



DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

N°...../SNV/2018

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

M^{elle} Abbassa Amira

et

M^{elle} Moussa Imane

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Nutrition et pathologies

THÈME

La production de cobalamine par les bactéries probiotiques

Soutenue publiquement le09...../.....09...../2018

DEVANT LE JURY

Président	Dr. Mokhtar. M	MCA	U. Mostaganem
Encadreur	Dr. ZIAR. H	MCA	U. Mostaganem
Examineurs	Dr. Yahla. I	MCB	U. Mostaganem

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2017 / 2018

Remerciements

Ce travail a été réalisé équitablement dans le Laboratoire des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS, site III (ex. INES)), et au laboratoire de microbiologie 2 au site II, ex ITA (l'université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem).

Nos vifs remerciements vont d'abord à tous les membres du jury pour avoir accepté de juger ce modeste travail.

Nous remercions Mme le docteur Mokhtar M. (maître de conférences A) à l'Université de Mostaganem qui a accepté de présider ce jury et qui trouve ici notre haute considération.

Nos sincères remerciements vont aussi à Mme le docteur Yahla I. (maître de conférences B) à l'Université de Mostaganem pour avoir accepté d'examiner la qualité de ce travail.

Nous remercions aussi notre encadreur Mme le docteur Ziar H. (maître de conférences A) à l'Université de Mostaganem pour le sujet proposé, ces orientations subtiles et ses conseils.

Nous remercions toute l'équipe LMBAFS du laboratoire des micro-organismes bénéfiques, aliments fonctionnels et de la santé sous la direction du professeur Riazi et son laborantine Madame Djahira, pour l'accueil, l'aide matérielle et morale.

A toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin pour mener à bien ce travail.

Dédicace ...

*A mes chers parents, à qui je dois beaucoup de choses et
qui m'ont tout appris,*

A ma raison d'être,

*A mon petit frère Mohamed Chamssedine et mes chères
sœurs: Rim, Ikram et la petite Ikhlass,*

*A mes grands parents, mes tantes, mes oncles et mes
cousines,*

*A mon encadreur Madame H. ZIAR pour sa compréhension
et sa sagesse,*

A mes camarades en master (nutrition et pathologies)

*Avec qui j'ai partagé tous les moments et les souvenirs (les
beaux et les amères),*

A la famille MOUSSA,

A tout le monde ...

Imane

Dédicace ...

*A mes chers parents, à qui je dois beaucoup de choses et
qui m'ont tout appris,*

*A mon grand frère Malik, mon petit frère Djamil et ma
chère sœur : Anissa*

*A mes grands parents, mes tantes, mes oncles et mes
cousines, ainsi à toute la famille ABBASSA.*

*A mon encadreur Madame H. ZIAR pour sa disponibilité et
ses orientations.*

*A mes amies de la spécialité master nutrition et
pathologies ; avec qui j'ai partagé tous les moments et les
souvenirs (les beaux et les amères),*

A tout le monde ...

Amira

La liste des tableaux et des figures.

I. Liste des tableaux

Tableau 1: Principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotique (Shah, 2007 et 2010).....	7
Tableau 2 : Classification des bactéries appartenant au genre <i>Lactobacillus</i> (Franz et al., 2014).....	8
Tableau 3 : Classe des vitamines (Anonyme, 2011).....	23
Tableau 4 : Teneur approximative en vitamine B12 de certains aliments (Anonyme, 2010 ; Anonyme 8, 2010 ; Anonyme 9, 2010).....	25
Tableau 5 : Apport nutritionnel recommandé en vitamine B12 en fonction de l'âge (Anonyme 4, 2010 ; Anonyme 5, 1998).....	26
Tableau 6 : Principaux facteurs de risque pouvant mener à une déficience en B12 (Dali Youcef et Andrès, 2009 ; Oh CR et Brown, 2003 ; Anonyme 4, 2010).....	28
Tableau 7 : Résumé de l'observation macroscopique des souches isolées de lait maternels et de selle de bébé.....	42
Tableau 8 : Résumé des tests physiologiques.....	51
Tableau 9 : Résultats de test de production d'acétoïne par les différents isolats.....	55
Tableau 10: Activité antimicrobienne des souches isolées vis-à-vis de certains pathogènes répertoriés.....	59
Tableau 11: Les quantités disponibles en vitamines B12 bactérienne produites par nos souches sélectionnées.....	65

II. La liste des figures

Figure 1: <i>Saccharomyces. cerevisiaesous</i> microscopie électronique (Tortora et al., 2003).....	5
Figure 2: Structure du système digestif (Villarrea, 2006).....	11
Figure 3: Microbiote intestinal et répartition le long du tractus digestif (Goulet, 2009).....	13
Figure 4: Implantation du microbiote intestinal. (Wilson, 2008).....	18
Figure 5 : Les échantillons de lait	34
Figure 6 : l'échantillon de selle de bébé.....	34
Figure 7 : Observation macroscopique de souche L5' cultivée sur milieu MRS acidifié ...	45
Figure 8 : Observation microscopique de souche L5' après coloration de Gram X1000.....	45
Figure 9: Observation macroscopique de la souche SL1 cultivée sur milieu MRS.....	46
Figure 10 : Observation microscopique de souche SL1 après coloration de Gram X1000.....	46
Figure 11 : Observation macroscopique de souche SS1 cultivée sur milieu MRS.....	47
Figure 12 : Observation microscopique de souche SS1 après coloration de Gram X1000.....	47
Figure 13: Observation macroscopique de souche SS7 cultivée sur milieu MRS.....	48
Figure 14 : Observation microscopique de souche SS7 après coloration de Gram X1000.....	48
Figure 15 : Résultats de test de croissance à pH 9.6.....	50
Figure 16: Résultats de test de croissance à NaCl 2.5%.....	50
Figure 17 : Résultats de test de croissance à NaCl 4%.....	50

Figure 18 : Résultats de test de croissance à NaCl 6.5%.....	50
Figure 19 : Résultats négatifs de test de résistance aux sels biliaires.....	52
Figure 20 : Résultats positifs de test de résistance aux sels biliaires.....	52
Figure 21 : Type fermentaire sur milieu MRS liquide glucosé contenant la cloche de Durham	53
Figure 22 : Résultats du test de thermorésistance des souches L4' et SS8.....	54
Figure 23 : Exemples des résultats obtenus dans le test de production de l'acétoïne (A : résultat positif ; B : résultat négatif).....	55
Figure 24 : Résultat du test résistance aux sels biliaires de la souche (SS7 : résultats négative) et (L4', L3' : résultats positive)	56
Figure 25 : Résultat du test de réduction de bleu de méthylène 0.1 et 0.3%	57
Figure 26 : Résultat de test recherche de l'Arginine dihydrolase (ADH)	58
Figure 27 : Résultat de production de CO2 à partir du citrate.....	58
Figure 28 : Résultats des études de l'activité antimicrobienne.....	63

Liste des abréviations

L : *Lactobacillus*

B : bifidobactéries

sp : espèce indéterminée

mOsm/litre : milliosmoles par litre

IF : facteur intrinsèque

VP1 : réactif de Vosges-Proskauer 1

VP2 : réactif de Vosges-Proskauer 2

p/v : poids/volume

UFC / ml : unité formant colonie par millilitre

KCN : cyanure de potassium

g : gramme

h: heure

H₂O₂ : eau oxygéné

CO₂ : Dioxyde de carbone

SL : souche isolée du lait maternel

SS : souche isolée de selles de bébé

Sommaire

Dédicaces	
Remerciements	
Résumé	
Abstract	
La liste des tableaux et des figures	
La liste des abréviations	

Introduction	1
---------------------	---

CHAPITRE I : Les probiotiques.

I.1. Historique et définitions	3
I.2. Les micro-organismes probiotiques	2
I.2.1. Levures	2
I.2.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
I.2.1.2. <i>Saccharomyces boulardii</i>	3
I.2.2. Les moisissures	4
I.2.3. Bactéries lactiques	4
I.2.3.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	5
I.2.3.2. <i>Lactobacillus farciminis</i>	6
I.2.3.3. Le genre <i>Lactococcus</i>	6
I.2.3.4. Le genre <i>Streptococcus</i>	6
I.2.3.5. Le genre <i>Enterococcus</i>	7
I.2.3.6. Les genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	7
I.2.3.7. Les genres <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	7
I.2.3.8. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	7
I.3. Directives pour l'évaluation des microorganismes probiotiques	8
I.3.1. Description générale du système digestif	8

Sommaire

I.3.2. Colonisation du tube digestif	10
I.4. La Flore intestinale.....	11
I.4.1. Microflore contaminant.....	12
I.4.1.1. Les facteurs influence la microflore	14
I.5. Le microbiote intestinal.....	15
I.5.1. Implantation du microbiote intestinal.....	15
I.6. Le lait source de probiotiques.....	17
I.6.1. Définition du lait	17
I.6.2. Caractères physico chimiques du lait.....	17
I.6.3. La valeur nutritive du lait	18
I.6.4. Microflore lactique du lait.....	18
I.7. La matière fécale source de probiotiques.....	19

CHAPITRE II : La vitamine B12.

II.1. Définition des vitamines.....	20
II.2. Classification des vitamines	20
II.3. Définition de vitamine B12.....	20
II.3.1. La vitamine B12 dans l'alimentation.....	22
II.3.1.1. Végétariens	23
II.3.2. Apport maximal tolérable et apport nutritionnel recommandé.....	23
II.3.3. Femmes enceintes, femmes qui allaitent et nourrissons.....	24
II.3.4. Facteurs de risque de carence	25
II.3.5. Personnes âgées.....	27
II.3.6. Digestion et métabolisme complexes et vulnérables.....	27
II.4. Fonctions dans le métabolisme et interactions avec d'autres vitamines du complexe B	28
II.5. La synthèse des vitamines par les probiotiques.....	28

II.5.1. La synthèse de vitamine B1228

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

III.1. Isolement des souches de bactéries lactiques.....31

III.1.1. L'échantillonnage.....31

III.1.1.1.Collection de l'échantillon.....31

III.1.2. Les milieux de culture32

III.1.3. Préparation des dilutions.....32

III.1.4. Ensemencement33

III.1.5. Purification des isolats33

III.2. Evaluation de l'effet probiotique des isolats bactériens33

III.2.1. Identification des souches bactérienne.....33

III.2.1.1. Critères morphologiques.....33

III.2.1.1.1. Observation macroscopique.....33

III.2.1.1.2. Observation microscopique.....34

III.2.1.2. Critères biochimiques et physiologiques.....34

CHAPITRE IV: RESULTATS ET DISCUSSION.

IV.1. Résultats d'identification des isolats40

IV.1.1. Pré-identification des souches40

IV.1.2. Résultats relatifs aux tests physiologiques et biochimiques.....47

IV.1.2.1. Présence de l'enzyme de catalase47

IV.1.2.2.Croissance sous conditions hostiles (Croissance à différentes température, pH, NaCl).....47

IV.1.2.3. Production de dextrane.....50

Sommaire

IV.1.2.4.Type fermentaire	51
IV.1.2.5. Thermorésistance.....	52
IV.1.2.6. La production d'acétoine.....	53
IV.1.2.7. Résistance aux sels biliaires.....	54
IV.1.2.8. Test de bleu de méthylène.....	55
IV.1.2.9. Recherche de l'Arginine dihydrolase (ADH)	55
IV.1.2.10. La production de CO ₂ à partir de citrate	56
IV.1.2.11. Etude de l'activité antimicrobienne des souches isolées.....	57
IV.2. Analyse sepectrophotométrique de la vitamine B12.....	61

Conclusion

Les références bibliographiques

Annexe

Résumé

Le présent travail s'inscrit dans le cadre d'une tentative d'isolement des bactéries probiotiques d'origines lait maternel et selles de bébés ayant pour caractéristique principale la production de cobalamine ou vitamine B12. L'isolement s'est déroulé sur deux échantillons de lait maternel et un échantillon de selles. Les milieux d'isolement étaient le MRS à pH 5.4 , MRS à pH 6.5. L'étude des caractéristiques phénotypiques, biochimiques et physiologiques a été réalisée *via* plusieurs tests : croissance à différentes températures : 15, 37 et 45°C, croissance à pH 5.4 et 9,6 croissance en présence de NaCl: 2,5 ; 4 et 6,5%, type fermentaire, production des exopolysaccharides, thermorésistance , résistance aux sels biliaires et la présence d'une activité antimicrobienne. Une analyse spectrophotométrique estimant la production de cobalamine a été aussi entreprise chez les isolats les plus performants.

