

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université d'Oran, Es-Sénia
Faculté des Sciences
Département de biologie



Mémoire de Magister
Option : Microbiologie Alimentaire

Thème

Etude de croissance de *Bifidobacterium* sp. dans le
de brebis

Présenté par
Monsieur Ait Abdeslam Arezki

Soutenue le / / 2008

Devant le jury :

<i>Pr. BELKHOUDJA Moulay</i>	<i>Président</i>	<i>Université d'Oran</i>
<i>Pr. AOUES Abdelkader</i>	<i>Examineur</i>	<i>Université d'Oran</i>
<i>Dr. CHEKROuNE Abdallah</i>	<i>Examineur</i>	<i>Université d'Oran</i>
<i>Dr. HADADJI Miloud</i>	<i>Examineur :</i>	<i>Université d'Oran</i>
<i>Pr. BENSOLTANE Ahmed</i>	<i>Rapporteur</i>	<i>Université d'Oran</i>

Année universitaire
2007-2008

Remerciement

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle sous la direction de Monsieur Bensoltane Ahmed, Professeur de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, au Département de Biologie, à l'Université d'Oran. Je lui exprime toute ma reconnaissance, ma gratitude pour son soutien, ses conseils judicieux, sa disponibilité pour mener à bien ce travail qu'il trouve ici mes sincères remerciements.

Mes vifs remerciements à tous les membres de jury pour avoir accepté de juger ce travail :

Je remercie Monsieur Belkhouidja Mouley, Professeur de physiologie végétale à l'Université d'Oran qui a accepté de présider ce jury dont je lui exprime ma haute considération.

Mes sincères remerciements vont à Monsieur Aoues Abdelkader, Professeur de Biochimie, à l'Université d'Oran d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes vifs et sincères remerciement vont Monsieur Chekroune Abdallah Maître de conférence de physiologie de la nutrition, à l'Université d'Oran d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie vivement Monsieur Hadadji Miloud Maître de conférence de microbiologie à l'Université d'Oran pour ces encouragements, ces conseils, et d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie toute l'équipe du Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle sous la direction du Professeur Bensoltane Ahmed.

Je tiens a remercier toutes les personnes qui ont contribué pour mener à bien ce travail.

Résumé

La caractérisation microbiologique et biochimique des souches bactériennes isolées à partir d'un lait fermenté probiotique (ACTEVIA Actiregularis) et des yaourts de Danone produit et commercialisés en Algérie a révélé qu'elles appartiennent aux trois genres : *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*.

Les souches qui ont été apparentées aux deux genres *Streptococcus* (Strp1, Strp2 et Strp3) et *Lactobacillus* (Lb1, Lb2 et Lb3) ont été identifiées comme étant des *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Les souches de *Bifidobacterium* (Bif1, Bif2 et Bif3) ont été apparentées à une seule espèce *Bifidobacterium animalis*.

La sensibilité des souches de *B. animalis* (Bif1, Bif2 et Bif3) aux antibiotiques a été étudiée. Ces souches ont montrées une résistance aux streptomycine, gentamicine, acide nalidixique et tétracycline. Par contre elles ont aussi montrés une sensibilité aux spectinomycine, chloramphénicol, rifampicine, érythromycine et vancomycine.

Le suivi de la fermentation du lait de brebis par *B. animalis* (Bif3) en culture pure et en culture mixte en association avec *Streptococcus thermophilus* (Strp1) et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb1), montre que la croissance *B. animalis* (Bif3) et l'acidification du lait de brebis est meilleure en culture mixte de celle en culture pure. Le taux de croissance de la souche *B. animalis* (Bif3) en culture pure a été estimé à $0,33 \text{ h}^{-1}$ et en culture mixte a été de $0,90 \text{ h}^{-1}$.

L'étude de survie de la souche *B. animalis* (Bif3) en culture pure et en culture mixte stocké à 6°C pendant 21 jours montre d'une part que son taux de létalité est moins élevé dans le lait fermenté de brebis comparé à celui observé dans le lait écrémé fermenté dans les deux cultures et d'autre part son taux de survie et beaucoup mieux en culture pure que en culture mixte dans le lait fermenté de brebis, où la vitesse moyenne de déclin de la souche *B. animalis* (Bif3) en culture pure a été de $-0,06 \text{ J}^{-1}$ et la vitesse moyenne de déclin en culture mixte a été de $-0,39 \text{ J}^{-1}$.

Mots clé : *Bifidobacterium*, probiotique, croissance, lait de brebis, fermentation, viabilité.

Abstract

The microbiological and biochemical characterization of the bacterial stocks insulated starting from a fermented milk probiotic (ACTEVIA Actiregularis) and yoghourts of Danone produced and marketed in Algeria revealed that they belong to the three genus: *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*.

The strains which were related with the two genus: *Streptococcus* (Strp1, Strp2 and Strp3) and *Lactobacillus* (Lb1, Lb2 and Lb3) were identified as being of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. The strains of *Bifidobacterium* (Bif1, Bif2 and Bif3) were related with only one species *Bifidobacterium animalis*.

The sensitivity the strains of *B. animalis* (Bif1, Bif2 and Bif3) to antibiotics was studied. These strains showed a resistance to the streptomycin, gentamicin, acid nalidixic and tetracyclin. On the other hand it also showed sensitivity to spectinomycin, chloramphenicol, rifampicin, erythromycin and vancomycin.

The follow-up of the fermentation of the ewe's milk by *B. animalis* (Bif3) in pure culture and mixed culture in partnership with *Streptococcus thermophilus* (Strp1) and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb1), shows that the growth *B animalis* (Bif3) and the acidification of the ewe's milk is better in mixed culture of that in pure culture. The growth rate of the strain *B animalis* (Bif3) in pure culture was estimated at 0,33 h⁻¹ and in mixed culture was 0,90 h⁻¹.

The study of survival of the strain *B. animalis* (Bif3) in pure culture and mixed culture stored with 6°C during 21 days shows on the one hand that its rate of lethality is less low in the fermented ewe's milk compared with that observed in the fermented skimmed milk in the two cultures and on the other hand its rate of survival and much better in pure culture than in mixed culture in the fermented ewe's milk, where the mean rate of decline of the strain *B. animalis* (Bif3) in pure culture was of -0,06 D⁻¹ and the mean rate of decline in mixed culture was of -0,39 D⁻¹.

Key words: *Bifidobacterium*, probiotic, growth, ewe's milk, fermentation, viability.

الملخص

إن التشخيص المايكرو بيولوجي و البيوكيميائي للسلاسل البكتيرية المعزولة من الحليب المخمر (ACTEVIA Actiregularis) و ياغورت من منتجات Danone المصنعة والمسوقة في الجزائر أظهرت أن هذه الأخيرة تنتمي إلى ثلاثة أجناس من البكتيرات *Streptococcus*, *Lactobacillus* و *Bifidobacterium*.

السلاسل التي تم إنمائها إلى الجنس *Streptococcus* (Strp1, Strp2, Strp3) و *Lactobacillus* (Lb1, Lb2, Lb3) تم التعرف عليها بأنها تنتمي إلى النوعين *Streptococcus thermophilus* و *Lb. delbrueckii subsp bulgaricus*. أما فيما يخص السلاسل (Bif1, Bif2, Bif3) التابعة للجنس *Bifidobacterium* تم التعرف على نوعها والذي هو: *Bifidobacterium animalis*.

إن دراسة حساسية السلاسل (Bif1, Bif2, Bif3) *Bifidobacterium animalis* للمضادات الحيوية أظهرت مقاومة هذه الأخيرة للمضادات الحيوية التالية: streptomycine, gentamicine, acide, nalidixique و tétracycline. بالمقابل أظهرت حساسية لل spectinomycine, chloramphénicol, rifampicine, érythromycine و vancomycine.

إن متابعة تخمر حليب النعجة بالسلسلة Bif3 *Bifidobacterium animalis* بمفردها أو مختلطة مع بكتيرات حمض اللبن Strp1 *Streptococcus thermophilus* و *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* أظهرت أن نسبة النمو للسلسلة Bif3 *Bifidobacterium animalis* والحموضة الناتجة من مزرعة السلاسل المختلطة كانت أعلى مما عليه عند مزرعة السلسلة المفردة. إن نسبة النمو *Bifidobacterium animalis* Bif3 في المزرعة المفردة قدرة بي 0,33 سا⁻¹ و في المزرعة المختلطة قدرة بي 0,90 سا⁻¹.

إن نسبة موت السلسلة Bif3 *Bifidobacterium animalis* في الحليب النعجة المخمر والمحفوظ في درجة 6° فوق الصفر لمدة 21 يوم كانت نوعا ما منخفضة في كلتا المزرعتين (المفردة والمختلطة) مما هو عليه في الحليب منزوع الدسم المخمر. حيث كانت السرعة المتوسطة لموت السلسلة في الحليب النعجة المخمر في المزرعة المفردة مقدرة بي 0,06 - يوم⁻¹ و في المزرعة المختلطة مقدرة بي 0,39 - يوم⁻¹.

كلمات المفاتيح: حليب النعجة، التخمر، الحيوية، *Bifidobacterium*, probiotique.

Liste des Abréviations

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ARN :	Acide Ribonucléique
ATP :	Adénosine Triphosphate
<i>B.</i> :	<i>Bifidobacterium</i>
CCLMAI :	Cultures Collection du Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle
CO ₂ :	gaz carbonique
F6PPK :	fructose-6-phosphokétolase
G+C :	guanine+cytosine
HCl :	Chlorure d'hydrogène
j. :	jours
kDa :	Kilodalton
h :	heure
<i>Lb.</i> :	<i>Lactobacillus</i>
LMAI :	Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle.
min. :	minute
ml :	millilitre
mM :	millimole
mg :	milligramme.
NaCl :	Chlorure de sodium
NaOH :	hydroxyde de sodium
O ₂ :	Oxygène
p/v :	poids/volume
pH :	potentiel d'hydrogène
PM :	pois moléculaire
sp. :	espèce
<i>St.</i> :	<i>Streptococcus</i>
Subsp	sous espèce
ufc :	unité formant colonie
UI :	Unité Internationale
Vol :	volume
°C :	degré celsius
°D :	degré dornique
μ :	micron
μg :	microgramme
% :	pour cent

Liste des tableaux

Tableau 1 : La liste d'espèces du genre <i>Bifidobacterium</i> et leur habitat.	p.9-10
Tableau 2 : Profils fermentaires des carbohydrates des <i>Bifidobacterium</i> .	p.17
Tableau 3 : Les espèces utilisées comme probiotiques.	p.29
Tableau 4 : Composition nutritionnelle de quelques laits fermentés.	p.36
Tableau 5 : Production mondiale en lait de chèvre et lait de brebis en 2005.	p.39
Tableau 6 : La composition moyenne des aliments de base dans lait de chèvre, lait de brebis et dans lait de vache.	p.43
Tableau 7 : Quelques propriétés physiques du lait de chèvre, du lait de brebis et du lait de vache.	p.43
Tableau 8 : La comparaison des caractéristiques physico-chimiques des lipides et des structures de micelle entre le lait de chèvre, le lait de brebis et le lait de vache.	p.44
Tableau 9: Contenu de minéraux et de vitamine du lait de chèvre, lait de moutons et lait de vache. (Quantité dans 100 g).	p.47
Tableau 10 : Résultats des tests enzymatiques et physiologiques des souches de bifidobactérie (Bif1, Bif2 et Bif3).	p.62
Tableau 11 : Résultat du test de fermentation des sucres par les souches de bifidobactérie (Bif1, Bif2 et Bif3).	p.64
Tableau 12 : Le résultat du teste d'antibiogramme des souches de bifidobactérie (Bif1, Bif2 et Bif3).	p.65
Tableau 13 : Résultats des tests enzymatiques et physiologiques des souches <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> .	p.69
Tableau 14: Résultats du profil fermentaire des souches de <i>Streptococcus</i> (Strp1, Strp2 et Strp3).	p.70
Tableau 15: Résultats du profil fermentaire des souches de <i>Lactobacillus</i> (Lb1, Lb2 et Lb3).	p.71
Tableau 16 : caractéristiques physicochimiques du lait de brebis pasteurisé.	p.72
Tableau 17 : Le taux de croissance (μ) de <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bif3) (en culture pur).	p.75
Tableau 18 : Variation du nombre de <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bif3) (en Log ufc/ml) en culture pure dans les laits fermentés de brebis et reconstitué écrémé enrichie conservé à 6°C pendant 21 jours.	p.76

Tableau 19 : La vitesse de déclin (J^{-1}) de <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bif3) dans le lait fermenté de brebis et le lait fermenté écrémé enrichie pendant le stockage à 6°C. (En culture pure).	p.77
Tableau12 : Le taux de croissance (μ) de <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bif3) en culture mixte.	p.77
Tableau 21 : Variation du nombre de <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bif3) (en Log ufc/ml) en culture mixte dans les laits fermentés de brebis et reconstitué écrémé enrichie conservé à 6°C pendant 21jours.	p.80
Tableau 22 : La vitesse de déclin (J^{-1}) de <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bif3) dans le lait fermenté de brebis et le lait fermenté écrémé pendant le stockage à 6°C. (En culture mixte).	p.81

Liste des figures

Figure 1 : Observation microscopique des cellules de <i>Bifidobacterium</i> sp	p.12
Figure 2 : Type de Peptidoglycane des déférentes espèces du <i>Bifidobacterium</i>	p.14
Figure 3 : Représentation schématique de principales étapes de la voie fermentative du glucose chez les <i>Bifidobacterium</i>	p.23
Figure 4 : Démarche scientifique de l'évaluation d'un probiotique	p.28
Figure 5 : Schéma simplifie des différentes étapes d'isolement des <i>Bifidobacterium</i> sp. , <i>St. thermophilus</i> et <i>Lb. delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> des yaourts et des laits fermentés probiotiques	p.50
Figure 6 : L'aspect des colonies de la souche <i>Bifidobacterium</i> Bif3 enssemencé par stries sur milieu TPY gélosé incubées à 37°C pendant 72 heures en anaérobiose	p.59
Figure 7: Les différentes formes de la souche <i>Bifidobacterium</i> Bif3 après coloration de Gram observé sous le microscope avec l'objective à immersion (X 120)	p.60
Figure 8 : Croissance de la souche <i>Bifidobacterium</i> Bif3 sur milieu TPY gélosé incubées à 45°C pendant 48h en anaérobiose	p.61
Figure 9 : Les résultats des tests uréase, indole et gélatinase de la souche <i>Bifidobacterium</i> Bif3 sur la galerie API20E	p.62
Figure 10 : Profil fermentaire de la souche <i>Bifidobacterium</i> Bif3	p.63
Figure 11 : Les résultats du test d'antibiogramme de la souche <i>Bifidobacterium</i> Bif3	p.66
Figure 12 : L'aspect des colonies de la souche Stra1, enssemencé par stries sur milieu M17 gélose incubées à 42°C pendant 48 heures	p.67

Figure 13 : Les différentes formes des souches *Streptococcus thermophilus* (Strp1) (a) et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb1) (b) après coloration de Gram observé sous le microscope avec l'objectif à immersion (X 120). p.68

Figure 14 : Courbe de croissance de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait reconstitué écrémé enrichie et dans le lait de brebis (Incubation à 37°C) p.73

Figure 15 : Cinétique d'acidification et de croissance de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait de brebis (Incubation à 37°C) p.74

Figure 16 : Cinétique d'acidification et de croissance de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait reconstitué écrémé enrichie (Incubation à 37°C) p.74

Figure 17 : Evolution du pH des laits de brebis et écrémé enrichie en fonction de la concentration de l'acide lactique p.75

Figure 18 : Survie de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait fermenté reconstitué écrémé enrichie et le lait de brebis fermenté à 6°C pendant 21 jours p.77

Figure 19 : Courbe d'évolution du pH du lait écrémé et lait de brebis pendant la fermentation par *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (Lb1), *Streptococcus thermophilus* (Strp1) et *Bifidobacterium animalis* à 42°C p.78

Figure 20 : Croissance de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (Lb1), *Streptococcus thermophilus* (Strp1) et *Bifidobacterium animalis* (Bif3) en culture mixte dans le lait de brebis (incubation à 42°C) p.79

Figure 20 : Croissance de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (Lb1), *Streptococcus thermophilus* (Strp1) et *Bifidobacterium animalis* (Bif3) en culture mixte dans le lait de brebis (incubation à 42°C) p.79

Figure 22 : Courbe de croissance de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) en culture mixte dans le lait reconstitué écrémé et le lait de brebis (Incubation à 42°C). p.80

Figure 23 : Survie des bacteries *Bifidobacterium animalis* (Bif3) en culture mixte avec *Streptococcus thermophilus* (Strp1) et *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (Lb1) dans le lait écrémé et le lait de brebis à 6°C pendant 21 jours. p.81

Sommaire

	Pages
Introduction	1
Rappels bibliographiques	
Chapitre I	
1. Les bifidobactéries	4
1.1. Définition et caractéristiques généraux des bactéries lactiques	4
1.2. Les bifidobactéries	5
1.2.1. Taxonomie	5
1.2.2. Ecologie	7
1.2.3. Propriétés phénotypiques	8
1.2.3.1. Morphologie	8
1.2.3.2. La composition de la paroi cellulaire	8
1.2.4. Propriétés physiologique	13
1.2.4.1. Température optimal	13
1.2.4.2. Sensibilité au pH	13
1.2.4.3. Anaérobiose	13
1.2.4.4. Sensibilité aux antibiotiques	15
1.2.5. Besoins nutritionnels	15
1.2.5.1. Besoin en acides aminés et source de carbone	15
1.2.5.2. Besoins en sels minéraux et vitamines	18
1.2.5.3. Les facteurs bifidogènes	18
- Définition	18
- Quelques exemples des facteurs bifidogènes	19
- Détermination génétique de la fermentation des polysaccharides et des oligosaccharides	20
1.2.6. Métabolismes des bifidobactéries	21
1.2.6.1. Métabolismes des carbohydrates	21
1.2.6.2. Activité protéolytique	21
1.2.6.3. Activité uréasique	22
1.2.7. La génétique des bifidobactéries	24
1.2.7.1. Contenu en guanine+cytosine (G+C%)	24

1.2.7.2. Plasmides	24
1.2.7.3. Les séquences d'ADN étudiées	25
<i>Le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S</i>	25
<i>Le gène codant pour la protéine Hsp60</i>	25
<i>L'espace intergénique 16S-23S</i>	26

Chapitre II

2. Les Probiotiques	27
2.1. Définition	27
2.2. Critères de sélection des souches probiotiques destinées à l'homme	28
2.3. Les différentes souches probiotiques appliquées dans l'industrie alimentaire	29
2.4. Les effets bénéfiques des probiotiques	30
2.5. Les laits fermentés	33
2.5.1. Fermentation par les bactéries lactiques	33
<i>Lait fermentés obtenus par action de bactéries lactiques thermophiles</i>	34
<i>Lait fermentés obtenus par action de bactéries lactiques mésophiles</i>	34
2.5.2. Quelques principales valeurs nutritionnelles des laits fermentés	35
2.6. Potentiel d'application des bifidobactéries dans les produits laitiers	37

Chapitre III

3. Lait de brebis	38
3.1. Introduction	38
3.2. Production mondiale du lait de brebis	38
3.3. Caractéristiques physico-chimiques du lait de brebis	40
3.4. Carbohydrates du lait de brebis	40
3.5. Lipides du lait de brebis	40
3.6 Protéines du lait de brebis	41
3.6.1. Les caséines	42
3.6.2. Protéines du petit lait	42
3.6.3. Protéines mineures et composées NPN :	45
<i>Protéines mineures</i>	45
<i>Composés azote non protéique (NPN)</i>	45

3.7. Les peptides bioactives dérivés des protéines du lait de brebis	45
3.8. Activités biologiques des peptides des protéines du lait de brebis	46
3.9. Minéraux et vitamine	47
Matériel et Méthodes	
1. Lieu de l'étude	48
2. Microorganismes	48
3. Lait de brebis	48
4. Les milieux de cultures	48
5. Conditions des cultures	48
6. Isolement et pré-identification des <i>Bifidobacterium</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus delbueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	49
7. Purification	51
8. Identification des bifidobacteries	51
8.1 Tests enzymatiques	51
8.1.1 Test du nitrate réductase	51
8.1.2 Test de la gélatinase, test de production d'indole et test d'uréase	51
8.2 Tests physiologiques	52
8.2.1 Croissance à 45°C	52
8.2.2 Test de croissance en aérobiose	52
8.2.3 Test de Croissance en milieu à pH 4 et à pH 8,5	52
8.2.4 La production de CO ₂ de la fermentation du glucose	52
9. Identification de <i>Lactobacillus</i> et <i>Streptococcus</i>	52
9.1 Croissance à différentes températures	52
9.2 Croissance en bouillon hypersalé	52
9.3 Test de thermorésistance	53
10. Fermentation des sucres	53
11. Test d'antibiogramme pour les <i>Bifidobacterium</i>	53
12. Conservation des souches	53
13. Aptitude technologique des bifidobacteries	54
13.1 Traitement de lait de brebis	54
13.1.1 Pasteurisation du lait de brebis	54
13.1.2 L'analyse physicochimique du lait de brebis pasteurisé	54
La teneur en matière grasse total	54
La teneur en matière sèche totale	54

Matière sèche totale dégraissée	54
La teneur en protéines	55
13.2 Préparation de lait reconstitué écrémé	55
13.3 Préparation d'inoculum	55
13.3.1 Inoculum des bifidobacteries	55
13.3.2 Inoculum des ferments lactiques	55
13.4 Étude de la croissance de bifidobactérie en culture pure dans le lait de brebis et le lait reconstitué écrémé enrichie avec 0,5 % d'extrait de levure et de 0,05% de cystéine-HCl	55
13.5 Détermination de la croissance de bifidobactérie	56
13.6 Détermination du pH au cours de la fermentation	56
13.7 Détermination de l'acidité titrable	56
13.8 Détermination de la survie de bifidobactérie dans du lait de brebis et du lait écrémé enrichie pendant le stockage à 6°C	56
13.9 Étude de la croissance des bifidobacteries en culture mixte avec (<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> et <i>Streptococcus thermophilus</i>) dans le lait de brebis et le lait reconstitué écrémé	57
13.9.1 Préparations des laits fermentés	57
13.9.2 Suivi de la cinétique de croissance de bifidobactérie	57
13.9.3 Suivi de pH au cours de la fermentation	57
13.9.4 Détermination de la survie de bifidobactérie en culture mixte dans les laits fermentés de brebis et écrémé pendant le stockage à 6°C	58
Résultats	
1. Isolement des bifidobacteries	59
1.1. Observation macroscopique des colonies	59
1.2 Observation microscopique	59
1.3 Tests physiologiques et biochimiques	61
Production de CO ₂	61
Croissance à 45°C	61
Activités enzymatiques	62
2. Identification de l'espèce par le profile fermentaire	63
3. Antibiogramme	65
4. Isolement des <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> et <i>Streptococcus thermophilus</i>	67

4.1 Observation macroscopique des colonies	67
4.2 Observation microscopique	67
4.3 Tests physiologiques et biochimiques	68
5. Identification de l'espèce par le profil fermentaire	70
6. Aptitude technologique des bifidobacteries	72
6.1 Résultats de l'analyse physicochimique du lait de brebis pasteurisé	72
6.1 Croissance et cinétique d'acidification en culture pur	72
6.2 Pouvoir tampon du lait de brebis	75
6.3 Survie de <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bif3) en culture pure dans le lait de brebis et lait écrémé	76
6.4 Croissance de <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bif3) et cinétique d'acidification en culture mixte avec <i>Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus</i> (Lb1), <i>Streptococcus thermophilus</i> (Strp1)	77
6.5 Survie de <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bif3) en culture mixte avec <i>Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus</i> (Lb1) et <i>Streptococcus thermophilus</i> (Strp1) dans le lait de brebis et le lait écrémé	81
Discussion	
1. Isolement et identification des bifidobacteries et les ferments lactiques (<i>Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus</i> et <i>Streptococcus thermophilus</i>)	82
2. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bifidobactéries	83
3. Aptitude technologique des bifidobacteries.	83
Etude de la croissance <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bif3) dans le lait reconstitué écrémé enrichie et dans le lait de brebis en culture pure.	84
Etude de la croissance <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bif3) dans le lait reconstitué écrémé et dans le lait de brebis en culture mixte.	86
Etude de la Survie de <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bif3) dans le lait reconstitué écrémé enrichie et dans le lait de brebis pendant le stockage à 6°C en en culture pure.	87
Etude de la Survie de <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bif3) dans le lait reconstitué écrémé et dans le lait de brebis pendant le stockage à 6°C en en culture mixte.	88
Conclusion et perspectives	90
Référence bibliographiques	92
Annexes	

Introduction

Le lait est une boisson de couleur généralement blanchâtre produite par les mammifères femelles. Cette capacité des femelles est une des caractéristiques définissant les mammifères. Le lait est produit par les cellules sécrétrices des glandes contenues dans les mamelles. La fonction première du lait est de nourrir la progéniture jusqu'à ce qu'elle soit sevrée, c'est-à-dire capable de digérer d'autres aliments. Dans la plupart des civilisations humaines, le lait des animaux domestiques (vache, brebis, chèvre, jument, chamelle, dromadaire, bufflonne) est couramment consommé.

Le lait est un liquide blanc mat, légèrement visqueux, dont la composition et les caractéristiques physico-chimiques varient sensiblement selon les espèces animales, et même selon les races. Ces caractéristiques varient également au cours de la période de lactation, ainsi qu'au cours de la traite.

Le lait de brebis a une densité moyenne égale à 1,038. C'est un mélange très complexe et très instable. Il contient une forte proportion d'eau, environ 86 %. Le reste constitue l'extrait sec qui représente 180 g par litre, dont 60 à 70 g de matières grasses (Anifantakis *et al.*, 1980). Les autres composants principaux sont les composants organiques (glucides lactose, lipides, protides, vitamines), les composants minéraux (Ca, Na, K, Mg, Cl) et l'eau.

Le lait de brebis est généralement considéré comme un aliment très complet du point de vue nutritionnel. Il contient en effet presque toutes les vitamines (Vitamine A, Vitamine D, Vitamine B6, Vitamine B12, Vitamine C, Riboflavine, Thiamine, Niacine, Acide Pantothéniques, Acide Folique et Biotine) (Park *et al.*, 2007). La matière grasse du lait de brebis est toutefois riche en d'acides gras à courte et à moyenne chaîne, mais moins d'acides gras à chaîne longue que le lait de vache, ce qui le rend donc plus facile à digérer (Park, 1994).

Les protéines du lait de brebis comptent approximativement 95% d'Azote total et 5% d'Azote non protéique. Cela a un effet positif pour le bon rendement de coagulation fromagère ainsi que d'une bonne texture et structure du yaourt (Park *et al.*, 2007).

Le lait que l'homme traite auprès de nombreuses espèces d'animaux est conditionné ou transformé en produit laitier (lait fermenté, le yaourt, les fromages...) pour la consommation humaine.

Le lait fermenté est consommé depuis des lustres à travers le monde. Selon le type de fabrication et de ferments utilisés, les produits obtenus sont très différents mais le but recherché de la fermentation est toujours le même : la conservation du lait et améliorer son assimilation par l'homme.

Le yaourt (ou yoghourt) est un lait fermenté bien particulier. Il est obtenu par le développement des bactéries lactiques *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, qui doivent être ensemencées simultanément et se trouver vivantes dans le produit fini, à raison d'au moins 10 millions de bactéries par gramme, à la date limite de consommation (Codex Stan 243-2003).

On trouve d'autres types de laits fermentés, Entre autre les bio-yogourts qui sont des laits fermentés a base du lait de vache ou de chèvre ou de brebis ou d'autre lait selon les régions. Fermenter par des bifidobactéries ou /et par les lactobacilles (*Lb. acidophilus* , *Lb. casei*) , souvent en association avec les ferments du yaourt qu'ils lui donnent une saveur assez douce. Ce type de lait fermenté est dans la catégorie des produits probiotiques (Guler-Akın et Akın ,2007).

Les probiotiques sont des microorganismes vivants, qui lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (Guarner et Schaafsma, 1998). En alimentation humaine, les genres microbiens les plus utilisés comme probiotiques sont *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* (Holzapfel *et al.*, 1998 ; Mercenier *et al.*, 2003)

Les bifidobactéries sont des habitants naturels de la flore intestinale humaine. Ces microorganismes sont les bactéries intestinales majeures chez les bébés nourris au lait maternel (Rasic et Kurmann ,1983). Toutes les espèces décrites jusqu'ici sont groupées en six places écologiques différentes: l'intestin humain, la cavité buccale, l'appareil gastro-intestinal animal (GIT), l'intestin d'insecte et les eaux d'égout (Biavati *et al.*, 2000). Les bifidobactéries produisent de l'acide acétique et de l'acide lactique dans un ratio molaire théorique de 3 : 2 en métabolisant une grande variété d'hexoses par le cycle du fructose-6-phosphate (Scardovi, 1986).

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

Aussi, différentes souches sont utilisées comme probiotiques dans l'industrie alimentaire (*Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*) (Mercenier *et al.*, 2003).

Les atouts nutritionnels et thérapeutiques combinés du lait de brebis et des bactéries probiotique du genre *Bifidobacterium* nous ont conduit à l'idée d'élaborés un lait fermenté probiotique (bio-yoghourt) à base de lait de brebis et de *Bifidobacterium* sp probiotique.

Pour atteindre cet objectif, notre travail comporte les étapes suivant :

- L'isolement des *Bifidobacterium* sp., *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

- Evaluer l'aptitude de *Bifidobacterium* à la croissance dans le lait de brebis en culture individuelle (culture pur).

- Evaluer l'aptitude de *Bifidobacterium* à la croissance dans le lait de brebis en association avec les ferment de yaourt (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) (culture mixte).

- Suivi de la survie de *Bifidobacterium* dans le lait fermenté de brebis en culture pure et en culture mixte stocké à 6°C pendant 21jours.

1. Les bifidobactéries

1.1. Définition et caractéristiques généraux des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont constituées d'un groupe hétérogène de Gram positif. Elles se présentent le plus souvent sous la forme de coques ou de bacilles, non sporulés, non mobiles, négatifs à la catalase et dépourvus de cytochrome. Elles sont en outre résistantes à l'acidité et aérotolérantes. Concernant les produits métaboliques, le point commun de ces bactéries lactiques est leur capacité à produire de l'acide lactique suite à la fermentation des glucides. Elles peuvent être homofermentaires (70% du produit métabolique est de l'acide lactique) ou hétérofermentaires (50 % acide lactique complété par d'autres composés tels que l'acide acétique, le CO₂ ou l'éthanol) (Larpent, 1996).

La composition de ce groupe de bactéries, à l'origine étant basé sur descriptions morphologiques et physiologiques, a fréquemment été due discuter aux études phylogénétiques récentes. Les principaux genres qui composaient le groupe des bactéries lactiques étaient les *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pédiococcus* et *Streptococcus*. Avec des révisions et la description taxonomiques de nouveaux genres menant à la liste suivante : *Aerococcus*, *Alloiooccus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Axelsson, 1998).

L'habitat naturel de ces microorganismes inclut l'homme, les animaux et les végétaux. leur longue histoire d'une utilité sûre, généralement désignée sous le nom du statut de GRAS (Generally Regarded As Safe) (Holzapfel *et al.*, 2001), combiné avec une variété d'intérêt des caractéristiques métaboliques a mené à un éventail d'applications industrielles. La saveur, la texture et les qualités de préservation de beaucoup d'aliments fermentés telles que les fromages, les yaourts, les saucisses et les pains (Wood, 1998) sont établies par l'utilisation de l'espèce appartenant à sept genres principaux : *Lactobacillus* (lait, viande, légumes, céréales), *Lactococcus* (lait), *Leuconostoc* (lait, légumes), *Pédiococcus* (légumes, viande), *Oenococcus* (vin), *Enterococcus* (lait) et *Streptococcus* (lait) (Klaenhammer *et al.*, 2002). Bien que n'appartenant phylogénétiquement pas aux bactéries lactiques, aussi les genres *Bifidobacterium*, *Propionobacterium* et *Brevibacterium* sont employés dans les industries

alimentaires parce que quelques souches montrent des propriétés ressemblant aux bactéries lactiques.

1.2. Les bifidobactéries

1.2.1. Taxonomie :

Les bifidobactéries ont été découverts pour la première fois dans les fèces infantiles nourries au lait maternel par Tissier (1900), qui a isolé une bactérie avec une forme étrange et caractéristique de Y et l'a appelée *Bacillus bifidus communis*. Cette bactérie était anaérobie, Gram positive et n'a pas développé de gaz pendant sa croissance.

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

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

Dehnert (1957) décrit l'existence des biotypes multiples des bifidobactéries et a proposé un arrangement pour la différenciation entre les souches basées sur leurs modèles de fermentation d'hydrate de carbone. Durant la même année Cummins *et al.* ont examiné la composition de la paroi cellulaire de plusieurs souches de bifidobactérie et ont conclu que ces bactéries sont différentes de toutes les bactéries Gram positifs précédemment examinées. La classification taxonomique des bifidobactéries était donc à revoir et le sujet a été relancé de nouveau à l'investigation.

En 1963, Reuter a effectué des tests biochimiques et sérologiques sur des souches de bifidobactéries isolées des fèces d'enfants et d'adultes et a proposé l'arrangement suivant pour l'identification de ces bactéries: des bactéries aux formes bacillaires, anaérobie, Gram positif, ressemblaient à des lactobacilles, excepté la variabilité morphologique, elles fermentent le glucose en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique d'un rapport 2:1 et fermentent

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

Scardovi et Trovatelli (1965) et De Vries *et al.* (1967) ont découvert une nouvelle voie de fermentation des hexoses chez les bifidobacteries, qui ne se trouve pas dans aucune des espèces du genre *Lactobacillus*. L'enzyme principale de cette voie est une fructose-6-phosphate phosphoketolase qui clive le fructose-6-phosphate en érythrose-4-phosphate et en acétyl phosphate.

En 1970, Scardovi *et al.* ont commencé à appliquer intensivement le procédé d'hybridation ADN-ADN afin d'évaluer la validité des espèces de bifidobacteries précédemment décrites et pour identifier de nouveaux groupes de séquences ADN homologues parmi les souches qu'ils isolaient dans des diverses niches écologiques. Cette technique d'identification est une avancée significative en bactériologie déterminative et a aidé à résoudre une grande partie de la confusion précédemment rencontrée quand à la différenciation d'espèce de *Bifidobacterium* qui a été faite principalement sur le profil fermentaire d'hydrate de carbone.

