (suppl 2):S104-6.

Stein, T., S. Heinzmann, S. sterhus, S. Borchert, and K. D. Entian. ,(2005). Expression and functional analysis of the subtilin immunity genes spaIFEG in the subtilin-sensitive host *Bacillus subtilis* MO1099. *Journal of Bacteriology* 187:822-828.

Sahl, H. G., R. W. Jack, and G. Bierbaum. (1995). Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *European Journal of Biochemistry* 230:827-853.

Spears, R. W. and R. Freter., (1967). "Improved isolation of anaerobic bacteria from the mouse cecum by maintaining continuous strict anaerobiosis." *Proc Soc Exp Biol Med* **124**(3): 903-9.

Smith, H. W. (1965). "Observations on the Flora of the Alimentary Tract of Animals and Factors Affecting Its Composition." *J Pathol Bacteriol* **89**: 95-122.

Suzuki, K., Harasawa, R., Yoshitake, Y. & Mitsuokam, T. (1983) Effects of crowding and heat stress on intestinal flora, body weight gain, and feed efficiency of growing rats and chicks. *Nippon Juigaku Zasshi*, 45, 331-8.

Sanders M. E., (2000). Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *Journal of Nutrition*, 130, 384-390.

Stanton C., Gardiner G., Meehan H., Collins K., Fitzgerald G., Lynch P. B., & Ross R. P., (2001). Market potential for probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 476-483.

Stingle F., Corthesy B., Kusy N., Porcelli S. A., Kasper D. L., & Tzianabos A. O., (2004). Zwitterionic polysaccharides stimulate T cells with no preferential V β usage and promote anergy, resulting in protection against experimental abscess formation. *Journal of Immunology*, 172, 1483-1490.

Storz, G., and R. Hengge-Aronis., (2000). Bacterial Stress Responses. ASM Press, Washington, D.C.

Sullivan A., & Nord C. E., (2002). The place of probiotics in human intestinal infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20, 313-319.

Sullivan A., Nord C. E., (2005). Probiotics and gastrointestinal diseases. *Journal of Internal Medicine*, 257, 78-92.

Sullivan DJ, Ju-Hoon Lee and Daniel J. O'Sullivan, (2010). Genomic Insights into Bifidobacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* vol. 74 no. 3 378-416 ,

Tamime AY, Marshall VME, Robinson RK .,(1995). Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* 62: 151-187.

Tsai C, Lin P , Hsieh Y. (2008). Three *Lactobacillus* strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* grown in vitro. *Anaerobe*, 14 .61–67.

Turrone F, van Sinderen D, Ventura M .,(2009). Bifidobacteria: from ecology to genomics. *Front Biosci* 14:4673–4684

Turrone.F. Sinderen. DV, Ventura.M .,(2011). Genomics and ecological overview of the genus Bifidobacterium, *International Journal of Food Microbiology* 149 (2011) 37–44),

Tlaskalová-Hogenová H., Štěpánková R., Hudcovic T., Tucková L., Cukrowskab B., Lodinová-Žádníková R., Kozáková H., Rossmanna P., Bártová J., Sokol D., Funda D. P.,

Borovská D., Reháková Z., Šinkora J., Hofmana J., Drastich P., & Kokešová A., (2004). Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters*, 93, 97-108.

Tahri, K ; Girll, J P ; Shneider, F .,(1997). Involement of trihydroxy conjugated bilesalts in cholesterol assimilation by bifidobacteries current microbiol. 34 : 79-84 danone world news letter N° 16.

Tannock GW, Fuller R, Smith SL, Hall MA., (1990). Plasmid profiling of members of the family Enterobacteriaceae, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *J Clin Microbiol*;28:1225-8.

Turroni F, van Sinderen D, Ventura M., (2009) .Bifidobacteria: from ecology to genomics. *Front Biosci* 14:4673–4684

Turroni.F. Sinderen. DV., (2011). Ventura.M Genomics and ecological overview of the genus Bifidobacterium, *International Journal of Food Microbiology* 149 . 37–44),

Turroni.F , Foroni.A Æ., (2008). Douwe van Sinderen Æ Marco Ventura Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality , *Antonie van Leeuwenhoek* 94:35–50

Tissier, H. (1900). Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (Etat normal et pathologique). *Thesis, ed. Georges Carre' et C.Maud, University of Paris (medecine)[Fr], Paris, France*, pp. 253.

van der Waaij D, Berghuis-de Vries JM, Lekkerkerk-van der Wees JEC.,(1971).Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg (Lond)*;69:405-11.

Varcoe J. J., Krejcarek G., Busta F., & Brady L., (2003). Prophylactic feeding of *Lactobacillus acidophilus* NCFM to mice attenuates overt colonic hyperplasia. *Journal of Food Protection*, 66, 457-465.