Nous avons pu isoler, purifier et partiellement identifier 22 isolats à caractère probablement probiotique. Tous les isolats ont démontré une bonne action antimicrobienne vis-à-vis de pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires et une bonne résistance à la bile. Les quantités de vitamine B12 produites étaient très acceptables et estimées à ¼ la quantité moyenne et journalière de nos besoins en cette vitamine.

Mots-clés :

Bactéries probiotiques ; lait maternel ; selles de bébés ; vitamine B₁₂.

Abstract

The present work is an attempt to isolate probiotic bacteria from breast milk and stool of babies whose main characteristic is the production of cobalamin or vitamin B12. The isolation was performed on two samples of breast milk and one stool sample. The isolation media were acidified MRS, MRS at pH 6.5. The study of phenotypic, biochemical and physiological characteristics was carried out *via* several tests: growth at different temperatures: 15, 37 and 45 ° C, growth at pH 5.4 and 9.6, growth in the presence of NaCl: 2.5; 4 and 6.5%, fermentative target, production of exopolysaccharides, heat resistance, bile salt resistance and the presence of an antimicrobial activity. Spectrophotometric analysis estimating cobalamin production was also undertaken with the best performing isolates.

We were able to isolate, purify and partially identify 22 probiotic isolates. All isolates have demonstrated good antimicrobial action against pathogens responsible of foodborne illness and have good resistance to bile. The amounts of vitamin B12 produced were very acceptable and estimated at the ¼ of the average daily amount of our vitamin requirements.

Key Words :

Probiotics bacteria ; Brest milk ; babies stools; B₁₂ vitamin.

ملخص

هذا العمل هو جزء من محاولة لعزل البكتيريا المعززة من حليب الثدي وبراز الأطفال الذين تتمثل خصائصهم الرئيسية في إنتاج (الكوبالامين) أو فيتامين ب 12. أجريت العزلة على عينة من حليب الثدي وعينة البراز. كانت وسائط العزل المتمثلة في MRS و MRS عند pH 6.5. وقد أنجزت دراسة المظهرية، والخصائص البيوكيميائية والفسولوجية عن طريق عدة اختبارات: النمو في درجات حرارة مختلفة: 15 و 37 و 45 درجة مئوية، ودرجة الحموضة عند 5.4 و 9.6، والنمو في وجود كلوريد الصوديوم: 2.5 و 4 و 6.5 %، ونوع التخمر، وإنتاج (exopolysaccharides)، ومقاومة الحرارة، ومقاومة الأملاح الصفراوية ووجود نشاط مضاد للميكروبات. كما تم إجراء التحليل الطيفي لتقدير إنتاج الكوبالامين في العزلات الأفضل أداءً.

تمكنا من عزل وتحديد 22 عزلة بروبيوتك. وقد أظهرت جميع العزلات عمل مضاد للميكروبات جيد ضد مسببات الأمراض المسؤولة عن الأمراض التي تنتقل عن طريق الغذاء ومقاومة جيدة للصفراء. كانت كميات فيتامين ب 12 المنتجة مقبولة للغاية ومقدرة بمتوسط 1/4 الكمية اليومية لمتطلبات الفيتامين لدينا.

كلمات البحث:

بكتيريا بروبيوتيك؛ حليب الأم؛ براز الأطفال؛ فيتامين ب 12 .

Introduction

La vitamine B12 est un micro-nutriment essentiel à notre organisme ce qui signifie que en son absence de nombreuses maladies peuvent apparaître. Elle est produite par des bactéries et provient pratiquement exclusivement d'origine animale. La vitamine B12 en elle-même n'est pas d'origine animale, mais bactérienne. Elle est produite par des micro-organismes très communs dans la nature que l'on retrouve dans l'humus, dans des algues marines, dans l'appareil digestif des animaux et des hommes.

Par conséquent, on peut affirmer que la vitamine B12 est végétane. Cependant, dans notre régime alimentaire on la retrouve presque uniquement dans les produits d'origine animale.

Notre organisme renferme des bactéries qui produisent de la vitamine B12 pratiquement sur toute la longueur de l'appareil digestif, de la bouche au rectum. La grande majorité de ces bactéries se trouvent dans le côlon où elles produisent des quantités significatives de B12. Malheureusement notre organisme ne peut pas en bénéficier car le côlon se trouve en aval de la zone d'absorption par notre système digestif : l'iléon, bas de l'intestin grêle. Ainsi nos excréments contiennent des quantités non-négligeables de vitamine B12 auto-produites que notre corps n'est pas en mesure d'absorber.

Cependant, une étude datant de 1980 publiée dans le magazine renommé *Nature* (**Albert et al., 1980**) rapportait que des quantités significatives de bactéries produisant de la vitamine B12 vivaient dans l'intestin grêle. Il est possible qu'il en soit de même pour la bouche et le pharynx. Cela pourrait expliquer pourquoi d'après des études cliniques, 10 à 40% des individus suivant un régime végétalien ne souffrent pas de carence de vitamine B12 bien que leur régime ne contienne pas de vitamine B12.

Le tube digestif abrite une communauté complexe de micro-organismes appelée microbiote qui va résider à la surface des muqueuses intestinales tout au long de la vie. C'est dans les parties basses du tractus gastro-intestinal, l'iléon mais surtout le côlon, que ce microbiote est le plus dense, le nombre de micro-organismes qui le compose excédant largement celui des cellules de l'hôte.

La charge microbienne dans les différents compartiments a été estimée à environ : 10^{3-4} , 10^{5-7} , 10^{7-8} et 10^{10-11} UFC / g dans l'estomac, le duodénum, le jéjunum, l'iléon et le côlon respectivement.

Dans l'estomac, l'acidité peut être très élevée mais une part importante des bactéries lactiques est évacuée avec les premières vidanges gastriques et elles atteignent rapidement l'iléon en une à deux heures après le repas (bifidobactéries et lactobacilles surtout).

Li et al (2017) ont pu identifier une production extracellulaire de vitamine B12 sous deux formes « adénosylcobalamine et méthylcobalamine » par *Lactobacillus plantarum*. D'autres études récentes ont aussi mis au point l'existence d'une production appréciable de vitamine B12 par *Lactobacillus plantarum* en mettant en évidence le rôle des gènes impliqués dans cette synthèse (**Bhushan et al., 2017**).

Le challenge des chercheurs sur les probiotiques reste à prouver le passage de la vitamine B12 bactérienne vers le sang.

L'objectif du présent mémoire est d'isoler et d'identifier des souches probiotiques à partir de selles de bébé et de laits maternels afin d'évaluer leur profil probiotique, *in vitro*, caractérisé par la production de la vitamine B12.

CHAPITRE I : Les probiotiques.

I.1. Historique et définitions

La notion de probiotiques a été développée grâce aux travaux de **Metchnikoff** en **1907 (Metchnikoff, 1907)**. Ce prix Nobel suggérait que la bonne santé et la longévité des paysans bulgares étaient dues à leur consommation de produits laitiers fermentés. Pour lui, la consommation de *Lactobacillus* influençait positivement la microflore intestinale, diminuait la « putréfaction » et les activités toxiques microbiennes. Il a ainsi proposé l'ingestion de bactéries lactiques pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie. Le terme probiotique a été introduit pour la première fois par **Lilly et Stillwell en 1965** pour décrire les substances produites par un microorganisme et stimulant la croissance d'autres microorganismes.

Elle a été validée par le groupe de travail conjoint mandaté par l'Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation (**FAO**) et par l'Organisation Mondiale pour la Santé (**OMS**). Ce groupe d'experts internationaux définit les probiotiques comme étant « des microorganismes vivants qui, administrés en quantités adéquates, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte » (**FAO/OMS, 2001**).

En **1989**, Fuller a défini les probiotiques par « suppléments alimentaires constitués de microorganismes vivants qui influent de façon favorable sur l'animal hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale ». En **1991**, **Fuller** redéfinit les probiotiques comme étant des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire et qui ont une action bénéfique sur l'hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale (**Fuller, 1991**). Il existe d'autres définitions des probiotiques ; elles reprennent pour la plupart l'image de « bactéries amies » vivantes utilisées pour améliorer de façon non spécifique la santé du consommateur (**Rafter, 2002**).

Les probiotiques doivent être génétiquement stables, et ne doivent pas présenter de danger pour leur hôte. Ils doivent également être capables de résister au passage dans les portions antérieures du tube digestif (**Limdi al., 2006**). Initialement, les probiotiques sont des micro-organismes vivants (bactéries ou levures) qui, ajoutés comme compléments à certains produits alimentaires comme les yaourts ou les céréales, auraient un effet

bénéfique sur la santé de l'hôte. La notion de probiotique s'applique également en alimentation animale. (Goossens al., 2003).

I.2. Les micro-organismes probiotiques

Sont considérés comme probiotiques différentes souches bactériennes ainsi que les levures. Les bactéries probiotiques sont principalement des bactéries lactiques et des *bifidobactéries*.

I.2.1. Levures

Les levures sont les premiers micro-organismes utilisées par l'homme depuis des millénaires, en particulier dans la fabrication des boissons alcoolisées et du pain par fermentation (Bouix et Leveau, 1991; Pol, 1996). Les levures sont des champignons microscopiques se présentant sous forme unicellulaire au moins à un stade de leur cycle biologique (Bouix et leveau, 1980).

Les levures sont des cellules eucaryotes, présentant une structure plus complexe que celle des bactéries notamment par la présence d'un noyau, de mitochondrie, d'un appareil de Golgi et de plus d'un chromosome (*Saccharomyces cerevisiae* a 16 chromosomes) (Labrecque, 2003).

Les biotechnologies et la recherche biomédicale exploitent ainsi largement ces microorganismes, pour la production de molécules à intérêt médical (ex : production de protéines hétérologues, comme le vaccin de l'hépatite B) (Mercier, 1997 ; Blin, 2002).

I.2.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

La classification des levures qui a été remaniée en 1984 par Kreger Van R montre que le genre *Saccharomyces* appartenant à la classe des ascomycètes et à l'ordre des endomycétales est le plus impliqué dans les productions industrielles (Leveau et al., 1993) (figure 1).

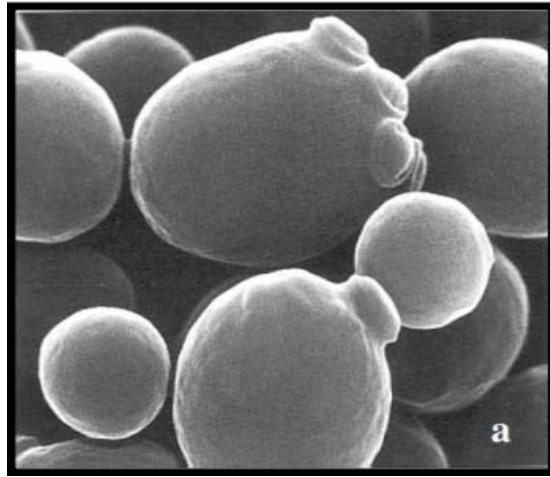


Figure 1: *Saccharomyces cerevisiae* sous microscopie électronique (Tortora et al., 2003)

Depuis l'antiquité, la levure *S. cerevisiae* a été utilisée dans la panification et la fabrication des boissons alcoolisées, après, la levure s'est installée et progressée en qualité d'additif alimentaire de probiotique en élevage intensif de ruminant (Carter et Phillips, 1944), actuellement, *S. cerevisiae* est utilisée comme des probiotiques contre les maladies fongiques chez les humains (Munoz et al., 2016).