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

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

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

Stackebrand *et al.* (1997), par l'analyse de rRNA 16S, ont proposé une structure hiérarchique rassemblant le genre *Bifidobacterium* avec le genre *Gardnerella* dans une seule

famille *Bifidobacteriaceae* dans l'ordre de *Bifidobacteriales*. De nos jours cette famille comporte 6 genres: *Aeriscardovia*, *Alloiscardovia*, *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Parascardovia* et *Scardovia* (Euzéby, 2007).

Avec l'utilisation des techniques de la biologie moléculaire (l'analyse des séquences des ARNr 16S, l'analyse des séquences des gènes codant pour la protéine du choc thermique de 60 kDa (*Hsp60*), contenu G+C d'ADN), on dénombre aujourd'hui 31 espèces de bifidobactéries de diverses origines. La liste des espèces et leurs habitats sont rapportés dans le tableau 1.

1.2.2. Ecologie :

Les bifidobactéries sont des habitants naturels de la flore intestinale humaine. Ces microorganismes sont les bactéries intestinales majeures chez les bébés nourris au lait maternel (Rasic et Kurmann, 1983). *B. breve* et *B. infantis* sont des espèces typiques des bébés nourris au lait maternel ou aux formules lactées pour nourrissons tandis que *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. longum* et *B. pseudocatenulatum* sont présents dans les fèces des nouveau-nés et/ou dans les fèces d'adulte. *B. adolescentis* a été isolée seulement dans les fèces d'adulte.

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

Chez les animaux quelques espèces sont apparemment une présence spécifique. *B. merycicum* et *B. ruminantium* sont isolés des bovins. *B. choerinum*, *B. psychraerophilum* et *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum* sont présents chez les porcs. *B. gallinarum* et *B. pullorum* sont associés aux volailles. *B. cuniculi*, *B. saeculare* et *B. magnum* sont isolés des lapins. *B. asteroides*, *B. coryneforme* et *B. indicum* sont hébergés dans l'intestin des abeilles. En revanche, *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. boum*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B.*

thermophilum sont isolés de diverses espèces animales. *Bifidobacterium tsurumiense* une nouvelle espèce isolée par Okamoto *et al.* , (2008) des plaques dentaires des hamsters nourris durant six semaines avec une alimentation riche en sucres.

Douze espèces de *Bifidobacterium* ont été isolées dans des eaux d'égout et parmi ces derniers *B. minimum* et *B. subtile* n'ont pas été trouvés ailleurs. *B. animalis* subsp. *lactis* est principalement isolé des laits fermentés. *B. thermacidophilum* subsp. *thermacidophilum* isoler des digeste anaérobie. *B. crudilactis* isolé dans le lait cru et des fromages fabriqués au lait cru récemment décrit par Delcenserie *et al.* (2007). Les habitats dans lesquels les bifidobactéries ont été isolés sont énumérés dans le tableau 1.

1.2.3. Propriétés phénotypiques :

1.2.3.1. Morphologie :

Les membres du genre *Bifidobacterium* montrent des formes bacillaires qui développent des ramifications donnant des formes en V, Y, X (Figure 1). Cependant, leur polymorphisme dépend principalement du milieu de culture et des conditions de croissance. Les niveaux de N-acetylglucosamine, qui est impliqué dans la synthèse de peptidoglycanes, affectent l'embranchement des bifidobactéries. Tandis que des niveaux plus bas de N-glucosamine et d'acides aminés produisent la forme plus fortement embranchée, les milieux favorables et riches en éléments de croissance produisent des formes bacillaires plus longtemps. Les colonies constituées par les bifidobactéries sont lisses, convexes, crèmes ou blanches, scintillant et de la régularité molle. Les cellules de *B. angulatum* montrent l'arrangement de V ou de palissade, tandis que les cellules *B. animalis* montrent la portion centrale agrandie. *B. asteroides* exposés des arrangements à la forme étoile peu communs (Shah et Lankaputhra, 2002).

1.2.3.2. La composition de la paroi cellulaire :

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

Tableau 1 : La liste d'espèces du genre *Bifidobacterium* et leur habitat (Selon Biavati *et al.*, 2000, modifié).

nomenclature	référence	Nouvelle nomenclature	référence	Source
<i>B. adolescentis</i>	Reuter (1963).			Fèces d'homme adulte; rumen de bovin; eaux usées; le vagin de la femme.
<i>B. angulatum</i>	Scardovi et Crociani (1974).			Fèces d'homme adulte; eaux usées.
<i>B. animalis</i>	(Mitsuoka, 1969) Scardovi et Trovatelli (1974).	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Masco <i>et al.</i> (2004).	fèces de rat, de poulet, de lapin, de veau et du cochon d'Inde; eaux usées.
<i>B. asteroides</i>	Scardovi et Trovatelli (1969)			Intestin d' <i>Apis mellifera</i>
<i>B. bifidum</i>	(Tissier, 1900) Orla-Jensen (1924).			les fèces de l'homme (nouveau-né et adulte) et de veau d'allaitement ; vagin de la femme.
<i>B. boum</i>	Scardovi <i>et al.</i> (1979).			Rumen de bovin; fèces de porcelet.
<i>B. breve</i>	Reuter (1963).			Les fèces d'enfant en bas âge et de veau d'allaitement ; vagin de la femme; eaux usées.
<i>B. catenulatum</i>	Scardovi et Crociani (1974).			Les fèces de l'homme (nouveau-né et adulte) ; eaux usées.
<i>B. choerinum</i>	Scardovi <i>et al.</i> (1979).			Les fèces de porcelet; eaux usées.
<i>B. coryneforme</i>	(ex Scadovi et trovatelli ,1969) Biavati <i>et al.</i> (1982).			Intestin d' <i>Apis mellifera</i> .
<i>B. crudilactis</i>	Delcenserie <i>et al.</i> (2007).			fromages au lait cru.
<i>B. cuniculi</i>	Scardovi <i>et al.</i> (1979).			Les fèces de lapin.
<i>B. denticolens</i>	Crociani <i>et al.</i> (1996).	<i>Parascardovia denticolens</i>	Jian et Dong (2002).	Carie dentaire de l'homme.
<i>B. dentium</i>	Scardovi et Crociani (1974).			Carie dentaire et cavité buccale de l'homme; fèces d'homme adulte; abcès et appendice.
<i>B. gallicum</i>	Lauer (1990).			Les fèces de l'homme.
<i>B. gallinarum</i>	Watabe <i>et al.</i> (1983).			Caecum de poulet.
<i>B. globosum</i>	(ex Scardovi <i>et al.</i> 1969) Biavati <i>et al.</i> (1982)	<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	Yaeshima <i>et al.</i> (1992).	Les fèces de porc, poulet, taureau, rat, veau et de cochon d'Inde.
<i>B. indicum</i>	Scardovi et Trovatelli (1969).			Intestin d' <i>Apis cerana</i> et <i>A. dorsata</i> .

Tableau 1 : (suit)

nomenclature	référence	Nouvelle nomenclature	référence	Source
<i>B. infantis</i>	Reuter (1963).	<i>B. longum</i> biovar. <i>infantis</i>	Sakata <i>et al.</i> (2002).	Les fèces d'enfant en bas âge et de veau d'allaitement.
<i>B. inopinatum</i>	Crociani <i>et al.</i> (1996).	<i>Scardovia inopinata</i>	Jian et Dong (2002).	Carie dentaire de l'homme.
<i>B. lactis</i>	Meile <i>et al.</i> (1997).	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Masco <i>et al.</i> (2004).	Lait fermenté.
<i>B. longum</i>	Reuter (1963).	<i>B. longum</i> biovar. <i>longum</i>	Sakata <i>et al.</i> (2002).	les fèces de l'homme (nouveau-né et adulte) et de veau d'allaitement ; vagin de la femme; eaux usées.
<i>B. magnum</i>	Scardovi et Zani (1974).			Les fèces de lapin.
<i>B. merycicum</i>	Biavati et Mattarelli (1991).			Rumen de bovin.
<i>B. minimum</i>	Biavati <i>et al.</i> (1982).			Eaux usées.
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Scardovi <i>et al.</i> (1979).			Les fèces d'enfant en bas âge et de veau d'allaitement ; eaux usées.
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	Mitsuoka (1969).			Les fèces de porcelet, veau, rat, lapin et d'agneau d'allaitements; eaux usées; rumen de bovin.
<i>B. psychraerophilum</i>	Simpson <i>et al.</i> (2004)			caecum porcin.
<i>B. pullorum</i>	Trovatelli <i>et al.</i> (1974)			Les fèces de poulet.
<i>B. ruminantium</i>	Biavati et Mattarelli (1991).			Rumen de bovin.
<i>B. saeculare</i>	Biavati <i>et al.</i> (1991).			Les fèces de lapin.
<i>B. scardovii</i>	Hoyles <i>et al.</i> (2002)			Sang humain.
<i>B. subtile</i>	Biavati <i>et al.</i> (1982).			Eaux usées.
<i>B. suis</i>	Matteuzzi <i>et al.</i> (1971).	<i>B. longum</i> biovar. <i>suis</i>	Sakata <i>et al.</i> (2002).	Les fèces de porcelets.
<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i>	Dong <i>et al.</i> (2000).			Digestes anaerobie
<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>	Zhu <i>et al.</i> (2003).			Les fèces de porcelets.
<i>B. thermophilum</i>	Mitsuoka (1969).			Les fèces de porc, poulet et de veau d'allaitement; rumen de bovin; eaux usées.
<i>B. tsurumiense</i>	Okamoto <i>et al.</i> (2008)			la plaque dentaire des hamsters.

Les acides aminés qui composent les bases des tétrapeptides du muréine diffèrent parmi les espèces et/ou les souches de la même espèce, de ce fait permettant leur différenciation (Lauer et Kandler, 1983; Tamime *et al.*, 1995) .

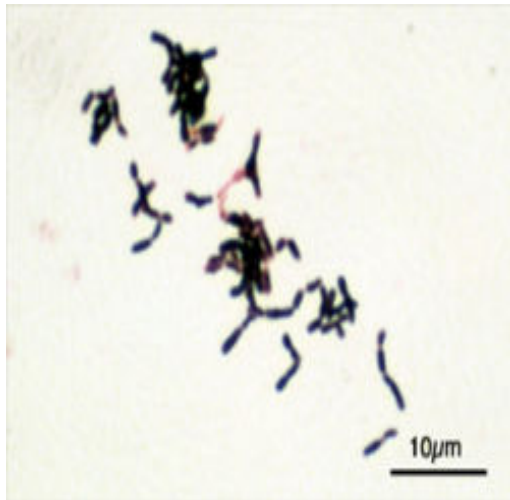
Habituellement, L-alanine, acide D-glutamique, L-ornithine et D-alanine composent les tétrapeptides, mais l'ornithine peut être remplacée par la lysine dans quelques souches (Klein *et al.*, 1998) (Figure 2).

Le glucose et le galactose et souvent le rhamnose sont repérés comme composant des polysaccharides de la paroi cellulaire des bifidobactéries, avec des différences qualitatives et quantitatives parmi l'espèce, les souches et les conditions de croissance (Arunachalam, 1999).

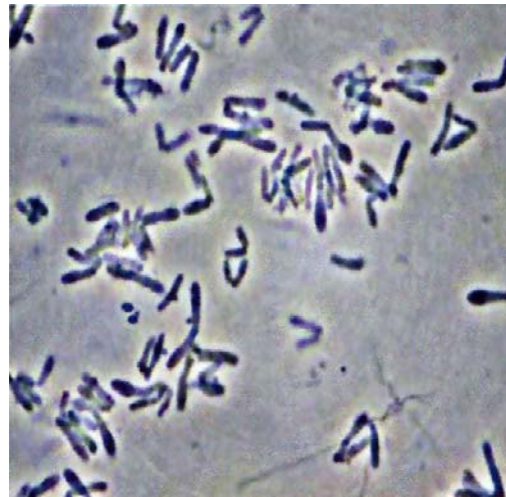
Abbad Andaloussi *et al* (1995) ont décrit que la production des polysaccharides extracellulaires par *B. longum* cultivé dans des milieux lait écrémé et de peptone-levure-lactose peuvent avoir une structure résultant des sous-unités répétées du glucose, du galactose et des un peu d'acides uroniques et d'hexosamines.

Les acides lipoteichoïque forment des liaisons avec des chaînes de polysaccharide sont considérés important pour l'adhérence des cellules à la paroi intestinale. Plusieurs espèces de bifidobactéries ont des lipoglycans de diverses structures, avec L-alanine au lieu de D-isomère habituel (Iwasaki *et al.*, 1990).

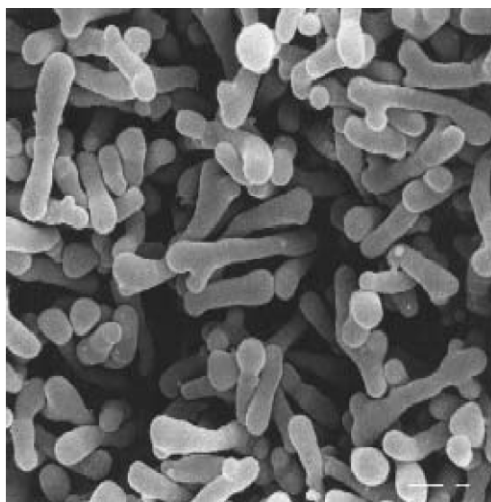
Les études immunochimiques ont indiqué que les acides lipoteichoïques sont un antigène commun dans le genre *Bifidobacterium* ; d'ailleurs, les protéines et les acides lipoteichoïque déterminent le caractère hydrophobe de la surface des bifidobactéries (Op Den Camp *et al.*, 1985). Les études sur la nature des enzymes d'hydrolyses de la paroi cellulaire des espèces de *Bifidobacterium* ont indiqué qu'il y a un nombre différent de telles enzymes variables dans leur poids moléculaire dans chaque souche (Lee et Yoon, 1998).



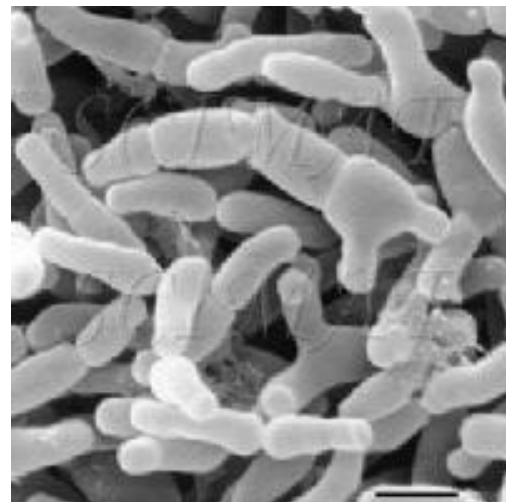
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 1 : Observation microscopique des cellules de *Bifidobacterium* sp.

Observation au microscope optique :

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

(b): *Bifidobacterium animalis* (x500) (Trojanova *et al.*, 2006).

Observation au microscope électronique:

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

(d): *Bifidobacterium breve* (Bar: 1μm). (Anonyme, 2006).

1.2.4. Propriétés physiologique :

1.2.4.1. Température optimal :

La température optimale pour la croissance des bifidobactéries est de 37- 41 °C, alors qu'aucune croissance ne se produit en-dessous de 20 °C et au-dessus de 46 °C, à l' exception de *B. thermophilum*, *B. thermacidophilum* subsp. *Thermacidophilum* et *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum* qui sont capable de croître aux états modérément thermophiles (47°C, 49,5°C et 46,5°C) (Scardovi *et al.*, 1979 ; Dong *et al.*, 2000 ; Zhu *et al.*,2003) et *B. psychraerophilum* cultive à température de 4°C (Simpson *et al.* ,2004).

Les bifidobactéries d'origine humaine révèlent une croissance optimale entre 36°C et 38°C, tandis que les bifidobactéries d'origine animale démontrent une croissance optimale entre 41°C et 43°C. La croissance à 45°C semble distinguer entre les espèces animales et humaines (Shah, 1997 ; Gavini *et al.*, 1991).

1.2.4.2. Sensibilité au pH :

Bifidobactéries sont des micro-organismes non acido-résistants. L'optimum pH est entre 6,5 et 7,0. Aucune croissance n'est enregistrée à pH plus bas que 4,5 et plus fortement qu'à 8,5. Seulement *B. thermacidophilum* subsp. *thermacidophilum* a une croissance retardée à pH 4 (Dong *et al.*, 2000) et *B. animalis* subsp. *animalis* et *B. animalis* subsp. *lactis* peuvent survivre exposer au pH 3,5 pendant 3 heures (Matsumoto *et al.*, 2004).

1.2.4.3. Anaérobiose :

Les bifidobactéries sont anaérobies. Cependant la sensibilité à l'oxygène parmi les espèces diffère selon leur origine, soit humaine ou animale. Les espèces d'origine humaine sont plus sensibles que les espèces d'origine animale. L'exposition à l'air pendant 4 jours à une température de 20°C permet la survie de beaucoup d'espèces d'origine animale (*B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* et *B. thermophilum*) (Beerens *et al.*, 2000). *Bifidobacterium psychraerophilum* cultive faiblement en aérobie (Simpson *et al.* ,2004) et *B. animalis* subsp *lactis* capable de croître en présence d'une concentration d'oxygène. (Meile *et al.*, 1997; Masco *et al.*, 2004).

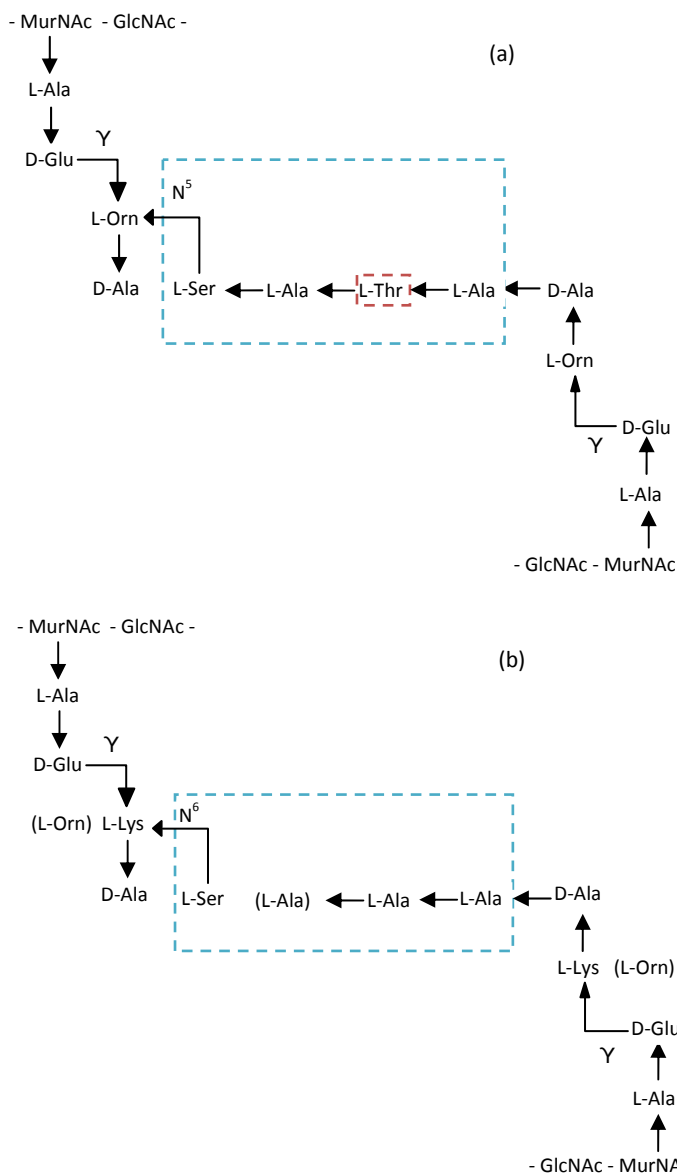


Figure 2 : Type de Peptidoglycane des différentes espèces du *Bifidobacterium* (selon Klein *et al.*, 1998).

(a)- Peptidoglycane type des :
B. longum biovar. *Longum*,
B. longum biovar. *infantis* et
B. longum biovar. *suis*.

(b)- Peptidoglycane type des :
B. animalis, *B. choerinum*, *B. cuniculi*
 et *B. ruminantium*.

L-Ala : L-alanine; L-Orn : L-ornithine;

MurNAc : Acide *N*-acetylmuramique;

D-Ala : D-alanine; L- Thr : L-threonine;

GlcNAc : *N*-acetylglucosamine;

L-Lys : L-lysine; L-Ser : L-serine;

D-Glu : Acide D-glucosamique

1.2.4.4. Sensibilité aux antibiotiques

Les bifidobactéries sont habituellement très sensibles à des antibiotiques de spectre Gram positifs (macrolides, bacitracine, érythromycine, lincomycine, novobiocine, teicoplanine et vancomycine), et les antibiotiques à large spectre (rifampicine, spectinomycine et chloramphenicol) et des bêta-lactames (pénicilline, ampicilline, amoxicilline, piperacilline, ticarcilline et imipenem) (Delgado *et al.*, 2005 ; Moubareck *et al.*, 2005 ; Zhou *et al.*, 2005 ; Masco *et al.*, 2006 ; D'Aimmo *et al.*, 2007). Une sensibilité variable a été constaté pour la tétracycline (Delgado *et al.*, 2005; Masco *et al.*, 2006; Jaana Mättö *et al.*, 2007), la céphalothine (Moubareck *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005) et la cefotetane (Moubareck *et al.*, 2005).

En revanche, la plupart des espèces de *Bifidobacterium* sont résistantes au metronidazole, antibiotiques de spectre des bactéries Gram négatifs (acide fusidique, acide nalidixique et polymyxine B) et aminoglycosides (néomycine, gentamicine, kanamycine et streptomycine) (Charteris *et al.*, 1998; Delgado *et al.*, 2005; Moubareck *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005; Masco *et al.*, 2006 ; D'Aimmo *et al.*, 2007).

Les bifidobactéries sont résistant au mupirocine, un antibiotique qui est étudié pour l'usage dans l'isolement sélectif de ces espèces (Thitaram *et al.*, 2005).

Quelques souches de *Bifidobacterium* ont été considérées comme vancomycine et cefoxitine résistant (Charteris *et al.*, 1998), et d'autres résistants à l'érythromycine, à la clindamycine et à la tétracycline (Delgado *et al.*, 2005 Moubareck *et al.*, 2005; Jaana Mättö *et al.*, 2007).

1.2.5. Besoins nutritionnels :

1.2.5.1. Besoin en acides aminés et source de carbone :

Les bifidobactéries sont des microorganismes aux exigences nutritionnelles élevées. La cystéine et la cystine sont des sources essentielles d'azote pour les bifidobactéries (Ravula et Shah, 1998). Certaines espèces de bifidobactéries peuvent aussi utiliser les sels d'ammonium comme source d'azote (Scardovi, 1986). Ces espèces, lorsqu'elles croissent sans source d'azote organique, rejettent des taux considérables d'acides aminés dans le milieu. Par

exemple, *B. bifidum* peut produire jusqu'à 150 mg/litre de thréonine. En général, les acides aminés les plus souvent produits sont l'alanine, la valine, l'acide aspartique et la thréonine (Matteuzzi *et al.*, 1978).

Ces bactéries ne réduisent pas les nitrates et sont incapables de former de l'indole, de liquéfier la gélatine, de fermenter le glycérol ou d'utiliser les acides aminés, les acides gras et les acides organiques comme sources de carbone. Toutefois, les carbonates ou les bicarbonates sont des sources de carbone utilisées par les bifidobactéries (scardovi, 1986). L'utilisation des hydrates de carbone comme source de carbone varie d'une espèce à l'autre. L'espèce *B. infantis* peut fermenter quatre types de hydrate de carbone alors que l'espèce *B. adolescentis* peut en fermenter plus de 19 (Shah, 1997). Toutes les souches d'origine humaine sont capables d'utiliser le glucose, le galactose, le lactose et généralement le fructose comme source de carbone (Tableau 2).

Tableau 2 : Profils fermentaires des carbohydrates des *Bifidobacterium* sp. (Selon Larpent, 1996).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>B. adolescentis</i>	±	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	±	+	+	+	+	±	+	±	+
<i>B. angulatum</i>	±	+	+	+	+	+	+	-	-	±	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>B. animalis</i>	-	+	+	+	+	+	-	±	±	-	+	±	+	+	+	+	±	+	-	+
<i>B. asteriodes</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	-	±	+	-	+	±	+	±	-	+	-	+
<i>B. bifidum</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	±	-	-	±	-	-
<i>B. boum</i>	-	-	+	-	+	±	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. breve</i>	±	-	+	+	-	+	±	±	±	-	-	+	+	+	+	+	±	+	±	+
<i>B. catenulatum</i>	+	+	+	+	-	+	±	+	-	±	+	-	+	+	+	+	±	+	±	+
<i>B. choerinum</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. coryneforme</i>	-	-	+	+	-	-	N	+	-	+	+	-	+	N	+	+	-	+	-	+
<i>B. cuniculi</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. dentium</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. gallinarum</i>	-	+	+	+	-	+	+	±	±	N	+	±	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>B. globosum</i>	-	±	+	+	+	+	-	-	-	-	±	-	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. indicum</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	±	+	±	+	±	-	+	-	+
<i>B. infantis</i>	-	-	+	+	-	+	±	-	-	-	±	±	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. longum</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	±	±	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. magnum</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. minimum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>B. pseudocatenulatum</i>	±	+	+	+	+	+	-	±	-	±	+	+	+	+	+	+	±	+	-	+
<i>B. pseudolongum</i>	-	+	+	+	+	±	-	±	±	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. pullorum</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>B. subtile</i>	+	-	+	+	+	-	±	-	+	+	-	-	+	+	+	+	±	+	-	±
<i>B. suis</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	±	±	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. thermophilum</i>	-	-	+	-	+	±	±	±	±	-	-	-	+	+	+	+	±	+	-	±

1 : sorbitol ; 2 : L-arabinose ; 3 : raffinose ; 4 : D-ribose ; 5 : amidon ; 6 : lactose ; 7 : inuline ; 8 : cellobiose ; 9 : mélézitose ; 10 : gluconate ; 11 : xylose ; 12 : mannose ; 13 : fructose ; 14 : galactose ; 15 : saccharose ; 16 : maltose ; 17 : tréhalose ; 18 : mélibiose ; 19 : mannitol ; 20 : salicine.
 + : réaction positif ; - : réaction négatif ; ± : variable ; N : non déterminé

1.2.5.2. Besoins en sels minéraux et vitamines :

Les besoins en minéraux ont été étudiés surtout chez *B. bifidum*. Cette espèce a besoin de fer, de magnésium et de manganèse (Bezkorovainy et Topouzian, 1981).

La plupart des espèces de bifidobactéries d'origine humaine sont capables de produire des vitamines telles que la thiamine (B1), riboflavine (B2), pyridoxine (B6), acide folique (B9), cobalamine (B12) , acide ascorbique (C), acide nicotinique (PP) et biotine (H). Toutefois, cette capacité est variable selon les espèces et les souches de la même espèce. *B. bifidum* et *B. infantis* sont des grandes producteurs des vitamines alors que *B. breve* et *B. longum* sont de faibles producteurs et certaines souches de l'espèce *B. adolescentis* ne synthétisant aucune vitamine (Deguchi *et al.*, 1985).

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

1.2.5.3. Les facteurs bifidogènes :

Définition :

Il y a des différences entre les facteurs bifidogènes et les facteurs de croissance pour les bifidobactéries en termes de leur nature et de leur fonction. Les facteurs de croissance sont des composés qui favorisent la croissance des bifidobactéries *in vitro* mais ne peuvent pas être livrés aux grands intestins ou caecum pour favoriser sélectivement la prolifération des bifidobactéries (Modler, 1994). En revanche, les facteurs de bifidogènes sont définis en tant que composés, habituellement à caractère d'hydrate de carbone, qui ne sont pas digérés directement par l'hôte et atteignent le grand intestin ou caecum, où elles sont préférentiellement métabolisées par les bifidobactéries comme source d'énergie.

Les facteurs bifidogènes peuvent être désignés sous le nouveau concept des prébiotiques, qui sont définis en tant qu'ingrédients non digestibles qui affectent avantageusement l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'un, ou un

nombre limité de, des bactéries dans le côlon, et qui peuvent améliorer ainsi la santé d'hôte (Gibson et Roberfroid, 1995).

Quelques exemples des facteurs bifidogènes :

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

La souche *B. bifidum* var. *pennsylvanicus* est reconnue comme un mutant puisqu'elle nécessite un apport exogène de N-acétyl-D-glucosamine pour la synthèse de sa paroi cellulaire (Petschow et Talbott, 1990; Tamura, 1983; Glick *et al.*, 1960). Toutefois, cet apport exogène de N-acétyl-D-glucosamine n'est pas représentatif des autres bifidobactéries. Dans le lait et le colostrum d'origine humaine, d'autres glycoprotéines, telles que le N-acétyl-glycosamine, le N-acétyl-galactosamine et le N-acétyl-mannosamine, ont été identifiées comme étant des facteurs bifidogènes (Modler, 1994).

Le lactulose s'est avéré un facteur efficace pour la croissance de *Bifidobacterium* et il est également appliqué dans une grande variété d'aliment comme facteur bifidogène ou comme ingrédient fonctionnel pour la réglementation intestinale. Le lactulose est aisément métabolisé par toutes les espèces de *Bifidobacterium* qui résident dans la région intestinale humaine. Terada *et al.* (1992), ont étudié l'effet de lactulose sur les *Bifidobacterium*, en administrant de 3 g par jour pendant 2 semaines à des volontaires. Ils ont observé qu'avant la prise du lactulose, le taux de *Bifidobacterium* était 8,3% et pendant la prise de lactulose il a augmenté de 4,7% et après l'arrêt de la prise, il a diminué au niveau initial. De ce fait ils ont démontré l'efficacité de la lactulose pour la prolifération des *Bifidobacterium in vivo*. Des résultats semblables ont été obtenus par Murawaki *et al.*, (2000) en plus de la réduction du taux des *Bacteroides*.

Les fructooligosaccharides (FOS) à chaîne courte, généralement référés comme des neosugars sont métabolisés aux quelques taux inférieurs que le lactulose, mais ces sucres ont des avantages par rapport au lactulose pendant que *Clostridium* et *Escherichia coli* se développent lentement ou pas du tout sur ces FOS. (Mitsuoka *et al.*, 1987).

Parmi les différents types de (FOS) étudié, l'oligofructose, une molécule à chaîne linéaire comportant le glucose et le fructose à un degré de polymérisation de quatre, ont montré l'effet bifidogène le plus élevé (Gibson et Wang, 1994a ; 1994b).

Xylooligosaccharides (par exemple xylobiose) (Okazaki *et al.*, 1990) et transgalactosyleoligosaccharides (par exemple lactosucrose) (Ito *et al.*, 1993) sont également connus en tant que facteur bifidogène efficaces de la prolifération des bifidobactéries intestinal. (Rastall et Gibson, 2002)

Détermination génétique de la fermentation des polysaccharides et des oligosaccharides :

Les espèces de *Bifidobacterium* ont différentes préférences pour fermenter des polysaccharides et ou des oligosaccharides. Par exemple *B. adolescentis* et *B. longum* biovar. *longum* ont la capacité de fermenter les arabinoxylan-oligosaccharides , tandis que le *B. breve* ne peut pas fermenter ces oligosaccharides. Des indications au sujet du potentiel de dégrader des polysaccharides et/ou des oligosaccharides peuvent être obtenues à partir du séquençage du génome de *Bifidobacterium* sp.

Différentes séquences du génome des espèces de *Bifidobacterium* sont complètement déchiffrées, *B. longum* biovar. *longum* NCC2705 (2.3Mb) (Schell *et al.*, 2002) et *B. adolescentis* ATCC15703 (de Mb 2,1) ou en progression, *B. breve* UCC2003 (2.4 Mb), *B. dentium* (2.6 Mb) et *B. longum* biovar. *longum* DJO10A (2.4 Mb). (Van Den Broek et Voragen , 2008)

Les espèces de *Bifidobacterium* contiennent un pourcentage élevé des gènes codés pour les enzymes de modification d'hydrate de carbone comme des glycoside hydrolases et glycoside estérases. *B. longum* biovar. *longum* et *B. adolescentis* contiennent respectivement 4,4 et 4,8% gènes codés pour les enzymes de modification d'hydrate de carbone. Seulement les *Bacteroides* sp. contiennent une quantité plus élevé des gènes codant pour des enzymes de modification d'hydrate de carbone (*B. thetaiotaomicron* 7,8%), tandis que *Clostridium* sp. et *Escherichia coli* ont une quantité inférieure. Ceci indique que des espèces de *Bifidobacterium*

sont très bien équipées pour l'utilisation des polysaccharides et ou des oligosaccharides dans le colon (Van Den Broek et Voragen , 2008).

1.2.6. Métabolismes des bifidobactéries :

1.2.6.1. Métabolismes des carbohydrates :

La voie de fermentation des sucres par les bifidobactéries diffère des bactéries homofermentaires et hétérofermentaires. En effet, celles-ci sont dépourvues des enzymes aldolase et glucose-6-phosphate déshydrogénase qui sont impliquées dans la glycolyse et la voie des hexoses monophosphates .Une voie alternative utilisée pour la dégradation du glucose, implique la fructose-6-phosphokétolase (F6PPK) est une enzyme typique des bifidobactéries. Le dosage de cette enzyme est d'ailleurs à l'origine d'un test d'identification du genre *Bifidobacterium* (Scardovi, 1986), qui est absente chez d'autres bactéries Gram-positives telles que *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium* et *Actinomycetaceae*, qui pourraient être morphologiquement confondus avec les bifidobactéries (Shah et Lankaputhra ,2002).