Vanderhoof J.A. (1999). *Lactobacillus GG* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *The Journal of Pediatrics*, Volume 135, Issue 5, Pages 564-568.

van Belkum, M. J. and M. E. Stiles. (2000). Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria (1995 to date). *Natural Product Reports* 17:323-335.

Venema, K., M. H. R. Dost, G. Venema, and J. Kok. (1996). Mutational analysis and chemical modification of Cys24 of lactococcin B, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. *Microbiology* 142:2825-2830.

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

Ventura, M., C. Canchaya, R. Zink, G. F. Fitzgerald, and D. van Sinderen. (2004). Characterization of the *groEL* and *groES* loci in *Bifidobacterium breve* UCC 2003: genetic, transcriptional, and phylogenetic analyses. *Appl Environ Microbiol* 70:6197-209.

Ventura, M., G. F. Fitzgerald, and D. van Sinderen. (2005). Genetic and transcriptional organization of the *clpC* locus in *Bifidobacterium breve* UCC 2003. *Appl Environ Microbiol* 71:6282-91.

Ventura, M., J. G. Kenny, Z. Zhang, G. F. Fitzgerald, and D. van Sinderen. ,(2005). The *clpB* gene of *Bifidobacterium breve* UCC 2003: transcriptional analysis and first insights into stress induction. *Microbiology* 151:2861-72.

Ventura, M., D. van Sinderen, G. F. Fitzgerald, and R. Zink. (2004). Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86:205-23.

Ventura, M., Z. Zhang, M. Cronin, C. Canchaya, J. G. Kenny, G. F. Fitzgerald, and D. van Sinderen. (2005). The ClgR protein régulates transcription of the *clp?* operon in *Bifidobacterium breve* UCC 2003. *J Bacteriol* 187:8411-26.

Ventura, M., R. Zink, G. F. Fitzgerald, and D. van Sinderen., (2005). Gene structure and transcriptional organization of the *dnaK* operon of *Bifidobacterium breve* UCC 2003 and application of the operon in bifidobacterial tracing. *Appl Environ Microbiol* 71:487-500.

Ventura, M., C. Canchaya, D. van Sinderen, G. Fitzgerald, and R. Zink. (2004). *Bifidobacterium lactis* DSM 10140: Identification of the *atp* operon and analysis of its genetic structure, characteristics, and phylogeny. *Appl Environ Microbiol* 70:3110-21.

Vanderpool, C., F. Yan, and D.B. Polk.,(2008). Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 14(11): p. 1585-96.

Villar J, Gülmezoglu AM, de Onis M. (1998). Nutritional and antimicrobial interventions to prevent preterm birth: an overview of randomized controlled trials. *Obstet Gynecol Surv*;53: 575—85.

Vitini, E., S. Alvarez, et al. (2000). "Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria." *Biocell* 24(3): 223-32.

- Waddington, L., Cyr, T., Hefford, M., Hansen, L.T., Kalmokoff, M., (2010).** Understanding the acid tolerance response of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 108, 1408–1420.
- Wang, X., S. P. Heazlewood, D. O. Krause, and T. H. Florin., (2003).** Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *J Appl Microbiol* 95:508-20
- Warner JO.,(2004).** The early life origins of asthma and related allergic disorders. *Arch Dis Child*;89:97–102.
- Wells CL, Maddaus MA, Simmons RL., (1988).** Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. *Rev Infect Dis* 1988;10:958-79.
- Wehkamp, J., et al., NF-kappaB- and AP-1-.,(2004).** mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun.* 72(10): p. 5750-8
- Weerkamp, A H ; Klaver, Fam ; Vander Meer, R., (1993).** Assimilation of cholesterol by lactobacillus is due to their role bile salt deconjugating Activity. *Fem/S. microbiol rev* ; 12 : 185-192.
- Westerbeek E.A., Van den Berg A., Lafeber H. N., et al., (2006).** *The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: a review of the literature.* *Clin Nutr*, 25, 361-368, 2006.
- Wiedemann, I., E. Breukink, C. Van Kraaij, O. P. Kuipers, G. Bierbaum, B. De Kruijff, and H. G. Sahl. (2001).** Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry* 276:1772-1779.
- Wills-Karp M. et al .,(2001).** *The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis.* *Nature Reviews Immunology*, vol 1: 69-75.
- Yildirim, Z et Johnson, M.G .(1998).** Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB1454. *Journal of food protection*, 61: 47-51
- Yildirim, Z., Winters, D. K., et Johnson, M. G. (1999).** Purification, amino acid sequence and mode of action of Bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Applied Microbiology.* 86:45-54.