I.2.1.2. *Saccharomyces boulardii*

C'est une levure semblable à *S. cerevisiae*, isolée, pour la première fois, en 1923 par le scientifique français **Henri Boulard**, elle appartient à la classe des *Saccharomycetes* et l'ordre des *Saccharomycetales* (Alis et Jespersen, 2003). *S. boulardii* est une souche de levure ayant fait l'objet de très nombreuses études cliniques démontrant son grand intérêt en cas de diarrhées (réduction de la fréquence) ou de prise d'antibiotiques (prévention de la diarrhée associée à l'antibiothérapie).

Elle favorise le réensemencement et la croissance des germes utiles, les saprophytes, en inhibant celle des germes nuisibles. Il a été démontré scientifiquement que l'utilisation périodique de la levure *S. boulardii*, réduit de manière sensible l'apparition des colites et des colopathies fonctionnelles, ou syndrome du côlon irritable (ballonnements, douleurs abdominales chroniques, troubles du transit chroniques, etc.), qui représentent près d'un tiers des consultations en gastro-entérologie. Il y a maintenant presque une dizaine d'années que des études randomisées et des méta-analyses ont montré l'effet des probiotiques sur la réduction du risque de survenue d'une diarrhée infectieuse et sur la

diminution de sa sévérité évaluée en termes de durée de l'épisode (**Rodrigues, 2000 ; Kamm, 2004 ; Szajewska, 2005 ; Olivier, 2009 ; Pothoulakis, 2009**).

I.2.2. Les moisissures

Sans importance dans le lait liquide, elles intéressent un grand nombre d'autres produits laitiers. Elles se développent en surface, ou dans les parties internes aérées. Elles sont productrices de lipases et de protéases, dont on rencontre le *Penicillium* et le *Geotrichum* (**F.A.O, 1995**).

I.2.3. Bactéries lactiques

Le groupe des bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique a été défini en **1919** par **Orla-Jensen**. Il réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (**Leveau, Bouix et al., 1993**).

En raison de sa composition physicochimique, le lait est considéré comme un écosystème idéal pour la croissance de différents types de microorganismes (**Belarbi, 2011**).

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini, du point de vue, taxonomique (**Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et al., 2005**).

Les bactéries lactiques sont des microorganismes utiles à l'homme lui permettant de fabriquer et de conserver un grand nombre de ses aliments. Les bactéries lactiques ont été isolées pour la première fois à partir du lait (**Metchnikoff, 1908 ; Sandine et al., 1972 ; et Carr et al., 2002**).

Ce sont des bactéries anaérobies facultatives, généralement immobiles, elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et pour les glucides fermentés cibles (**Dellaglio et al., 1994 ; Hogg, 2005**). En général ces bactéries ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions), elles sont protéolytiques, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (**Dellaglio et al., 1994; Salminen et al., 2004**).

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature, elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples (**Leveau et Bouix, 1993 ;**

Hassan et Frank, 2001). Les genres les plus utilisés comme des probiotiques sont des *Lactobacillus* et des *Bifidobacterium* (**Khan et Ansari, 2007**), et aussi des souches de genres : *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. (**Stiles et Holzapfel, 1997 ; Pot, 2008 ; Rokka et Rantamaki, 2010 ; Gbassi et al., 2011**) (**Tableau 1**).

Tableau 1: Principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotique (**Shah, 2007 et 2010**).

Espèces de <i>Lactobacillus</i>		
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. paracasei</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. johnsonni</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. plantarum</i>
Espèces de <i>Bifidobacterium</i>		
<i>B. lactis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. infantis</i>
<i>B. longum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. breve</i>
<i>B. adolescentis</i>		
Autres bactéries lactiques		
<i>Lc. lactis</i>	<i>St. Diacetylactis</i>	<i>En. faecalis</i>
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>St. intermedius</i>	<i>En. faecium</i>
<i>P. acidilactici</i>	<i>St. Thermophiles</i>	

I.2.3.1. Le genre *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae* (**Tableau 2**), il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développant à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les *lactobacilles* ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (**Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et al., 1994**).

Tableau 2 : Classification des bactéries appartenant au genre *Lactobacillus* (Franz et al., 2014).

Classification	
Règne	<i>Bacteria</i>
Division	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Lactobacillales</i>
Famille	<i>Lactobacllaceae</i>

I.2.3.2. *Lactobacillus farciminis*

Lactobacillus farciminis (*L. farciminis*) est une bactérie à Gram positif, catalase négative, mobile et asporulée n'appartenant pas à la flore commensale. Il s'agit d'une bactérie homofermentaire stricte qui fermente les hexoses par la voie de la glycolyse en produisant presque exclusivement de l'acide lactique. Sa température de croissance est comprise entre 15 et 42°C avec une croissance optimale à 35 °C et à pH 7 (Reuter, 1970), *L. farciminis* produit du NO *in vitro* à partir de la réduction des nitrites par une nitrite réductase (Wolf et al., 1990).

I.2.3.3. Le genre *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* représente les streptocoques dits lactique, car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène (Pilet et al., 2005). Les *lactocoques* se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, mais capables de se développer à 10°C (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et al., 2005).

I.2.3.4. Le genre *Streptococcus*

La seule espèce de *streptococcus* utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* (Stiles et Holzappel, 1997). Cette souche, se caractérise par son habitat (lait

et produits laitiers), son caractère non pathogène et sa résistance à la température (52°C) (Haddie, 1986 ; Pilet et al., 2005).

I.2.3.5. Le genre *Enterococcus*

Ce genre regroupe les *streptocoques* fécaux qui représentent, sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *Enterococcus faecalis*. Les *entérocoques* sont des coques qui peuvent être mobiles, homofermentaires (Tamime, 2002 ; Ho et al., 2007). Et qui se caractérisent par leur développement à 10 et 45°C, leur aptitude à croître en présence de 6,5 % NaCl, et leur grande résistance aux facteurs de l'environnement (Giraffa et al., 1997).

I.2.3.6. Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Oenococcus et *Weissella* ressemblent aux coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire, avec production de l'acide lactique, de CO₂ et d'éthanol (Pilet et al., 1998 ; Ho et al., 2007).

Le genre *Leuconostoc* est anaérobie facultatif et exigeant du point de vue nutritionnel. Le développement des *leuconostoc* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides (Hassan et Frank, 2001 ; Guiraud, 2003 ; Ogier et al., 2008).

I.2.3.7. Les genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées (18% de NaCl), comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* (Pilet et al., 2005).

I.2.3.8. Le genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal (Axelsson et al., 2004 ; Pilet et al., 2005 ; Ho et al., 2007). Les bactéries appartenant au genre

Bifidobacterium sont des bactéries Gram positif se présentant au microscope sous forme de bâtonnets de différentes formes (Scardovi, 1986). Ces formes peuvent varier de courtes à longues avec de nombreuses variations au niveau de leurs extrémités. Ces bâtonnets peuvent se retrouver seuls ou associés selon différentes configurations, selon les espèces. Ces configurations peuvent même aider à

Les *bifidobactéries* constituent la population dominante de la flore intestinale dès les premiers jours de la vie d'un humain et continuent de représenter une importante partie d cette flore tout au long de sa vie (Gournier et al., 1994 ; Hagiage, 1994).

Les *bifidobactéries* sont largement dominantes dans la flore du nourrisson (Mitsuoka et al., 1989). Parmi toutes les espèces de bifidobactéries, celles que l'on retrouve naturellement le plus souvent chez l'homme sont : *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* (surtout chez les nouveaux-nés) et *B. longum* (Gournier et al., 1994). Ces espèces, en plus de *B. animalis* et *B. lactis* sont toutes considérées comme des probiotiques.

I.3. Directives pour l'évaluation des microorganismes probiotiques

Afin d'évaluer les propriétés des probiotiques, la consultation a suggéré que les directives ci-après soient utilisées. Pour l'utilisation dans les aliments, les microorganismes probiotiques ne devraient pas seulement être capables de survivre au passage à travers le tractus gastro-intestinal mais aussi avoir la capacité de proliférer dans l'intestin. Cela signifie qu'ils doivent être résistants aux sucs gastriques et capables de se développer en présence de bile, ou être consommés dans un véhicule alimentaire qui leur permet de survivre au passage dans l'estomac et à l'exposition à la bile. Ce sont des bactéries Gram positif qui sont incluses principalement dans les deux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Holzapel et al., 1998; Klein et al., 1998).

I.3.1. Description générale du système digestif

Le système digestif est composé successivement de la cavité buccale, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jejunum et iléon), le caecum, le côlon ou gros intestin (côlon ascendant, côlon transversal et côlon descendant) puis se termine par le rectum et l'anus (Villarrea, 2006).

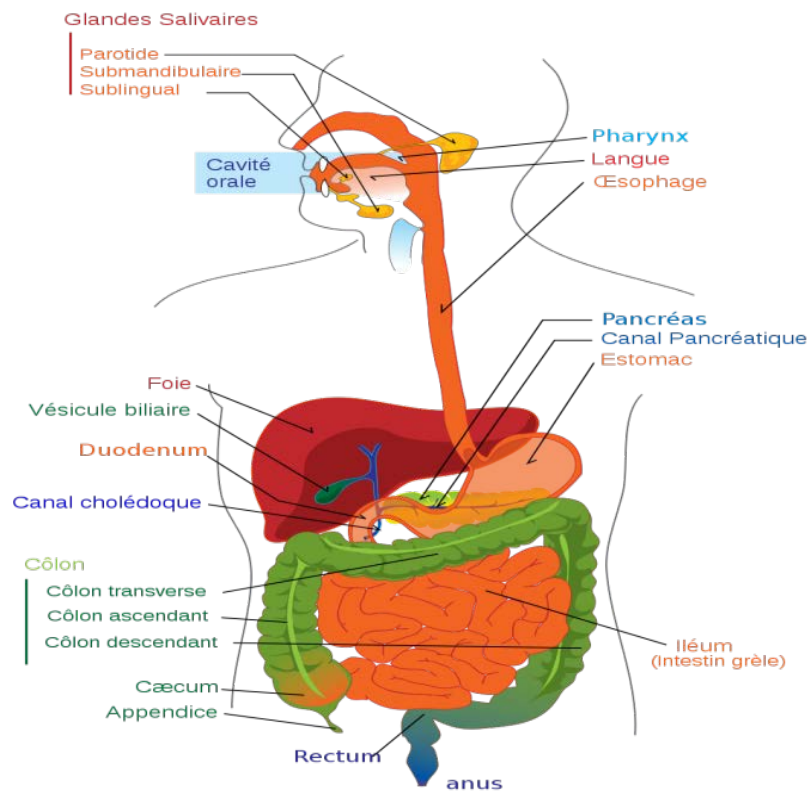


Figure 2: Structure de système digestif (Villarrea, 2006).

A) L'intestin grêle

L'intestin grêle mesure 4 à 7 m chez l'homme. Les parois sont recouvertes de plis circulaires, de villosités et de microvillosités formant la bordure en brosse, ce qui lui confère une surface d'échange avec la lumière de 400 m² en moyenne. Les sécrétions intestinales permettent de maintenir un pH neutre ou légèrement basique au alentour de 8. L'intestin grêle est le siège de phénomènes d'absorption mais joue également un rôle dans les phénomènes de sécrétion et participe à la réponse immunitaire. Il comprend le duodénum (0,25 m), le jejunum (2,5 m) et l'iléon (3,5 m) (Sergi, 1997; André et al., 2002).

b) Le côlon

De calibre plus large que l'intestin grêle, le gros intestin mesure environ 1,5 m de long, il comprend le côlon ascendant, transversal et descendant. Le pH est compris entre 4,7 et 7,5 respectivement dans sa partie proximale et distale. A la différence de la muqueuse de l'intestin grêle, le côlon ne comporte pas de villosités mais un épithélium plan (ou épithélium de surface). L'épithélium est constitué de colonocytes, cellules responsables de l'absorption de l'eau et des électrolytes, de cellules caliciformes et de cellules entéroendocrines. Le chorion lui, est riche en tissu lymphoïde.