Cette enzyme scinde le fructose-6-phosphate en acétyl-1-phosphate et en érythrose-4-phosphate. Par la suite, ces métabolites intermédiaires sont transformés en acide acétique et en acide lactique (Figure 3). Les bifidobactéries ne produisent ni l'acide butyrique ni l'acide propionique et le CO₂ est synthétisé seulement lors de la dégradation du gluconate (Scardovi, 1986). En théorie, les bifidobactéries produisent des acides acétique et lactique dans un ratio de 3:2, mais on observe parfois une perturbation de ce dernier. Il arrive que le pyruvate soit clivé en acide formique et en acétyl-1-phosphate plutôt qu'en acide lactique. De plus, l'acétyl-1-phosphate est parfois réduit en éthanol, ce qui génère l'apparition d'acétate, d'acide formique et d'éthanol dans le métabolisme (De Vries et Stouthamer, 1968 ; Ruas-Madiedo *et al.*,2005).

1.2.6.2. Activité protéolytique :

Les *Bifidobacterium* sont comparables aux bactéries lactiques par la présence d'une activité générale d'aminopeptidase, des dipeptidases et probablement iminopeptidases et des tripeptidases (Bockelmann et Fobker, 1991; Eggimann et Bachmann, 1980; Meyer et Jordi, 1987).

Minagawa *et al.* (1985) ont dressé un profil de l'activité des exopeptidases d'extraits cellulaires de cinq souches d'origine humaine. Une forte activité hydrolytique sur les peptides contenant de la leucine, phénylalanine, tyrosine, ou de la valine en position N-terminale a été observée. L'activité enzymatique contre les dipeptides contenant de la proline en position N-terminale serait particulièrement élevée. Cheng et Nagasawa (1984 ; 1985) ont identifié et purifié des exopeptidases, une leucine aminopeptidase et une proline iminopeptidase à partir d'extraits cellulaires de *Bifidobacterium breve*. Desjardins *et al.* (1990) ont détecté une activité leucine aminopeptidase sur la plupart des souches d'origine humaine qu'ils ont testées.

El-Soda *et al.* (1992) ont observé une activité hydrolytique semblable à celle de *Lb. casei* chez certaines espèces de bifidobactéries (*B. infantis*, *B. longum*, et *B. adolescentis*). Ils ont confirmé la présence d'aminopeptidase, d'iminopeptidase et d'une aminopeptidase, dipeptidase, tripeptidase et d'une carboxypeptidase.

Des souches de *Bifidobacterium* (*B. angulatum* ATCC 27535, *B. breve* NCFB 2258 et *B. bifidum* NCFB 2715) ont montré une activité protéolytique faible dans du lait de chamelle non fermenté pendant le stockage à 4°C. Cependant ; cette activité a augmenté brusquement après le 9^e jour jusqu'à la fin de la période de stockage chez toutes les souches excepté *B. breve* NCFB 2258 (Abu-Tarbaoush, 1998)

Une étude réalisée par Shihata et Shah (2000) sur le profile protéolytique des ferments du yaourt (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), *Lb. acidophilus* et des espèces probiotiques de *Bifidobacterium* a démontré que les bifidobactéries ont des niveaux élevés de l'activité intracellulaire d'aminopeptidase mais d'une activité protéolytique très faible comparé de celle des ferments du yaourt.

1.2.6.3. Activité uréasique :

Les souches les plus fréquemment uréolytiques sont celles appartenant à l'espèce *B. suis* (80% des souches sont uréolytiques). Toutes les autres espèces possèdent également des souches uréolytiques sauf *B. cuniculi*. Les bifidobactéries d'origine humaine sont moins souvent uréolytiques (moins de 10 %) (Crociani et Matteuzi, 1982).

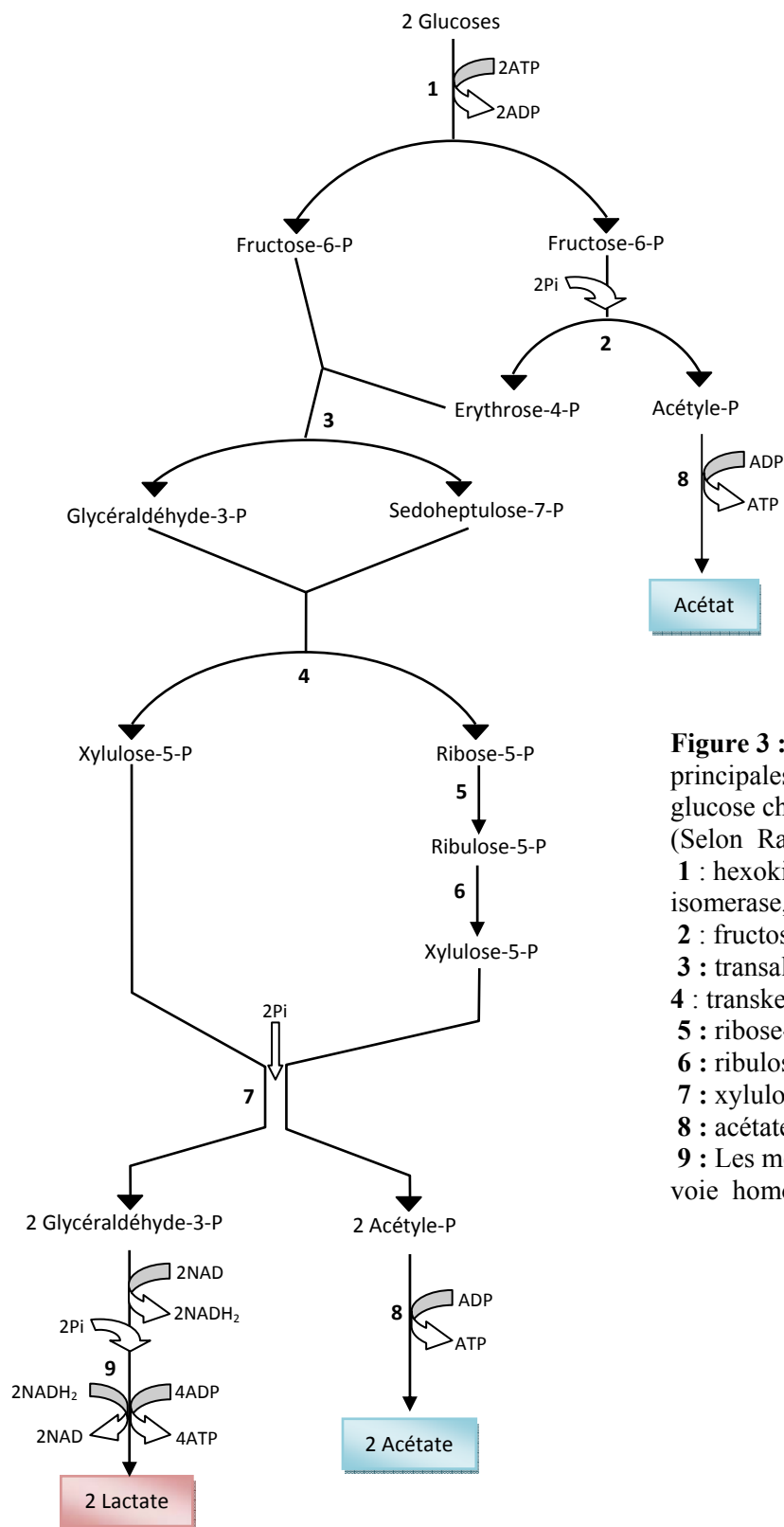


Figure 3 : Représentation schématique de principales étapes de la voie fermentative du glucose chez les *Bifidobacterium*. (Selon Rasic et Kurmann, 1983).

1 : hexokinase et fructose-6-phosphate isomerase,

2 : fructose-6-phosphate phosphoketolase,

3 : transaldolase,

4 : transketolase,

5 : ribose-5-phosphate isomerase,

6 : ribulose-5-phosphate-3-epimerase,

7 : xylulose-5-phosphoketolase,

8 : acétate kinase,

9 : Les mêmes enzymes appliqués dans la voie homofermentative.

1.2.7. La génétique des bifidobactéries :

1.2.7.1. Contenu en guanine+cytosine (G+C%) :

Les bifidobactéries ont un pourcentage en base G+C plus élevé que la plupart des autres espèces bactériennes. Ce taux est en général supérieur à 55% par rapport aux bases A+T. Jian *et al.*, (2001) ont classé les bifidobactéries en 3 groupes : les bifidobactéries riches en G+C (55-67%), les bifidobactéries pauvres G+C (45%) et les bifidobactéries ayant un % G+C intermédiaire (55%). Cette classification a été annulée par (Jian et Dong, 2002) en reclassant *Bifidobacterium inopinatum* et *Bifidobacterium denticolens* dans deux nouveaux genres *Parascardovia inopinata* et *Scardovia denticolens* qui ont respectivement 45% et 55% de contenu G+C.

1.2.7.2. Plasmides :

Un bon nombre de bactéries, incluant celles appartenant au genre *Bifidobacterium* possèdent de l'ADN extrachromosomique. Les plasmides bactériens ne sont généralement pas essentiels pour la survie de la cellule. Par contre, ils peuvent procurer un avantage sélectif à l'hôte pour l'occupation de niches écologiques particulières où, par exemple, les sources énergétiques sont restreintes (voies cataboliques spécifiques) ou encore lorsque la cellule est en présence d'agents sélectifs (résistance aux antibiotiques).

L'analyse des souches de bifidobactéries ont indiqué que les ADN extrachromosomique sont plus rares que chez d'autre espèce de la flore intestinale (Sgorbati *et al.*, 1982; Iwata et Morishita, 1989; Park *et al.*, 1997) , et dans des cas où ils sont présent, leur taille est petit. Néanmoins 10 plasmides de *Bifidobacterium longum* ont été complètement séquencés jusqu'ici: pMB1 (Rossi *et al.*, 1996) , pKJ36 et pKJ50 (Park *et al.*, 1997, 1999) , pBLO1 (Schell *et al.*, 2002) , pNAC1, pNAC2 et pNAC3 (Corneau *et al.*, 2004) , pTB6 (Tanaka *et al.*, 2005) , et pDOJH10S (Lee et O'Sullivan, 2006) , et pB44 (GenBank numéro d'accession NC004443). En outre, cinq plasmides d'autres espèces de *Bifidobacterium* ont été également séquencés: pVS809 de *Bifidobacterium globosum* (Mattarelli *et al.*, 1994) , pCIBb1 (O'Riordan et Fitzgerald, 1999), pNBb1 (GenBank numéro d'accession E17316) du *Bifidobacterium breve* , pAP1 du *Bifidobacterium asteroides* (GenBank numéro d'accession Y11549) et p4M du *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (GenBank numéro d'accession NC003527).

1.2.7.3. Les séquences d'ADN étudiées :

L'étude de la séquence de l'ADN est un bon moyen pour pouvoir identifier une espèce bactérienne, mais aussi pour pouvoir étudier le lien de parenté entre des souches appartenant à une même espèce. En ce qui concerne les bifidobactéries, certaines régions du génome ont particulièrement été étudiées.

Le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S

L'analyse du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (16SrDNA) est un moyen utile pour identifier des relations phylogéniques entre les espèces (Mangin *et al.*, 1996 ; 1999). Le 16SrDNA a été séquencé pour presque toutes les espèces et sous espèces de bifidobactéries. Ce gène est très bien conservé, jusqu'à 99% dans le genre *Bifidobacterium*. En tenant compte de la séquence du 16SrDNA, presque toutes les espèces du genre *Bifidobacterium* et l'espèce *Gardnerella vaginalis* appartiennent à un groupe phylogénétiquement distinct des autres genres (Miyake *et al.*, 1998).

Le gène codant pour la protéine Hsp60

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

Il a été établi que la similitude de séquence est de 99,4 à 100% dans la même espèce, 96% en cas de sous espèces et 73-96% (85% en moyenne) entre les différentes espèces. La similitude entre la séquence du gène *hsp60* de *G. vaginalis* et les séquences de *Bifidobacterium* est de l'ordre de 75%. Cette classification semble être meilleure que la classification par le 16SrDNA car le dendrogramme obtenu est mieux corrélé avec le contenu en G+C. Avec le classement phylogénique basé sur *hsp60*, toutes les bactéries riches en G+C (55-67%) appartiennent au genre *Bifidobacterium*, tandis que les bactéries pauvres et moyennes en G+C (45% *B. inopinatum*, 55% *B. denticolens*) se retrouvent dans deux genres (*Parascardovia inopinata* et *Scardovia denticolens*) (Jian et Dong 2002).

L'espace intergénique 16S-23S

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

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

2. Les Probiotiques

2.1. Définition :

Le terme “probiotique” est un mot relativement nouveau qui signifie “en faveur de la vie” et qui est actuellement utilisé pour désigner des bactéries associées à des effets bénéfiques chez l’homme et les animaux. L’observation originale du rôle positif joué par quelques bactéries sélectionnées est attribuée à Eli Metchnikoff, d’origine russe, lauréat du Prix Nobel qui travaillait à l’Institut Pasteur au début du siècle dernier et qui a suggéré que "la dépendance des microbes intestinaux vis-à-vis des aliments rend possible l’adoption de mesures pour modifier la flore dans nos corps et remplacer les microbes dangereux par des microbes utiles" (Metchnikoff, 1907).

A cette époque, Henry Tissier, pédiatre français, a observé que les selles des enfants souffrant de diarrhée contenaient un petit nombre de bactéries caractérisées par une morphologie particulière en forme de Y. Ces bactéries “bifides” étaient au contraire abondantes chez les enfants sains (Tissier, 1906). A son avis, ces bactéries pourraient être administrées aux patients souffrant de diarrhée pour aider à rétablir une flore intestinale saine.

Ce sont Metchnikoff et Tissier qui ont été les premiers à avancé dans leurs travaux des propositions scientifiques au sujet de l’utilisation probiotique des bactéries, même si le mot "probiotique" n’a été forgé qu’en 1960, pour désigner des substances produites par des microorganismes qui favorisaient la croissance d’autres microorganismes (Lilly et Stillwell, 1965). Afin de souligner la nature microbienne des probiotiques, Fuller (1989) a redéfini le terme comme suit: "Un complément nutritionnel microbien vivant qui a un effet positif sur l’animal hôte en améliorant son équilibre intestinal". Une définition très semblable a été proposée par Havenaar et Huis in 't Veld (1992) "une culture viable composée d’une ou d’un mélange de bactéries qui, lorsqu’elle est appliquée à l’animal ou à l’homme, exerce un effet bénéfique sur l’hôte en améliorant les propriétés de la flore indigène". Selon Guarner et Schaafsma, (1998) les probiotiques sont: "microorganismes vivants, qui lorsqu’ils sont consommés en quantités adéquates, ont un effet bénéfique sur la santé de l’hôte"

2.2. Critères de sélection des souches probiotiques destinées à l'homme :

Les probiotiques doivent être capables d'exercer leurs effets bénéfiques sur l'hôte par leur croissance et/ou leur activité dans le corps humain (Collins *et al.*, 1998; Morelli, 2000). Toutefois, c'est la spécificité de l'action, et non la source du microorganisme, qui est importante. En effet, il est très difficile de confirmer la source d'un microorganisme. Les nourrissons naissent sans aucune de ces bactéries dans l'intestin, et l'origine de la microflore intestinale n'a pas été entièrement élucidée. C'est leur aptitude à rester viables sur le site cible et à être efficaces qui devrait être vérifiée pour chaque souche potentiellement probiotique.

Tsuneo (2002) a proposé les démarches scientifiques nécessaires à la définition et à l'évaluation d'une souche et/ou un aliment probiotique (Figure 4).

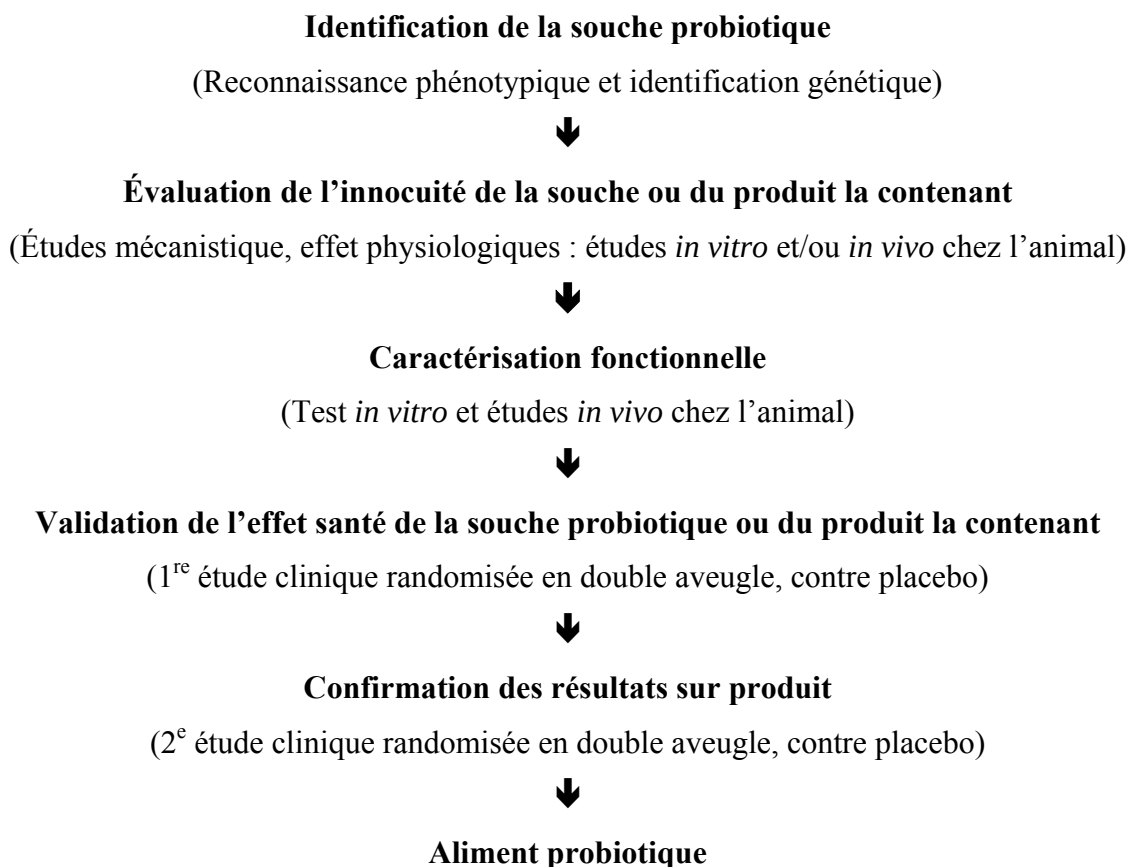
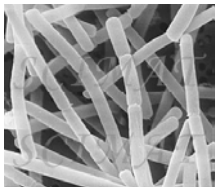
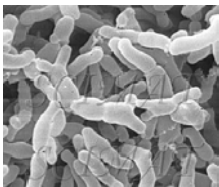
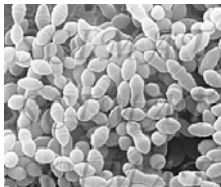
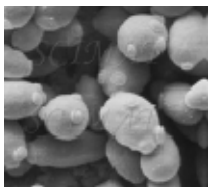


Figure 4 : Démarche scientifique de l'évaluation d'un probiotique
(Tsuneo, 2000)

2.3. Les différentes souches probiotiques appliquées dans l'industrie alimentaire :

Les microorganismes les plus communément utilisés comme probiotiques viennent des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. D'autres souches bactériennes comme les *Enterococcus*, les *Streptococcus* et les *Escherichia* sont aussi utilisées. (Tableau 3)

Tableau 3 : Les espèces utilisées comme probiotiques (Holzapfel *et al.*, 1998; Mercenier *et al.*, 2003)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres bactéries lactiques	Non bactéries lactiques
			
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. amylovorus</i> <i>L. casei</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. gallinarum</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. salivarius</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>breve</i> <i>B. adolescentis</i> <i>B. animalis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>B. lactis</i> <i>B. longum</i>	<i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> <i>Pediococcus</i> <i>acidilactici</i> <i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i>	<i>Saccharomyces</i> sp. <i>Bacillus cereus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Propionibacterium</i> <i>freundenreichii</i> <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> <i>Saccharomyces</i> <i>boulardii</i>

2.4. Les effets bénéfiques des probiotiques :

Un certain nombre d'effets bénéfiques sont réclamées en faveur des produits contenant les microorganismes probiotiques comprenant l'activité antimicrobienne et les infections gastro-intestinales, l'amélioration dans le métabolisme de lactose, les propriétés antimutagène, les propriétés anticarcinogéniques, les propriétés anti-diarrhéiques, la stimulation de système immunitaire, l'amélioration de la maladie inflammatoire des intestin et la suppression de l'infection de *Helicobacter pylori*. Certains des effets sont bien établis, alors que d'autres ont montré des résultats prometteurs chez les modèles animaux. Cependant, des études additionnelles sont exigées chez l'homme pour justifier ces réclamations.

Les effets bénéfiques attribués aux bactéries probiotiques sont détaillés à la souche et pas à l'espèce ou genre spécifique. Il est important de noter qu'aucune souche ne fournira tous les avantages proposés, et non toutes les souches de la même espèce seront efficaces contre des états définis de santé.

La diarrhée d'origine infectieuse est un grave problème sanitaire mondial, responsable chaque année de la mort de plusieurs millions de personnes. Si la majorité des décès se produit parmi les enfants des pays en développement, on estime que jusqu'à 30% de la population même dans les pays développés souffre chaque année de diarrhée d'origine nutritionnelle. Les probiotiques pourraient constituer un important moyen de réduire ces problèmes. L'effet bénéfique de souches définies de probiotiques a parfaitement été démontré à l'aide de *Lactobacillus rhamnosus* GG et *Bifidobacterium lactis* BB-12 pour la prévention (Saavedra *et al.*, 1994; Szajewska *et al.*, 2001) et avec le traitement (Isolauri *et al.*, 1991; Perdone *et al.*, 1999; Guandalini *et al.*, 2000) de la diarrhée aiguë causée principalement par des rotavirus chez les enfants.

Les bifidobactéries produisent les acides organiques et les bactériocines en tant que substances antimicrobiennes qui bloquent la multiplication des bactéries pathogènes et de putréfaction. Quatre-vingt-dix pour cent (90%) des acides organiques produits sont les acides lactiques et acétiques. L'acide lactique produit par les bifidobactéries est uniquement sous la forme L(+). Celle-ci est facilement métabolisée par les enfants, alors que l'acide lactique D(-) produit par *L. acidophilus* et *L. debrueckii* subsp. *bulgaricus* peut causer des acidoses durant les premières années de développement (Rasic et Kurmann, 1983). La formation d'acide

acétique et d'acide lactique tend à diminuer le pH dans l'intestin qui provoque un effet bactéricide ou bactériostatique. *Bifidobacterium* produit diverses bactériocines et substances antibactériennes telles que Bifidolin et Bifilong qui inhibait plusieurs bactéries enteropathogéniques (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*) (Shah, 1999 ; Gopal *et al.*, 2001; Bernet Camard *et al.*, 1997).

Un problème grave associé au traitement antibiotique est l'apparition de la diarrhée, souvent causée par *Clostridium difficile*. Cet organisme n'est pas rare dans un tractus intestinal sain, mais le bouleversement de la microflore indigène par des antibiotiques provoque une augmentation anormale de leur nombre et d'autres symptômes liés à la production de toxines. La raison d'utiliser des probiotiques est nécessaire pour ramener la microflore à un état qui reflète le plus fidèlement la flore normale avant la thérapie antibiotique. Des laits fermentés contenant le *B. longum* est avéré efficace en réduisant le cours de la diarrhée induite par érythromycine. La préparation probiotique contenant 4×10^9 cfu *B. animalis* Bb-12 et *L. acidophilus* La-5 a montré les résultats similaires quand les volontaires ont reçu l'ampicilline avec la préparation probiotique. (Shah, 2006).

Helicobacter pylori c'est un pathogène Gram négatif responsable de la gastrite de type B, d'ulcères peptiques et du carcinoïde gastrique. Les données *in vitro* et sur les animaux indiquent que les bactéries lactiques peuvent inhiber la croissance des agents pathogènes et diminuer l'activité des uréases nécessaire pour que l'agent pathogène reste dans le milieu acide de l'estomac (Midolo *et al.*, 1995; Kabir *et al.*, 1997; Aiba *et al.*, 1998; Coconnier *et al.*, 1998 ; Collado *et al.*, 2005 ; Tabak *et al.*, 2007).

Les maladies intestinales inflammatoires, telles que la pochite et la maladie de Crohn, ainsi que le syndrome du colon irritable, peuvent être causés ou aggravés par des altérations dans la flore intestinale incluant l'infection (Shanahan, 2000). Il y a de nouveaux champs d'investigation, bien qu'il soit prématuré d'affirmer que les probiotiques agissent efficacement dans ces conditions. Selon certaines études, les probiotiques pourraient jouer un rôle dans la thérapie et la prophylaxie et des combinaisons de souches pourraient avoir un rôle à jouer dans le traitement thérapeutique (Gionchetti *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2000 ; Chekroun et Bensoltane , 2007).

Il a déjà été démontré que les microorganismes probiotiques peuvent prévenir ou retarder l'apparition de certains cancers. Cela vient de la connaissance que les membres de la microflore intestinale peuvent produire des cancérogènes tels que les nitrosamines. Par conséquent, l'administration de certaines souches de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sp. pourrait théoriquement modifier la flore, réduisant les niveaux de b-glucuronidase, l'azoreductase, et la nitroreductase responsable de l'activation des pro-carcinogènes et diminuant par conséquent le risque de développement de tumeur (Hosada *et al.*, 1996 ; Yoon *et al.*, 2000).

L'intestin est le plus grand organe immunitaire de l'organisme (60 à 70% du nombre total de nos cellules immunitaires se trouve dans la muqueuse intestinale). Les neurologistes ont également montré que l'on trouverait de cette muqueuse 100 millions de neurones ce qui fait le deuxième cerveau. Enfin, une microflore intestinale considérable et très diversifiée composée de cent mille milliards d'individus et 300 à 500 espèces différentes de bactéries colonisent en permanence les parties distales du tube digestif. Les probiotiques peuvent interagir avec la flore intestinale, les cellules épithéliales intestinales et dans une moindre mesure les cellules immunitaires situées dans la *lamina propria* de l'intestin grêle et du côlon pour les bactéries qui franchissent l'épithélium. Ces interactions conduisent généralement à une stimulation de l'immunité innée et acquise, notamment chez l'individu sain (Heyman et Heuvelin, 2006).

Bifidobacterium sont principalement lancés sur le marché par les produits laitiers fermentés, qui sont bien convenus pour favoriser l'image de santé du probiotique pour plusieurs raisons. Les nourritures fermentées, et les produits laitiers en particulier, ont déjà une image positive de santé, et les consommateurs sont au courant du fait que ces produits contiennent les micro-organismes vivants (Heller, 2001). D'ailleurs, d'un côté l'image des laits fermentés et les yaourts en tant que aliments sains facilite la recommandation de la consommation quotidienne des bifidobactéries, d'un autre côté les bifidobactéries sont protégées par des protéines du lait pendant le passage dans le tractus gastro-intestinal, qui permet de garantir des taux élevés de survie de bifidobactérie à l'arrivée au colon et meilleur effet pour le consommateur (Lönnerdal, 2003).

2.5. Les laits fermentés :

Il existe dans le monde une très grande variété de lait fermenté obtenu principalement à partir de lait de vache; mais aussi de lait de chèvre, de brebis, de bufflesse, d'ânesse et de chamelle (loones, 1994)

La dénomination « lait fermenté » est réservée au produit laitier préparé avec des laits écrémés ou non ou des laits concentrés ou en poudre écrémés ou non, enrichis ou non en constituant du lait, ayant subi un traitement thermique au moins équivalent à la pasteurisation,ensemencés avec des micro-organismes appartenant à l'espèce ou aux espèces caractéristiques de chaque produit. La coagulation ne doit pas être obtenue par d'autre moyen que ceux qui résultent de l'activité des micro-organismes utilisés (Codex Stan 243-2003).

Plusieurs générations de laits fermentés ont été d'écrites (Kurmman, 1993)

- 1^{re} génération (800 av. J.-C. jusqu'à 1900 apr. J.-C.) : la microflore n'est pas définie et la fermentation se déroule de façon non contrôlée.
- 2^e génération (depuis environ 1910) : la microflore est définie et la fermentation maîtrisées.
- 3^e génération (débutée en 1921) : la microflore contient des bactéries sélectionnées, principalement d'origine humaine. Cette génération correspond au début de la reconnaissance de l'effet probiotique.
- 4^e génération (XXI^e siècle) : le perfectionnement recherché au travers de la floreensemencée.

2.5.1. Fermentation par les bactéries lactiques :

Les laits fermentés à l'aide de bactéries lactiques peuvent être classés en deux catégories en fonction des micro-organismes utilisés. Ils peuvent être thermophiles, avec une température optimale de croissance proche de 45°C ou mésophile, avec une température optimale de croissance proche de 30°C.

Lait fermentés obtenus par action de bactéries lactiques thermophiles

C'est dans cette catégorie que se classe le yaourt, qui obtenu par l'activité exclusive de deux ferments lactique associés : *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* qui doivent être ensemencées simultanément et se trouver vivantes dans le produit mis en vente (Codex Stan 243-2003).

D'autres laits fermentés à flore lactique thermophile sont traditionnellement produits dans certains pays, tels que :

- le zabady en Egypte, qui contient les deux souches du yaourt en plus *L. casei*, *L. viridescens*, *L. helveticus* (Abou-Dounia, 1984 ; 2004).
- Le calpis en Japon, produit uniquement à partir de lactobacilles (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. helveticus* var *jugurii*) (Merilainen ; 1984).
- Le dahi en Inde, pouvant contenir outre les ferment du yaourt, de nombreuse autres bactéries, telles que *L. plantarum* (Marshall, 1982 ; Gandhi et Rao 1989).

Lait fermentés obtenus par action de bactéries lactiques mésophiles

Les principales bactéries utilisées sont différentes sous-espèces *Lactococcus lactis* et *Leuconostoc mesenteroides*, plus rarement *Pediococcus acidilactici* (Loones, 1994). Ces laits fermentés sont souvent rencontrés dans les pays scandinaves (*langfil* , *lattfil*) (Marchall, 1982), dans les pays de l'Est (*laktorol*), au Moyen-Orient (*laban*) (Jandal, 1994) ou aux Etats-Unis (*buttermilk*).

Cette classification des laits fermentés selon la température de fermentation est toutefois remise en question par des associations des ferments thermophiles et mésophiles, comme dans le cas du *Kumiss* de Colombie (Loones, 1994).

2.5.2. Quelques principales valeurs nutritionnelles des laits fermentés :

La valeur nutritionnelle des laits fermentés et en particulier les yaourts dépendent de leur composition (Tableau 4). Avec la grande variété des produits, il est donc difficile de généraliser. On peut cependant dire que ces produits associent les qualités nutritionnelles du lait aux propriétés particulières apportées par leurs ferments.

Ils sont riches en protéines (4 à 5 g par pot) et de très bonne qualité nutritionnelle. Ils sont également riches en vitamines du groupe B (B2 et B12 surtout, indispensables notamment au renouvellement des cellules) et apportent aussi de la vitamine A (rôle dans la vision, la protection de la peau) lorsqu'ils ne sont pas totalement écrémés. Mais surtout ils sont riches en calcium (statut osseux). Un yaourt apporte en effet 180 à 200 mg de calcium par pot. Leur contenu en eau n'est pas négligeable (80 %). Leur teneur en matière grasse est plutôt faible mais dépend du lait utilisé : elle peut varier de 0 % (yaourt maigre) à environ 4 % pour un yaourt au lait entier et 7,5 % pour un yaourt au lait de brebis. Le yaourt classique, fabriqué à base de lait 1/2 écrémé est à 1,5 % environ (Tableau 4).

La teneur en glucides des produits est variable. Le yaourt nature classique en apporte environ 6 % alors qu'un yaourt aux fruits et sucré (auquel on a ajouté du saccharose) avoisine les 15 %. La valeur énergétique des produits est donc extrêmement variable selon qu'ils sont allégés, sucrés, édulcorés, enrichis en crème ou en fruits etc. (Tableau 4). A titre de repère : un yaourt nature apporte environ 41,9 kcal/100 g alors qu'un yaourt au lait de brebis peut en apporter le triple (109,5 kcal/100 g).

Tableau 4 : Composition nutritionnelle de quelques laits fermentés (pour 100 g)
(Credoc, 2004).

	Yaourt au lait entier, nature, brassé	Yaourt au lait 1/2 écrémé nature (le classique)	Lait fermenté 0 % nature	Yaourt à boire, au lait 1/2 écrémé aux fruits, sucré	lait entier avec fruits, sucré	Yaourt au lait de chèvre, 1/2 écrémé nature	Yaourt au lait de brebis
Énergie (kcal)	71,4	41,9	37,5	69,2	104	37,5	109,5
Eau (g)	85	89,5	90	85	76,8	90,5	80,9
Protéines (g)	4,6	4	4,4	3	3,5	3,3	4,9
Glucides (g)	5,6	4	4,1	9,5	15	2,7	5,6
Lipides (g)	3,41	1,48	0,06	1,8	3,03	1,5	7,5
Sodium (mg)	68	53	61	35	43	36	150
Magnésium (mg)	11	13	13	10	12	13	16
Phosphore (mg)	95	98	105	82	80	103	140
Potassium (mg)	217	176	182	116	140	159	190
Calcium (mg)	161	142	144	111	110	112	150
Iode (µg)	15	20	20	11	15	*	*
Riboflavine (vit B2) (mg)	0,2	0,25	0,24	0,16	0,18	0,16	0,33
Acide pantothénique (vit B5) (mg)	*	0,42	0,44	0,29	*	*	*
Vitamine B12 (µg)	0,2	0,22	0,29	0,07	0,16	*	0,2
Folates (vit B9) (µg)	*	25	28	28	21	*	5

* : Données manquantes

2.6. Potentiel d'application des bifidobactéries dans les produits laitiers:

L'addition des bifidobactéries au lait fermenté et d'autres produits laitiers est assez nouvelle. En 1968, l'équipe de Schuler-Malyoth *et al.* a été la première à envisager un procédé commercial pour la fabrication de lait fermenté contenant des bifidobactéries. Aujourd'hui sur le marché mondial, on y dénombre plusieurs produits contenant des bifidobactéries, que ce soit sous formes de laits fermentés (Baron *et al.*, 2000), de desserts congelés (Kailasapathy et Sultana, 2003), de fromages (Boylston *et al.*, 2004), des yaourts à boire et congelé (Gilliland *et al.*, 2002), les crème glacé (Godward et Kailasapathy, 2003), etc

Au contraire des levains classiques utilisés dans la production des laits fermentés, les bifidobactéries n'ont pas un rôle dans l'acidification du lait, ou dans la formation de la texture et/ou de la saveur, mais sont pensés pour jouer un rôle de promoteur des bienfaits santé pour le consommateur (Leahy *et al.*, 2005 ; Tannock, 2005).