Yuguchi, H., Hiramatsu, A., Doi, K., Idach, et Okogoni, S., (1989). Studies on the flavor of yogurt fermented with Bifidobacteria: Signifiame of volatils components and organic acids in the sensory acceptance of yogurt. *Jpn J. Zootech Sci*; 60:734-741

Zareie, M., Johnson-Henru, K., Jury, J., Yang, P. C., Ngan, B. Y., Mckay, D. Soderholm. M., Perdue .JD., Sherman, PM., (2006). Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut*, 55, 1553-60

Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR., (2004). Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr*;134:465-72

Les milieux de culture

Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de levure 5 g
Extrait de viande 10 g
Polypeptone 10 g
Citrate de sodium 2 g
Acetate de sodium 5 g
Glucose 20 g
KH₂PO₄ 2 g
MgSO₄ 0,25g
MnSO₄ 0,05 g
Agar-Agar 15 g
Cysteine chlorhydrique 0.5g
Acide nalidixique 2 mg
Eau distillee 1000 ml
pH 6.8
Autoclavage 120°C/ 20 minutes

Milieu KMK (Kempner et Mc Kay, 1980)

Extrait de levure 3 g
Biopolytone 2,5g
Glucose 5 g
Agar 15 g
Eau distillee 1000 ml
pH6.6

Le milieu est reparti a raison de 100 ml par flacon, puis autoclave 15 minutes a 121°C.

Au moment de l'emploi on ajoute :

1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium 10 % (p/v)

1 ml d'une solution aqueuse a 2.5 % (p/v) de citrate ferrique et citrate de sodium (p/p)

Ces solutions sont sterilisees par filtration sur filtre millipore 0.22 µm et sont conservees a l'obscurite

a 4°C.

Milieu MRS-BCP

MRS (milieu liquide) 1000 ml

Bromocresol pourpre 0,025 mg

pH 7.0

Autoclavage 120°C/ 20 minutes

Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)

Infusion de viande de boeuf 3000 cm³

Peptone de caseine 17,5 g

Amidon de maïs 1,5 g

Agar-agar 17 g

pH 7.4

Autoclavage 120°C/ 15 minutes

Milieu Chapman

Peptone 10g

Extrait de viande 1g

Chlorure de sodium 75g

Mannitol 10g

Rouge de phénol 0.025g

Agar-Agar 15g

pH 7.4

Autoclavage 120°C/ 20 minutes

Gélose nutritive

Extrait de viande 1 g

Extrait de levure 2 g

Peptone 5 g

Chlorure de sodium 5 g

Agar-agar 15 g

Eau distillée 1000 ml

pH 7,4

Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

Bouillon nutritif

Extrait de viande 1 g

Extrait de levure 2 g

Peptone 5 g

Chlorure de sodium 5 g

Eau distillée 1000 ml

pH 7,4

Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

Milieu EMB

Peptone 10 g

Lactose 10 g

Éosine 0,4 g

Bleu de méthylène 0,0625 g

Hydrogénophosphate de potassium 2 g

Agar 15 g

pH : 6,8

Milieu Cétrimide

Peptone 20

Sulfate de potassium 10

Chlorure de magnésium 3

Hydrogénophosphate de potassium 0,3

Cétrimide 0,2

Acide nalidixique 0,015

Agar 13

Lait écrémé

Lait en poudre 100 g

Extrait de levure 0,5 g

Eau distillée 1000 ml

cystéine-Hcl 0,5g

Autoclavage 110°C pendant 10 minutes

Eau Physiologique

Chlorure de sodium 8,5 g

Peptone 0,5 g

Cysteine chlorhydrique 2g

Eau distillée 1000 ml

pH 7,0

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Milieu urée-indole

Uree 2.0g

l-tryptophane 0.3g

ethanol a 0.95 1cm³

rouge phenol 2.5mg

Chlorure de sodium 0.5g

K₂HPO₄ 0.1g

KH₂PO₄ 0.1g

Sterilisation par filtration

Bouillon nitrate

Infusion coeur cervelle 25 g

Nitrate de potassium 10 g

Eau distillée 1000 ml

pH 7,2

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

Gélatine nutritive

Extrait de viande 3g

Peptone 5g

Gelatine 130g

pH 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Sels biliaries (Fernandez *et al.*, 2002)

MRS_c 1000ml

Sels biliaries 50g

pH 6,8

Bain marie 100°C pendant 10 min

Tampon phosphate de sodium

Solution (a) :27.8g NaH₂PO₄ dans 100ml d'eau distillee.

Solution(b) :53.65 Na₂HPO₄, 7H₂O dans 100ml d'eau distillee

Tampon 0.1M :39ml(a) +61ml(b) + eau distillee.

Sterilisation a 110° pendant 20min

Réactifs

Reactifs de Kovacs

Diméthyl-amino-4 benzaldéhyde 50 g

Acide chlorhydrique pur 250 ml

Pentanol 1 750 ml

Les réactifs de Griess

Nit1

Acide Sulfanilique 8 g

Eau distillée 750 ml

Nit2

Alpha-naphtyl-amine 5 g

Acide éthanoïque à 1 mol.dm³ 1 dm³