➤ Les fonctions du côlon sont

- i) la déshydratation du bol alimentaire (absorption de l'eau et des électrolytes);
- ii) la digestion terminale de la cellulose et autres polysaccharides résistant à la digestion au niveau de l'intestin grêle par le microbiote
- iii) l'évacuation des déchets alimentaires (**Villarrea, 2006**).

Le tractus gastro-intestinal est un écosystème complexe et ouvert aux microorganismes exogènes. Sa muqueuse étant estimée à 200-300 m², il représente la plus grande surface du corps en contact avec l'environnement. L'écosystème gastro-intestinal est généré par une alliance stable entre l'épithélium gastro-intestinal, le système immunitaire et une importante flore microbienne. Si l'un des trois composants de l'écosystème est défaillant, des pathologies peuvent survenir. Les interactions entre les microorganismes et l'hôte peuvent être de trois types : symbiose, commensalisme ou pathogénicité. L'hôte est protégé contre la microflore intestinale pathogène par les barrières chimiques et physiques formées par l'épithélium gastro-intestinal (**Bäckhed et al., 2004 ; Amrouche, 2005**).

I.3.2. Colonisation du tube digestif

La colonisation du tube digestif par les micro-organismes a lieu dès les premiers jours de vie. Chez l'Homme, le profil microbien varie selon la durée de la gestation, la voie de naissance (césarienne ou voies naturelles), et l'alimentation du nouveau-né (**Goldin, 1986**).

Le microbiote intestinal a été le plus amplement étudié, peut-être parce que ce tractus représente la plus grande surface d'échange de notre corps et qu'il est aussi le plus colonisé, avec à lui seul une population de bactéries issues de plusieurs centaines

d'espèces différentes, c'est environ dix fois plus de bactéries que le nombre total de cellules de notre corps. En poids cela représente entre 1,5 et 2 kg.

Du fait de l'accès difficile à certaines parties du tractus digestif, et de la très grande complexité de la flore digestive, elle n'est pas totalement découverte. Cependant, les chercheurs ont déterminé les bactéries principales et un ordre de grandeur des quantités présentes dans les différentes régions du tractus digestif. Plus on avance vers le colon, plus le nombre de bactéries présentes grandit (**figure 3**) (**Coudeyras et Forestier, 2010**).

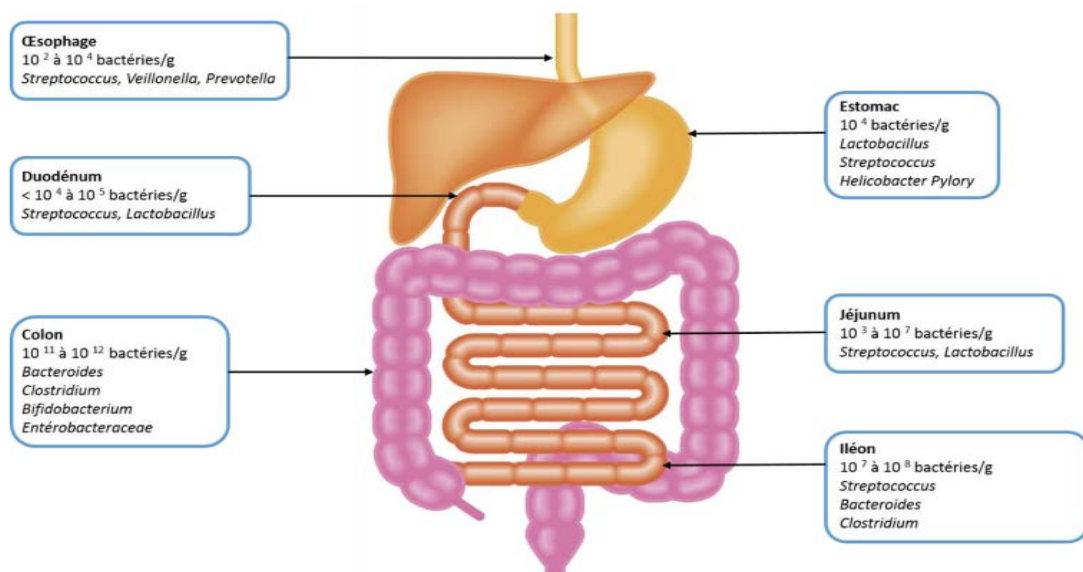


Figure 3: Microbiote intestinal et répartition le long du tractus digestif (**Goulet, 2009**)

I.4. La Flore intestinale

La microflore intestinale possède des fonctions nutritionnelles, métaboliques, immunologiques et protectrices. En effet, par la fermentation de sucres (digestibles ou non), elle libère principalement des gaz (H_2 , CO_2), de l'acide lactique et des acides gras à courtes chaînes (acétate, butyrate et propionate) (**Tannock, 2003**).

Le plus grand facteur de variabilité de la composition de la flore intestinale est l'individu lui-même (**Eckburg et al., 2005**). Chez un individu donné, la flore peut varier selon l'alimentation et l'âge (**O'Hara et Shanahan, 2006**).

La flore intestinale est constituée de diverses espèces bactériennes, sa composition varie le long du tube digestif (**Gollado, 2009**).

I.4.1. Microflore contaminant

Elle est composée de la flore pathogène et de la flore d'altération.

✓ Flore pathogène

Elle fait partie de la flore contaminant du lait. Les bactéries pathogènes pour l'homme peuvent être présentes dans le lait cru, ou dans les produits laitiers qui en dérivent. Elles sont capables de provoquer des malaises chez les personnes qui consomment ces produits. Les bactéries les plus importantes de cette flore pathogène sont le plus souvent mésophiles et les principaux microorganismes pathogènes associés aux produits laitiers sont : *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella sonnei* et certaines moisissures (**Vignola, 2002**).

✓ Flore d'altération

Incluse dans la flore contaminant, la flore d'altération causera des défauts sensoriels de goût, d'arômes, d'apparence ou de texture et réduira durée de vie du produit laitier. Parfois, certains microorganismes nuisibles peuvent aussi être pathogènes. L'un n'exclut pas l'autre. Les principaux genres identifiés comme flore d'altération sont : *Pseudomonas* sp, *Proteus* sp, les coliformes soit principalement les genres : *Escherichia* et *Enterobacter*, les sporulées telles que *Bacillus* sp, *Clostridium* sp et certaines levures et moisissures (**Vignola, 2002 et Richard, 1990**).

L'hôte joue un rôle et on conçoit un dialogue entre l'épithélium intestinal et la microflore (**Gordon et al., 1992**). La distribution des espèces bactériennes de cette microflore diffère dans les compartiments du tube digestif. Une population moins dense est observée dans l'estomac et le duodénum en raison des conditions acides, alors qu'une population plus diversifiée et plus dense est observée dans le jéjunum et l'iléum. Le côlon est la partie la plus colonisée du tractus digestif (**Salminen et al., 1998**).

Après une colonisation complète, la microflore intestinale est considérée comme un organe acquis après la naissance. Il est constitué d'une grande diversité d'espèces microbiennes assurant différentes fonctions pour l'hôte. La microflore du tractus gastro-intestinal a été estimée à près de 10^{13} à 10^{14} cellules microbiennes représentant 400 à 600 espèces et sous espèces (**Bäckhed et al., 2004**). C'est au niveau du côlon que la population est la plus abondante, avec environ 10^{11} bactéries/g de contenu, constitué de façon dominante de genres anaérobies stricts. Les fonctions de la flore sont multiples. Une des fonctions majeures est son rôle métabolique par la fermentation au niveau colique des substrats d'origine endogène ou exogène et non absorbés dans l'intestin grêle (**Bernalier et al., 2004**).

Cette microflore représente environ 10 fois le nombre total de cellules du corps humain. La prévalence des bactéries dans le tractus gastro-intestinal dépend des conditions régnant dans le compartiment du tractus. Deux catégories de bactéries ont été identifiées : les bactéries autochtones ou indigènes se trouvant dans des niches particulières, et les bactéries allochtones ou transitoires (comme les probiotiques) rencontrées dans d'autres habitats du tractus après une colonisation complète.

A coté de ce rôle métabolique, la microflore intestinale joue un rôle majeur dans la résistance à la colonisation des bactéries exogènes qu'elles soient à potentialité pathogène ou non. Cette fonction de barrière est essentielle car elle maintient un équilibre relativement stable dans la microflore du tube digestif (**Moreau et al., 2004 ; Forchielli et al., 2005**).

La microflore joue aussi un rôle de protection contre les bactéries potentiellement pathogènes par un effet barrière, en empêchant leur passage dans la circulation sanguine, en inhibant leur prolifération (production de substance antimicrobiennes) et en empêchant leur implantation dans le tractus digestif (compétition pour les nutriments et les sites d'adhésion) (**Liévin et Servin, 2006**). C'est parmi cette flore bénéfique autochtone de sujets sains que nous pouvons isoler des souches bactériennes potentiellement probiotiques adaptées aux conditions gastro-intestinales et qui se trouvent dans la matière fécale (**Vaughanet al., 1999 ; FAO/OMS, 2002**).

I.4.1.1. Les facteurs influencent la microflore

Facteurs influençant la cinétique cette d'implantation de la fore digestive du nouveau-né. De nombreux éléments vont influence cette cinétique d'implantation et la composition de la flore intestinale du nouveau-né parmi lesquels le monde d'accouchement l'environnement, le types d'alimentation, l'âge gestationnel et l'antibiothérapie (**Mailys et al., 2010**).

A la naissance, le tube digestif du nouveau-né est stérile, c'est-à-dire dépourvu de bactérie. La formation de cet écosystème débute rapidement dès la rupture des membranes fœtales et se poursuit pendant plusieurs mois. En effet, en l'absence d'un système immunitaire mature, le tube digestif du nouveau-né est particulièrement permissif. La symbiose "hôte-microbiote" se met en place progressivement principalement par contact avec la communauté microbienne provenant de la mère (flores vaginale, fécale, buccale) et de l'environnement (bactéries véhiculées par le personnel soignant, l'entourage, etc...) (**Gras et al., 2011**).

Le nouveau-né, stérile in utéro, est rapidement colonisé dès sa naissance. Cette toute nouvelle flore est constituée de bactéries provenant de la flore fécale de la mère, principalement des entérobactéries et des *bifidobactéries* ; et de la flore vaginale de la mère, principalement des lactobacilles (accouchement par voie basse) ; et/ou de la flore provenant de l'environnement proche incluant l'air et le personnel soignant (accouchement par césarienne) (**Campeotto et al., 2007 ; Grosdidier, 2010**).

Même si les facteurs bactériens, permettant l'implantation d'une souche donnée au niveau de la flore, sont encore peu connus, la colonisation suit néanmoins un schéma relativement organisé sous la dépendance de facteurs endogènes et exogènes qui vont influencer la composition de ce microbiote (**Doré et al., 2010**).

I.5. Le microbiote intestinal

I.5.1. Implantation du microbiote intestinal

Tout contact entre le corps humain et un microorganisme qu'il vienne d'un aliment, de l'environnement, d'un autre humain ou d'animaux, peut en principe conduire à la colonisation. Le fœtus des mammifères évolue in utero dans un environnement stérile et la colonisation microbienne débute durant le processus de la naissance. En l'absence des mécanismes immunitaires sophistiqués de l'adulte, le tube digestif du nouveau-né est un environnement particulièrement permissif où les niveaux de population atteignent rapidement 10^{11} bactéries par gramme de selles. La colonisation suit néanmoins un schéma relativement organisé, sous la dépendance de facteurs exogènes (exposition aux microorganismes d'origine maternelle (fécale, vaginale et cutanée) et environnementale, mais aussi l'alimentation et parfois l'antibiothérapie) et endogènes.