Les bifidobactéries sont incorporées dans les produits laitiers sous deux formes : soit les laits fermentés où ces bactéries sontensemencées en même temps que les bactéries lactiques, soit les laits fermentés auxquels on ajoute une quantité importante de bifides après la fermentation. Les inoculum de bifidobactéries utilisés pour la fabrication des laits fermentés varient entre 2% et 10% (Kurmman et Rasic, 1991) et peuvent même aller jusqu'à 20% (Goh *et al.*, 1986; Marshall *et al.*, 1982). La survie des bifidobactéries dans un lait fermenté doit être assurée jusqu'à la consommation du produit puisqu'on doit y dénombrer plus de 10^7 bifidobactéries /g pour exercer des effets probiotiques (Ouwehand et Salminen, 1998)

Les souches de *Bifidobacterium* qui sont communément utilisées comme probiotiques pendant quelques années et dont les identités sont documentées incluent dans une certaine mesure, entre autres, *B. breve* Yakult et RO70, *B. lactis* Bb1 2 et HN019, *B. longum* BB-536, SBT-2928 et SBT-2062, *B. bifidum* RO71 et *B. infantis* RO33, *B. lactis* DSM 10140 et Bb12 (Meile *et al.*, 1997) , qui est récemment classé en tant que sous espèce du *B. animalis* (Masco *et al.*, 2004). Les souches de bifidobactérie les plus fréquemment utilisées en production laitiers dans le monde entier sont celles qui appartiennent au *B. animalis* subsp. *lactis* et *B. animalis* subsp. *animalis* (Masco *et al.*, 2005).

3. Lait de brebis

3.1. Introduction :

Les petits ruminants tels que les chèvres et les brebis sont largement répandus dans le monde entier et élevés dans de grands nombres en raison des conditions climatiques difficiles et des terrains montagneux qui favorisent ce type d'animal à d'autre bétail comme les vaches. Le lait de chèvre et de brebis est d'intérêt économique particulier pour certaines régions du monde. Dans les pays en voie de développement, la production de ce type de lait est vue pour être une stratégie utile pour aborder le problème de la sous-alimentation, particulièrement parmi la population infantile (Haenlein, 1996; 2001; 2004). Un élément additionnel d'intérêt pour la production du lait des petits ruminants est le fait que c'est une ressource durable avec d'excellentes possibilités de rentabilité économique et de stabilité démographique dans des zones arides et semi-arides et d'autres régions difficiles de la terre.

Comme est remarqué par Haenlein (1996; 2004), la consommation du lait de brebis et de chèvre, dans certains cas, peut être tout simplement parce que cette forme de lait est la plus disponible au d'autres. Il peut être l'ingrédient principal des aliments particulièrement favorisés (fromage et lait fermenté de chèvre ou de brebis), où sa composition alimentaire peut signifier qu'elle répond à des exigences spécifiques pour les secteurs particuliers de la population.

3.2. Production mondiale du lait de brebis :

Les statistiques publiées par l'Organisation mondiale de l'agriculture et de l'alimentation (FAO, 2005) (Tableau 5) montrent que le lait de brebis et de chèvre représente 4.25% de toute la production laitière du monde (11,8 millions tonnes pour du lait de chèvre et 7,8 millions de tonnes du lait de brebis) avec les plus grandes quantités en Asie. Pour l'Algérie la quantité de lait produite annuellement est de 200,000 tonnes pour le lait de brebis et 160,000 tonnes pour le lait de chèvre (tableau 5).

Tableau 5 : Production mondiale en lait de chèvre et en lait de brebis
(FAO, 2005).

Lait de chèvre		Lait de brebis	
pays	Production (tonnes)	pays	Production (tonnes)
Inde	2.700.000	Chine	1.120.000
Bangladesh	1.416.000	Italie	820.000
Soudan	1.295.000	Turquie	750.000
Pakistan	660.000	Grèce	700.000
France	587.000	Syrie	604.200
Grèce	495.000	Soudan	464.940
Espagne	465.000	Espagne	400.000
Iran	365.000	Iran	380.000
Ukraine	290.000	Romanie	344.000
Russie	259.000	France	264.000
Chine	256.000	Algérie	200.000
Turquie	240.000	Mali	126.000
Mali	238,590	Bulgarie	115.644
Indonésie	220.000	Indonésie	102.000
Algérie	160.000	Portugal	98.000
Mexique	154.478	Mauritanie	96.250
Brésil	135.000	Égypte	93.000
Italie	115.000	Arabie Saoudite	82.500
Mauritanie	109.800	Albanie	76.000
Bulgarie	109.320	Jordanie	65,752
Totale dans le monde	11.879.780	Totale dans le monde	7.815.231

3.3. Caractéristiques physico-chimiques du lait de brebis :

La densité du lait de brebis est plus élevée que celle du lait de chèvre et le lait de vache. De même, le lait de brebis et le lait de chèvre ont une viscosité et une acidité titrable plus élevée, mais un point inférieur d'indice de réfraction et de congélation que le lait de vache. (Parkash et Jenness, 1968; Haenlein et Wendorff, 2006 ; Rouissat et Bensoltane, 2006) (Tableau 7).

Les lipides du lait de brebis et de chèvre ont des caractéristiques physiques généralement plus élevées qu'en lait de vache (Tableau 6) (Anifantakis, 1986; Park, 2006 ; Rouissat et Bensoltane, 2006). Les constituants de saveur en lait de brebis sont semblables entre les trois espèces, mais différent quantitativement au-dessus du lait de vache (Moio *et al.*, 1993).

3.4. Carbohydrates du lait de brebis :

Le lactose est le principal carbohydrate du lait (chèvre, brebis et vache) (tableau 6). Il est synthétisé du glucose dans la glande mammaire avec la participation active de l' α -lactalbumine (Larson et Smith, 1974). Le lactose est un aliment de valeur, parce qu'il favorise l'absorption intestinale du calcium, magnésium et du phosphore, et l'utilisation de la vitamine D (Campbell et Marshall, 1975).

Comme chez la plupart des ruminants, dans le colostrum le lactose dans le lait de brebis est inférieur au début et à la fin de lactation, contrairement au comportement des teneurs en graisse et en protéines du lait (Pulina et Bencini, 2004; Haenlein et Wendorff, 2006).

3.5. Lipides du lait de brebis :

Les lipides sont les composants les plus importants du lait en termes de coût, nutrition et caractéristiques physiques et sensorielles qu'ils donnent aux produits laitiers.

Les triacylglycérols (TAG) constituent le plus grand groupe (presque 98%), y compris un grand nombre d'acides gras estérifiés. En conséquence, la composition des TAG est très complexe. Avec les TAG, la composition en lipides du lait de brebis et du lait de chèvre

présente d'autres lipides simples (diacylglycerols, monoacylglycerols, esters de cholestérol), lipides complexes (phospholipides) et composés liposolubles (stérols, esters de cholestérol, hydrocarbures) (Park, 2006; Haenlein et Wendorff, 2006).

Les lipides sont présents sous forme de globules de moins de 3,5 μm de tailles, qui en lait de brebis et de chèvre sont caractéristiquement abondantes. La taille moyenne des globules de graisse est la plus petite en lait de brebis suivi du lait de chèvre (65% des globules moins de 3 μm) (Mens, 1985) (tableau 8). C'est avantageux pour la digestibilité et un métabolisme de lipide plus efficace comparé à la matière grasse du lait de vache (Park, 1994).

3.6 Protéines du lait de brebis :

La teneur moyenne en protéines dans le lait de brebis (5,8%, p/p) est plus élevée qu'en lait de chèvre (4,6%, p/p) ou lait de vache (3,3%, p/p) (tableau 6). Les teneurs en protéines changent considérablement dans l'espèce, et sont influencées par la race, l'étape de la lactation, l'alimentation, le climat, la mise bas, la saison, et l'état de santé de la mamelle. Le lait de chèvre et de brebis contient environ 0,7 – 1,0% et 0,4 – 0,8% d'azote, respectivement, qui est distribué dans les fractions, dont l'importance change en termes de technologie laitière et nutrition humaine. Les protéines du lait de brebis compte approximativement 95% d'azote total et 5% de azote non protéique (Anifantakis *et al.*, 1980). (Tableau 6)

Le lait de chèvre a le taux le plus élevé d'azote non protéique et moins de azote-caséine que le lait de brebis et de vache. Cela est responsable du bas rendement de coagulation fromagère ainsi que la faible texture et structure du yaourt (Guo, 2003), alors que le lait de brebis a des capacités de coagulation très bonnes (Park *et al.*, 2007; Chougrani *et al.*, 2006 ; 2008).

Les principales protéines du lait de brebis et lait de chèvre sont plus ou moins commune au lait de vache. Les protéines du lait se produisent dans deux phases distinctes. L'une d'eux est la phase micellaire instable composée de micelles de caséines en suspension, avec un diamètre en moyenne de 190 nm. Elles sont liées par le phosphate de calcium et une petite quantité de magnésium, sodium, potassium et citrate, qui permet la diffusion et donne au lait son aspect blanc opaque. L'autre est une phase soluble composée de protéines de petit lait. Les caséines précipitent à pH 4,6 à la température ambiante, tandis que dans les mêmes

conditions les protéines de petit lait (β - lactoglobuline, α -lactalbumine et sérumalbumine) restent solubles (Anifantakis 1986; Juarez and Ramos 1986; Alichanidis et Polychroniadou, 1996; Guo, 2003; Ramos et Juarez, 2003; Tziboula-Clarke, 2003; Haenlein, 2004; Park, 2006).

3.6.1. Les caséines

Les caséines (α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN et K-CN) sont les protéines principales dans le lait de brebis (76 – 83% des protéines totales). L'hétérogénéité des caséines est déterminée par la présence des variantes génétiques ou par d'autres facteurs tels qu'un niveau discret de phosphorylation, la variation de l'ampleur de la glycosylation de la fraction K-CN, et la coexistence des protéines avec différentes longueurs de chaîne (Park *et al.*, 2007).

3.6.2. Protéines du petit lait

Les protéines du petit lait de brebis représentent 17 – 22% des protéines totales. Les protéines principales du petit lait sont la β -lactoglobuline (β -Lg) et l' α -lactalbumine (α - La). Les immunoglobulines, l'albumine de sérum et les protéose de peptones sont présentes dans de plus petites concentrations. Les derniers sont des produits de la dégradation de la β - caséine par la plasmine. Une autre protéine soluble trouvée en petites quantités présente des propriétés antibactériennes est la lactoferrine (Anifantakis, 1986).

Tableau 6 : La composition moyenne des aliments de base dans lait de chèvre, lait de brebis et dans lait de vache (Posati et Orr ,1976 ; Jenness ,1980 ; Larson et Smith ,1974 ; Haenlein et Caccese ,1984; Anifantakis *et al.*, 1980).

Composition	Chèvre	Brebis	vache
Matière grasse (%)	3,8	7,9	3,6
Extrait sec non gras (%)	8,9	12,0	9,0
Lactose (%)	4,1	4,9	4,7
Protéine (%)	3,4	6,2	3,2
Caséine (%)	2,4	4,2	2,6
Albumine, globulin (%)	0,6	1,0	0,6
Azote non protéique (%)	0,4	0,8	0,2
Cendre (%)	0,8	0,9	0,7
Calories/100 ml	70	105	69

Tableau 7 : Quelques propriétés physiques du lait de chèvre, du lait de brebis et du lait de vache (Juarez et Ramos, 1986; Kurkdjian et Gabrielian, 1962; Haenlein et Wendorff, 2006; Jenness *et al.*, 1974).

Properties	Chèvre	Brebis	Vache
Densité	1,029–1,039	1,0347–1,0384	1,0231–1,0398
Viscosité (<i>Cp</i>)	2,12	2,86–3,93	2,0
Tension de Surface (Dynes/cm)	52,0	44,94–48,70	42,3–52,1
Conductivité ($\Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	0,0043–0,0139	0,0038	0,0040–0,0055
Indice de Réfraction	1,450±0,39	1,3492–1,3497	1,451±0,35
point de congélation (-°C)	0,540–0,573	0,570	0,530–0,570
Acidité (acide lactique %)	0,14–0,23	0,22–0,25	0,15–0,18
pH	6,50–6,80	6,51–6,85	6,65–6,71

Tableau 8 : La comparaison des caractéristiques physico-chimiques des lipides et des structures de micelle entre le lait de chèvre, le lait de brebis et le lait de vache.

(Park, 2006; Anifantakis, 1986; Anjaneyulu *et al.*, 1985 ; Remeuf et Lenoir ,1986).

Caractéristiques	Chèvre	Brebis	Vache
Valeurs Physico-chimique			
Matière non saponifiable de matière grasse du lait (%)	0,41±0,02	*	0,41±0,02
Indice d'acidité	0,47±0,02	0,22-0,25	0,48±0,05
Teneur en iode	19–20	20–35	27,09±1,26
Valeur de saponification	228,6±5,24	230–245	232,3±7,61
Fat diamètre des globules de la matière grasse (µm)	3,49	3,30	4,55
Structure des Micelle			
Caséine non centrifugé (% caséine total)	8,7	*	5.7
Diamètre moyen (nm)	260	193	180
Hydrations des micelles (g/g MS)	1,77	*	1,9
Minéralisations des micelles (g/ca/100 caséine)	3,6	3,7	2,9

* : non disponible.

3.6.3. Protéines mineures et composées NPN :

Protéines mineures

Les protéines mineures importantes incluent des immunoglobulines, lactoferrine, transferrine, ferritine, peptone de protéose, calmoduline (protéine liant le calcium) et prolactine etc. les lactoferrines constituent une famille des glycoprotéines homologues actuelles en lait de toutes les espèces des vertébrées (Renner *et al.*, 1989).

Composés azote non protéique (NPN)

L'azote non protéique (NPN) sont des composants qui se trouvent dans le lait de brebis comme dans tous les laits et se composent de : α -amine, urées, créatinines, créatine d'ammoniaque, acide urique, ammoniac.

Les acides aminés libres (FAA) représentent 10 –20% du NPN en lait, et leur concentration est de 5 –8 mg/100 ml (Renner *et al.*, 1989). FAA comprennent principalement les acides aminés non essentiels acide glutamique, glycine, acide aspartique et alanine, alors que les autres acides aminés sont présents comme FAA seulement dans des concentrations très basses (Renner *et al.*, 1989). Parmi les FAA, la taurine et la carnitine, qui ne se produisent pas en tant qu'acides aminés liés aux protéines, sont importantes en raison de leurs fonctions physiologiques essentielles dans le nouveau-né.

3.7. Les peptides bioactives dérivés des protéines du lait de brebis :

L'hydrolyse enzymatique des protéines du lait peut libérer des fragments capables d'exercer des activités biologiques spécifiques, telles que l'anti-hypertension, antimicrobien, opioïde, antioxydant, immunomodulant, ou attaches minérales. De tels fragments de protéine, connus sous le nom de peptides bioactifs, sont formés d'une protéine précurseur inactive pendant la digestion gastro-intestinale et/ou pendant la transformation des produits alimentaires (Korhonen et Pihlanto-Leppala, 2003). En raison de leur polyvalence physiologique et physico-chimique, les peptides du lait sont considérés comme composants fortement proéminent pour la santé favorisant des applications pharmaceutiques ou alimentaires.

3.8. Activités biologiques des peptides des protéines du lait de brebis :

Un certain nombre de peptides avec l'activité opioïde ont été isolés et identifiés des hydrolysats de caséine bovine et/ou de protéines de petit lait avec différentes enzymes. Ces peptides peuvent moduler le comportement social, augmenter le comportement analgésique, prolonger le temps passager gastro-intestinal en empêchant le péristaltisme et la motilité intestinaux, exercer l'action anti-sécrétoire, moduler le transport des acides aminés, et stimuler des réponses endocrines telles que la sécrétion de l'insuline et de la somatostatine (Clare et Swaisgood, 2000). Plusieurs de ces peptides ont également montré des effets inhibiteurs, des effets de prolifération et/ou inducteur d'apoptosis dans différentes lignes de cellules de carcinome (Kampa *et al.*, 1997; Mader *et al.*, 2005).

Il a été clamé que les phosphopeptides de caséine (CPP) peuvent former des sels solubles d'organophosphate et peuvent fonctionner comme porteurs pour différents minéraux, particulièrement le calcium dans l'intestin (Sato *et al.*, 1986). En outre, il a été montré que le calcium lié au CPP peut avoir des effets anticariogéniques en empêchant des lésions de carie par la recalcification de l'émail dentaire, en compétition pour le calcium avec les bactéries de la plaque dentaire (Reynolds, 1987).

Récemment, les études ont centré leur intérêt pour l'identification des peptides dérivés des caséines et des protéines de petit lait avec l'activité antioxydant efficace agissant par différents mécanismes. Ces peptides sont libérés par l'hydrolyse enzymatique (Suetsuna *et al.*, 2000; Rival *et al.*, 2001a ; 2001b; Hernandez-Ledesma *et al.*, 2005) et la fermentation du lait par des bactéries lactiques (Kudoh *et al.*, 2001).

En raison de la grande homologie parmi les séquences des protéines bovines, ovines, et caprines du lait, il serait prévisible que les peptides rapportés en tant qu'agents bioactive et libérés des protéines de bovin soient également dans les protéines du lait de brebis et du lait de chèvre.

3.9. Minéraux et vitamine

Les données concernant la composition du lait de brebis des sels minéraux et des vitamines sont données sous forme de tableau 9. Dans un ensemble de données on remarque que le contenu de minéraux et de vitamine du lait de brebis est la plupart du temps plus élevé qu'en lait de vache.

Tableau 9: Contenu de minéraux et de vitamine du lait de chèvre, lait de moutons et lait de vache (Quantité dans 100 g) (Posati et Orr ,1976; Park et Chukwu ,1989; Jenness ,1980 ; Haenlein et Caccese, 1984 ; Debski *et al.*, 1987 ; Coni *et al.*, 1999; Gebhardt et Matthews ,1991; Park, 2006).

Constituants	Chèvre	Brebis	vache
Minéraux			
Ca (mg)	134	193	122
P (mg)	121	158	119
Mg (mg)	16	18	12
K (mg)	181	136	152
Na (mg)	41	44	58
Cl (mg)	150	160	100
S (mg)	28	29	32
Fe (mg)	0,07	0,08	0,08
Cu (mg)	0,05	0,04	0,06
Mn (mg)	0,032	0,007	0,02
Zn (mg)	0,56	0,57	0,53
I (mg)	0,022	0,020	0,021
Se (µg)	1,33	1,00	0,96
Al (mg)	*	0,05–0,18	*
Vitamine			
Vitamine A (IU)	185	146	126
Vitamine D (IU)	2,3	0,18µg	2,0
Thiamine (mg)	0,068	0,08	0,045
Riboflavine (mg)	0,21	0,376	0,16
Niacine (mg)	0,27	0,416	0,08
Acide Pantothénique (mg)	0,31	0,408	0,32
Vitamine B6 (mg)	0,046	0,08	0,042
Acide Folique (µg)	1,0	5,0	5,0
Biotine (µg)	1,5	0,93	2,0
Vitamine B12 (µg)	0,065	0,712	0,357
Vitamine C (mg)	1,29	4,16	0,94

* : non déterminé.

Matériel et Méthodes

1. Lieu de l'étude :

L'étude s'est déroulée dans le laboratoire de microbiologie alimentaire et industrielle, département de biologie, faculté des sciences, université d'Oran.

2. Microorganismes :

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude ont été isolées des yaourts et des laits fermentés probiotiques (ACTEVIA Actiregularis) de Danone produits et commercialisés en Algérie. Les produits contiennent les ferments lactiques (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) et *Bifidobacterium* sp.

Les souches de références utilisées sont : *Bifidobacterium animalis* LMAI, *Streptococcus thermophilus* LMAI et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LMAI qui proviennent des Cultures Collection du Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle (CCLMAI).

3. Lait de brebis :

Le lait de brebis cru provient des petites fermes situées dans la région Ouest d'Algérie (Ain-Temouchent). La traite du lait a été faite dans des conditions aseptiques (mains, mamelle et le pis lavés à l'eau de javel). Le lait est recueilli dans des flacons de 250 ml stériles et transporté au laboratoire dans une glacière à température 4°C.

4. Les milieux de cultures :

Les milieux de cultures utilisés lors de l'étude sont le TPY (Scardovi, 1986), MRS (De Man *et al.*, 1960) et M17 (Terzaghi et Sandine, 1975) en bouillon et en gélose (voir l'annexe).

5. Conditions des cultures :

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

Réductions des milieux :

Tous les milieux et solutions utilisées pour cultiver les souches de bifidobactérie sont additionnés 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).

Régénération des milieux :

Les milieux, juste avant leur utilisation, sont dégazés par ébullition à 100°C dans un bain-marie pendant 20 min. L'ébullition assure la diminution de la solubilité des gaz avec l'augmentation de la température, le départ de l'oxygène (et des autres gaz de l'air).

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.

6. Isolement et pré-identification des *Bifidobacterium*, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* :

A partir d'un ml de lait fermenté probiotique (et du yaourt) bien homogénéisés nous avons réalisé une série de dilution décimale dans une solution Ringer (1/4) (Ringer-cystéine pour les bifidobactéries) (Martin-Diana *et al.*, 2003)(voir l'annexe). Cent microlitres des dilutions (10⁻⁵, 10⁻⁶ et 10⁻⁷) sont ensemencés sur les milieux TPY, MRS et M17. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48 à 72 heures en anaérobiose pour *Bifidobacterium*, en anaérobiose enrichie en CO₂ pour *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et en aérobie pour *Streptococcus thermophilus*. Ensuite, on prend de chaque boîte 10 colonies isolées de forme caractéristique sur lesquelles sera effectuée une coloration de Gram (voire l'annexe) et une recherche de la catalase (voire l'annexe). Les bactéries aux formes bacillaires polymorphes à Gram-positive et catalase-négatif sont retenues et repiquées sur le bouillon TPY. Les bactéries aux formes bacillaires régulières à Gram-positive et catalase-négatif sont repiquées sur le bouillon MRS. Les bactéries aux formes de coque Gram-positive et catalase-négatif sont repiquées sur le milieu M17. (Figure 5)

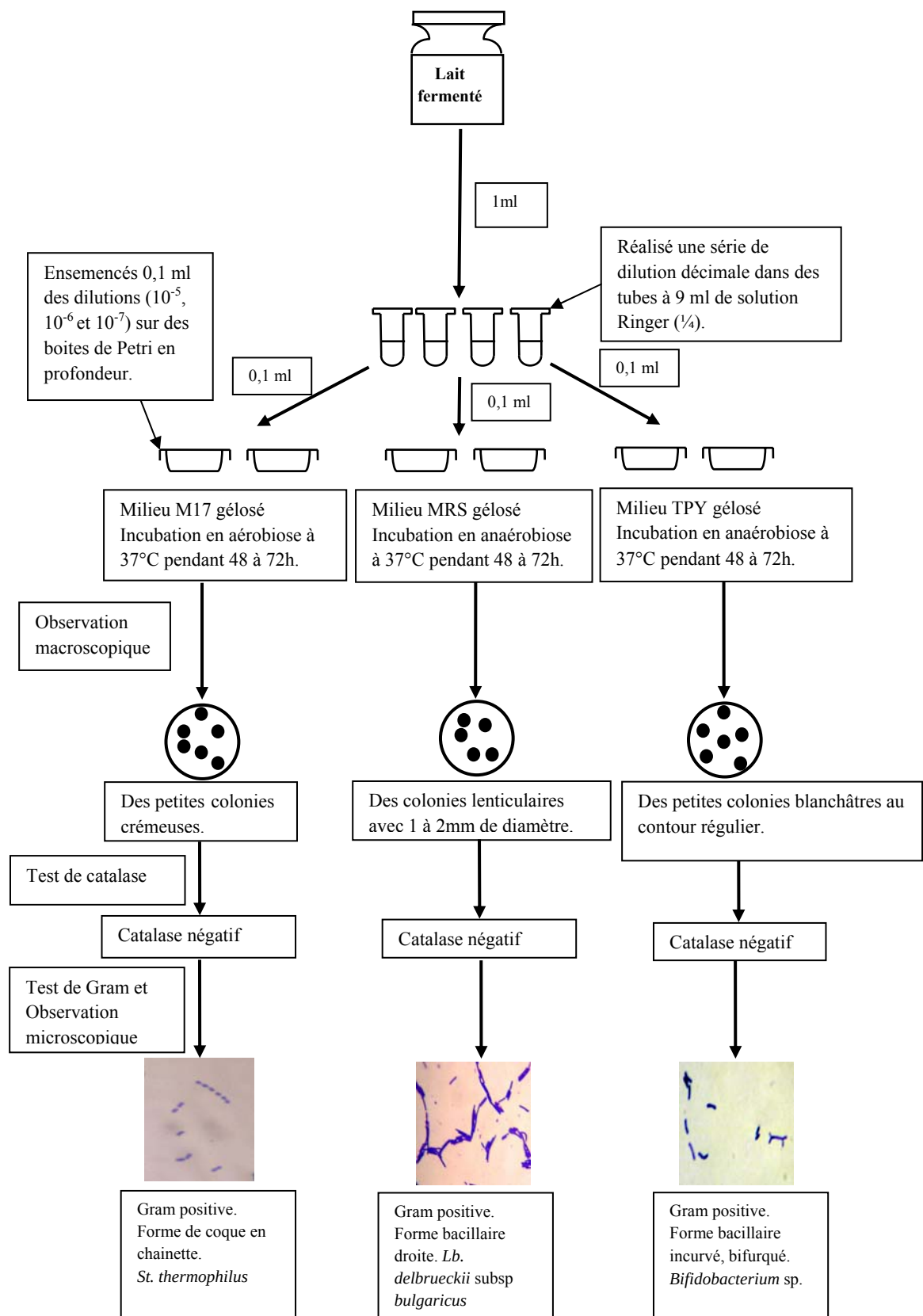


Figure 5 : Schéma simplifié des différentes étapes d'isolement des *Bifidobacterium* sp. , *St. thermophilus* et *Lb. delbrueckii* subsp *bulgaricus* des yaourts et des laits fermentés probiotiques.

7. Purification :

A partir des cultures des bouillons TPY, MRS et M17 nous avons effectué une série de repiquage sur les milieux TPY, MRS et M17 gélosés pour but d'avoir des cultures pur. L'opération est renouvelée en prenant chaque fois au hasard une colonie isolée. Ceci conduit à obtenir une culture dont la pureté est estimée par observation microscopique après coloration de Gram.

8. Identification des bifidobactéries :

8.1 Tests enzymatiques :

8.1.1 Test de la nitrate réductase : (Marchal *et al.*, 1991)

Les souches de bifidobactérie ont été ensemencés 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.

8.1.2 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 sa, France) (voir l'annexe). Nous avons préparés une suspension dense d'une culture de bifidobactérie et on l'a ensemencé 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.

8.2 Tests physiologiques :

8.2.1 Croissance à 45°C :

Les souches de bifidobactéries ont étéensemencées sur le milieu TPY gélose et incubées à 45°C pendant 48h en anaérobiose.

8.2.2 Test de croissance en aérobie :

Nous avons préparé une culture sur le milieu TPY gélosé pour les souches de bifidobactérie et ont été incubées à 37°C en aérobie pendant 72 h.

8.2.3 Test de croissance en milieu à pH 4 et à pH 8,5 :

Ce test a été réalisé sur milieu TPY liquide à pH 4 et à pH 8.5. Ensuite, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 48h en anaérobiose.

8.2.4 La production de CO₂ de la fermentation du glucose : (Garvie, 1984)

Pour déterminer la production de CO₂ de la fermentation de glucose par les souches de bifidobactérie, nous avonsensemencé des colonies d'une culture pure dans le bouillon TPY contenant une cloche de Durham et incubé à 37°C pendant 24h en anaérobiose. La présence de gaz dans la cloche indique qu'il y a production de CO₂.

9. Identification de *Lactobacillus* et *Streptococcus* :

9.1 Croissance à différentes températures :

Les souches ont étéensemencées dans des tubes contenant le bouillon MRS pour les *Lactobacillus* et bouillon M17 pour les *Streptococcus*. Une série de tubes du MRS et du M17 ont été incubés à 45°C pendant 48h et l'autre série de tubes ont été incubés à 15°C pendant 7 à 10 jours.

9.2 Croissance en bouillon hypersalé

Des souches de *Streptococcus* et des souches de *Lactobacillus* ont étéensemencées dans des tubes contenant le bouillon M17 et MRS additionnés de 65g/l de NaCl et incubées à 37°C pendant 48h.

9.3 Test de thermorésistance :

Les souches de *Streptococcus* ont été ensemencées dans des tubes contenant le bouillon M17 et mise dans un bain-marie (Memmert, Germany) à 63,5°C pendant 30 minutes. Ensuite ont été incubées à 37°C pendant 24 h.

10. Fermentation des sucres :

Plusieurs colonies isolées d'une culture pure ont été repiquées dans 5ml de milieu liquide, incubé à 37°C pendant 24 h. La culture a été centrifugée à 3100 T/mn pendant 10 minutes (centrifugeuse Jouan B3.10, France), lavée deux fois avec 2 ml solution Ringer (¼) (Ringer-cystéine-HCl pour les bifidobactéries). En suit, le culot a été suspendu dans 1 ml de la même solution. Cinquante microlitre de la suspension a été inoculer dans 5 ml de milieu liquide dans lequel on avait additionnés des sucres a testés (raffinose, ribose, sorbitol, arabinose, amidon, lactose, mélézitose, saccharose, maltose, inuline, cellobiose, mélibiose, tréhalose, salicine, mannitol, xylose, fructose, mannose, dextrine, galactose, glycérol, lévulose) avec une concentration finale de 2 % (p/v). Les tubes ont été recouverts avec 1 ml de l'huile de paraffine stérile pour obtenir l'anaérobiose et incubé à 37°C pendant 24 à 48 h. La fermentation des sucres a été révélée par l'addition d'un indicateur coloré de pH (pourpre de bromocrésol à 0.004% (p/v)).

11. Test d'antibiogramme pour les bifidobactéries : (Scardovi, 1986)

Le test d'antibiogramme a été réalisé par la technique de diffusion en milieu TPY gélosé, en utilisant des disques imprégnés d'antibiotique (Cefalotine (30µg), Acide nalidixique (30µg), Spectinomycine (100µg), Gentamicine (10µg), Vancomycine (30µg), Erythromycine (15UI), Streptomycine (10UI), Tétracycline (30UI), Rifampicine (30 µg), Acide oxolinique (10µg), Chloramphénicol (30µg), Ampicilline (10µg)) (Sanofi Diagnostics, Pasteur, France). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h en anaérobiose. La détermination de la sensibilité et la résistance des bactéries s'effectuent par la mesure des diamètres de la zone d'inhibition apparue (voir l'annexe).

12. Conservation des souches :

Les souches sont cultivées sur leurs milieux gélosés inclinés à 37°C pendant 48h. Ensuite les tubes sont conservés à 4°C. Les cultures sont repiquées toutes les deux semaines.

La conservation des souches à long terme fut préparée en ajoutant à une culture jeune du glycérol à 20% et d'une solution de lait écrémé à 20% dans des rapports d'un 2:5:5. Le

mélange fut ensuite congelé à -20°C. Avant toutes utilisations des souches, une culture congelée était réactivée et repiquée sur son milieu à 37°C pendant 2 nuits successives. (Bolduc *et al.*, 2006).

13. Aptitude technologique des bifidobactéries :

13.1 Traitement du lait de brebis :

13.1.1 Pasteurisation du lait de brebis :

Le lait de brebis a été pasteurisé à 85°C pendant 30 min dans un bain-marie (Memmert, Germany) et rapidement refroidi à 4°C jusqu'à ce qu'il soit inoculé (Papadimitriou *et al.*, 2007).

13.1.2 L'analyse physico-chimique du lait de brebis pasteurisé

Les paramètres qui ont été analysés sont :

La teneur en matière grasse totale :

La teneur en matière grasse totale est déterminée par la méthode de van Gulik (Schwarz *et al.*, 1950) (voir l'annexe).

La teneur en matière sèche totale :

La teneur en matière sèche totale est déterminée par l'étuvage à une température de 105°C pendant 24h (AOAC, 1984). La teneur en matière sèche totale (MST) est calculée comme suit : $MST = [(P_0 - P_1) \times 100] / V$.

Où : P_0 est le poids de la capsule avec l'échantillon séché. P_1 est le poids de la capsule vide. V est le volume (ml) de la prise d'essai.

Matière sèche totale dégraissée :

La Matière sèche totale dégraissée est calculée en appliquant la formule suivante :

$$MSTD = MST - MG.$$

Où : MSTD est la matière sèche totale dégraissée. MST est la matière sèche totale. MG est la matière grasse totale.

La teneur en protéines :

Ce dosage a été fait par la méthode de Kjeldahl on multipliant le taux de l'azote total (N) par le facteur 6,38 (% de protéine total = % de l'azote total x 6,38) (AOAC, 1990). (Voir l'annexe).

13.2 Préparation de lait reconstitué écrémé :

Du lait reconstitué écrémé a été préparé en dissolvant de la poudre du lait écrémé (La Paulina, Molino, Argentina) dans l'eau distillé à 10% (p/v) et autoclavé à 110°C pendant 10 min (Martin-Diana *et al.*, 2003).

13.3 Préparation d'inoculum :

13.3.1 Inoculum des bifidobactéries :

Des colonies isolées sur le milieu TPY agar ont été transférées sur le bouillon TPY et incubées à 37°C pendant 24h. Deux millilitres de cette suspension ont été ensemencés 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, suivi d'une préculture dans du lait de brebis pasteurisé afin de bien adapter les bifidobactéries à ce lait. La préculture est incubée à 37 °C pendant 18h pour être utilisée comme inoculum.

13.3.2 Inoculum des ferments lactiques :

Des cultures jeunes des souches de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* ont été repiquées dans le lait reconstitué écrémé. Suivi d'une préculture dans le lait de brebis pasteurisé.

13.4 Étude de la croissance de bifidobactérie en culture pure dans le lait de brebis et le lait reconstitué écrémé enrichie avec 0,5 % d'extrait de levure et de 0,05% de cystéine-HCl :

Deux flacons de 200 ml pour chacun des laits ont été inoculés à 3 % d'inoculum précédemment préparé, en suite après une légère agitation, les laits ont été aseptiquement répartis dans des tubes stériles à raison de 10 ml chacun et incubés à 37°C pendant une durée allant de 0 à 24h en anaérobiose.

13.5 Détermination du taux de croissance de bifidobactérie :

La cinétique de croissance de bifidobactérie a été étudiée dans le lait de brebis et le lait reconstitué écrémé enrichie. Les prélèvements ont été effectués au moment d'inoculation et après 3, 6, 9, 14, 18 et 24 heures, en employant des dilutions décimales périodiques préparées dans une solution de Ringer (1/4)- cystéine. Cent microlitres des dilutions de 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} pour les périodes (0, 3, 6 et 9h), de 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} pour les périodes (14, 18 et 24h) ont été ensemencé sur TPY agar en double pour chaque dilution et incubé à 37°C pendant 72 h. seul les boîtes qui contiennent entre 30 et 300 colonies sont retenu 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 .

13.6 Détermination du pH au cours de la fermentation :

Les niveaux de pH ont été mesurés pendant la fermentation à 0 h, 3h, 6h, 9h, 14h, 16h, 18h et 24h, à l'aide d'un pH-mètre (Inolab pH Level1 WTW, Germany) numérique, qui a été calibrée en utilisant les tampons de pH 4,00 et de pH 7,00.

13.7 Détermination de l'acidité titrable :

L'acidité produite pendant la fermentation a été titrée à 0 h, 3h, 6h, 9h, 14h, 16h, 18h et 24h. A partir d'échantillons fermentés 10 ml est placé dans un bêcher de 100 ml en présence de 0,1 ml de phénolphtaléine à 1% dans l'alcool à 95%. De la soude N/9 est ajoutée à la burette jusqu'au virage au rose de l'échantillon (la couleur doit persister au moins 10 secondes). L'acidité est exprimée en degré Dornic (D°) qui correspond au nombre de 1/10 de ml de soude Dornic N/9 nécessaires pour assurer la neutralisation totale de l'acide. Acidité en D° = le volume de NaOH x 10. ($1D^\circ = 0,1$ g d'acide lactique dans 1 Litre de lait.) (Guiraud, 1998).

13.8 Détermination de la survie de bifidobactérie dans du lait de brebis et du lait écrémé enrichie en culture pur pendant le stockage à 6°C :

La viabilité de bifidobactérie a été étudiée dans le lait de brebis et le lait écrémé enrichie dans à 6°C. Des cultures de bifidobactéries incubées durant 24h à 37°C ont été stockées à 6°C pour des périodes de 7, 14 et 21 jours. Le dénombrement a été fait sur des boîtes de TPY avec les dilutions 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} .

La vitesse moyenne de déclin de bifidobactérie pendant le stockage a été calculée comme suit :

$VD_7 = (\log_{10} X_7 - \log_{10} X_0) / 7 \text{ jours.}$

$VD_{14} = (\log_{10} X_{14} - \log_{10} X_7) / 7 \text{ jours.}$

$VD_{21} = (\log_{10} X_{21} - \log_{10} X_{14}) / 7 \text{ jours.}$

$VMD = (VD_7 + VD_{14} + VD_{21}) / 3.$

Où X_0 , X_7 , X_{14} et X_{21} sont le nombre des colonies (cfu.ml^{-1}) à temps t_0 , t_7 , t_{14} et t_{21} .

VD_7 , VD_{14} et VD_{21} sont les vitesses de déclin entre (0-7 jours), (7-14 jours) et (14-21 jours).

VMD c'est la vitesse moyenne de déclin en jours^{-1} (J^{-1}).

13.9 Étude de la croissance des bifidobactéries en culture mixte avec (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) dans le lait de brebis et le lait reconstitué écrémé :

13.9.1 Préparations des laits fermentés :

Le lait de brebis et le lait reconstitué écrémé ont été inoculés par 3% d'inoculum de bifidobactérie et 1% d'inoculum de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et 1% d'inoculum de *Streptococcus thermophilus*. Les laits ont été incubés à 42°C jusqu'à l'obtention un pH compris entre 4,2 et 4,7 (pH d'un lait fermenté).

13.9.2 Suivi de la cinétique de croissance de bifidobactérie :

Les souches de bifidobactérie, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* ont été dénombrées respectivement sur leur milieux suivant : BEE (Beerens, 1990), MRS pH 5, 2 (Shah, 2000) et M17. L'énumération des colonies a été faite au moment de l'inoculation, après 2h, 4h et après 6h. L'incubation a été faite à 37°C pendant 48h en anaérobiose pour les bifidobactéries, anaérobiose enrichie en CO_2 pour les *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et aérobie pour *Streptococcus thermophilus*.

13.9.3 Suivi de pH au cours de la fermentation

Les niveaux de pH ont été mesurés pendant la fermentation à l'aide d'un pH-mètre (Inolab pH Level1 WTW, Germany).

13.9.4 Détermination de la survie de bifidobactérie en culture mixte dans les laits fermentés de brebis et écrémé pendant le stockage à 6°C

Lait de brebis et le lait reconstitué écrémé inoculés par les bifidobactérie, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* après 4h d'incubation à 42°C ont été stockées à 6°C pour des périodes de 7, 14 et 21 jours. Le dénombrement de ces bactéries a été faite au cours de ces périodes.

Résultats

1. Isolement des bifidobactéries.

1.1. Observation macroscopique des colonies :

L'observation des colonies des souches de bifidobactérie (Bif1, Bif2 et Bif3) (figure 6) isolées du lait fermenté (ACTEVIA Actiregularis de Danone) cultivées sur milieu TPY gélosé pendant 72h en anaérobiose nous montrent des petites colonies blanchâtres (de 1 à 1,5 mm) au contour régulier.

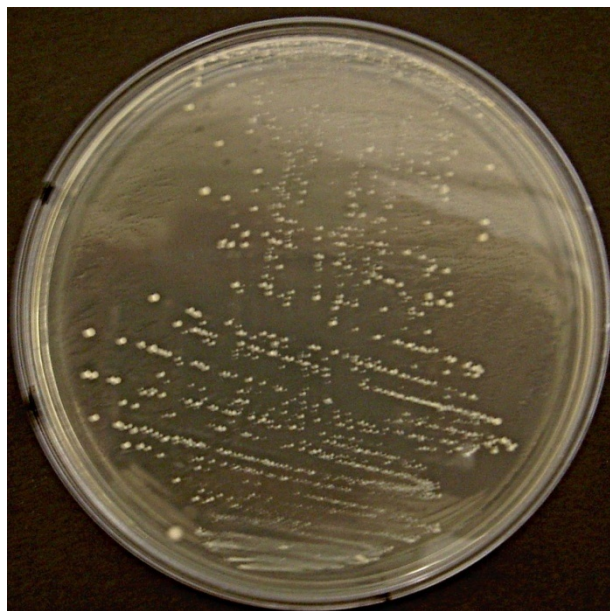
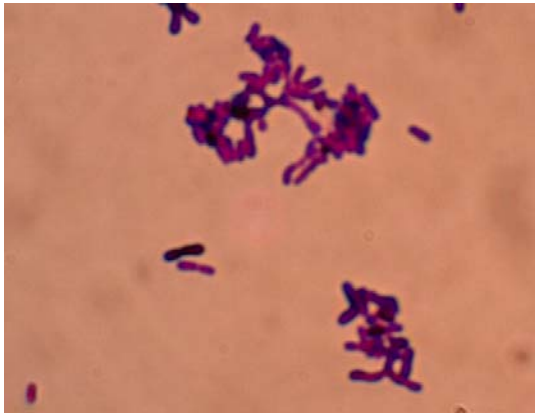


Figure 6 : L'aspect des colonies de la souche *Bifidobacterium* Bif3 enssemencé par stries sur milieu TPY gélosé, incubées à 37°C pendant 72 heures en anaérobiose.

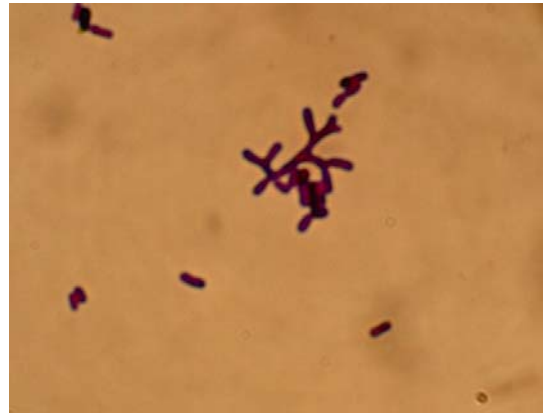
1.2. Observation microscopique :

L'observation microscopique des cellules de bifidobactérie (Bif1, Bif2 et Bif3) cultivés sur le milieu TPY gélosé incubé à 37°C, nous a montrée des aspects polymorphes de ces souches (forme bacillaires incurvés, enflés et bifurqués) et leur arrangement isolées et en amas.

La figure 7 représente l'aspect et l'arrangement des cellules de la souche *Bifidobacterium* Bif3 examiné au microscope optique après coloration de Gram.



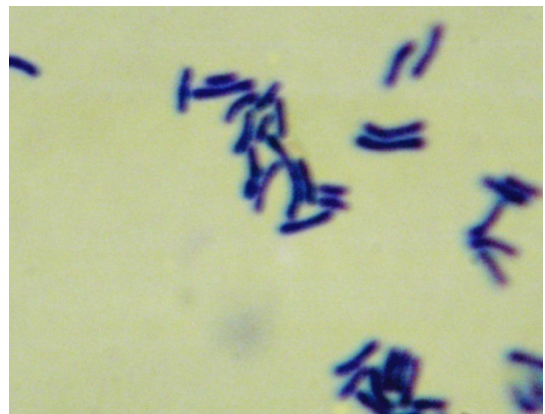
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 7: Les différentes formes de la souche *Bifidobacterium* Bif3 après coloration de Gram observé sous le microscope optique avec l'objectif à immersion (X 120).

(a) et (b) : forme bifurqué de la souche *Bifidobacterium* Bif3

(c) et (d) : forme enflé et incurvé de la souche *Bifidobacterium* Bif3

1.3. Tests physiologiques et biochimiques

Production de CO₂ :

La culture des souches de bifidobactérie (Bif1, Bif2 et Bif3) dans des tubes contenant le milieu TPY bouillon et la cloche de Durham incubés à 37°C en anaérobiose, n'a montrée aucune production de gaz dans la cloche.

Ce résultat nous démontre que ces souches fermentent le glucose sans production du CO₂.

Croissance à 45°C :

Les souches de bifidobactérie (Bif1, Bif2 et Bif3)ensemencées sur le milieu TPY gélosé et incubées à la température de 45°C pendant 48h en anaérobiose, ont montrées la capacité de croître à cette température (Figure 8). Ce résultat nous permet de dire que les souches sont thermophiles.



Figure 8 : Croissance de la souche *Bifidobacterium* Bif3 sur milieu TPY gélosé incubées à 45°C pendant 48h en anaérobiose.

Activités enzymatiques

Les activités des enzymes suivantes uréase, gélatinase, test indole, catalase et nitrate réductase ont été étudiées. Les résultats nous montrent que les souches de bifidobactérie (Bif1, Bif2 et Bif3) sont uréase, gélatinase, et indole négatifs (figure9).

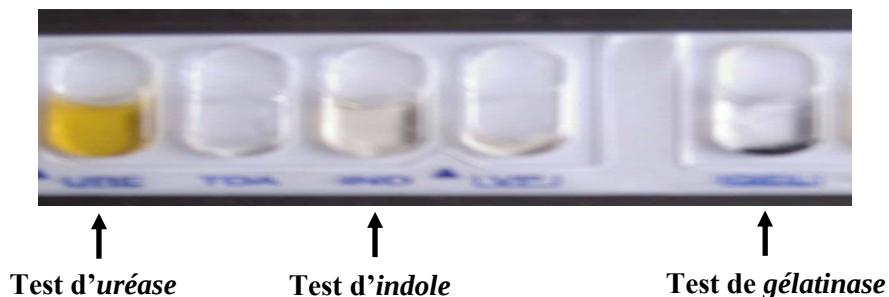


Figure 9 : Résultats des tests uréase, indole et gélatinase de la souche *Bifidobacterium* Bif3 sur la galerie API20E.

Le tableau 10 résume les résultats des tests des activités enzymatiques, croissance sur gélose TPY à pH (4 et 8,5), croissance à 45°C, croissance en aérobiose et production de CO₂

Tableau 10 : Résultats des tests enzymatiques et physiologiques des souches de bifidobactérie (Bif1, Bif2 et Bif3) et *Bifidobacterium animalis* LMAI^{*}

Tests	Bif1	Bif2	Bif3	<i>Bifidobacterium animalis</i> LMAI [*]
Uréase	-	-	-	-
Production d'Indole	-	-	-	-
Gélatinase	-	-	-	-
Nitrate réductase	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-
Croissance à 45°C	+	+	+	+
Croissance à pH = 4	-	-	-	-
Croissance à pH = 8,5	-	-	-	-
Croissance en aérobiose	-	-	-	-
Production de CO ₂ à partir du glucose.	-	-	-	-

* : souche de référence.

2. Identification de l'espèce par le profil fermentaire :

L'identification au niveau de l'espèce des souches de bifidobactérie (Bif1, Bif2 et Bif3) a été réalisée par l'étude de leurs profils fermentaires, 22 sucres ont été utilisés (tableau 9). Les résultats obtenus nous ont montrés que les souches fermentent 13 sucres (figure 11).

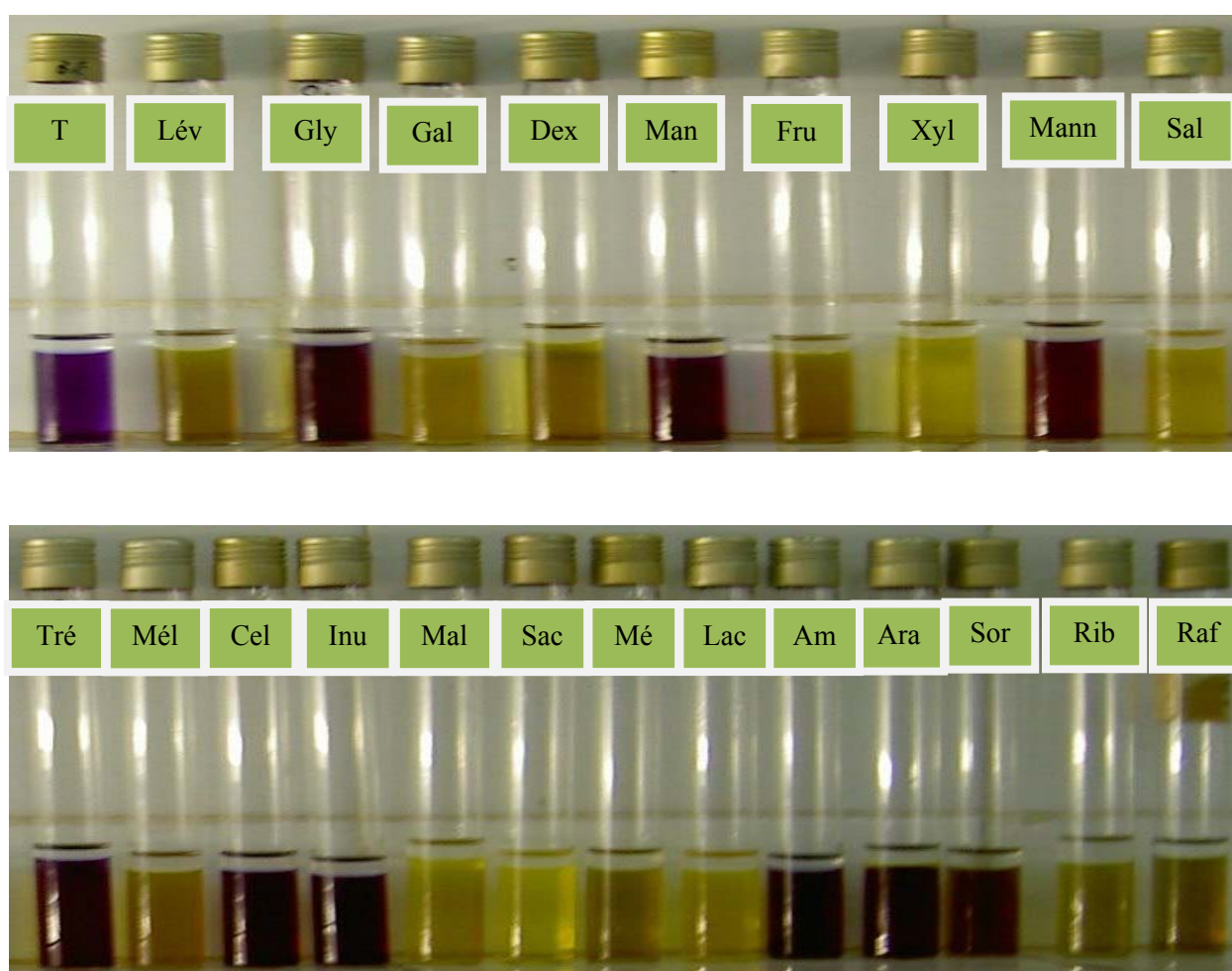


Figure 10 : Profil fermentaire de la souche *Bifidobacterium* Bif3

T : Témoins ; Lév.: Lévilose; Gly.: Glycérol; Gal.: Galactose; Dex.: Dextrine; Man.: Mannitol; Fru.: Fructose; Xyl.: Xylose; Mann.: Mannitol; Sal.: Salicine; Tré.: Tréhalose; Méli.: Mélibiose; Cel.: Cellobiose; Inu.: Inuline; Mal.: Maltose; Sac.: Saccharose; Mél.: Mélitose; Lac.: Lactose; Am.: Amidon; Ara.: Arabinose; Sor.: Sorbitol; Rib.: Ribose; Raf.: Raffinose.

Coloration jaune : milieu acidifié (réaction positif).

Coloration violette : milieu non acidifié (réaction négatif).

Tableau 11 : Résultats du test de fermentation des sucres par les souches de bifidobactérie (Bif1, Bif2 et Bif3) et *Bifidobacterium animalis* LMAI.

Sucres	Bif1	Bif2	Bif3	<i>Bifidobacterium animalis</i> LMAI*
sorbitol	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	+
Raffinose	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+
Amidon	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+
Inuline	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-
Mélicitose	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+
Tréhalose	-	-	-	-
Mélibiose	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-
Salicine	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+
Mannose	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	+
Dextrine	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+
Lévéulose	+	+	+	+
Glycérol	-	-	-	-

+ : réaction positif ; - : réaction négatif ; * : souche de référence.

3. Antibiogramme :

Les résultats obtenus du test d'antibiogramme sont représentés dans le tableau 12. La figure 11 montre la sensibilité et la résistance des souches de bifidobactérie (Bif1, Bif2 et Bif3) aux antibiotiques.

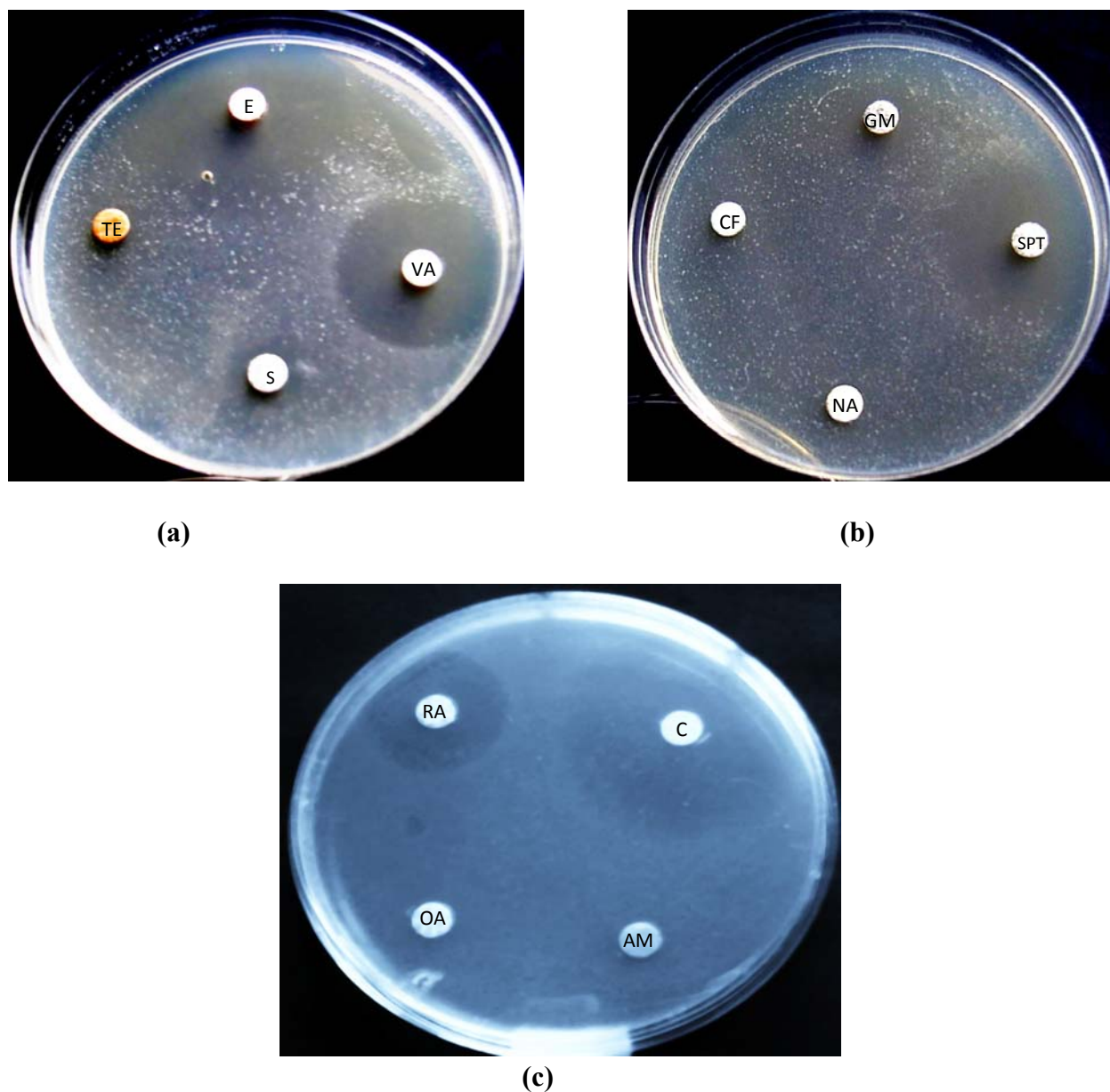


Figure 11 : Résultats du test d'antibiogramme de la souche *Bifidobacterium* Bif3

(a) : VA. : Vancomycine; TE. : Tétracycline; E. : Erythromycine; S. : Streptomycine.

(b) : CF. : Cefalotine; NA. : Acide nalidixique; SPT. : Spectinomycine; GM. : Gentamicine.

(c) : AM. : Ampicilline; RA. : Rifampicine; OA. : Acide oxolinique; C. : Chlorophénicol.

Tableau 12 : Le résultat du teste d'antibiogramme des souches de bifidobactérie
(Bif1, Bif2 et Bif3).

Antibiotiques	Concentration	Bif1	Bif2	Bif3
Cefalotine (CF)	30 µg	R	R	R
Acide nalidixique (NA)	30 µg	R	R	R
Spectinomycine (SPT)	100 µg	S	S	S
Gentamicine (GM)	10 µg	R	R	R
Vancomycine (Va)	30 µg	S	S	S
Erythromycine (E)	15 UI	S	S	S
Streptomycine (S)	10 UI	R	R	R
Ampicilline (Am)	10 µg	R	R	R
Rifampicine (RA)	30 µg	S	S	S
Acide oxolinique (OA)	10 µg	R	R	R
Chloramphénicol (C)	30 µg	S	S	S
Tétracycline (TE)	30 UI	R	R	R

R : résistant S : sensible UI : unité international µg : microgramme

4. Isolement des *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*

4.1. Observation macroscopique des colonies :

L'observation des colonies des souches *Streptococcus thermophilus* (Strp1, Strp2 et Strp3) isolées de yaourt de Danone (figure 12) cultivées sur milieu M17 gélosé nous montrent des petites colonies crémeuses. L'aspect des colonies des souches de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb1, Lb2 et Lb3) isolées de yaourt de Danone ensemencé sur le milieu MRS gélosé est de forme lenticulaires avec 1 à 2mm de diamètre.

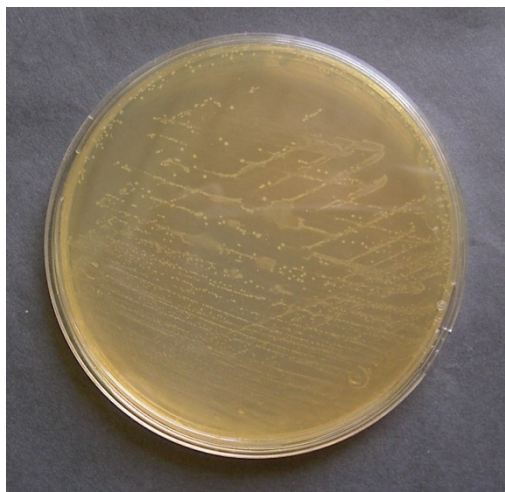
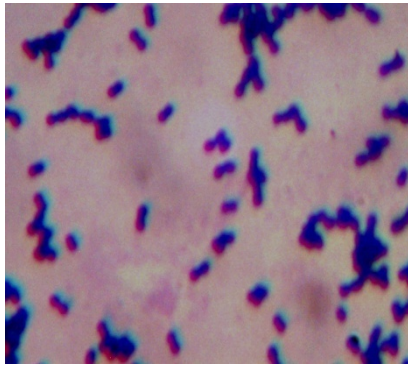


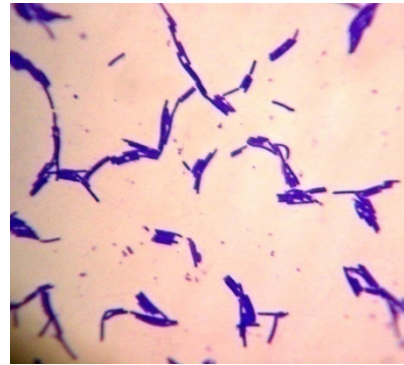
Figure 12 : Aspect des colonies de la souche de *Streptococcus* Strp1, ensemencé par stries sur milieu M17 gélosé incubée à 42°C pendant 48 heures.

4.2. Observation microscopique :

La figure 13 montre l'aspect des cellules des souches *Streptococcus thermophilus* (Strp1, Strp2 et Strp3) et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb1, Lb2 et Lb3) examiné au microscope optique après coloration de Gram. Les streptocoques sont au forme de coque et organisés en chainettes. Les lactobacilles sont de forme bacillaire droite.



(a)



(b)

Figure 13: Les différentes formes des souches *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* après coloration de Gram observé sous le microscope optique avec l'objectif à immersion (X 120).

(a) : *Streptococcus thermophilus* (Strp1).

(b) : *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb1).

4.3. Tests physiologiques et biochimiques :

Production de CO₂ :

Les cultures des souches *Streptococcus thermophilus* (Strp1, Strp2 et Strp3) et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb1, Lb2 et Lb3) dans des tubes contenant le milieu M17 et MRS et la cloche de Durham à 42°C n'a montrée aucune production de gaz dans la cloche. Ce résultat nous démontre que les souches *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fermentent le glucose sans production du CO₂.

Les autres résultats des tests physiologiques sont résumés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Résultats des tests enzymatiques et physiologiques des souches *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

	Les testes enzymatiques et physiologiques					
	Bouillon hypersalé 65g/l de NaCl	Thermorésistance 63,5°C pendant 30 minutes.	Catalase	Croissance à 45°C	Croissance à 15°C pendant 7 à 10 jours	Production de CO ₂ à partir du glucose.
Strp1	-	+	-	+	-	-
Strp2	-	+	-	+	-	-
Strp3	-	+	-	+	-	-
Strp. LMAI	-	+	-	+	-	-
Lb1	-	**	-	+	-	-
Lb2	-	**	-	+	-	-
Lb3	-	**	-	+	-	-
Lb. LMAI	-	**	-	+	-	-

+ : réaction positif ; - : réaction négatif ; ** : non effectuer.

(Lb1, Lb2 et Lb3) : les souches de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Lb. LMAI : *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LMAI (souche de référence).

(Strp1, Strp2 et Strp3) : les souches de *Streptococcus thermophilus*

Strp. LMAI: *St. thermophilus* LMAI (souche de référence).

5. Identification de l'espèce par le profil fermentaire :

L'identification au niveau de l'espèce des souches de *Streptococcus* (Strp1, Strp2 et Strp3) et des souches de *Lactobacillus* (Lb1, Lb2 et Lb3) a été réalisée par l'étude de leurs profils fermentaires. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 14 et 15.

Tableau 14: Résultats du profil fermentaire des souches de *Streptococcus* (Strp1, Strp2 et Strp3) et *St. thermophilus* LMAI.

Sucres	Strp1	Strp2	Strp3	<i>St. thermophilus</i> LMAI*
Sorbitol	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-
Ribose	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+
Amidon	-	-	-	-
Mélicitose	-	-	-	-
Saccharose	+	+	+	+
Maltose	-	-	-	-
Tréhalose	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	-
Mannose	-	-	-	-
Fructose	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+
Lévulose	-	-	-	-
Mélibiose	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-
Glycérol	-	-	-	-

+ : réaction positif ; - : réaction négatif ; * : souche de référence.

Tableau 15: Résultats du profil fermentaire des souches de *Lactobacillus* (Lb1, Lb2 et Lb3) et *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LMAI.

Sucres	Lba1	Lba2	Lbf4	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LMAI*
Sorbitol	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-
Ribose	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+
Amidon	-	-	-	-
Mélizitose	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-
Tréhalose	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	-
Mannose	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-
Lévuiose	+	+	+	+
Mélibiose	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-
Glycérol	-	-	-	-

+ : réaction positif ; - : réaction négatif ; * : souche de référence.

Au cours de la première partie de notre étude qui consiste à l'isolement des bifidobactéries et des bactéries lactiques (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) dans les laits fermentés probiotiques et les yaourts. Nous avons isolés et identifiés 3 espèces bactériennes : *Streptococcus thermophilus* (Strp1, Strp2 et Strp3), *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (Lb1, Lb2 et Lb3) et *Bifidobacterium animalis* (Bif1, Bif2 et Bif3).

Les souches *Streptococcus thermophilus* (Strp1), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb1) et *Bifidobacterium animalis* (Bif3) ont été utilisées dans la deuxième partie de l'étude.

6. Aptitude technologique des bifidobactéries :

6.1. Résultats de l'analyse physicochimique du lait de brebis pasteurisé :

L'analyse physicochimique du lait de brebis pasteurisé montrent qu'il est riche en protéines (6,15 %) et en matière grasse (5,27%). (Tableau 16)

Tableau 16 : Caractéristiques physicochimiques du lait de brebis pasteurisé.

Paramètres physicochimiques	Lait de brebis pasteurisé
Matière grasse total (%)	5,27
Matière sèche totale (%)	17,35
Matière sèche totale dégraissée (%)	12,08
Protéines (%)*	6,15

* (% de protéine total = % de l'azote total x 6,38)

6.1. Croissance et cinétique d'acidification en culture pure :

La croissance et la cinétique d'acidification de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) ont été étudiées dans le lait de brebis et le lait reconstitué écrémé enrichie (avec 0,5 % (p/v) d'extrait de levure et de 0,05 % (p/v) de cystéine-HCl) à 37°C pendant 24 heures. Les résultats sont présentés dans les figures 14, 15 et 16.

Le taux de croissance de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) est estimé à $0,33 \text{ h}^{-1}$ dans le lait de brebis et à $0,47 \text{ h}^{-1}$ dans le lait reconstitué écrémé enrichie (Tableau 17).

Le pH atteint la valeur de 5,21 au bout de 24 heures pour le lait de brebis alors qu'il est de 4,26 pour le lait reconstitué écrémé enrichie, soit respectivement une concentration d'acidité totale de 73,5 D° et de 117,75 D°.

En remarque aussi que le caillé du lait reconstitué écrémé enrichie est plus solide que celui du lait de brebis avec une forte synérèse (apparition du lactosérum) par contre celui du lait de brebis constitue un caillé blanc homogène.

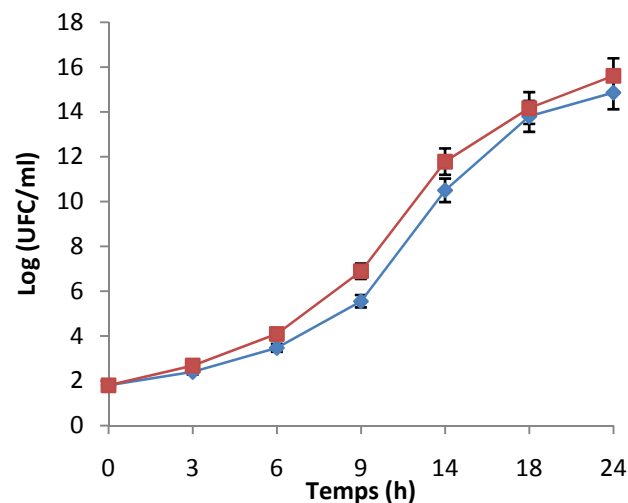


Figure 14 : Courbe de croissance de *Bifidobacterium animalis* (Bif3).
(Incubation à 37°C).

(—■—) Dans le lait reconstitué écrémé enrichie.

(—◆—) Dans le lait de brebis.