Quelques études indiquent que le lait maternel pourrait être le vecteur de microorganismes de la mère vers l'enfant. Ainsi, même collecté aseptiquement, le lait de femme n'est pas stérile (**Warner, 2003**). Les bactéries qu'il contient peuvent être transmises à l'enfant via l'allaitement. Deux équipes de chercheurs ont étudié l'influence de l'allaitement maternel dans la mise en place de la flore microbienne intestinale du nouveau né (**Perez et al., 2007**). Elles ont montré que des bactéries ayant pour origine l'intestin de la mère transitent par le lait. La mère transmet donc des éléments qui vont contribuer à la colonisation de l'intestin de son enfant et auront un impact sur la mise en place de son immunité. Les bactéries anaérobies qui dominent le microbiote intestinal de l'adulte font parties des premiers microbes rencontrés lors d'une naissance par voie basse. Elles ne se développeront cependant en dominance dans l'intestin que lorsque les aérobies stricts et les anaérobies facultatifs auront consommé l'oxygène présent. Ce premier relais d'espèces s'opère durant les heures qui suivent la naissance. Des relations antagonistes gouvernent ensuite progressivement le relais d'espèces en dominance conduisant vers l'âge de deux ans à un microbiote stable sur le plan fonctionnel (**Figure 4**).

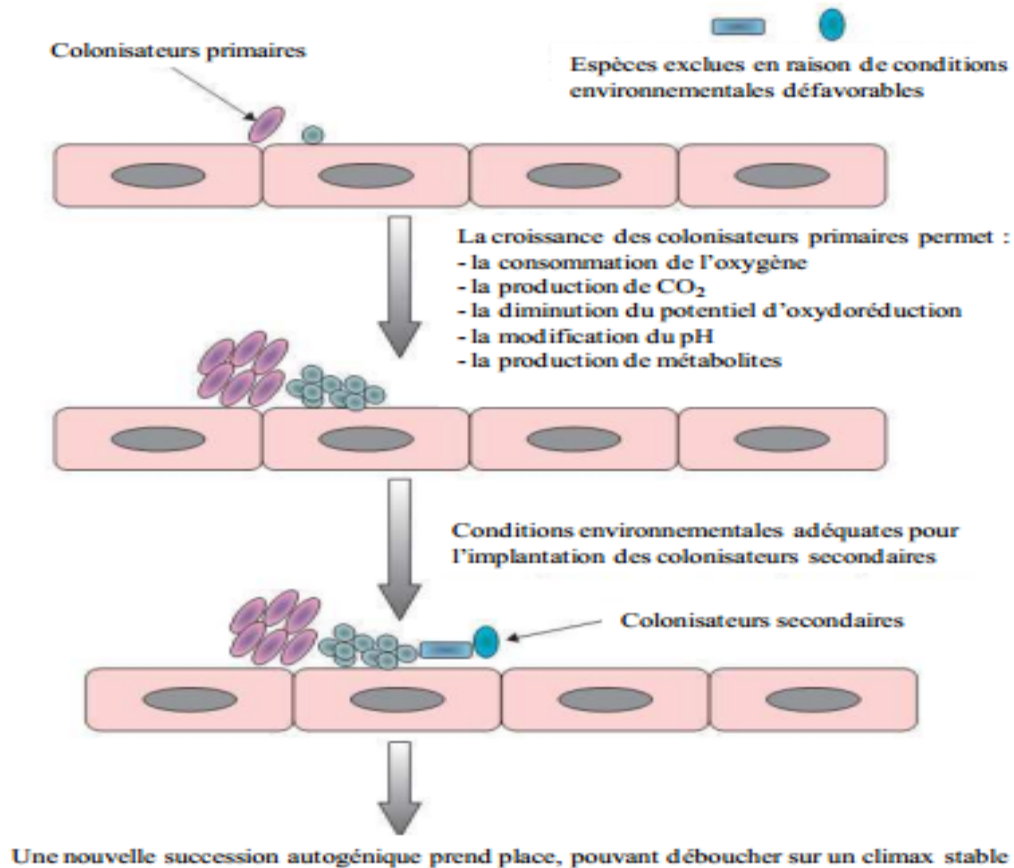


Figure 4: Implantation du microbiote intestinal (Wilson, 2008).

Les bactéries anaérobies strictes dominent les bactéries anaérobies facultatives dans le côlon distal et les selles par un facteur 1000 environ. L'hygiène qui entoure la naissance et les premiers moments de la vie conditionne fortement la dynamique de colonisation. Il apparaît aujourd'hui clairement que la colonisation par des espèces commensales habituelles comme *E. coli* est retardée dans des pays industrialisés par rapport au passé (de quelques jours à 6 mois) et par rapport au pays en voie de développement, apparemment du fait des conditions d'hygiène appliquées aujourd'hui (Nowrouzian et al., 2003; Adlerberth et al., 2006). Des bactéries habituellement associées à la peau (*Staphylococcus sp*) apparaissent alors dans la flore précoce (Lindberg et al., 2004).

La quantité de bactéries implantées est légèrement plus faible chez les nouveau-nés nourris au lait infantile et encore plus faible pour les nouveau-nés nés par césarienne (Campeotto et al., 2007).

I.6. Le lait source de probiotiques

I.6.1. Définition du lait

Le lait a été défini en **1908**, au cours du **Congrès International de la Répression des Fraudes** à Genève comme étant : « Le produit intégral de la traite et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum » (Alais, 1975).

L'allaitement maternel a constitué depuis toujours le mode alimentaire naturel et, jusqu'à récemment, quasi exclusif des nouveau-nés et nourrissons. Avec le XXe siècle, l'alimentation artificielle, basée essentiellement mais non exclusivement sur l'emploi du lait de vache, a pris un réel essor dans les pays industrialisés où ce changement de comportement a répondu à un besoin social (Vis et Hennart, 1978).

Le lait maternel, ce n'est pas qu'un aliment. Ce n'est pas que l'addition de lipides, de glucides, de protides, de vitamines, d'oligo-éléments destinés à faire grandir et grossir les petits humains, mais il est parfaitement adaptés à leur métabolisme. Le lait maternel, c'est aussi plein de facteurs de protection : anticorps, lactoferrine, lysozyme, caséine, fibronectine, protectine, protéines du complément, lymphocytes, cytokines, enzymes comme la catalase, oligosaccharides, etc. (Cleary, 2004).

I.6.2. Caractères physico chimiques du lait

Le lait est un liquide opaque blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur de la matière grasse en bêta carotène (Bourgeois et al., 1996).

Le lait humain contient environ 87 pourcent d'eau et son osmolarité, voisine de 290 mOsm/litre, est proche de celle du plasma (de 250 à 290 mOsm/litre). La densité spécifique du lait maternel varie de 1,026 à 1,037 et le poids des matières sèches varie de 100 à 175 g/litre. Plus de la moitié de cette masse est constituée de lactose (de 70 à 80 g/litre), un quart environ de lipides (de 35 à 40 g/litre) et une part bien moindre de protéines (1 g/litre environ) et de minéraux (2 g/litre).

I.6.3. La valeur nutritive du lait

Le lait un substrat très fournissant à l'homme et aux jeunes mammifères un aliment presque complet, protides, glucides, lipides, sels minéraux et vitamines sont présents à des concentrations tout à fait satisfaisantes pour la croissance et la multiplication cellulaire (**Bourgeois et al., 1996**).

I.6.4. Microflore lactique du lait

Les chercheurs ont mené des analyses génétiques auprès de 7 mamans et leur bébé. Ils ont été surpris de constater que les bonnes bactéries (probiotiques) se retrouvant dans le lait maternel puis dans les selles des nourrissons étaient identiques à celles provenant des intestins des mamans.

Selon leur hypothèse, par un mécanisme encore inconnu, les probiotiques de la flore intestinale maternelle parviendraient donc à se frayer un chemin jusqu'aux glandes mammaires. Et de là, elles s'installeraient dans le système digestif du nourrisson.

La présence de ces micro-organismes dans l'intestin des bébés n'étonne cependant pas les chercheurs. Les intestins des enfants logent naturellement plusieurs centaines d'espèces de bonnes bactéries qui favorisent le bon fonctionnement de leurs systèmes digestif et immunitaire (**Anonyme 1, 2013**).

Elle fait partie de la flore normale du lait et se caractérise par son aptitude à fermenter le lactose avec production d'acide lactique et donc, abaissement du pH. Les ferments lactiques laitiers constituent un groupe diversifié de bactéries qui ont néanmoins un certain nombre de caractéristiques communes : elles sont à Gram positifs, catalase négatifs, anaérobies facultatifs ou micro-aérophiles et hétérotrophes (**Aiais, 1984 ; Claude et Champagne, 1998**). L'ensemble de ces caractères précieux permet aux bactéries lactiques un développement plus rapide que les espèces considérées comme nuisibles (**Saiedkouda et Boudabous, 1994**).

Le lait maternel est composé d'une flore bactérienne abondante et très diverse et notamment de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium* (**Jean, 2017**).

Le lait maternel n'est pas stérile, mais contient moins de 600 espèces différentes de bactéries différentes, y compris *Bifidobacterium breve*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. bifidum* et *B. dentium* (Salminen et al., 2012). Ces bactéries peuvent provenir de la bouche du bébé, mais plus ils peuvent aussi intrigant venir de l'intestin de la mère. Une étude a montré que, dans un jour âgé de nouveau-nés *Enterococcus* et *Staphylococcus* sont les micro-organismes les plus fréquemment isolés (Solis et al., 2010). A partir de 10 jours jusqu'à l'âge de 3 mois, *bifidobactéries* devenir le groupe prédominant. *Lactobacilles* et *bifidobactéries* se trouvent dans le lait maternel et peut contribuer à la mise en place initiale du microbiote dans les quelques-uns des bactéries les plus courantes nouveau née (Olivares et al., 2006).

Les nouveau-nés qui ont reçu du lait maternel ont également un microbiote intestinal plus favorable que ceux nourris au lait maternisé (Harmsen et al., 2000), ce qui est probablement dû à la présence de bactéries lactiques dans le lait maternel (Rudloff et al., 1993). Il a été suggéré que ces différences dans le microbiote intestinal pourraient être responsables de certains des effets bénéfiques observés chez les nourrissons allaités. On sait depuis plusieurs décennies que les *lactobacilles* et les *biofobactéries* inhibent la croissance de micro-organismes pathogènes tels que *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* et *Clostridium perfringens* (Gilliland et al., 1977).

1.7. La matière fécale source de probiotiques

La composition de la microflore intestinale est spécifique de chaque espèce animale ; voir même de l'individu (Ducluzeau et Raibaud, 1979). La matière fécale constitue une meilleure source d'isolement des bactéries probiotiques. Pour être sélectionnées, les souches probiotiques doivent remplir certains critères, in vitro, comprenant, la résistance aux conditions gastriques et intestinales, la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte et l'origine humaine pour un emploi chez l'Homme (FAO / OMS, 2001).

CHAPITRE II : La vitamine B12.

II.1. Définition des vitamines

Les vitamines sont des substances organiques, sans valeur énergétique propre, qui sont nécessaires à l'organisme et que l'homme ne peut synthétiser en quantité suffisante. Elles doivent être fournies par l'alimentation. Treize substances répondent à cette définition. Il s'agit d'un groupe de molécules chimiquement très hétérogènes. Ce sont des substances de faible poids moléculaire (**Anonyme, 2011**).

Il existe deux sortes de vitamines : les vitamines hydrosolubles et les vitamines liposolubles. On compte, parmi les vitamines hydrosolubles, les vitamines B1, B2, B3, B6 et B12, la vitamine C, la biotine et l'acide folique. Elles ne sont pas emmagasinées en grandes quantités dans le corps, et toute quantité superflue est rejetée dans l'urine. On compte, parmi les vitamines liposolubles, les vitamines A, D, E et K. Ces vitamines peuvent être stockées dans notre corps. Il n'est pas recommandé d'avoir de grandes quantités de vitamines liposolubles dans notre corps, car cela peut provoquer des problèmes de santé (**Anonyme 3, 2014**).

II.2. Classification des vitamines

Les propriétés chimiques et physiologiques des vitamines sont très variées, jusqu'à présent nous avons connaissance de 13 vitamines. Les vitamines sont classées en deux groupes sur base de leurs propriétés de solubilité, les vitamines liposolubles et les vitamines hydrosolubles (**Tableau 3**).