Les valeurs indiquées sont des moyennes $\pm$ erreur standard , (n=3)

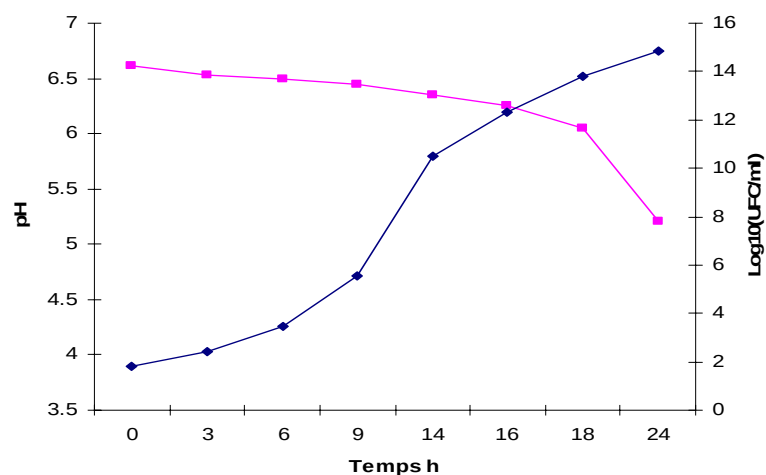


Figure 15 : Cinétique d'acidification et de croissance de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait de brebis (Incubation à 37°C).

(—■—) Evolution du pH.

(—◆—) Courbe de croissance.

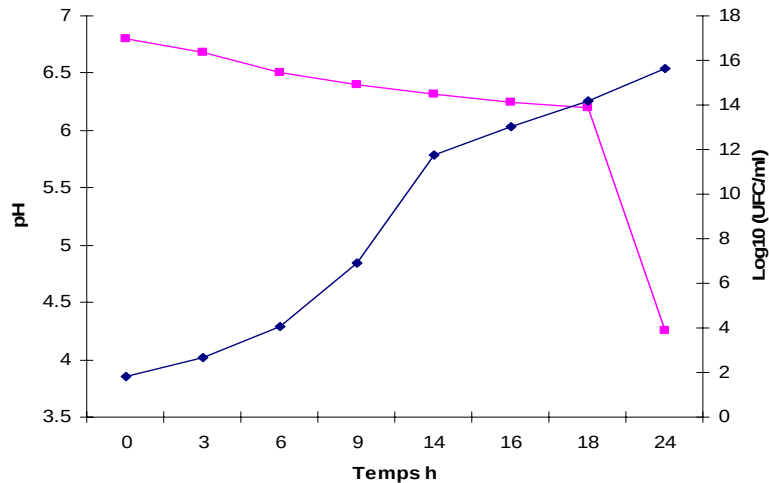


Figure 16 : Cinétique d'acidification et de croissance de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait reconstitué écrémé enrichie (Incubation à 37°C).

(—■—) Evolution du pH.

(—◆—) Courbe de croissance.

Tableau 17 : Le taux de croissance (μ) de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) en culture pur.

	Taux de croissance μ (h ⁻¹)
Lait de brebis	0,33
Lait reconstitué écrémé*	0,47

* enrichie avec 0,5 % (p/v) d'extrait de levure et de 0,05% (p/v) de cystéine-HCl

6.2 Pouvoir tampon du lait de brebis (concentration en acide lactique supérieure pour un même pH).

L'évaluation du pouvoir tampon du lait est importante puisque le pH et la concentration en acide lactique sont des paramètres directeurs importants de la croissance et de la survie des bactéries lactiques dans le lait.

Ceci peut être attribué au fait que le lait reconstitué écrémé enrichie est pauvre en protéines que le lait de brebis. Il contient, en effet 45 g/l (La Paulina, Molino hnos, Argentine) contre 61,5 g/l pour le lait de brebis.

La figure 17 montre l'évolution du pH des laits de brebis et écrémé enrichie en fonction de la concentration en acide lactique.

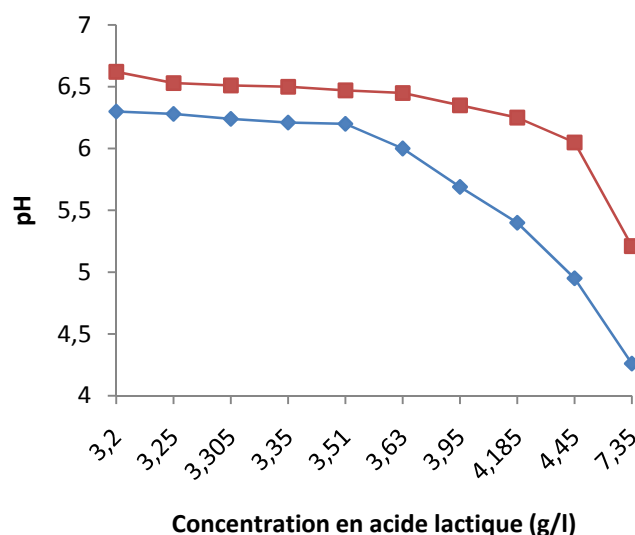


Figure 17 : Evolution du pH en fonction de la concentration de l'acide lactique.

(—■—) Dans le lait de brebis.

(—◆—) Dans le lait écrémé enrichie.

Le pouvoir tampon du lait de brebis est supérieur à celui du lait reconstitué écrémé enrichie (concentration en acide lactique supérieure pour un même pH). A pH 6,2 la concentration en acide lactique est de 3,51 g/l dans le lait reconstitué écrémé enrichie et de 4,20 g/l dans le lait de brebis.

6.3 Survie de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) en culture pure dans le lait de brebis et lait écrémé enrichie.

Le lait de brebis et le lait reconstitué écrémé enrichie fermenté par *Bifidobacterium animalis* (Bif3) pendant 24 heures a été stockés à 6°C pendant 21 jours.

Les résultats de l'évolution de la viabilité de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) sont présentés dans la le tableau 18 et la figure 18.

Tableau 18 : Variation du nombre de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) (en Log ufc/ml) en culture pure dans les laits fermentés de brebis et reconstitué écrémé enrichie, conservé à 6°C pendant 21 jours.

Les jours de stockage	Lait fermenté de brebis	Lait fermenté reconstitué écrémé*
0	10,33	11,28
7	10,01	10,33
14	9,39	8,61
21	8,95	3,89

* enrichie avec 0,5 % (p/v) d'extrait de levure et de 0,05% (p/v) de cystéine-HCl

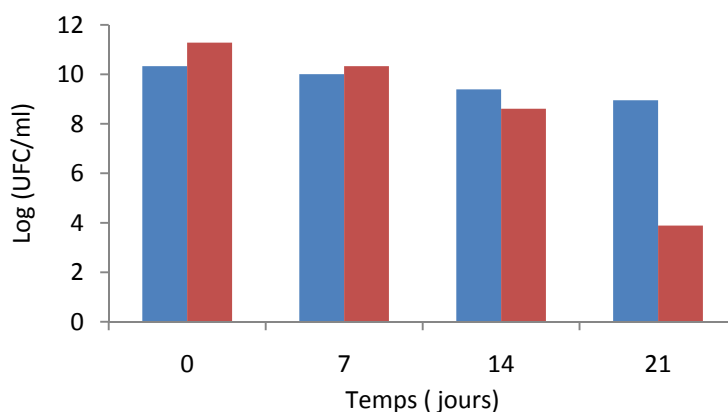


Figure 18 : Survie de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) en culture pure stocké à 6°C pendant 21 jours.

(■) Nombre de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait fermenté écrémé enrichie

(■) Nombre de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait de brebis fermenté

La vitesse moyenne de déclin de la population de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) a été calculée pour chaque lait. Dans le lait reconstitué écrémé enrichie fermenté a été est égale à $-0,35 \text{ j}^{-1}$ et $-0,06 \text{ j}^{-1}$ dans le lait de brebis fermenté (Tableau 19).

Tableau 19 : La vitesse de déclin (J^{-1}) de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait fermenté de brebis et le lait fermenté écrémé enrichie pendant le stockage à 6°C .
(En culture pure)

La vitesse de déclin	Lait fermenté de brebis	Lait fermenté reconstitué écrémé enrichie*
Premier semaine	$-0,04 \text{ J}^{-1}$	$-0,13 \text{ J}^{-1}$
Deuxième semaine	$-0,08 \text{ J}^{-1}$	$-0,24 \text{ J}^{-1}$
Troisième semaine	$-0,06 \text{ J}^{-1}$	$-0,67 \text{ J}^{-1}$
Vitesse moyenne de déclin	$-0,06 \text{ J}^{-1}$	$-0,35 \text{ J}^{-1}$

* enrichie avec 0,5 % (p/v) d'extrait de levure et de 0,05% (p/v) de cystéine-HCl

6.4 Croissance de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) et cinétique d'acidification en culture mixte avec *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* (Lb1) et *Streptococcus thermophilus* (Strp1).

D'après les courbes d'évolution du pH (figure19) , nous constatons que l'acidification des deux laits a été tres rapide. après 4 heures de fermentation, le pH des deux laits fermentés a atteint 4,5 pour le lait reconstitué écrémé fermenté et 4,6 pour le lait de brebis fermenté.

Toutes les souches sont développées mieux dans le lait de brebis que dans le lait reconstitué écrémé (figures 20, 21 et 22), de même pour *Bifidobacterium animalis* (Bif3). Le taux de croissance (μ) de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) a été calculé dans les deux laits : il est égal à $0,90 \text{ h}^{-1}$ dans le lait de brebis et à $0,53 \text{ h}^{-1}$ dans le lait reconstitué écrémé (Tableau 20).

Tableau 20 : Taux de croissance (μ) de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) en culture mixte.*

	Taux de croissance $\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$
Lait de brebis	0,90
Lait reconstitué écrémé	0,53

* en association avec *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* (Lb1) et *Streptococcus thermophilus* (Strp1)

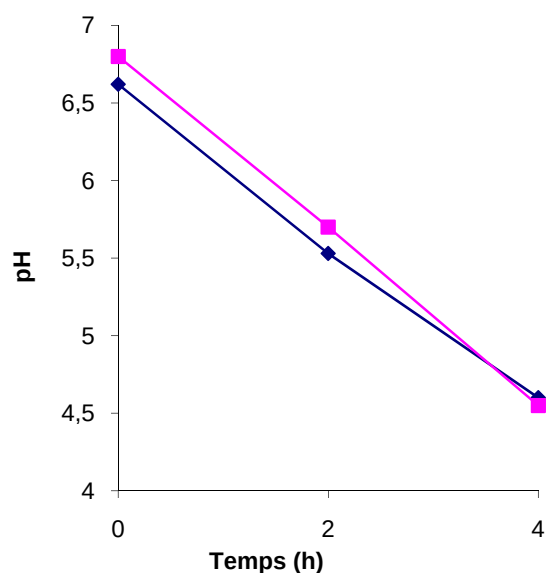


Figure 19 : Courbe d'évolution du pH des laits pendant la fermentation par *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb1), *Streptococcus thermophilus* (Strp1) et *Bifidobacterium animalis* (Bif3) (Incubation à 42°C).

(—■—) Lait écrémé.
(—◆—) Lait de brebis.

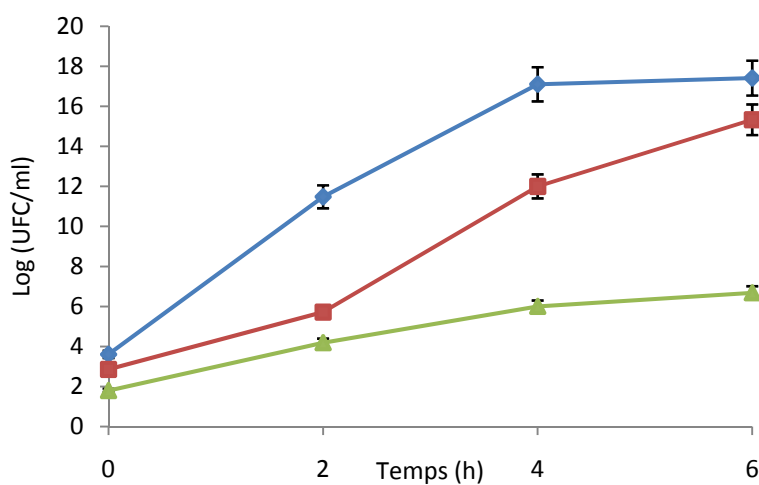


Figure 20 : Croissance de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb1), *Streptococcus thermophilus* (Strp1) et *Bifidobacterium animalis* (Bif3) en culture mixte dans le lait de brebis (Incubation à 42°C).

(—■—) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb1)
(—◆—) *Streptococcus thermophilus* (Strp1)
(—▲—) *Bifidobacterium animalis* (Bif3)

Les valeurs indiquées sont des moyennes $\pm$ erreur standard, (n=3).

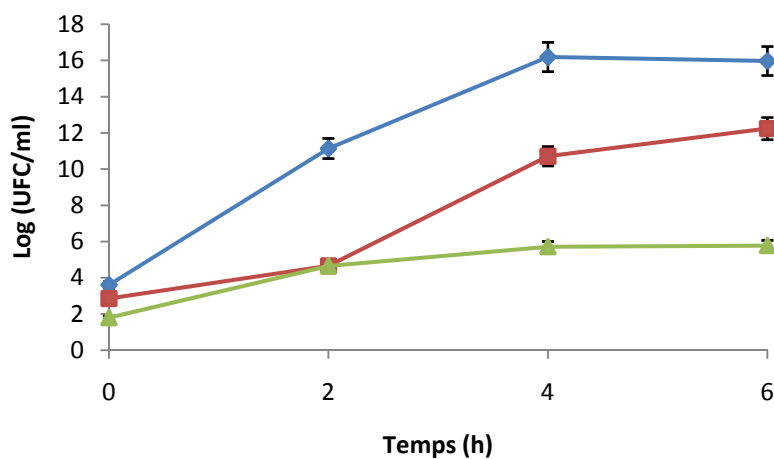


Figure 21 : Croissance de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb1), *Streptococcus thermophilus* (Strp1) et *Bifidobacterium animalis* (Bif3) en culture mixte dans le lait écrémé (Incubation à 42°C).

- (—■—) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb1)
- (—◆—) *Streptococcus thermophilus* (Strp1)
- (—▲—) *Bifidobacterium animalis* (Bif3)

Les valeurs indiquées sont des moyennes $\pm$ erreur standard, (n=3)

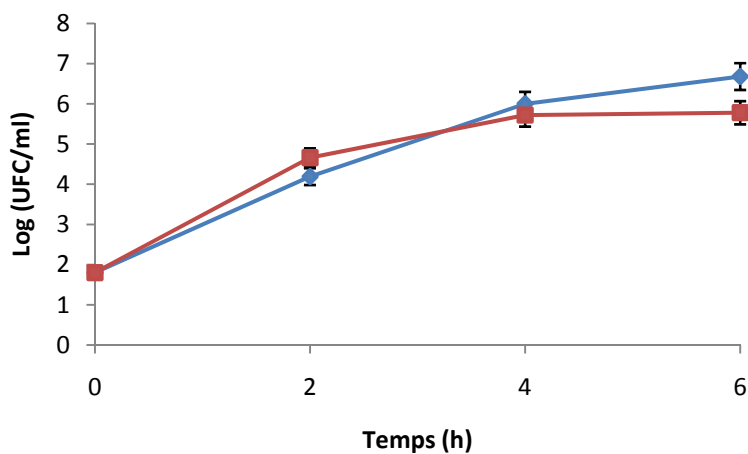


Figure 22 : Courbe de croissance de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) en culture mixte. (Incubation à 42°C).

- (—■—) Dans le lait reconstitué écrémé.
- (—◆—) Dans le lait de brebis.

Les valeurs indiquées sont des moyennes $\pm$ erreur standard, (n=3)

6.5 Survie de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) en culture mixte avec *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (Lb1) et *Streptococcus thermophilus* (Strp1) dans le lait de brebis fermenté et le lait reconstitué écrémé fermenté.

La survie de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans les produits fermentés en culture mixte en association avec *Lb. delbrueckii* subsp *bulgaricus* (Lb1) et *St. thermophilus* (Strp1) à base de lait reconstitué écrémé et de lait de brebis stocké à 6°C pendant 21 jours a été étudiée et les résultats sont présentés dans le tableau 21 et la figure 23.

Tableau 21 : Variation du nombre de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) (en Log ufc/ml) en culture mixte* dans les laits fermentés de brebis et reconstitué écrémé conservé à 6°C pendant 21 jours.

Les jours de stockage	Lait fermenté de brebis	Lait fermenté reconstitué écrémé
0	12,31	11,81
7	11,25	8,97
14	7,71	6,86
21	3,91	2,17

* en association avec *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (Lb1) et *Streptococcus thermophilus* (Strp1).

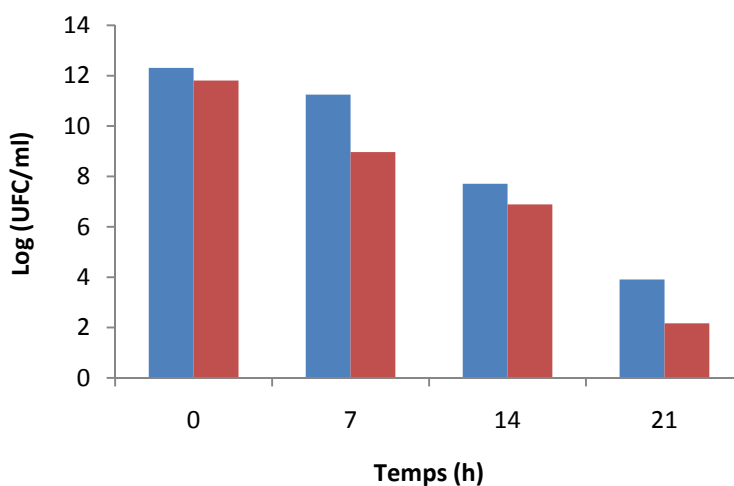


Figure 23 : Survie de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) en culture mixte avec *Streptococcus thermophilus* (Strp1) et *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (Lb1) stocké à 6°C pendant 21 jours.

(■) Nombre de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait fermenté écrémé.

(■) Nombre de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait de brebis fermenté.

La vitesse moyenne de déclin de la population de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) a été calculée (Tableau 22). On remarque que le taux de mortalité de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait fermenté de brebis et dans le lait fermenté reconstitué écrémé est plus important après 15 jours de stockage. En plus, nous assistons à une vitesse moyenne de déclin de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait fermenté reconstitué écrémé un peu plus forte à celle obtenue en lait fermenté de brebis (vitesses des déclinés égales au $-0,45 \text{ J}^{-1}$ et $-0,39 \text{ J}^{-1}$ respectivement).

Tableau 22 : La vitesse de déclin (J^{-1}) de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait fermenté de brebis et le lait fermenté reconstitué écrémé pendant le stockage à 6°C
(En culture mixte)*

La vitesse de déclin	Lait fermenté de brebis	Lait fermenté reconstitué écrémé
Première semaine	$-0,15 \text{ J}^{-1}$	$-0,40 \text{ J}^{-1}$
Deuxième semaine	$-0,50 \text{ J}^{-1}$	$-0,29 \text{ J}^{-1}$
Troisième semaine	$-0,54 \text{ J}^{-1}$	$-0,67 \text{ J}^{-1}$
Vitesse moyenne de déclin	$-0,39 \text{ J}^{-1}$	$-0,45 \text{ J}^{-1}$

* en association avec *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* (Lb1) et *Streptococcus thermophilus* (Strp1).

Discussion

1. Isolement et identification des bifidobactéries et les ferments lactiques (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*)

Les informations obtenues à partir des résultats des observations macroscopiques et microscopiques et des tests physiologiques et enzymatiques des souches Bif1, Bif2 et Bif3 isolées d'un lait fermenté probiotique (ACTEVIA Actiregularis de Danone) nous ont permis de les apparenter au genre *Bifidobacterium* selon Scardovi (1986).

La comparaison du profil fermentaire de ces isolats avec la table des profils biochimiques des *Bifidobacterium* sp. (Larpent, 1996) et avec la souche de référence *Bifidobacterium animalis* LMAI nous a permis de constater que les souches de *Bifidobacterium* (Bif1, Bif2 et Bif3) sont plus proches de l'espèce *Bifidobacterium animalis* selon Cai *et al.* (2000) et Masco *et al.* (2004).

La croissance des souches de *Bifidobacterium* (Bif1, Bif2 et Bif3) à 45°C pendant 48h nous a permis de confirmer leur appartenances à l'espèce *Bifidobacterium animalis* et non aux espèces *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium brevis* ou *Bifidobacterium longum* (généralement utilisés comme probiotiques dans les laits fermentés) parce qu'elles sont d'origine humaine et ne poussent pas à 45°C pendant 48h (Shah, 1997 ; Gavini *et al.*, 1991).

Cependant, on peut dire que l'espèce de *Bifidobacterium* utilisé pour la production de ce lait fermenté probiotique est *Bifidobacterium animalis*. Cette espèce regroupe deux sous espèces (subsp. *animalis* et subsp. *lactis*). Une identification finale au niveau de la sous espèces est pratiquement impossible sans l'application des techniques faisant appel à la biologie moléculaire (Masco *et al.*, 2004 ; Ward et Roy , 2005).

Les observations morphologiques et des tests physiologiques et biochimiques des souches de lactobacille (Lb1, Lb2 et Lb3) et de streptocoque (Strp1, Strp2 et Strp3) isolées du yaourt de Danone, nous ont permis de les identifier comme étant des *Streptococcus thermophilus* pour les Strp1, Strp2 et Strp3 et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pour les Lb1, Lb2 et Lb3. Selon Gueimonde *et al.*, (2004) ; Collado *et al.* (2006) ; Carmen-Collado et Hernandez (2007), les tests physiologiques et biochimiques, et l'observation morphologique des cellules des lactobacilles et streptocoques isolés des yaourts sont suffisantes pour leur identification.

2. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bifidobactéries

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques c'est un critère important pour sélectionner les probiotiques (Zhou *et al.*, 2005). La résistance reste une condition controversée, d'un côté elle est recherchée chez les probiotiques pour qu'ils soient actifs même après un traitement aux antibiotiques et d'un autre côté elle est redoutée qu'elle soit transmise aux autres bactéries indésirables dans l'intestin pourrait mener au développement de nouveaux microbes pathogènes résistants aux antibiotiques (Salminen *et al.*, 1998; Saarela *et al.*, 2000).

Toutes les souches *Bifidobacterium animalis* (Bif1, Bif2 et Bif3) ont montrées des résistances à l'acide nalidixique, streptomycine et gentamicine. Ces résultats sont conformes aux résultats précédemment rapportés pour la même espèce (Zhou *et al.*, 2005).

La résistance des bifidobactéries à la tétracycline et la céphalothine a été signalée par plusieurs auteurs (Delgado *et al.*, 2005; Moubareck *et al.*, 2005; Jaana Mättö *et al.*, 2007) chez des souches d'origine diverses. Cette résistance a été observée chez *Bifidobacterium animalis* (Bif1, Bif2 et Bif3).

Par contre comme toutes les espèces de *Bifidobacterium*, les souches *Bifidobacterium animalis* (Bif1, Bif2 et Bif3) sont sensibles aux antibiotiques de spectre des bactéries Gram positif (érythromycine, vancomycine) et aux antibiotiques à large spectre (spectinomycine, chloramphénicol, rifampicine) (Delgado *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005). Une résistance des souches (Bif1, Bif2 et Bif3) à l'ampicilline a été observée, ce résultat est différent de celui de Zhou *et al.* (2005) sur une souche de *Bifidobacterium* de la même espèce.

3. Aptitude technologique des bifidobactéries

Les propriétés les plus importantes pour l'utilisation commerciale des ferments lactiques composée de souches probiotiques incluent la croissance et l'acidification rapide du lait, et la bonne tolérance à l'acidité et à l'oxygène (Rasic et Kurmann, 1983). De même, il est important de considérer les caractéristiques des produits crus, la sécurité du produit, la capacité d'exercer un effet bénéfique et les caractéristiques désirées du produit final (Gomes et Maccata, 1998).

Les sélections des souches afin de disposer d'un ferment lactique qui permette d'obtenir un lait fermenté à caractéristiques organoleptiques bien définies sont orientés vers des souches de *Streptococcus* et *Lactobacillus* (pour leur pouvoir acidifiant, pouvoir protéolytique, activité aromatique et la production des exopolysaccharides) (Pernoud *et al.*, 2005). Les souches de *Bifidobacterium animalis* (subsp. *animalis* ou subsp. *lactis*) sont les plus utilisées dans la production des laits fermentés aux caractères probiotiques (Masco *et al.*,

2005), parce que ces deux sous-espèce sont connus pour être relativement oxygène tolérantes (Meile *et al.*, 1997 ; Masco *et al.*, 2004).

De nombreux paramètres influencent la croissance des bifidobactéries dans le lait. Parmi ces paramètres on a : la température de croissance, le lait utilisé, l'état physiologique des souches utilisées et leur concentration et les ingrédients ajoutés (par ex. les facteurs bifidogènes).

Etude de la croissance *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait reconstitué écrémé enrichie et dans le lait de brebis en culture pure

Bifidobacterium animalis (Bif3) pousse mieux dans lait écrémé enrichie ($0,47 \text{ h}^{-1}$) par rapport au lait de brebis ($0,33 \text{ h}^{-1}$). Ces taux de croissances sont supérieurs à ceux observés par Hadadji et Bensoltane (2006) pour *B. longum* ($0,18 \text{ h}^{-1}$) pendant sa croissance dans le lait de chèvres.

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 Ziajka, 1986; Rasic et Kurmann, 1983).

Ceci dit, la croissance de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait écrémé reconstitué est 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 Shah, 1998). Cet ingrédient peut être utilisé dans la production des laits fermentés probiotiques. Guler-Akın et Akın (2007), ont produit un lait fermenté probiotique (bio-yogourt) à partir du lait de chèvre en utilisant les ferments du yaourt (*St. thermophilus* et *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*) et des probiotiques (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* BB12 et *Lactobacillus paracasei subsp. casei*), avec ou sans l'addition de cystéine (0,5%). Ces auteurs ont constaté que la concentration des bifidobactéries est plus forte dans les bio-yogourts complétés avec de la cystéine que dans bio-yogourts sans la cystéine.

La teneur plus élevée en protéines dans le lait de brebis (61,5g/L) ne peut expliquer le nombre de *B. animalis* (Bif3) atteints après 24h de fermentation à 37°C ($3 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$). Car les bifidobactéries ont une activité protéolytique très faible pour dégrader les protéines du lait comparé de celle des bactéries lactiques (Shihata et Shah, 2000). Plus récemment, différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer le comportement des bifidobactéries dans le lait de brebis. Certaines d'entre elles s'appuyant sur la concentration plus élevée de β -

lactoglobuline, α -lactalbumine et des complexes de vitamines B (acide pantothénique, biotine et la riboflavine) (Gomes et Malcata, 1998 ; Kehagias *et al.*, 2008). Ces composés sont considérés comme des bons facteurs de croissances pour les bifidobactéries (Petschow et Talbott, 1990 ; 1991 ; Ibrahim et Bezkorovainy, 1994 ; Poch et Bezkorovainy, 1988).

Malgré ça, 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 Bensoltane, 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 Stouthamer, 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).

Etude de la croissance *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait reconstitué écrémé et dans le lait de brebis en culture mixte

Une production lente de l'acide lactique a comme conséquence un temps prolongé de fermentation. L'industrie laitière fait face à ce problème en employant les cultures combinées des bifidobactéries et d'autres bactéries lactiques. La majorité des fabricants utilisent les *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Roy, 2005).

L'avantage d'employer une culture mélangée contenant des bactéries de bifidobactérie et de ferment du yaourt est non seulement la réduction du temps de fermentation, mais également l'action d'éviter d'autres défauts des produits contenant seulement les bifidobactéries peut avoir, comme la séparation de petit lait, texture arénacée ou gluante, goût trop léger, goût de levure ou aigre ou trop peu d'arôme (Rasic et Kurmann, 1983). En outre, l'addition aux produits bifides des ferments de yaourt peut améliorer leur valeur diététique (Gilliland, 1991).

Le suivi de la croissance *B. animalis* (Bif3) en association avec *Streptococcus thermophilus* (Strp1) et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb1) dans le lait de brebis et dans le lait reconstitué écrémé nous montre un taux de croissance bien significative par rapport à celui observé en culture pure. En effet, certains auteurs ont mentionné qu'il existe une synergie active entre les souches en culture mixte (Bensoltan *et al.*, 2004 ; Chekroune *et al.*, 2006 ; Chirigane *et al.*, 2006 ; 2007).

Klaver et al. (1993) ont aussi démontrés que le taux de croissance des bifidobactéries dans le lait pouvait être augmenté par la présence de souches protéolytiques telles que *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* ou *L. casei*.

L'utilisation de l'association *B. animalis* (Bif3) en association avec *Streptococcus thermophilus* (Strp1) et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Lb1) dans la fermentation est benifique pour les trois souches. Cela s'explique par les exigences différentes en facteurs de croissance des trois espèces. Les souches de *Streptococcus thermophilus* et de bifidobactérie sont souvent moins protéolytiques (Shihata et Shah, 2000 ; Checroune, 2005). De ce fait, leur croissance est limitée, les acides aminés et les peptides étant initialement dans le lait étant insuffisants pour couvrir leurs besoins. En revanche, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* possède une protéase membranaire qui va permettre la libération d'acides aminés et de petits peptides à partir des caséines du lait, ceux-ci étant ensuite utilisables par *Streptococcus thermophilus* et de bifidobactérie dotés de peptidase intracellulaires (Shihata et Shah, 2000 ; Marshall, 1987).

Quant à *Streptococcus thermophilus*, cette espèce a la capacité à utiliser l'oxygène dissous dans le lait de la sorte à réduire sa concentration à un taux très faible, mais non nul, permettant ainsi d'augmenter la viabilité des bifidobactéries. *Streptococcus thermophilus* aussi produit de l'acide formique et du dioxyde de carbone stimulant la croissance de *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* (Veringa et al., 1968 ; Radke-Mitchell et Sandine, 1984).

Le résultat de cette protocoopération ou symbiose a comme conséquence le bon développement de ces trois espèces, où *B. animalis* (Bif3) a atteint le nombre de $1,3 \times 10^7$ ufc/ml dans le lait de brebis et de $9,2 \times 10^6$ ufc/ml dans le lait reconstitué écrémé pour un nombre initial de 2×10^6 ufc/ml après 6 heures de fermentation à 42°C et une acidification rapide des deux laits qui ont atteint des pH (4,6 – 4,5) après seulement 4 heures de fermentation.

Etude de la Survie de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait reconstitué écrémé enrichi et dans le lait de brebis pendant le stockage à 6°C en culture pure

La survie des bifidobactéries dans un lait fermenté doit être assurée jusqu'à la consommation du produit puisqu'on doit y dénombrer plus de 10^5 - 10^6 bifidobactéries par gramme ou millilitre du lait fermenté pour exercer des effets probiotiques (Shah, 1997).

Les résultats de l'étude de la survie de *Bifidobacteriu animalis* (Bif3) en culture pure dans le lait fermenté de brebis stockés à 6°C pendant 21 jours montrent que la vitesse moyenne de déclin ($-0,06 \text{ j}^{-1}$) est moins importante que celle observée par Hadadji (2007), sur des

souches de *B. bifidum*, *B. longum* et *B. breve* dans un lait chèvre fermenté stocké à 4°C pendant 21 jours. Où la vitesse moyenne de déclin de ces souches a été de (-0,12 j⁻¹ à -0,14 j⁻¹) pour *B. breve*, (-0,17 j⁻¹) pour *B. bifidum* et de (-0,15 j⁻¹ à -0,16 j⁻¹) pour *B. longum*. Par contre, la vitesse moyenne de déclin de *Bifidobacteriu animalis* (Bif3) en lait écrémé fermenté a été de (-0,35 j⁻¹) ceci peut s'expliquer par le pH bas (acide) du lait fermenté (4,26). Selon Roy (2005), le pH de lait fermenté au-dessus de 4,6 est une des causes de la perte de viabilité de bifidobactérie.

Grosso et Favaro-Trindade (2004), ont démontré par une étude sur la stabilité des *Bifidobacterium lactis* (Bb-12) dans des lait acidifié que la vitesse de déclin de cette souche stockée à 7°C pendant 21 est moins importante dans le lait acidifié à pH 5,0 (-0,06 j⁻¹) que celle dans le lait acidifié à pH 4,4 (-0,16 j⁻¹).

Etude de la Survie de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans le lait reconstitué écrémé et dans le lait de brebis pendant le stockage à 6°C en culture mixte

Par ailleurs, en culture mixte nous avons noté une augmentation du taux de déclin chez *B. animalis* (Bif3) dans les deux laits fermentés. La vitesse moyenne de déclin a été calculée pour le lait fermenté de brebis (-0,39 j⁻¹) et pour le lait écrémé reconstitué (-0,45 j⁻¹). Beaucoup de recherches ont démontré que la majorité des souches de *Bifidobacterium* voit leur population réduite pendant l'entreposage au froid. Biavati *et al.* (1992), ont observés que le taux des bifidobactéries étudiées diminués par un facteur de 10³ dans un lait fermenté après un stockage de 2 semaines. Cette perte de viabilité des bifidobactéries probiotiques ont été précédemment rapporté par plusieurs auteurs (Dave et Shah, 1997; Gueimonde *et al.*, 2004 ; Gilliland *et al.*, 2002; Medina et Jordano, 1994; Micanel *et al.*, 1997; Rosenthal et Bernstein, 1998; Shin *et al.*, 2000).

La viabilité des bifidobactéries en culture mixte est particulièrement affectée suite à la post-acidification des laits fermentés par les bactéries lactiques. Ce phénomène est connu surtout chez *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* qui développe une acidité supplémentaire pendant l'entreposage au froid, ce qui abaisse légèrement le pH et augmente la saveur acide du lait fermenté (Accolas *et al.*, 1977 ; Bouillanne et Desmazeaud, 1980 ; 1981 ; Donkor *et al.*, 2006). D'autres facteurs stressant comprenant l'oxygène, l'épuisement nutritif et les métabolites autres que les acides organiques produits pendant la fermentation peuvent aussi influencer la survie des bifidobactéries en lait fermenté pendant l'entreposage (Takahashi *et al.*, 2004). Cependant, il y a une différence significative entre le taux de déclin de *Bifidobacterium animalis* (Bif3) dans les deux laits fermentés. Le taux de survie est

beaucoup mieux dans le lait fermenté de brebis que dans le lait reconstitué écrémé fermenté. Ceci peut s'expliquer par la teneur importante en protéines du lait de brebis (61,5g/L) qui ont un pouvoir tampon élevé selon Mietton *et al.*, (2004) et Salaun *et al.*, (2005). D'un autre côté les bifidobactéries sont bien protégées par les protéines du lait de brebis qui ont un effet protecteur contre l'acidité du lait fermenté (Lönnerdal, 2003).