II.3. Définition de vitamine B12

La vitamine B12 ou cobalamine est une vitamine hydrosoluble. Elle a une structure chimique proche de l'hème, l'atome central de fer étant remplacée par un atome de cobalt, d'où son nom. A l'état naturel, elle existe sous forme de cristaux ou de poudre cristalline de couleur rouge foncé, due au cobalt.

Tableau 3 : Classe des vitamines (Anonyme 2, 2011).

Classe des vitamines	Nom chimique	Abréviation
Vitamines liposolubles	Rétinol	Vitamine A
	Calciférol	Vitamine D
	Tocophérol	Vitamine E
	Phytoménadione	Vitamine K1
	Phylloquinone	
Vitamines hydrosolubles	Thiamine	Vitamine B1
	Riboflavine	Vitamine B2
	Acide pantothénique	Vitamine B5
	Pyridoxine	Vitamine B6
	Niacine	Vitamine PP ou B3
	Acide folique	Vitamine B9
	Cobalamine	Vitamine B12
	Acide ascorbique	Vitamine C
Biotine	Vitamine H ou B8	

La B12 est une vitamine soluble dans l'eau qui, contrairement aux autres vitamines de cette catégorie, n'est pas rapidement excrétée dans l'urine. Elle s'accumule plutôt dans plusieurs organes (Larsen, 2010). Bien que le foie constitue le principal site des réserves corporelles de la vitamine B12, cette dernière peut aussi être stockée dans les reins, la moelle osseuse et les glandes surrénales (Larsen, 2010 ; Schrier, 2011). La quantité emmagasinée est de l'ordre d'environ 2 à 5 mg et en l'absence d'un apport exogène supplémentaire, cette provision met de 2 à 7 ans avant de s'épuiser (Chatelier, 2003 ; Andrès et al., 2005).

❖ La cobalamine

La cobalamine sous ses diverses formes est une molécule complexe avec un atome de cobalt central. Le corps humain ainsi que les plantes et animaux supérieurs sont incapables de la synthétiser. Les cobalamines contenues dans les aliments d'origine animale (viande, lait) sont toutes produites par des microorganismes. On en trouve deux formes actives chez l'être humain: la méthylcobalamine et la 5'-adénosylcobalamine. Il existe par ailleurs une variante de synthèse, la cyanocobalamine, utilisée en supplémentation et pouvant être transformée dans le corps humain en formes biologiquement actives (Elisabeth et al., 2011).

II.3.1. La vitamine B12 dans l'alimentation

La vitamine B12 est présente uniquement dans les aliments d'origine animale et dans les aliments enrichis de cette vitamine (**Anonyme 7, 2017**) comme la viande, la volaille, le poisson, les mollusques, les crustacés, les œufs et les produits laitiers (**Oh CR et Brown, 2003 ; Anonyme 4, 2010 ; Anonyme 5, 1998**). Elle est ajoutée artificiellement aux céréales à prendre au petit déjeuner, aux substituts de viande à base de soja et à certaines boissons également à base de soja (**Anonyme 4, 2010 ; Anonyme 5, 1998**). Il faut consulter la valeur nutritive indiquée sur l'étiquette des aliments afin de connaître plus précisément leur teneur en B12.

Une consultation avec un nutritionniste peut également éclairer les patients sur cette question. Le **tableau 4** présente la quantité de B12 retrouvée dans quelques aliments pouvant être consommés dans le cadre d'une saine alimentation dérivés des animaux. Il est juste d'affirmer que des substances analogues à la vitamine B12 sont présentes dans certaines algues ou plantes. Cependant, elles ne sont pas actives dans le corps humain (**Anonyme 6, 2010**).

On recommande aux personnes qui évitent tous les produits d'origine animale de consommer des substituts de la viande comme des produits de soya enrichis de vitamine B12. Dix à trente pourcents des personnes âgées ont des problèmes d'absorption de la vitamine B12. **Santé Canada** recommande aux personnes de plus de 50 ans de consommer des aliments enrichis de vitamine B12 ou de prendre un supplément de vitamine B12 (**Anonyme 7, 2017**).

Chaque denrée alimentaire a naturellement son propre spectre de vitamines. Plus l'aliment est frais, plus son contenu en vitamines est important. Les vitamines peuvent également être ajoutées aux aliments (on parle de denrées enrichies en vitamines. C'est donc dire qu'il peut s'écouler de nombreuses années entre l'installation d'une carence et l'apparition des manifestations cliniques qui y sont associées.

Tableau 4 : Teneur approximative en vitamine B12 de certains aliments (**Anonyme, 2010 ; Anonyme 8, 2010 ; Anonyme 9, 2010**).

Aliment	Portion	Teneur
Bœuf, surlonge, cuit, braisé	75 g	1,488 µg
Fromage cheddar	50 g	0,200 µg
Fromage Cottage 2 % m.g.		
250 ml	1,070 µg	
Lait 2 % m.g.	250 ml	0,990 µg
Œuf, gros, poché*	1	0,760 µg
Poulet, viande blanche, grillée	75 g	0,260 µg
Sardines égouttées (conserves)	75 g	6,750 µg
Thon pâle égoutté (conserves)	75 g	2,240 µg
Yogourt nature 2 % m.g.	175 ml	1,401 µg

* Certaines sources mentionnent que les œufs contiennent un facteur nommé « avidine » qui bloquerait l'absorption de la B12. Il n'y a cependant aucun risque lorsque le blanc d'œuf est cuit ou battu en neige.

II.3.1.1. Végétariens

Tel que mentionné précédemment, la B12 se retrouve de manière naturelle dans les produits dérivés des animaux. Il est juste d'affirmer que des substances analogues à la vitamine B12 sont présentes dans certaines algues ou plantes. Cependant, elles ne sont pas actives dans le corps humain (**Anonyme 6, 2010**). Les végétariens et, plus particulièrement, les végétaliens présentent donc un risque accru de manifester une carence à long terme. Il est essentiel que leur alimentation comporte suffisamment d'aliments enrichis artificiellement en B12. La prise d'un supplément peut également être suggérée afin de combler leurs besoins.

II.3.2. Apport maximal tolérable et apport nutritionnel recommandé

À ce jour, il n'existe pas suffisamment de données pour établir l'apport maximal tolérable de vitamine B12 (**Anonyme 4, 2010 ; Anonyme 5, 1998**). En fait, aucun cas de

toxicité à la suite de l'ingestion d'une dose élevée de cette vitamine n'est rapporté dans la documentation scientifique (**Anonyme 4, 2010**). Toutefois, les individus qui consomment des quantités de nutriments supérieures à l'apport nutritionnel recommandé doivent être prudents et le faire sous la supervision d'un professionnel de la santé. L'apport nutritionnel recommandé pour la vitamine B12 varie en fonction de l'âge. Il est possible d'en prendre connaissance au **tableau 5**. Notons que chez les Québécois, les apports habituels de vitamine B12 se chiffrent à 3,5 µg par jour pour les femmes et à 4,3 µg par jour pour les hommes, ce qui dépasse largement l'apport recommandé (**Anonyme 10, 2011**).

Ainsi, l'apparition d'une carence en B12 d'origine alimentaire peut paraître improbable. Cependant, l'absorption et le transport de la B12 une fois celle-ci ingérée constituent un phénomène très complexe se produisant en plusieurs étapes. Un problème survenant à l'une ou l'autre de ces étapes peut augmenter les probabilités d'apparition d'une carence.

II.3.3. Femmes enceintes, femmes qui allaitent et nourrissons

La vitamine B12 traverse le placenta durant la grossesse et elle est présente de manière naturelle dans le lait maternel (**Anonyme 4, 2010**). Afin d'assurer un apport suffisant à leur nourrisson, les femmes enceintes ou celles qui allaitent doivent s'assurer de respecter les normes de l'apport nutritionnel recommandé, indiquées au **tableau 5**.

Tableau 5 : Apport nutritionnel recommandé en vitamine B12 en fonction de l'âge (**Anonyme 4, 2010 ; Anonyme 5, 1998**).

Groupe d'âge	Vitamine B12 (µg/jour)
0-6 mois	0,4 µg*
7-12 mois	0,5 µg*
1-3 ans	0,9 µg
4-8 ans	1,2 µg
9-13 ans	1,8 µg
14-50 ans	2,4 µg
50 ans +	2,4 µg**
Grossesse	2,6 µg
Allaitement	2,8 µg

*Pour ces deux catégories d'âge, l'apport déterminé est un apport suffisant, et non un apport nutritionnel recommandé. L'apport suffisant est défini comme un apport nutritionnel quotidien moyen pour un bébé né à terme, en bonne santé et exclusivement nourri par allaitement (**Anonyme 4, 2010 ; Anonyme 5, 1998**).

Étant donné le phénomène de malabsorption de la B12, souvent observé chez les personnes âgées, il est recommandé qu'elles obtiennent l'apport nutritionnel recommandé par la consommation d'aliments enrichis artificiellement en B12 ou en prenant un supplément (Anonyme 5, 1998**).

Pendant la grossesse, l'enfant qui se développe est approvisionné en vitamine B12 et en autres substances nutritives de façon prioritaire par rapport au corps de la mère. Si la femme a un apport suffisant en vitamine B12, l'enfant constitue des réserves qui suffisent pour 10 à 12 mois. Pendant l'allaitement, l'enfant reçoit en outre de la vitamine B12 par le lait maternel. Néanmoins, si les besoins en vitamine B12 de la femme enceinte et qui allaite ne sont pas couverts, il n'en résulte pas uniquement une carence en vitamine B12 pour la femme, mais aussi pour le fœtus et le nourrisson. Ce déficit entraîne chez lui des troubles neurologiques (**Anonyme 11, 2006**).

Puisque les mères qui suivent un régime végétarien strict présentent un risque accru de souffrir de carence, il est suggéré de leur fournir un supplément de B12 (**Anonyme 4, 2010 ; Anonyme 5, 1998**).

II.3.4. Facteurs de risque de carence

L'étiologie d'une carence en vitamine B12 est souvent multifactorielle et, dans plusieurs cas, la cause exacte demeure inconnue (**Anonyme 4, 2010 ; Anonyme 5, 1998**). En effet, les personnes atteintes présentent habituellement plusieurs facteurs de risque qui, combinés, mènent à une carence. Ces facteurs de risque sont présentés au **tableau 6**. Il sera maintenant question des populations présentant fréquemment certains de ces facteurs.

Tableau 6 : Principaux facteurs de risque pouvant mener à une déficience en B12 (Dali et Andrès, 2009 ; Oh CR et Brown, 2003 ; Anonyme 4, 2010).

Principaux facteurs de risque pouvant mener à une déficience en B12	
Une déficience nutritionnelle	<ul style="list-style-type: none"> - Régime végétarien - Régime peu varié - Consommation d'alcool excessive pendant plus de deux semaines
Facteurs de risque liés à une malabsorption	<ul style="list-style-type: none"> - Utilisation de médicaments réduisant la production d'acidité de l'estomac - Diminution du facteur intrinsèque ou du fonctionnement des cellules pariétales (anémie pernicieuse, gastrite atrophique chronique, après une gastrectomie, etc.)
Autres facteurs gastro-intestinaux	<ul style="list-style-type: none"> - Malabsorption au niveau de l'iléon (résection de l'iléon, Maladie de Crohn, etc.) - Présence d'un trop grand nombre de bactéries utilisant la B12 dans l'intestin Insuffisance pancréatique affectant la fonction exocrine - Déficience en transcobalamine II (rare) - VIH (causes multiples)

Les organes impliqués dans le processus d'absorption de la vitamine B12 provenant de l'alimentation sont l'estomac, le pancréas et l'intestin grêle. Ainsi, l'absorption de vitamine B12 dans l'intestin grêle dépend du « facteur intrinsèque », une protéine qui est produite dans l'estomac. Les troubles de la fonction de l'estomac, du pancréas et l'intestin grêle peuvent

affecter de manière significative l'absorption de la vitamine B12 et conduire à des carences. L'absorption est également moins efficace avec l'âge (**Eveline, 2016**).

II.3.5. Personnes âgées

Les personnes âgées présentent plusieurs facteurs de risque de connaître une déficience en vitamine B12. Premièrement, leur régime alimentaire, souvent peu varié, et leur faible appétit contribuent à un apport insuffisant (**Oh CR et Brown, 2010**). De plus, ces personnes souffrent fréquemment de malabsorption de la B12, que l'on retrouve naturellement dans les aliments. La gastrite atrophique chronique, une maladie touchante 10 % à 30 % des personnes âgées, est la principale cause de malabsorption dans cette population (**Dali et Andrès, 2009 ; Anonyme 4, 2010 ; Anonyme 5, 1998**).

Cette proportion grimpe à près de 40 % chez les personnes de 80 ans et plus. Cette maladie se traduit par une diminution de la sécrétion d'acide chlorhydrique dans l'estomac et donc par une réduction de l'absorption de la B12 liée aux protéines (**Dali et Andrès, 2009 ; Anonyme 4, 2010**). Par ailleurs, un niveau d'acide chlorhydrique moindre contribue également à accroître la croissance des bactéries intestinales. Celles-ci utilisent de la B12, ce qui en diminue la quantité disponible et vient aggraver la carence (**Anonyme 4, 2010**). La gastrite chronique atrophique a de nombreuses étiologies et elle se manifeste notamment, comme nous le verrons plus loin, chez les patients souffrant d'anémie pernicieuse (**Delamare et Garnier, 2006**). Étant donné les problèmes de malabsorption qu'il est possible de retrouver chez les personnes âgées, il est recommandé que cette population obtienne un apport de B12 par la consommation d'aliments enrichis artificiellement ou encore par la prise de suppléments (**Oh CR et Brown, 2003 ; Anonyme 4, 2010**). Cependant, chez les patients souffrant de gastrite atrophique chronique, de fortes doses orales sont requises (**Anonyme 4, 2010**).

II.3.6. Digestion et métabolisme complexes et vulnérables

Dans les aliments, la vitamine B12 est liée à des protéines. La liaison protéique est dissoute dans l'estomac sous l'effet du suc gastrique et des enzymes protéolytiques (pepsine). Dans le duodénum, la vitamine B12 se lie au facteur intrinsèque (IF), une glycoprotéine sécrétée par l'estomac. Dans l'iléon, le complexe cobalamine-IF est résorbé activement, un processus qui consomme de l'énergie. La vitamine est ensuite libérée dans la muqueuse

intestinale, puis liée à la transcobalamine qui lui sert de vecteur dans le sang. L'excès de vitamine B12 apportée (p. ex. sous forme de suppléments) ne peut pas être résorbé via le facteur intrinsèque. La vitamine traverse alors la paroi intestinale par diffusion passive, dont l'efficacité est nettement moindre. Dans certaines pathologies de l'estomac, par exemple lors d'une inflammation chronique de la muqueuse gastrique (gastrite atrophique) ou après la résection de l'estomac, la résorption de la vitamine B12 est préjudiciable par le déficit de facteur intrinsèque. De plus, une gastrite atrophique fait baisser la production du suc gastrique, qui est nécessaire à la libération de la vitamine liée aux protéines. Les besoins journaliers en vitamine B12 augmentent alors de manière correspondante.

II.4. Fonctions dans le métabolisme et interactions avec d'autres vitamines du complexe B

Les cobalamines jouent dans le métabolisme le rôle de cofacteurs d'enzymes. Leur interaction avec l'acide folique, notamment, est d'importance éminente. Le métabolisme homocystéine-méthionine constitue ici un mécanisme central. La méthionine (après avoir été activée) sert d'important fournisseur de groupes méthyle pour la synthèse des neurotransmetteurs, de l'ADN et de l'ARN. Elle se transforme pour cela en homocystéine. Le processus de régénération de la méthionine dépend de la présence d'acide folique et de (méthyl-) cobalamine (en tant que coenzyme). À défaut d'apports suffisants de vitamine B12 (ou d'acide folique), l'homocystéine s'accumule dans les cellules et le déroulement des processus métaboliques dépendants de la méthionine est perturbé. Par ailleurs, l'absence de la réaction provoquant la transformation de l'homocystéine en méthionine conduit à un déficit d'importants métabolites de l'acide folique. C'est ainsi qu'un déficit en B12 conduit indirectement à un déficit en acide folique. C'est cet enchaînement qui est à l'origine des symptômes neurologiques et hématologiques d'une carence en vitamine B12. La vitamine B6 participe également à l'ensemble du métabolisme. Elle catalyse en tant que coenzyme la dégradation de l'homocystéine. Des taux élevés d'homocystéine sont mis en relation avec un risque accru de maladies cardiovasculaires (**Elisabeth et al., 2011**).

II.5. La synthèse des vitamines par les probiotiques

Parmi les bactéries intestinales, on considère généralement que les Bifidobactéries synthétisent plusieurs vitamines du groupe B, y compris le folate, la biotine, la thiamine, l'acide nicotinique, la pyridoxine, la riboflavine et la vitamine B12, mais ne produisent pas de vitamine K. Néanmoins, la capacité des Bifidobactéries à produire les vitamines et de les

libérer extracellulairement n'a jamais été exploré en profondeur, à la seule exception du folate (**Pompei et al., 2007 ; Cordisco et al., 2007 ; Strozzi et al., 2008**).

En raison d'applications potentiellement pertinentes, la capacité à produire du folate a été étudiée intensivement dans de nombreux isolats de *Lactobacillus* provenant de diverses origines. Les souches du tractus gastro-intestinal humain pourraient être utilisées comme probiotiques producteurs de folate, alors que les souches provenant d'aliments fermentés pourraient être utilisées comme initiateurs microbiens pour la fabrication de produits laitiers enrichis de folate ayant une valeur nutritive améliorée. Dans cette perspective, des efforts ont été déployés pour étudier les besoins en vitamines des *lactobacilles* et pour déterminer les effets de leur croissance sur les niveaux de folate dans divers milieux (**Rao et al., 1984 ; Weg et al., 2010**).

Dans la perspective de développer un probiotique à base de souches productrices de folates, il est important que la biosynthèse des vitamines ne soit pas affectée par les conditions environnementales du côlon, et notamment par le niveau de vitamine exogène, dont la concentration peut être assez importante selon l'apport alimentaire, l'absorption et l'excrétion de l'urine, de la peau et de la bile (**Birn, 2006**).

Certaines bactéries sont capables de synthétiser des vitamines comme riboflavine (Vitamine B2), Acide pantothénique (Vitamine B5), Pyridoxine (Vitamine B6), Biotine (Vitamine B8 ou H), vitamine B12 et vitamine K (**Christoph, 2017**). Donc la vitamine B12 est l'un des plus grands produits naturels non polymériques connus. (**Taga et al., 2010**).

II.5.1. La synthèse de vitamine B12

La vitamine B12 est synthétisée exclusivement par des bactéries présentes dans le sol et chez les animaux. Chez les végétaux, la présence de B12 n'est que fortuite et due à des contaminations par des bactéries du sol. Ces bactéries sont normalement présentes à la surface des végétaux, mais, occasionnellement, peuvent aussi se trouver à l'intérieur, comme dans le cas de certaines légumineuses où des bactéries du genre *Rhizobium*, qui vivent dans les nodules, produisent un peu de B12 et chez les animaux, la B12 est synthétisée par les bactéries de la flore intestinale ; elle est fortement présente chez les ruminants (mais aussi chez les autres animaux y compris les poissons). La B12 des produits animaux provient donc essentiellement de l'activité des bactéries endogènes, l'apport par les végétaux étant

extrêmement réduit (rappel : les plantes ne contiennent pas de B12, sauf en cas de contamination par les bactéries du sol). Chez les humains, de la B12 est fabriquée par les bactéries du côlon (partie médiane du gros intestin), mais la zone d'absorption possible se situe en amont, dans l'iléon (partie terminale de l'intestin grêle). Donc, sauf cas particuliers encore sujets à caution (présence de faibles quantités de bactéries productrices dans l'iléon ou même dans la bouche), les humains doivent trouver la totalité de leur B12 par des apports alimentaires ou des supplémentations (**Anonyme 13, 2014**).

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES.

Le but de cette étude était d'isoler des souches lactiques à caractère probiotique à partir de lait maternel et de selles de bébé. La partie expérimentale a été réalisée au sein du Laboratoire des micro-organismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS, site III, ex. INES) et au laboratoire de Microbiologie 2 (Micro-2 au site II, ex. ITA), faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.

III.1. Isolement des souches de bactéries lactiques

III.1.1. L'échantillonnage

III.1.1.1. Collection de l'échantillon

Les souches probiotiques proviennent à partir de deux échantillons :

1) Le premier échantillon est un échantillon lait provenant de deux mères (**Figure 5**) :

Lait 1 : Nous avons pris le premier échantillon d'une mère en bonne santé ne recevant pas d'antibiotiques après six mois d'accouchement. Le prélèvement a été réalisé le 26 février 2018.

Lait 2 : Le deuxième échantillon de lait provient d'une mère ayant accouché d'un bébé de vingt jours. Le prélèvement a été réalisé le 11 mars 2018.

2) Le deuxième échantillon est la matière fécale de bébé sain allaité exclusivement au sein et né par voie basse, ne recevant pas d'antibiotiques et d'un âge de 6 mois. Les selles ont été stérilement prélevées d'une couche jetable. Le prélèvement a été réalisé le 26 février 2018 (**Figure 6**).

Les selles sont mises dans des pots propres, le lait est collecté dans des tubes stériles et secs et acheminés dans des glacières directement au laboratoire pour être analysés le jour même.

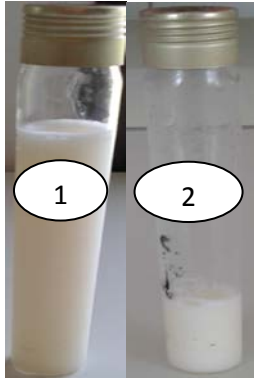


Figure 5 : Les échantillons de lait



Figure 6 : l'échantillon de selle de bébé

III.1.2. Les milieux de culture

- ✓ Milieu MRS (PH=6,5): Gélose de Man, Rogosa, Sharpe (1960) gélosé ou bouillon pour culture et isolement des bactéries lactiques, et incubé à 45°C
 - ✓ Milieu MRS gélosé acidifiée à pH =5.4 est utilisé pour l'isolement des lactobacilles, et incubé à 45°C
 - ✓ Gélose MES : Ce milieu, mis au point en 1962 par Mayeux, Sandine et Elliker est utilisé pour l'isolement des bactéries leuconstoques après incubation à 37°C pendant 3 jours.
 - ✓ Gélose Mueller –Hinton (MH) (1941) est utilisé pour le teste antimicrobienne
- Eau physiologie peptonique : Pour les dilutions

Remarque : Tous les milieux ont ajouté la cystéine HCL

Les échantillons précédents ont servi à chercher des microorganismes à activité probiotique. Pour ce faire, deux groupes de microorganismes ont été ciblés à savoir ; des bactéries lactiques

III.1.3. Préparation des dilutions

La réalisation des dilutions consiste, tout d'abord, à préparer la solution mère en mettant 1g de selle de bébé et 1 ml de lait maternels dans l'eau physiologie pepetonique (**voire l'annexe**), suivie d'une agitation pendant 3 min. Ensuite, la préparation est laissée se reposer. À partir de cette préparation des dilutions décimales ont été préparées par l'ajout successif de 0.1 mL de la solution précédente à 9 mL d'eau physiologie pepetonique stérile

jusqu'à l'obtention de la dilution de 10^{-7} (Jerome et al., 2004). La même méthode a été appliquée pour les échantillons des selles.

III.1.4. Ensemencement

Un volume de 0.1 mL de chacune des dilutions, préparées précédemment, a été déposé sur milieu gélosé de Man Rogosa Sharpe (MRS), (pH = 5.4 et 6.5) (voir l'annexe) pour les bactéries lactique. Ensuite, les dépôts ont été étalés uniformément avec un étaloir stérile par un mouvement de balayage et de rotation sur l'ensemble de la surface de la gélose. Enfin, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h à 48h en condition anaérobie, durée nécessaire pour l'apparition des colonies de souches bactériennes (Tortora et al., 2003) et à 45°C pendant 48 à 72h en conditions anaérobiose pour tous les boites dans une jarre enrichie en CO₂ (bicarbonate de sodium et FeCl₃).