Conclusion générale

Au cours de cette étude nous avons isolés des souches bactériennes qui appartiennent à trois genres utilisés généralement dans la production des yaourts et des fermentés probiotiques qui sont (*Bifidobacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*).

L'utilisation des milieux et des conditions de cultures qui répondent aux exigences de ces bactéries (surtout pour les bifidobactéries), nous ont permis de les bien isoler et purifier. Nous avons même constaté la forme typique de *Bifidobacterium* (aspect bifurqué).

Les tests physiologiques et biochimiques nous ont révélés que les souches Bif1, Bif2 et Bif3 isolées du lait fermenté probiotique (ACTEVIA Actiregularis de Danone) appartiennent à l'espèce *Bifidobacterium animalis* (l'espèce de *Bifidobacterium* la plus utilisée comme souche probiotique), les souches Lb1, Lb2 et Lb3 appartiennent à l'espèce *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et les souches Strp1, Strp2 et Strp3 appartiennent à l'espèce *Streptococcus thermophilus* (les ferments classiques dans la production des laits fermentés et les yaourts).

L'étude de la sensibilité de *B. animalis* (Bif1, Bif2 et Bif3) aux antibiotiques a montré que ces souches sont résistantes à l'acide nalidixique antibiotique généralement utilisé comme agent sélectif pour l'isolement des *Bifidobacterium*. Une résistance aux streptomycines, gentamicine, et tétracycline. Par contre elles ont montré une sensibilité aux spectinomycine, chloramphénicol, rifampicine, érythromycine et vancomycine.

Les propriétés technologiques de *B. animalis* Bif3 sont déterminées par sa croissance et son aptitude à fermenter le lait de brebis et le lait reconstitué écrémé en culture pure et culture mixte en association avec *St. thermophilus* Strp1 et *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lb1.

Le suivi de la cinétique de croissance et l'évolution de l'acidité et de pH au cours de la fermentation a révélé que *B. animalis* Bif3 se développe mieux en culture mixte (en association avec *St. thermophilus* Strp1 et *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lb1) dans le lait

de brebis que en culture pure, où son taux de croissance en culture pure est de $0,33 \text{ h}^{-1}$, et en culture mixte est de $0,90 \text{ h}^{-1}$.

Le taux de létalité *B. animalis* Bif3 pendant le stockage au froid à 6°C pendant 21 jours dans le lait fermenté de brebis (en culture pure et en culture mixte) est moins élevé que celui observé dans le lait reconstitué écrémé (dans les deux cultures).

Perspectives

Les résultats présentés dans cette étude nous ont permis de bien comprendre quelques mécanismes pour le développement d'un lait de brebis fermenté probiotique à l'échelle du laboratoire. Pour que cette expérience soit concrétisée en grand échelle nous proposons :

- 1- Etude probiotique du lait de brebis.
- 2- Etude génétique des souches de bifidobactéries.
- 3- Application biotechnologique des souches des bifidobactéries.
- 4- Production d'un lait fermenté à base du lait de brebis et des bifidobactéries probiotiques.
- 5- Collaboration avec un industriel pour le développement d'un procédé de fermentation à grand échelle.

Références bibliographiques

- Abbad Andaloussi S., Talbaoui H., Marczak R. and Bonaly R. (1995).** Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43: 995-1000.
- Abou-Donia S.A. (2004).** Recent developments in Zabady and Egyptian Labneh research: a review. *Egyptian J. Dairy Sci.*, 32:1–15.
- Abou-Donia S.A. (1984).** Egyptian fresh fermented milk products, *New Zealand Journal of Dairy Sci. technol.*, 19 (1): 7-18.
- Abu-Tarbaoush H. M., Al-Dagal M. M. and Al-Royli M. (1998).** Growth, viability and proteolytic activity of bifidobacteria in whole camel milk. *J. Dairy Sci.*, 81: 354-361.
- Accolas J.P., Bloquel R. Diddienne R. et Regnier J. (1977).** Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication de yoghourt. *Lait*, 57 (561/562) : 1-23.
- Aiba Y., Suzuki N., Kabir A. M. A., Takagi A. and Koga Y. (1998).** Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am. J. Gastroenterol.*, 93: 2097-2101.
- Alichanidis E. and Polychroniadou A. (1996).** Special features of dairy products from sheep and goat milk from the physicochemical and organoleptic point of view .In: Production and Utilization of Sheep and Goat Milk, (eds. International Dairy Federation), Brussels, pp. 21–43.
- Anifantakis E.M. (1986).** Comparison of the physico-chemical properties of ewe's and cow's milk. In: Proceedings of the IDF Seminar Production and Utilization of Ewe's and Goat's Milk, (eds. International Dairy Federation.), Bulletin No. 202. Athens, Greece, pp. 42–53.
- Anifantakis E.M., Rosakis B. and Ramou C. (1980).** Travaux Scientifiques de l'Institut Technologique Supérieur des Industries Alimentaires (Scientific work of the Technology Institut for Nutrition Industries). Plovdiv, Bulgaria, Tom, XXVII, CB1.
- Anjaneyulu A.S.R., Lakshmanan V. and Rao K.V. (1985).** Status of meat and milk production from Indian goats. *J. Food Sci. Technol.* 22: 151.
- Anonyme (2008).**
www.ebablyone.com/encyclopedie_Image:Bifidobacterium_adolescentis_Gram.jpg
- Anonyme (2006).** <http://www.magma.ca/~scimat/>
- AOAC (1990).** Official methods of analysis, 15th ed., Assoc. Offic. Anal. Chem., Arlington.
- AOAC (1984).** Official Methods of Analysis, 14th ed., Assoc. Offic. Anal. Chem., Washington, DC. No. 43.292, 7.001, 7.009, 7.006
- Arunachalam K.D. (1999).** Role of *Bifidobacterium* in nutrition, medicine and technology. *Nut. Res.*, 19(10): 1559-1597.
- Axelsson L. (1998).** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid bacteria, microbiology and functional aspects, second edition, (eds. Salminen S. and Wright A. von), Marcel Dekker, Inc., New York, USA. pp. 1-59.
- Baron M., Roy D. and Vuilleumard J. C. (2000).** Biochemical characteristics of fermented milk produced by mixed-cultures of lactic starters and bifidobacteria. *Lait*, 80: 465–478.

- Beerens H. (1990).** An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp., *Lett. Appl. Microbiol.*, 11:155–157.
- Beerens H. Gavini F. and Neut C. (2000).** Effect of exposure to air on 84 strains of bifidobacteria. *Anaerobe*, 6: 65-67.
- Bennama R. (1999).** Contribution à l'étude des bifidobactéries : Caractérisation biochimique, physiologique et technologique de souches isolées en Algérie. Thèse de Magister, département de biologie, faculté des sciences, Université d'Oran, Algérie.
- Bensoltane A., Yagoubi A.; Mahi M. and Cheriguene A. (2004).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional Algerian butter. *Egypt. J. Appl. Sci.*, 19(11B): 604-614.
- Bernet-Camarad MF., Lievin V., Brassart D., Neeser JR., Servin AL. and Hudault S. (1997).** The human *Lactobacillus acidophilus* strain La-1 secretes a non bacteriocin antibacterial substance active *in vivo* and *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 2747-2753.
- Bezkorovainy A. and Topouzian N. (1981).** The effect of metal chelators and other metabolic inhibitors on the growth of *B. bifidum* var. penn. *Clin. Biochem.*, 14: 135-141.
- Biavati B. and Mattarelli P. (1991).** *Bifidobacterium ruminantium* sp. nov. and *Bifidobacterium merycicum* sp. nov. from the rumens of cattle. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41: 163-168.
- Biavati B., Mattarelli P. and Crociani F. (1991).** *Bifidobacterium saeculare* a new species isolated from feces of rabbit. *Syst. Appl. Microbiol.*, 14: 389-392.
- Biavati B., Sozzi T., Mattarelli P. and Trovaletti L.D. (1992).** Survival of bifidobacteria from human habitat in acidified milk. *Microbiologica*. 15(2): 197-200.
- Biavati B., Vescovo M., Torriani S. and Bottazzi V. (2000).** Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Ann. Microbiol.*, 50: 117–131.
- Biavati B., Scardovi V. and Moore W.E.C. (1982).** Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32 : 358-373.
- Bockelmann W. and Fobker M. (1991).** Purification and characterization of the X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*. *Int. Dairy J.*, 1:55-66.
- Bolduc M. P., Raymond Y., Fustier P., Champagne C.P. and Vuilleumard J C. (2006).** Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk. *Int. Dairy J.*, 16: 1038–1048.
- Bouillanne C. et Desmazeaud M. (1981).** Classement de souches de *Lactobacillus bulgaricus* selon quelques caractères utilisés en fabrication de yoghourt. Association avec *Streptococcus thermophilus*. *Sciences des Aliments*, 1 : 7-17.
- Bouillanne C. et Desmazeaud M. (1980).** Etude de quelques caractères de souches de *Streptococcus thermophilus* utilisés en fabrication de yoghourt et proposition d'une méthode de classement. *Lait*, 60(598) : 458-473.
- Boylston T. D., Vinderola C. G., Ghoddusi H. B. and Reinheimer J. A. (2004).** Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *Int. Dairy J.*, 14: 375–387.

- Breed R.S., Murray E.G.D. and Smith N.R. (1957).** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th edn., Williams & Wilkins, Baltimore.
- Cai Y., Matsumoto M. and Benno Y. (2000).** *Bifidobacterium lactis* Meile et al. 1997 is a subjective synonym of *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka 1969) Scardovi and Trovatelli 1974. *Microbiol. Immunol.*, 44 :815–820.
- Campbell J.R. and Marshall R.T. (1975).** The Science of Providing Milk for Man. McGraw-Hill Book Co., New York, NY, p. 801.
- Castellani A. and Chalmers A. J. (1919).** Manual of tropical medicine, 3rd ed. William Wood and Co., New York.
- Carmen-Collado M. and Hernandez M. (2007).** Identification and differentiation of *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* species in fermented milk products with bifidobacteria. *Microbiol. Res.*, 162: 86-92
- Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L. and Collins J.K. (1998).** Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26: 333–337.
- Chekroun A. (2005).** Valorisation diététique des protéines du lait de vache par la fermentation lactique : rôle des bactéries lactiques et des bifidobactéries. Thèse de doctorat d'état Es-Sciences, département de biologie, faculté des sciences, Université d'Oran, Algérie.
- Chekroun A. and Bensoltane A. (2007) .** Nutritional characterization of fermented cow's milk at 45°C by *Lactobacillus acidophilus* and *bifidobacteria*. *Egypt. J. App. Sci.* 22: (12A), 188-202.
- Chekroun A. , Bensoltane A. , Kheroua O. and Saidi D. (2006) .** Biotechnological characteristics of fermented milk by bacterial associations of the strains *Streptococcus* , *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* . *Egypt. J. App. Sci.* 21: (2b), 583-598.
- Cheng C. C. and Nagasawa, T. (1985).** Purification and some properties of an aminopeptidase from *Bifidobacterium breve*. *Japanese J. Zootech. Sci.*, 56(3): 257-266.
- Cheng C. C. and Nagasawa T. (1984).** Effect of peptides and amino acids produced by *Lactobacillus casei* in milk on the acid production of bifidobacteria. *Japanese J. Zootech. Sci.*, 55: 339-349.
- Cherigene A., Chougrani F., Bekada A. M. A., El soda M. and Bensoltane A. (2007).** Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goat's milk. *A. J. B.*, 6(15): 1854-1861.
- Cherigene A., Chougrani F. and Bensoltane A. (2006).** Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian goat's milk. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 9(7): 1242-1249.
- Chougrani F., Cherigene A. and Bensoltane A. (2008).** Use of lactic strains from Algerian ewe's milk in the manufacture of a natural yogurt. *A.J.B.*, 7 (8): 1181-1186.
- Chougrani F., Cherigene A. and Bensoltane A. (2006).** Identification and some technological properties of lactic acid bacteria isolated from Algerian ewe's milk. *Egypt. J. App. Sci.*, 21(8): 148-157.
- Clare D.A. and Swaisgood H.E. (2000).** Bioactive milk peptides: a prospectus. *J. Dairy Sci.*, 83: 1187–1195.

- Codex Alimentarius Commission (2003).** CODEX standard for fermented milks. Codex Stan243-2003.
http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf
- Coconnier MH. , Liévin V., Hemery E. and Servin AL. (1998).** Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 4573-4580.
- Collado M.C., Moreno Y., Cobo J.M. and Hernandez M. (2006).** Microbiological evaluation and molecular characterization of bifidobacteria strains in commercial fermented milks. *Eur. Food Res. Technol.*, 1–2:112–117.
- Collado M.C. Gonzalez A., Gonzalez R., Hernandez M., Ferrus M.A. and Sanz Y. (2005)** Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 25: 385–391
- Collins J.K., Thornton G. and O’Sullivan G.O. (1998).** Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.*, 8: 487-490.
- Coni E., Bocca B. and Caroli S. (1999).** Minor and trace element content of two typical Italian sheep dairy products. *J. Dairy Res.*, 66: 589–598.
- Corneau N., Emond E. and LaPointe G. (2004).** Molecular characterization of three plasmids from *Bifidobacterium longum*. *Plasmid.*, 51: 87–100.
- Credoc (2004).** Enquête CCAF 2004 du Credoc <http://www.credoc.fr>.
- Crociani F. and Matteuzzi D. (1982).** Urease activity in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol.*, 133: 417-423.
- Crociani F., Biavati B., Alessandrini A., Chiarini C. and Scardovi V. (1996).** *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 564-571.
- Cummins C. S., Glendenning O. M. and Harris H. (1957).** Composition of the cell wall of *Lactobacillus bifidus*. *Nature* (London), 180: 337-338.
- D’Aimmo M. R., Modesto M. and Biavati B. (2007).** Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *Int. J. Food Microbiol.*, 115: 35–42.
- Dave R. I. and Shah N. P. (1997).** Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *Int. Dairy J.*, 7: 31–41.
- Debski B., Picciano M.F. and Milner J.A. (1987).** Selenium content and distribution of human, cow and goat milk. *J. Nutr.*, 117: 35–46.
- Deguchi Y., Morishita T. and Mutal M. (1985).** Comparative studies on synthesis of water soluble vitamins among human species of Bifidobacteria. *Agr. Biol. Chem.*, 49: 13-19.
- Dehnert J. (1957).** Untersuchungen über die Gram positive Stuhlflora des Brustmilchkinder. *Zentrabl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. Reihe A*, 169: 66-79.
- Delcenserie V., Gavini F., Beerens H., Tresse O., Franssen C. and Daube G. (2007) .** Description of a new species, *Bifidobacterium crudilactis* sp. nov., isolated from raw milk and raw milk cheeses. *System. Appl. Microbiol.*, 30 : 381–389
- Delcenserie V., China B., Gavini F., Beerens H. and Daube G. (2002).** Proposition pour un nouveau standard indicateur de la contamination d’origine fécale dans les aliments : le genre *Bifidobacterium*. *Ann. Méd. Vét.*, 146 : 279-293.

- Delgado S., Florez A.B. and Mayo B. (2005).** Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Curr. Microbiol.*, 50: 202–207.
- De Man J.C., Rogosa M. and Sharpe E.M. (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23: 130-135.
- Desjardins M. L., Roy D. and Goulet J. (1990).** Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. *J. Dairy Sci.*, 73: 299-307.
- De Vrese M., Stegelmann A., Richter B., Fenselau S., Laue C. and Schrezenmeir J. (2001).** Probiotics compensation for lactase insufficiency. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73(2S): 421S-429S.
- De Vries W. and Stouthamer A.H. (1968).** Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol and xylose by bifidobacteria. *J. Bacteriol.*, 96(2): 472-478.
- De Vries W., Gerbrandy S.J. and Stouthamer A.H. (1967).** Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 136: 415-425.
- Dong X., Xin Y., Jian W., Liu X. and Ling D. (2000).** *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 119-125.
- Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T. and Shah N. P. (2006).** Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *Int. Dairy J.*, 16: 1181-1189.
- Eggimann B. and Bachmann M. (1980).** Purification and partial characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40: 876-882.
- El-Soda M., Macedo A. and Olson N. F. (1992).** The peptide hydrolase system of *Bifidobacterium* species. *Milchwissenschaft*, 47(2): 87-90.
- Euzéby J.P. (2007).** List of prokaryotic names with standing in nomenclatures, list of genera included in families. Update: September 04, 2007.
<http://www.bacterio.cict.fr/classifgenerafamilies.html#Bifidobacteriaceae>.
Date de visite du site vendredi 07 septembre 2007, 16h: 32min.
- FAO STAT data (2005).** <http://www.fao.org/faostat>
- Frank AMK. , Kegma F. and Weerkamp HA. (1993).** Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Neth. Milk. Dairy. J.*, 47: 151-164.
- Fuller R. (1989).** Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66: 365–378.
- Gandhi D.N. and Rao S.M. (1989).** Dahi and acidophilus. *Indian Dairyman*, 41: 521-525.
- Gavini F., Pourcher A-M., Neut C., Monget D., Romond C., Oger C. and Izard D. (1991).** Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origin. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 4: 548-557.
- Garvie E.I. (1984).** Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. In: *Methodes in Microbiology* volume 16. Academic press London: 147-178.
- Gebhardt S.E. and Matthews R.H. (1991).** Nutritive Value of Foods. USDA, Human Nutrition Information Service Publ., Washington, DC, USA, Home & Garden Bulletin 72, p.72.
- Gibson G.R. and Roberfroid M.B. (1995).** Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J. Nutr.*, 125: 1401-1412.
- Gibson G.R. and Wang X. (1994a).** Bifidogenic Properties of Different types of Fructo-oligosaccharides. *Food Microbiol.*, 11: 491- 498.

- Gibson G.R. and Wang X. (1994b).** Enrichment of Bifidobacteria from Human Gut Contents by Oligofructose using Continuous Culture. *FEMS Microbiol. Lett.*, 118: 121-128
- Gilliland S. E. (1991).** Properties of Yoghurt. In: Therapeutic Properties of Fermented Milks, (eds. Robinson R. K.) London, Chapman & Hall.
- Gilliland S. E., Reilly S. S., Kim G. B. and Kim H. S. (2002).** Viability during storage of selected probiotic lactobacilli and bifidobacteria in a yogurt-like product. *J. Food Sci.*, 67:3091-3095.
- Gionchetti P., Rizzello F., Venturi A., Brigidi P., Matteuzzi D., Bazzocchi G., Poggioli G., Miglioli M. and Campieri M. (2000).** Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: A double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterol*, 119: 305-9.
- Glick M.C., Sall T., Zilliken J. and Mudd S. (1960).** Morphological changes *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus* produced by a cell-wall precursor. *Biochimica and Biophysica Acta.*, 37: 361 -363.
- Godward G. and Kailasapathy K. (2003).** Viability and survival of free, encapsulated and co-encapsulated probiotic bacteria in ice cream. *Milchwissenschaft*, 58:161-164.
- Goh J.S., Kwon L.K. and Kim Y.O. (1986).** Studies on the growth of *Bifidobacterium bifidum* ATCC 1 1863 in milk. *Korean J. Dairy Sci.*, 8(1):48-56.
- Gomes A. M. P. and Malcata F. X. (1998).** Use of small ruminants' milk supplemented with available nitrogen as growth media for *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Appl. Microbiol*, 85:839–848.
- Gopal PK., Prasad J., Smart J. and Gill HS. (2001).** *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. Food Microbiol.*, 67(3) : 207-216.
- Grosso C. R. F. and Fávaro-Trindade C. S. (2004).** Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. *Brazilian J. Microbiol.*, 35: 151-156
- Guandalini S., Pensabene L., Zikri MA., Dias JA., Casali LG., Hoekstra H., Kolacek S., Massar K., Micetic-Turk D., Papadopoulou A., de Sousa JS., Sandhu B., Szajewska H. and Weizman Z. (2000).** *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhoea: A multicenter European trial. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 30: 54-60.
- Guarner F. and Schaafsma GJ. (1998).** Probiotics., *Int. J. Food Microbiol.*, 39: 237-238
- Gueimonde M., Delgado S., Mayo B., Ruas-Madiedo P., Margolles A. and Reyes-Gavilan C. G. de los (2004).** Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Res. Int.*, 37: 839-850.
- Guiraud J. P. (1998).** Analyse du lait. In : Microbiologie alimentaires, (eds. Guiraud J. P.). Dunod Parie. pp. 390-391.
- Guler-Akın M. B. and Akın M. S. (2007).** Effects of cysteine and different incubation temperatures on the microflora, chemical composition and sensory characteristics of bio-yogurt made from goat's milk. *Food Chem.*, 100: 788–793.

- Guo M. (2003).** Goat's milk. *In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* Caballero, B., (eds. Trugo L. and Finglas P.), Academic Press, London, UK, pp. 2944–2949.
- Gupta P., Andrew H., Kirschner B.S. and Guandalini S. (2000).** Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 31:453-7.
- Hadadji M. (2007).** Caractérisation biochimique, et microbiologique des bifidobactéries et leurs utilisations en biotechnologie. Thèse de doctorat d'état Es-Sciences, département de biologie, faculté des sciences, Université d'Oran, Algérie.
- Hadadji M. and Bensoltan A. (2006).** Growth and lactic acid production by *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in goat's milk. *A.J.B.*, 5(6): 505-509.
- Haenlein G.F.W. (2004).** Goat milk in human nutrition. *Small Rumin. Res.*, 51: 154–163.
- Haenlein G.F.W. (2001).** Past, present and future perspectives of small ruminant research. *J. Dairy Sci.*, 84: 2097–2115.
- Haenlein G.F.W. (1996).** Nutritional value of dairy products of ewe and goat milk. *In: Proceedings of the, IDF/CIRVAL, Seminar Production, Utilization of Ewe, Goat, Milk*, vol. 9603, *Internat. Dairy Fed. Publ.*, Brussels, Belgium, pp. 159–179.
- Haenlein G.F.W. and Wendorff W.L. (2006).** Sheep milk: production and utilization of sheep milk. *In: Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*, (eds. Park Y.W. and Haenlein G.F.W.), Blackwell Publishing Professional, Oxford, UK, and Ames, Iowa, USA, pp. 137–194.
- Haenlein G.F.W. and Caccese R. (1984).** Goat milk versus cow milk. *In: Extension Goat Handbook*, (eds. Haenlein G.F.W. and Ace D.L.), USDA Publ., Washington, DC, p. 1, E-1.
- Havenaar R and Huis in't Veld JHJ (1992).** Probiotics: A general view. *In: Wood BJB: The Lactic Acid Bacteria*, Vol. 1: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease, Chapman & Hall, New York, NY: 209–224
- Heller J.K. (2001).** Probiotic bacteria in fermented food: Product characteristics and starter organisms. *American J. Clin. Nutr.*, 73: 374S-379S.
- Hernandez-Ledesma B., Davalos A., Bartolome B. and Amigo L. (2005).** Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from (alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC–MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 588–593.
- Heyman M. and Heuvelin E. (2006).** Probiotic micro-organisms and immune regulation: the paradox. *Nutr. Clin. metab.*, 20 : 85–94.
- Holland D.F. (1920).** Generic index of the commoner forms of bacteria. *J. Bacteriol.*, 5: 215-229.
- Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J. and Schillinger U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American J. Clin. Nutr.* 73(2): 365S-373S.
- Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. and Huis in't Veld J.H.J. (1998).** Overview of gut flora and probiotics. *I. J. Food Microbiol.*, 41: 85-101.
- Hosada M. , Hashimoto H., He D., Morita H. and Hosono A. (1996).** Effect of administration of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA-2 on faecal mutagenicity and microflora in human intestine. *J. Dairy. Sci.*, 79: 745-749.

- Hoyles L., Inganas E., Falsen E., Drancourt M., Weiss N., McCartney A.L. and Collins M.D. (2002).** *Bifidobacterium scardovii* sp. nov., from human sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52: 995–999.
- Ibrahim S. A. and Bezkorovainy A. (1994).** Growth promoting factors for *Bifidobacterium longum*. *J. Food Sci*, 59: 189-191.
- Isolauri E., Arvola T., Sutas Y., Moilanen E. and Salminen S. (2000).** Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin. Exp. Allergy.*, 30: 1604-10.
- Isolauri E., Juntunen M., Rautanen T., Sillanauke P. and Koivula T. (1991).** A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp. strain GG) promotes recovery from acute diarrhoea in children. *Pediatrics*, 88: 90-97.
- Ito M., Kimura M., Deguchi Y., Miyamori-Watabe A., Yajima T. and Kan T. (1993).** Effects of Transgalactosylated Disaccharides on the Human Intestinal Microflora and their Metabolism. *J. Nutr. Sci. Vitamin.*, 39: 279-288
- Iwasaki H., Araki Y., Ito E., Nagaoka M. and Yokokura T. (1990).** Structure of macroamphiphiles from several *Bifidobacterium* strains. *J. Bacteriol.*, 172: 845-852.
- Iwata M. and Morishita T. (1989).** The presence of plasmids in *Bifidobacterium breve*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 9: 165–168.
- Jaana Mättö , Angela H.A.M. van Hoek , Konrad J. Domig , Maria Saarela , Ana Belen Florez , Elke Brockmann , Ernst Amtmann, Baltasar Mayo, Henk J.M. Aarts and Morten Danielsen (2007).** Susceptibility of human and probiotic *Bifidobacterium* spp. to selected antibiotics as determined by the Etest method. *Int. Dairy J.*, 17: 1123–1131.
- Jandal J.M. (1994).** Physical, chemical and biochemical studies on leben in Salah Aladdin province area. *Beverage Food W.*, 21: 11-12.
- Jenness R. (1980).** Composition and characteristics of goat milk: review 1968–1979. *J. Dairy. Sci.*, 63: 1605–1630.
- Jenness R., Shipe W.F. and Sherbon J.W. (1974).** In: Fundamentals of Dairy Chemistry (eds. Sebb B.H., Johnson A.H. and Alford J.A.), A.V. Publishing Co., Westport, p. 402.
- Jian W. and Dong X. (2002).** Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* and *Bifidobacterium denticolens* to *Scardovia inopinata* gen. nov., comb. nov., and *Parascardovia denticolens* gen. nov., comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52:809-812.
- Jian W., Zhu L. and Dong X. (2001).** New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 1633-1638.
- Juarez M. and Ramos M. (1986).** Physico-chemical characteristics of goat milk as distinct from those of cow milk. In: Proceedings of the IDF Seminar Production and Utilization of Ewe's and Goat's Milk, (eds. International Dairy Federation), Bulletin No. 202. Athens Greece, pp. 54–67.
- Kabir AM., Aiba Y., Takagi A., Kamiya S., Miwa T. and Koga Y. (1997).** Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut*, 41: 49-55.
- Kailasapathy K. and Sultana K. (2003).** Survival and b-galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice-cream. *Australian J. Dairy Technol.*, 58:223–227.

- Kampa M., Loukas S., Hatzoglou A., Daminaki A., Martin P.M. and Castanas E. (1997).** Opioid alkaloids and casomorphin peptides decrease the proliferation of prostatic cancer cell lines (LNCaP, PC3 and DU145) through a partial interaction with opioid receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 335: 255–265.
- Kehagias C., Csapo J., Konteles S., Kolokitha E., Koulouris S. and Csapo-Kiss Zs. (2008).** Support of growth and formation of D-amino acids by *Bifidobacterium longum* in cow's, ewe's, goat's milk and modified whey powder products. *Int. Dairy J.*, 18 : 396–402.
- Klaenhammer T., Altermann E., Arigoni F., Bolotin A., Breidt F., Broadbent J., Cano R., Chaillou S., Deutscher J., Gasson M., van de Guchte M., Guzzo J., Hartke A., Hawkins T., Hols P., Hutkins R., Kleerebezem M., Kok J., Kuipers O., Lubbers M., Maguin E., McKay L., Mills D., Nauta A., Overbeek R., Pel H., Pridmore D., Saier M., van Sinderen D., Sorokin A., Steele J., O'Sullivan D., de Vos W., Weimer B., Zagorec M. and Siezen R. (2002).** Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek, I. J. General Mol. Microbiol.* 82(1-4):29-58.
- Klaver F.A.M., Kingma F. and Weerkamp A.H. (1993).** Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Netherlands Milk Dairy J.*, 47: 151-164.
- Klein G., Pack A., Bonaparte C. and Reuter G. (1998).** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 41: 103–125.
- Korhonen H. and Pihlanto-Leppala A. (2003).** Food derived bioactive peptides opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Des.* , 9: 1297–1308.
- Kudoh Y., Matsuda S., Igoshi K. and Oki T. (2001).** Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* IFO13953. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, 48: 44–50.
- Kurkdjian V. and Gabrielian T. (1962).** Physical and chemical properties and composition of ewe's milk. *In: Proceedings of the XVI Int. Dairy Congr.*, vol. AP, pp. 197–208.
- Kurmann J.A. (1993).** Une nouvelle génération de cultures en industrie laitière: aspects microbiologiques, biotechnologiques et probiotiques des cultures de bactéries composées de souches sélectionnées d'origine intestinale humaine. *Lait* , 73: 233-239
- Kurmann J.A. and Rasic J.L. (1991).** The health potential of products containing bifidobacteria : Therapeutic properties of fermented milks. *Elsevier Appl. Sci.*, Londres, Angleterre.
- Larpent J.P. (1996).** Les bacteries lactiques. *In : Microbiologie alimentaire, Aliments fermentés et fermentations alimentaires (Tome 2), 2^e édition*, (eds Bourgeois C.M. et Larpent J.P.), Lavoisier, Tec. & Doc., Paris. pp. 6-33
- Larson B.L. and Smith V.R. (1974).** Lactation, vol. 4. Academic Press, New York, p. 1994.
- Lauer E. (1990).** *Bifidobacterium gallicum* sp. nov. isolated from human feces. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40: 100-102.
- Lauer E. and Kandler O. (1983).** DNA-DNA homology, murein types and enzyme patterns in the type strains of the genus *Bifidobacterium*. *System. Appl. Microbiol.*, 4:42-64.
- Leahy S.C., Higgins D.G., Fitzgerald G.F. and van Sinderen, D. (2005).** Getting better with bifidobacteria : a review. *J. Appl. Microbiol.*, 98: 1303-1315.

- Leblond-Bourget N., Philippe H., Mangin I. and Decaris B. (1996).** 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 102-111.
- Lee J.-H. and O'Sullivan D.J. (2006).** Sequence analysis of two cryptic plasmids from *Bifidobacterium longum* DJO10A and construction of a shuttle cloning vector. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 527-535.
- Lee J.H. and Yoon Y.H. (1998).** Characteristics of cell wall hydrolysing enzyme of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. *Korean J. Anal. Sci.*, 40: 43-50.
- Lehmann K. B. and Neumann R. O. (1927).** Bakteriologie insbesondere Bakteriologische Diagnostik, Chapter 7. Allgemeine und spezielle Bakteriologie, vol. 2.
- Lilly DM and Stillwell RH (1965).** Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147:747-748.
- Loones A. (1994).** Laits fermentés par des bactéries lactiques. In: Bactéries Lactiques (eds De Roissard H. et Luquet F.M.), Loriga, Uriage. pp. 135-154.
- Loönnnerdal B. (2003).** Nutritional and physiological significance of human milk proteins. *American J. Clin. Nutr.*, 77: 1537S-1543S.
- Mader J.S., Salsman J., Conrad D.M. and Hoskin D.W. (2005).** Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines. *Mol. Cancer Ther.*, 4: 612-624.
- Mahi M., Yagoubi A., Rouissat L., Tabak S, Medouakh L. and Bensoltane A. (2006).** Growth , viability and acidifying activity of bifidobacteria in goat's milk. *Egypt. J. App. Sci.* 21: (3), 248-261.
- Mangin I., Bouhnik Y., Bisetti N. and Descaris B. (1999).** Molecular monitoring of human intestinal *Bifidobacterium* strain diversity. *Res. Microbiol.*, 150: 343-350.
- Mangin I., Bourget N. and Decaris B. (1996).** Ribosomal DNA polymorphism in the genus *Bifidobacterium*. *Res. Microbiol.*, 147:183-192.
- Marchal N., Bourdon J. and Richard C. L. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Ed. Doin.* p. 65-149.
- Marshall V. M. (1987).** Fermented milks and their future trends. I. Microbial aspects. *J. Dairy Res.*, 54(4): 559-574.
- Marchall V.M. (1982)** .Flavor compounds in fermented milks. *Perfumer and Flavorist.* 7 (2): 27-34.
- Marshall V.M., Cole W.M. and Mabbitt L.A. (1982).** Fermentation of specially formulated milk with single strains of bifidobacteria. *J. Soc. Dairy Technol.*, 35(4): 143-1 44.
- Martin-Diana A.B., Janer C., Pelaez C. and Requena T. (2003).** Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, 13: 827-833.
- Masco L., Van Hoorde K., De Brandt E., Swings J. and Huys G. (2006).** Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium* strains from humans, animals and probiotic products. *J. Antimicrob. Chemother.*, 58:85-94.
- Masco L., Huys G., De Brandt E., Temmerman R. and Swings J. (2005).** Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *I. J. Food Microbiol.*, 102: 221-230.
- Masco L., Ventura M., Zink R., Huys G. and Swings J. (2004).** Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at

- the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 1137-1143.
- Matsumoto M., Ohishi H. and Benno Y. (2004)** .H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *Int. J. Food Microbiol.*, 93:109–113
- Mattarelli P., Biavati B., Alessandrini A., Crociani F. and Scardovi V. (1994).** Characterization of the plasmid pVS809 from *Bifidobacterium globosum*. *Microbiologica*, 17: 327–331.
- Matteuzzi D., Crociani F. and Emaldi O. (1978).** Amino Acids produced by bifidobacteria and some clostridia. *Ann. Microbiol.*, 129 B: 175-181.
- Matteuzzi D., Crociani F., Zani G. and Trovatelli L.D. (1971).** *Bifidobacterium suis* n. sp.: a new species of the genus *Bifidobacterium* isolated from pig feces. *Allg. Mikrobiol.*, 11:387-395.
- Medina L. M. and Jordano R. (1994).** Survival of constitutive microflora in commercially fermented milk containing bifidobacteria during refrigerated storage. *J. Food Protec.*, 56: 731–733.
- Meile L., Ludwig W., Rueger U., Gut C., Kaufmann P., Dasen G., Wenger S. and Teuber M. (1997).** *Bifidobacterium lactis* sp.nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *System. Appl. Microbiol.*, 20: 57-64.
- Mens P.L. (1985).** Propriétés physico-chimiques nutritionnelles et chimiques (physico-chemical nutritional and chemical properties). In: *Laits et Produits Laitiers de Vache, Brebis et de Chèvre (Milk and Milk Products from Cows, Sheep and Goats)*, vol. 1 (eds. Luquet F.M.), Apria, Paris, pp. 349–367.
- Metchnikoff E. (1907).** Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: *The prolongation of life:Optimistic studies*. W. Heinemann, London: 161-183.
- Mercenier A., Pavan S. and Pot B. (2003).** Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Curr. Pharma. Design*, 8: 99-110.
- Merilainen V.T. (1984).** Microorganisms in fermented milks : other microorganisms (besides lactic acid bacteria). *Bulltein Int. Dairy Fed.*, 179:89-93.
- Meyer J. and Jordi R. (1987).** Purification and characterization of Xprolyl- dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus lactis* and from *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Sci.*, 70: 738-745.
- Micanel N., Haynes I. N. and Playne M. J. (1997).** Viability of probiotic cultures in commercial australian yogurts. *Australian J. Dairy Technol.*, 52: 24–27.
- Midolo PD., Lambert JR., Hull R., Luo F. and Grayson ML (1995).** *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* , 79: 475-479.
- Mietton B., Gaucheron F. and Salaun-Michel F. (2004).** Minéraux et transformations fromagères. In : *Minéraux et produits laitiers*, (eds. Gaucheron F.), Lavoisier, Paris. pp. 463–471.
- Minagawa E., Kaminogawa S., Tsukasaki F., Motoshima H. and Yamauchi K. (1985).** Exopeptidase profiles of bifidobacteria. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 31:599-606.

- Mitsuoka T. (1969).** Vergleichende Untersuchungen über die Bifidobakterien aus dem Verdauungstrakt von Menschen und Tieren. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.* Abt. 1 Orig. Reihe A, 210:52-64.
- Mitsuoka, T., Hidaka, H. and Eida, T. (1987)** .Effect of Fructo-oligosaccharides on Intestinal Microflora. *Die Nahrung* 31:427-436
- Miyake T., Watanabe K., Watanabe T. and Oyaizu H. (1998).** Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rDNA sequences. *Microbiol. Immunol.*, 42: 661-667.
- Modler, H.W. (1994).** Bifidodogenic Factors-Sources, Metabolism and Applications . *Int. Dairy J.*, 4: 383-407.
- Moio L., Dekimpe J., Etievant P. and Addeo F. (1993).** Neutral volatile compounds in the raw milks from different species. *J. Dairy Res.*, 60: 199–213.
- Morelli L. (2000).** In vitro selection of probiotic lactobacilli: A critical appraisal. *Curr Issues Intestinal Microbiol.*, 1:59-67.
- Moubareck C., Gavini F., Vaugien L., Butel M.J. and Doucet-Populaire F. (2005).** Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* , 55: 38–44.
- Murawaki Y., Kobayashi M., Koda M. and Kawasakia H. (2000).** Effects of lactulose on intestinal bacterial flora and fecal organic acids in patients with liver cirrhosis *Hepato. Res.*, 17: 56–64
- Murti T.W., Roger S. Bouillanne C., Landon M. et Desmazeaud M. (1992).** Croissance de *Bifidobacterium* sp. CNRZ 1494 dans l'extrait de soja et le lait de vaches effets sur des composés aromatiques. *Science des Aliments*, 12(3) : 429-439.
- Nannizzi A. (1934).** Repertio sistematico dei miceti dell'uomo e degli animali. Pollacci G. (ed.), *Tratto di Micopathologia Umana* (Sienna) 4:13.
- Okamoto M., Benno y., Leung K.P. and Maeda N. (2008).** *Bifidobacterium tsurumiense* sp. nov., from hamster dental plaque. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58: 144-148.
- Okazaki M., Fujiwaka S. and Matsumoto N. (1990).** Effect of Xylooligosaccharide on the Growth of Bifidobacteria. *Bifidobacteria and Microflora* ,9: 77-86
- Olsen E. (1949).** Studies on the intestinal flora of infants. *Ejnar Munksgaard*, Copenhagen.
- Op Den Camp H., Veerkamp J., Oosterhof A. and Can Hal Beek H. (1985).** Structure of the lipoteichoic acids from *B. bifidum* spp. *Penn. Biochim. Biophys. Acta.*, 795 :301-313.
- O’Riordan K. and Fitzgerald G.F. (1999).** Molecular characterization of a 5.75-kb cryptic plasmid from *Bifidobacterium breve* NCFB 2258 and determination of mode of replication. *FEMS Microbiol. Lett.*, 174: 285–294.
- Orla-Jensen S. (1924).** La classification des bactéries lactiques. *Lait* , 4: 468-474.
- Ouwehand A. C. and Salminen S. (1998).** The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int. Dairy J.*, 8: 749–758.
- Papadimitriou C. G. , Vafopoulou-Mastrojiannaki A., Silva S. V. Gomes A-M., Malcata F. X. and Alichanidis E. (2007).** Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food Chem.*, 105: 647–656.
- Park M.S., Lee K.H. and Ji G.E. (1997).** Isolation and characterization of two plasmids from *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 25: 5–7.

- Park M.S., Shin D.W., Lee K.H. and Ji G.E. (1999).** Sequence analysis of plasmid pKJ50 from *Bifidobacterium longum*. *Microbiolo.*, 145: 585–592.
- Park Y.W. (2006).** Goat milk: chemistry and nutrition. In: Handbook of Milk of Non-bovine Mammals (eds. Park Y.W. and Haenlein G.F.W.), Blackwell Publishing Professional, Oxford, UK/Ames, Iowa, pp. 34–58
- Park Y.W. (1994).** Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Rumin. Res.*, 14: 151–161.
- Park Y.W. and Chukwu H.I. (1989).** Trace mineral concentrations in goat milk from French-Alpine and Anglo-Nubian breeds during the first 5 months of lactation. *J. Food Compos. Anal.* 2: 161–169.
- Park Y.W., Juarez M., Ramos M. and Haenlein G.F.W. (2007).** Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.*, 68: 88–113
- Parkash S. and Jenness R. (1968).** The composition and characteristics of goat's milk: a review. *Dairy Sci. Abstr.*, 30 : 67–75.
- Perdone CA., Bernabeu AO., Postaire ER., Bouley CF. and Reinert P. (1999).** The effect of supplementation by *Lactobacillus casei* (strain DN-114 001) on acute diarrhoea in children attending day care centers. *Int. J. Clin. Pract.*, 53:179-184.
- Prenoud S., Schneid-Citrain N., Agnetti V., Berton S., Faurie J.M., Marchal L., Obis D., Oudot E., Paquet D. et Robinson T. (2005).** Application des bactéries lactiques dans les produits laitiers frais et effets probiotiques. In : Bactéries lactiques et probiotiques, (eds : Luquet F-M. et Corrieu G). Lavoisier, Editions Tec & Doc Parie.
- Petschow B. W. and Talbott D. (1991).** Response *Bifidobacterium* species Growth promoters of human and bovine milk. *Ped. Res.*, 29: 208-213.
- Petschow B.W. and Talbott R.D. (1990).** Growth promotion of *Bifidobacterium* species by whey and casein fractions from human and bovine milk. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 287-292.
- Poch M. and Bezkorovainy A. (1988).** Growth-enhancing supplements for various species of genus *Bifidobacterium*. *J. Dairy Sci.*, 71: 3214-3221.
- Posati L.P. and Orr M.L. (1976).** Composition of Foods. ARS, USDA, Washington, DC (Agric. Handbook No. 8–1).
- Pribram E. (1929).** A contribution to the classification of microorganisms. *J. Bacteriol.*, 18: 361-394.
- Pulina G. and Bencini R. (2004).** Dairy Sheep Nutrition. CABI Publ., Wallingford, UK, p.222
- Puntoni V. (1937).** Sulle relazioni fra il b. bifido gli attinomiceti anaerobi typo Wolff-Israel. *Ann. Ig. Sper.* , 47: 157-168.
- Radke-Mitchell L. and Sandine W. E. (1984).** Associative growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* : a review. *J. Food Prot.*, 47: 245-248.
- Ramos M. and Juarez M. (2003).** Sheep milk. In: Encyclopedia of Dairy Sciences, vol. 4, (eds. Roginski, H., Fuquay J.W. and Fox P.F.), Academic Press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 2539–2545.
- Rasic J. Lj. and Kurmann J. Am. (1983).** Bifidobacteria and their role. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, 278 pp.

- Rastall R. A. and Gibson G. R. (2002).** Prebiotic oligosaccharides: Evaluation of biological activities and potential future developments. *In: Probiotics and prebiotics: where are we going?*, (eds. Tannock G.W.), Norfolk: Caister Academic Press. pp. 107–148.
- Ravula R. R. and Shah N. P. (1998).** Effect of acid casein hydrolysate and cysteine on the viability of yogurt and probiotic bacteria in fermented frozen dairy desserts. *Australian J. Dairy Technol.*, 53(3): 175–179.
- Remeuf F. and Lenoir J. (1986).** Relationship between the physicochemical characteristics of goat's milk and its rennetability. *Intl. Dairy Bull.*, 202: 68.
- Renner E., Schaafsma G. and Scott K.J. (1989).** Micronutrients in milk. *In: Micronutrients in Milk and Milk-based Products*, (eds. Renner E.), Elsevier Appl. Sci., New York, pp. 1–70.
- Reuter G. (1963).** Vergleichende Untersuchungen über die Bifidus-Flora in Säuglings- und Erwachsenenstuhl. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Hyg. Abt. Orig.*, 191: 486–507.
- Reynolds E.G. (1987).** Patent Application WO 87/07615A1
- Rival S.G., Fornaroli S., Boeriu C.G. and Wichers H.J. (2001a).** Caseins and casein hydrolysates. 1. Lipoxigenase inhibitory properties. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 287–294.
- Rival S.G., Boeriu C.G. and Wichers H.J. (2001b).** Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxigenase inhibition. *J. Agric Food Chem.*, 49: 295–302.
- Rouissat L. and Bensoltane A. (2006).** Physico-chemical, microbiological and biotechnological studies of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk of Algerian tow breeds (Ouled Djellal and El Hamra). *Egypt. J. App. Sci.* 21: (2b), 567–582.
- Rogosa M. (1974).** Genus III, *Bifidobacterium* Orla-Jensen. *In: Buchanan R.E., Gibbons N.E.*, eds, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edn., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 669–676.
- Rosenthal I. and Bernstein S. (1998).** The survival of a commercial culture of bifidobacteria in milk products. *Milchwissenschaft*, 53: 441–443.
- Rossi M., Bridigi P., Gonzalez A., Rodriguez V. and Matteuzzi D. (1996).** Characterization of the plasmid pMB1 from *Bifidobacterium longum* and its use for shuttle vector construction. *Res. Microbiol.*, 147:133–143.
- Roy D. (2005).** Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. Review. *Lait*, 85: 39–56.
- Roy D., Dussavlt F. and Ward P. (1990).** Growth requirements of *Bifidobacterium* strains in milk. *Milchwissenschaft*. 45(8): 500–502.
- Ruas-Madiedo P., Hernandez-Barranco A., Margolles A. and Reyes-Gavilan Clara G. de los (2005).** A Bile Salt-Resistant Derivative of *Bifidobacterium animalis* Has an Altered Fermentation Pattern When Grown on Glucose and Maltose. *Appl. Env. Microbil.*, 71(11): 6564–6570.
- Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J. and Mattila-Sandholm T. (2000).** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.*, 84: 197–215.
- Saavedra JM., Bauman NA., Oung I., Perman JA. and Yolken RH. (1994).** Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet.*, 344:1046–9.

- Sakata S., Kitahara M., Sakamoto M., Hayashi H., Fukuyama M. and Benno Y. (2002).** Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52: 1945-1951.
- Salaun F., Mietton B. and Gaucheron F. (2005).** Buffering capacity of dairy products : a review. *Int. Dairy J.*, 15: 95–109.
- Salminen S., von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., Vos de W.M., Fonde'n R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S.E. and Sandholm T.M., (1998).** Demonstration of safety of probiotics a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 44: 93–106.
- Samona A. , Robinson R K and Marakis S. (1996) .** Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. *Food Microbiol.*, 13: 275-280.
- Sato R., Naguchi T. and Naito H. (1986).** Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 32: 67–76.
- Scardovi V. (1986).** Section 15. Irregular nonsporing gram positive rods. Genus *Bifidobacterium* Orla Jensen 1924, p. 1418–1434. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Scardovi V. and Crociani F. (1974).** *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, and *Bifidobacterium angulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24: 6-20.
- Scardovi V. and Trovatelli L.D. (1974).** *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka) comb. nov. and the “*minimum*” and “*subtile*” groups of new bifidobacteria found in sewage. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24: 21-28.
- Scardovi V. and Trovatelli L.D. (1969).** New species of bifidobacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*. *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 2*, 123 : 64-88.
- Scardovi V. and Trovatelli L.D. (1965).** The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol. Enzimol.* ,15:19-29.
- Scardovi V. and Zani G. (1974).** *Bifidobacterium magnum* sp. nov., a large, acidophilic *Bifidobacterium* isolated from rabbit feces. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24: 29-34.
- Scardovi V., Zani G. and Trovatelli L.D. (1970).** Deoxyribonucleic acid homology among the species of the genus *Bifidobacterium* isolated from animals. *Arch. Mikrobiol.*, 72: 318-325.
- Scardovi V., Trovatelli L.D., Biavati B. and Zani G. (1979).** *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium boum*, and *Bifidobacterium pseudocatenulatum*: four new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 29: 291-311.
- Scardovi V., Trovatelli L.D., Crociani F. and Sgorbati B. (1969).** Bifidobacteria in bovine rumen. New species of the genus *Bifidobacterium*: *B. globosum* n. sp. and *B. ruminale* n. sp. *Arch. Microbiol.*, 68: 278-294.

- Schell M.A., Karmirantzou M., Snel B., Vilanova D., Berger B., Pessi G., Zwahlen M.C., Desiere F., Bork P., Delley M., Pridmore R.D. and Arigoni F. (2002).** The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 14422– 14427.
- Schuler-Malyoth R., Ruppert A. and Müller F. (1968).** A survey of the theoretical and practical principles of using bifidus cultures in the dairy industry. Technology of the bifidus culture in the milk processing factory. *Milchwissenschaft.*, 23(9) : 554-558.
- Schwarz G., Hageman B., Huttig C., Kellermann R. and Staeger, W. (1950).** Untersuchung von Milch Milcherzeugnissen und Molkereihilfsstoffen. Methodenbuch Band VI (2nd ed.). Radebeul, Germany: NeumannVerlag
- Sgorbati B., Scardovi V. and Leblanc D.J. (1982).** Plasmids in the genus *Bifidobacterium*. *J. Gen. Microbiol.*, 128: 2121–2131.
- Shah N. P. (2006).** Health benefits of yogurt and fermented milks. In R. C. Chandan (Ed.), *Manufacturing yogurt and fermented milks* (pp. 327–340). Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional
- Shah N. P. (2000).** Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.*, 83(4): 894–907.
- Shah N. P. (1999).** Probiotic bacteria: Antimicrobial and antimutagenic properties. *Probiotica*, 6: 1–3.
- Shah N.P. (1997).** Bifidobacteria : Characteristics and potential for application in fermented milk products. *Milchwissenschaft* , 52(1):16-21.
- Shah N. P. and Lankaputhra W. E. V. (2002).** *Bifidobacterium* spp. Morphology and Physiology. *Elsevier Sci. Ltd* , 141-146
- Shanahan F. (2000).** Probiotics and inflammatory bowel disease: Is there a scientific rationale? *Inflamm Bowel Dis*, 6:107-15.
- Shihata A. and Shah N.P. (2000).** Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria *Int. Dairy J.*, 10: 401-408.
- Shin H. S., Lee J. H., Pestka J. J. and Ustunol Z. (2000).** Viability of bifidobacteria in commercial dairy products during refrigerated storage. *J. Food Protec.*, 63: 327–331.
- Simpson p. J., Ross R.P., Fitzgerald G.F. and Stanton C. (2004).** *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 401-406.
- Stackebrandt E., Rainey F.A. and Ward-Rainey N.L. (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47:4479- 4491.
- Suetsuna K., Ukeda H. and Ochi H. (2000).** Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J. Nutr. Biochem.* , 11:128–131.
- Szajewska H., Kotowska M., Mrukowicz JZ., Armanska M. and Mikolajczyk W. (2001).** Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhoea in infants. *J. Pediatr.*, 138 (3): 361-365.
- Tabak S. , Medouakh L., Adda M., Chekroun A., Krantar K. and Bensoltane A. (2007).** Interaction between *Helicobacter pylori* responsible for diseases gastro-duodenal and *bifidobacteria*. . *Egypt. J. App. Sci.* 22: (12A), 72-83.

- Takahashi N., Xiao J., Miyaji K., Yaeshiima T., Hiramatsu A., Iwatsuki K., Kokubo S. and Hosono A. (2004).** Selection of acid tolerant bifidobacteria and evidence for a low-pH-inducible acid tolerance response in *Bifidobacterium longum*, *J. Dairy Res.* 340-345.
- Tamime Ay., Marshall V.M.E. and Robinson R.K. (1995).** Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *J. Dairy Res.*, 62: 151-187.
- Tamura Z. (1983).** Nutriology of bifidobacteria. *Bifidobacteria and Microflora.*; 2(1): 3-16.
- Tanaka K., Samura K. and Kano Y. (2005).** Structural and functional analysis of pTB6 from *Bifidobacterium longum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69: 422–425.
- Tannock G. W. (2005).** Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects. *Caister Academic Press* (USA).
- Terada A., Hara H., Katoaka M. and Mitsuoka T. (1992).** Effect of lactulose on the composition and metabolic activity of the human faecal flora. *Microbiol. Ecol. Health Dis.*, 5:43-50.
- Tersaghi B. E. and Sandine W. E. (1975).** Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 29: 807-813.
- Thitaram S.N., Siragusa G.R. and Hinton Jr. A. (2005).** *Bifidobacterium* selective isolation and enumeration from chicken caeca by a modified oligosaccharide antibiotic-selective agar medium. *Lett. Appl. Microbiol.*, 41 : 355–360.
- Tissier H (1906).** Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *CR.Soc Biol*, 60 : 359-361.
- Tissier M.H. (1900).** Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourrisson. Thèses : 1-253, Université de Paris.
- Trojanova I.,Vlkova E., Rada V. and Marounek M. (2006).** Different utilization of glucose and raffinose in *Bifidobacterium breve* and *Bifidobacterium animalis*. *Folia Microbiol.*, 51(4): 320-324.
- Trovatelli L.D., Crociani F., Pedinotti M. and Scardovi V. (1974).** *Bifidobacterium pullorum* sp. nov. A new species isolated from chicken feces and a related group of bifidobacteria isolated from rabbit feces. *Arch. Mikrobiol.*, 98: 187-198.
- Tsuneo Hirahara (2002).** Guidelines for the evaluation of probiotics for food use. 26th *IDF World Dairy Congress,ILSI*.Japan.
- Tziboula-Clarke A. (2003).** **Goat milk.** In: Encyclopedia of Dairy Sciences, (eds. Roguiski H., Fuquay J. and Fox P.). *Academic Press*, Amsterdam, pp. 1270–1279.
- Van Den Broek L.A.M. and Voragen A.G.J. (2008).** *Bifidobacterium* glycoside hydrolases and (potential) prebiotics. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, (Article in Press).
- Veringa H. A., Galesloot T. E. and Davelaar H. (1968).** Symbiosis in yoghurt. Isolation and identification of a growth factor for *Lactobacillus bulgaricus* produced by *Streptococcus thermophilus*. *Netherlands Milk Dairy J.*, 22: 114.
- Vuillemin P. (1931).** Les champignons parasites et les mycoses de l'homme. Lechevalier, Paris.
- Ward P. and Roy D. (2005).** Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *Lait*, 85 : 23–32.
- Watabe J., Benno Y.and Mitsuoka T. (1983).** *Bifidobacterium gallinarum* sp. nov.: a new species isolated from the ceca of chickens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33 :127-132.

- Wood B.J.B. (1998).** Microbiology of fermented foods. Blackie Academic & Professional, London.
- Yaeshima, T., Fujisawa T. and Mitsuoka T. (1992).** *Bifidobacterium globosum*, subjective synonym of *Bifidobacterium pseudolongum*, and description of *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *pseudolongum* comb. nov. and *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 15: 380-385.
- Yoon H., Benamouzig R., Little J., Francois-Collange M. and Tome D. (2000).** Systematic review of epidemiological studies on meat, dairy products, and egg consumption and risk of colorectal adenomas. *Eur. J. Can. Prev.*, 9:151–164.
- Zhou J.S., Pillidge C.J., Gopal P.K. and Gill H.S. (2005).** Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Int. J. Food Microbiol.*, 98: 211–217.
- Zhu L., Li W. and Dong X. (2003).** Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial *HSP60* gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53:1619-1623.
- Zbikowski Z. and Ziajka S. (1986).** Hydrolyzed casein as a source of bifidus factor. *Die Nahrung*, 30(3-4):415-416.

Annexe

Milieu TPY (scardovi, 1986)

Tryptone	10	g
Phytone peptone	5	g
Glucose	5	g
Extrait de levure	2, 5	g
Tween 80	1	ml
Cystéine Hydrochloride	0, 5	g
K ₂ HPO ₄	2	g
MgCL ₂ .6H ₂ O	0, 5	g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0, 25	g
CaCl ₂	0, 15	g
FeCl ₃	Traces	
Agar	15	g
Eau distillée	1000	ml

pH=7,4

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

Milieu MRS (De Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de levure	5	g
Extrait de viande	10	g
Peptone	10	g
Acétate de sodium	5	g
Citrate de sodium	2	g
Glucose	20	g
KH ₂ PO ₄	2	g
Mgso ₄	0,25	g
Mnso ₄	0,05	g
Agar-agar	15	g
Cystéine-HCL	0,5	g
Eau distillée	1000	ml

PH=6,8

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

Milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)

Peptone de caséine	10 g
Peptone pepsique de viande	2,5 g
Peptone papaïne de soja	5 g
Extrait de levure	2,5 g
Extrait de viande	5 g
B-glycérophosphate	19 g
MgSO ₄	0,25 g
Lactose	5 g
Acide ascorbique	0,5 g
Agar-agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH=7,2	
Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes	

Milieu BEE (Beerens, 1990)

Columbia agar	42 g
Glucose	5 g
Cystéine hydrochloride	0,5 g
Eau distillée	1000 ml

Fair bouillir pour dissoudre les ingrédients, refroidir vers 70°C et ajouter 5,0 ml d'acide propionique. Ajuster à pH 5 à l'aide de soude 1N. Ne pas Stériliser.

Eau physiologique

Chlorure de sodium	8,5 g
Peptone	0,5 g
Eau distillée	1000 ml
pH=7	

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

Lait écrémé

Lait écrémé	10	g
Extrait de levure	0,5	g
Eau distillée	100	ml

pH=7

Autoclavage : 110 °C pendant 10 mn.

Solution de Ringer cystéine diluée au ¼.

NaCl	2, 25	g
KCl	0, 10	g
CaCl ₂	0, 12	g
Na ₂ CO ₃	0, 05	g
Cystéine HCl.	0, 3	g
Eau distillée	1000	ml

pH 7

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

Bouillon nitrate

Infusion cœur cervelle	25	g
Nitrate de potassium	10	g
Eau distillée	1000	ml

pH 7,2

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

Eau peptonnée

Peptone	10	g
NaCl	5	g
Eau distillée	1000	ml

pH 7,2

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

Reactifs de Kovacs

Diméthyl-amino-4 benzaldéhyde	50	g
Acide chlorhydrique pur	250	ml
Pentanol 1	750	ml

Les réactifs de Griess**Nit1**

Acide Sulfanilique	8	g
Eau distillée	750	ml

Nit2

Alpha-naphtyl-amine	5	g
Acide éthanoïque à 1 mol.dm ³	1	dm ³

Coloration de Gram :

Technique

- Préparer un frottis d'une culture bactérienne pure ;
- Recouvrir le frottis avec de cristal violet ; laisser agir une minute ; rincer à l'eau distillée ;
- Verser du Lugol et le laisser agir pendant une minute ; rincer à l'eau distillée ;
- Décolorer à l'alcool à 95⁰ entre 15 et 30 secondes ; rincer à l'eau distillée ;
- Recolorer avec de la fuchsine phénique ; pendant 10 seconde si elle est concentrée ou 1 minute si elle est diluée. Rincer à l'eau distillée ;
- Sécher au dessus de la flamme d'un bec Bunsen ;
- Observer à l'objectif à immersion (objectif x 100) et à pleine lumière.

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

Recherche d'une *catalase* :

Exposer une culture sur boîte à l'air pendant 30 min. Prélever alors quelques colonies, les émulsionner dans une goutte d'eau oxygénée à 10 vol. La formation de bulles est due à la catalase du germe.

Les galeries référence d'identifications biochimiques d'entérobactérie API20E
(bioMérieux sa, France, version 04/98) :



Tableau des résultats des teste biochimiques API20E :

Teste	Substrats	Réactions / Enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
1 : ONPG	Ortho-nitro-phényl-β-D-galactosidase.	β-galactosidase	incolore	jaune
2 : ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	jaune	rouge / orangé
3: LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	jaune	orangé
4 : ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	jaune	rouge / orangé
5 : CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu
6 : H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d' H ₂ S	incolore / grisâtre	dépôt noir / fin liseré
7 : URE	Urée	Uréase	jaune	rouge / orangé
8 : TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA / immédiat	
			jaune	marron foncé
9 : IND	Tryptophane	Production d'indole	JAMES / immédiat ou IND / 2 min	
			JAMES : incolore vert pâle / jaune. IND : jaune.	JAMES : rose. IND : anneau rouge
10 : VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoine	VP 1+ VP 2 / 10 min	
			incolore	rose / rouge

Tableau des résultats des teste biochimiques API20E (suite)

Teste	Substrats	Réactions / Enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
11 : GEL	Gélatine de Kohn	Gélatinase	non diffusion	diffusion du pigment noir
12 : GLU	Glucose	fermentation	bleu	jaune
13 : MAN	Mannitol	fermentation	bleu	jaune
14 : INO	Inositol	fermentation	bleu	jaune
15: SOR	Sorbitol	fermentation	bleu	jaune
16 : RHA	Rhmnose	fermentation	bleu	jaune
17 : SAC	Saccharose	fermentation	bleu	jaune
18 : MEL	Melibiose	fermentation	bleu	jaune
19 : AMY	Amygdaline	fermentation	bleu	jaune
20 : ARA	Arabinose	fermentation	bleu	jaune

Tableau d'interprétation des résultats du test d'antibiogramme (édition 1995, Pasteur) :

Antibiotiques	Charge du disque	Sigle du disque	Diamètre en millimètre (mm)		
			Sensible	Intermédiaire	résistante
Cefalotine	30 µg	CF	≥ 18	18 - 12	≤ 12
Acide nalidixique	30 µg	NA	≥ 20	20 - 15	≤ 15
Spectinomycine	100 µg	SPT	≥ 18	*	< 18
Gentamicine	10 µg	GM	≥ 16	16 - 14	≤ 14
Vancomycine	30 µg	Va	≥ 17	*	< 17
Erythromycine	15 UI	E	≥ 22	22 - 17	≤ 17
Streptomycine	10 UI	S	≥ 15	15 - 13	≤ 13
Ampicilline	10 µg	Am	≥ 17	17 - 11	≤ 11
Rifampicine	30 µg	RA	≥ 19	19 - 14	≤ 14
Acide oxolinique	10 µg	OA	≥ 20	20 - 17	≤ 17
Chloramphénicol	30 µg	C	≥ 23	23 - 19	≤ 19
Tétracycline	30 UI	TE	≥ 19	19 - 17	≤ 17

* pas de zone intermédiaire

La méthode de Kjeldahl : (AOAC, 1990)

Cette méthode consiste en la digestion de l'échantillon dans de l'acide sulfurique (H_2SO_4) avec un catalyseur à base de cuivre et de titane pour convertir tout l'azote en ammoniacque (NH_3). Toute l'ammoniacque est ensuite distillée et titrée à l'acide. La teneur en azote de l'échantillon est proportionnelle à la quantité d'acide nécessaire au titrage de l'ammoniacque. La méthode Kjeldahl nécessite :

- une unité de digestion permettant d'atteindre des températures de digestion de l'ordre de 360°C à 380°C pour des périodes allant jusqu'à 3 heures.
- des ballons spéciaux Kjeldahl (500 à 800 ml).
- une unité de distillation qui garantit une distillation hermétique du ballon contenant l'échantillon digéré dans un Erlenmeyer de 500 ml recevant la fiole de distillation.
- une burette afin de mesurer exactement l'acide nécessaire pour le titrage dans la fiole recevant la distillation pour la neutralisation de l'hydroxyde d'ammonium obtenu.
- toutes les installations Kjeldahl nécessitent des appareils d'extraction des vapeurs acides. Il peut s'agir de hottes, d'extracteurs, de ventilateurs, d'appareils de recirculation de l'eau ou d'armoires d'extraction des vapeurs.

Produits chimiques nécessaires dans cette méthode :

- un catalyseur Kjeldahl : contenant 10 g de K_2SO_4 plus 0,30 g de CuSO_4
- de l'acide sulfurique concentré H_2SO_4
- un mélange solution tampon : 3125 g de rouge méthyl et 0,2062 g de bleu de méthylène dans 250 ml d'éthanol à 95 % (mélangé pendant 24 heures)
- une solution d'acide borique : 522 g U.S.P. d'acide borique dans 18 l d'eau déionisée.

Ajouter 50 ml de la solution mélange tampon et laisser le mélange reposer pendant une nuit.

- zinc : en poudre ou granulés, tamisé à 10
- hydroxyde de sodium : 50 % poids/vol, solution aqueuse saturée
- solution standardisée à 0,1 N d' HCl

Mode opératoire

- Peser 1 g d'échantillon que l'on transfère dans un papier filtre ne contenant pas de cendre que l'on plie afin d'éviter les pertes d'échantillon.
- Introduire le catalyseur dans le ballon Kjeldahl.
- Ajouter 25 ml d'acide sulfurique concentré H_2SO_4 à chaque ballon Kjeldahl.

- Commencer la digestion par un préchauffage du bloc de digestion à 370°C et y installer les ballons Kjeldahl pendant 3 heures.
- Après avoir enlevé les ballons de l'unité de digestion et les avoir laissé refroidir, y ajouter 400 ml d'eau déionisée.
- Préparer les fioles de réception pour la distillation à la vapeur en ajoutant 75 ml de la solution préparée d'acide borique à un erlenmeyer propre de 500 ml que l'on place sur la plate-forme de distillation. Placer le tube de livraison du condenseur dans l'erlenmeyer.
- Mettre en marche le système d'eau de l'unité de distillation et tous les réchauds.
- Préparer l'échantillon pour la distillation en ajoutant approximativement 0,5g de zinc en poudre dans la fiole. Mélanger énergiquement et laisser reposer.
- Une fois le digestat reposé, mesurer 100 ml d'une solution aqueuse saturée de soude NaOH (50 % poids/volume) dans un cylindre gradué. Incliner les fioles Kjeldahl contenant la solution préparée du digestat de 45° par rapport à la verticale. Verser la solution de soude doucement dans la fiole de manière à former une couche au fond.

Toutes ces opérations sont effectuées à l'aide de gants et en portant un masque de protection.

- Insérer la fiole dans l'ensemble de distillation. Le mélange du contenu de la fiole ne débute que lorsque la fiole a été bien fixée. Après avoir vérifié que le bouchon a bien été inséré à sa place, prendre soigneusement la fiole et remuer le contenu jusqu'à mélange complet. Directement après, installer la fiole sur le réchaud.

Enlever momentanément la fiole de réception du tube de l'unité de « distillation condensation » pour égaliser la précision et prévenir l'aspiration de retour.

- Continuer la distillation jusqu'à ce que 250 ml de distillat ait été collecté dans les fioles de réception.
- Eteindre les réchauds. Enlever partiellement les fioles de réception et rincer le tube de livraison avec de l'eau déionisée, collecter l'eau de rinçage dans la fiole de réception.
- Transférer la fiole de réception dans un bécher contenant 400 ml d'eau déionisée.

L'eau sera aspirée dans les fioles Kjeldahl durant leur refroidissement lavant ainsi les tubes de condensation.

- Le titrage du distillat vert vers la couleur pourpre initiale est effectué en utilisant de l'acide chlorhydrique 0.1N. Noter le volume d'acide utilisé lors du titrage.
- Il est recommandé d'utiliser plusieurs témoins et contrôles ou normes dans chaque série. Les contrôles : les réactifs Kjeldahl contiennent généralement de petites quantités d'azote qui doivent être mesurées et corrigées dans les calculs.

Les contrôles sont préparés pour des échantillons secs en pliant un papier filtre ne contenant pas de cendre et en le plaçant dans les fioles Kjeldahl. Les contrôles sont traités exactement de la même manière que les échantillons à analyser.

Normes : peser deux échantillons de 0,1 g d'urée, les transférer dans un papier filtre ne contenant pas de cendre et les traiter exactement comme le reste des échantillons. On calcule alors le pourcentage d'azote récupéré de l'urée et on s'assure que le résultat obtenu est celui attendu.

Le calcul est le suivant :

Protéines brutes % = $[(\text{ml d'acide} - \text{ml du blanc}) \times \text{normalités} \times 0.014 \times 6.38 / \text{poids initial}] \times 100$

La méthode de van Gulik : (Schwarz *et al.*, 1950)

On introduit dans un butyromètre de Gerber (NFB 35-522) 10 ml d'acide sulfurique et 11 ml du lait de brebis, puis 1 ml d'alcool isoamylique, agiter l'ensemble et centrifuger à 1200 tours/min pendant 5 minutes. Ensuite on fait la lecture de la matière grasse directement sur le butyromètre.