Un ml de chaque dilution a été ensemencé sur gélose MRS à raison de 3 boites par dilution. Les boites de Pétri ont été incubées en anaérobiose à 37°C pendant 24 à 72h.

III.1.5. Purification des isolats

Après le développement des colonies, les isolats ont été purifiés par la méthode rétro repiquage en stries sur la surface d'une gélose en MRS neuve en boites de Pétri suivi d'incubation à 37°C dans les mêmes conditions précédemment citées. Les colonies parfaitement isolées, ont été réensemencées et conservées.

III.2. Evaluation de l'effet probiotique des isolats bactériens

Afin d'évaluer l'activité probiotique des isolats, des paramètres ont été testés à savoir ; la production des substances antimicrobiennes, la résistance aux sels biliaries et à l'acidité gastrique

III.2.1. Identification des souches bactérienne

III.2.1.1. Critères morphologiques

III.2.1.1.1. Observation macroscopique

L'étude de l'aspect macroscopique consiste en une observation à l'œil nue de la taille (petite, moyenne, grande), la forme de la colonie (ronde, irrégulière...), transparence, élévation de la colonie, type de colonie et le relief (**Guiraud, 1998**).

III.2.1.1.2. Observation microscopique

- **Observation à l'état frais**

La technique de la goutte pendante utilisée consiste à déposer une goutte de la culture bactérienne jeune sur une lamelle et à recouvrir la lamelle par une lame creuse, puis la lame est inversée de manière à obtenir une goutte pendante dans le creux. Ensuite, la lame est examinée au microscope optique à l'objectif (40X) puis à immersion (100X), cette technique permet d'observer les bactéries vivantes et leur morphologie (**Singleton, 2005**).

L'aspect microscopique des souches retenues est réalisée par la coloration de Gram à partir d'une culture âgée de 24h (**Gerhardt et al., 1981**).

- **Coloration de Gram**

Cet examen a été effectué selon la méthode classique suivante : les frottis utilisés sont étalés à l'aide d'une anse sur des lames en verre propre. Les lames sont ensuite séchées à l'air à proximité d'un bec Bunsen, puis fixées par la chaleur en les passant deux ou trois fois sur la flamme. Les frottis préparés sont colorés pendant 1 minute au cristal violet, qui est un colorant basique, ils sont ensuite, inondés rapidement par une solution de lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de Potassium) qui agit comme un mordant, c'est-à-dire, il augmente les interactions entre le colorant et la cellule pour que cette dernière soit contrasté. Sans rincer en inclinant les lames, les frottis sont ensuite décolorés par lavage avec un mélange d'éthanol (1 à 3 secondes). Juste après, la décoloration est arrêtée rapidement par lavage à l'eau du robinet. Dans la dernière étape, les frottis sont soumis à une contre coloration de 30 secondes à la fuchsine basique diluée. Après un bref rinçage, les frottis sont séchés par le papier buvard et examinés par microscope jusqu'à l'objectif à immersion (grossissement X100) (**Singleton, 2005**). La couleur violette due au cristal violet est l'aspect caractéristique des bactéries à coloration Gram positive, les bactéries Gram négative se colorent en rose par la fushine (**Tortora et al., 2003**).

III.2.1.2. Critères biochimiques et physiologiques

- **Test de catalase**

La catalase est une enzyme contenant du fer, qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène synthétisée par la plupart des bactéries aérobies, elle élimine le peroxyde d'hydrogène produit au cours du métabolisme aérobie. Le test de la catalase sert à détecter la présence de cette enzyme dans une souche bactérienne donnée. Il consiste essentiellement à exposer les cellules bactériennes au peroxyde d'hydrogène, la présence de catalase se manifeste par la formation de bulles (oxygène). Dans la version traditionnelle du test, un prélèvement bactérien a été transféré au moyen d'une boucle dans une goutte de peroxyde d'hydrogène et déposé sur une lame. (**Prescott et al., 2007**).

Pour réaliser ce test, une colonie bactérienne à tester, a été émulsionnée dans l'eau oxygénée sur lame. La catalase a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. Son action directe est mise en évidence dans la masse bactérienne. Une réaction positive se traduit par l'apparition de bulles (**Guiraud, 1998**).

- **Test d'oxydase**

Le test oxydase permet de mettre en évidence la présence de l'enzyme capable d'oxyder le substrat utilisé et ne signifie pas la présence d'une oxydase particulière (**Guiraud, 1998**). Le substrat utilisé est l'oxalate de diméthyl-paraphénylène-diamine sous forme d'un disque du papier filtre. Ce dernier est placé sur une lame puisensemencé, par une goutte de culture bactérienne jeune. La présence de l'oxydase se manifeste par une coloration violette après 30 secondes, lorsque la bactérie est oxydase positive (**Singleton, 2005**).

- **Resistance aux sels biliaires**

Etude de la survie des souches lactiques dans les conditions extrêmes du tube digestif. Le but de cette étude est de sélectionner des souches lactiques extrêmophiles qui peuvent résister aux barrières physiologiques du tube digestif (pH stomacal bas, péristaltisme intestinale et concurrence bactérienne au niveau du gros intestin). La méthode utilisée est celle de (**Ziar et al., 2012**).

La résistance des isolats bactériens aux sels biliaires a été déterminée dans des tubes à essai contenant le bouillon MRS et 0.3% de sels biliaires à pH 6.4, les tubes ont été inoculés

avec une culture jeune des isolats bactériens puis incubés à 37°C pendant 24h à 48h dans des boîtes contenant MRS. Le test est considéré positif s'il y a des colonies bactériennes.

- **Production des Exopolysaccharides (Mayeux et al., 1962)**

La production des exopolysaccharides (dextrane) à partir du saccharose est mise en évidence sur milieu MSE gélosé (**voir l'annexe**). Les souches productrices de dextrane sont caractérisées par la formation de colonies larges, visqueuses et gluantes.

- **Test de la production d'acétoïne (Clark et Lubs, 1915)**

Le milieu utilisé est le bouillon Clark et Lubs (**voire l'annexe**) préalablement inoculé avec des souches bactériennes et incubé à une température adéquate pendant 24h.

L'acétoïne est mis en évidence par la réaction de **Voges Proskauer (VP)**, en ajoutant 10 gouttes de réactif VP1 et le même volume de réactif VP2. Les tubes sont inclinés pour permettre une bonne oxygénation. La réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge à la surface du milieu, après quelques minutes à 1 heure.

- **Test de production de CO₂ à partir du glucose (Holzapfel and Gerber, 1983 ; Müller, 1990)**

Des colonies bien isolées ont étéensemencées sur milieu MRS bouillon modifié (sans le citrate et l'extrait de viande) renferme une cloche de Durham inversé. L'incubation se fait à une température de 37°C pendant 24 à 48h.

- **Tests de la croissance sur des milieux hostiles (Sherman, 1937 ; Larpent et al., 1997)**

1. **Test de croissance en présence de NaCl (2,5 ; 4 et 6,5%)**

Sur des bouillons hypersalés contenant du NaCl à concentration de 2,5 ; 4 et 6,5% (**voir l'annexe**), cultiver les souches isolées et les faire incubées à des températures adéquates pendant 24 à 72h. Le développement des cultures a été apprécié par comparaison avec un tube témoin nonensemencé, incubé dans les mêmes conditions.

2. **Test de croissance à un milieu hyperalcalin**

Le test a été réalisé sur un bouillon ajusté à un pH = 9,6. Après ensemencement du milieu avec une culture jeune et incubé à 30°C pour les souches mésophiles et à 45°C pour

les souches thermophiles pendant 24 à 72h. Après le temps d'incubation, l'observation d'un trouble signifie que la bactérie résiste au milieu hyperalcalin (pH = 9,6).

3. Test de croissance à différentes températures (Larpent, 1996)

Les souches bactériennes sontensemencées dans leurs milieux sélectifs et tester leurs croissances à deux températures 15°C, 37°C et 45°C. Le développement des souches était apprécié après une semaine d'incubation pour les cultures à 15°C et après 24 et 48h pour les cultures à 37°C et 45°C, par comparaison avec un tube de milieu nonensemencé incubé à la même température (examen de la turbidité).

- **Test de production de CO₂ à partir du citrate (Larpent et al., 1997)**

Dans 10,5 ml du lait écrémé stérile, additionner 0,5 ml d'une solution de citrate de Na à 10% et laisser reposer 30 min. Les tubes sont inoculés avec 0,1ml d'une suspension bactérienne de 24h. Ensuite, ajouter 4ml d'une gélose blanche (**voire l'annexe**) (1,5%) fondue et refroidie à 50°C et mélanger sans faire de bulles. Les tubes sont incubés à 20°C et 30°C pendant 3 à 5 jours. La production de gaz se traduit par la fragmentation de la gélose dans le tube.

- **Test de la thermorésistance**

Les souches bactériennes sont inoculées dans des tubes contenant le bouillon MRS et mises dans un bain-marie (Memmert, Germany) à 63,5°C pendant 30 minutes. Après le traitement thermique les tubes ont été transvasés dans le même milieu stérile et incubées à 30°C à 37°C pendant 24 à 48h. Le résultat positif se traduit par un trouble.

- **Test de croissance en présence de bleu de méthylène (annexe)**

L'aptitude des souches lactiques de forme cocci à pousser en présence de bleu de méthylène aux différentes concentrations 0,1% et 0,3% (p/v) dans le lait écrémé stérile est testée.

Ce test nous permet de différencier entre les lactocoques qui poussent en présence de 0,3% de bleu de méthylène, les entérocoques qui poussent en présence de 0,1% et non à 0,3% et les streptocoques thermophiles qui sont très sensible au colorant.

La réaction positive se traduit par la réduction de par la réduction de bleu de méthylène qui vire de bleu (forme oxydé) vers transparent (forme réduite).

- **Test de la mise en évidence d'arginine décarboxylase (ADH)**

Une culture de 24h estensemencée dans le milieu Moller à l'arginine (**voir l'annexe**) et sur un autre sans l'arginine (serviront de contrôle). Puis l'ajout d'une couche de l'huile de vaseline stérile (1ml) pour favoriser les conditions d'anaérobiose. La lecture s'effectue après 1 à 2 jours à 37°C.

L'arginine décarboxylase est mis en évidence par le changement de la couleur du milieu du violet vers le jaune au bout de quelques heures (8-10h) qui s'explique par l'acidification du milieu par les bactéries lactiques en utilisant le glucose comme source de carbone et d'énergie, puis un virage vers le violet (après 24h) qu'est due à la formation d'ammoniaque (réalcalinisation du milieu). Le tube témoin vire au jaune et garde la couleur.

- **La recherche des substances antimicrobiennes par méthode indirecte (méthode de diffusion en puits)**

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie, repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu semi solide (gélose molle), l'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit testé (**Broadasky et al., 1976**).

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

La technique de diffusion en puits, décrite par (**Hechard et al., 1990**) a été utilisée pour étudier la capacité des bactéries lactiques à inhiber un groupe représentatif de souches pathogènes intestinales sensibles aux antimicrobiens à savoir : (*Condida albicans* ATCC 10231) ; (*Escherichia coli* ATCC 25922) ; (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) ; (*Bacillus cereus* ATCC 10876) ; (*Bacillus subtilis* ATCC 6633).

Des cultures d'une nuit ont été préparées également sur bouillon MRS pour les bactéries lactiques et des cultures sur bouillon nutritif pour réactiver les souches pathogènes. Après réponse culturale typique de 24h d'incubation à 37°C pour la préparation de l'inoculum qui a été réalisé en transférant 10 ul de culture conservé à 10 ml de bouillon nutritif de chaque bactérie pathogène testé et incubée 37° C pendant 24h. Puis ajuster la densité optique de 0.08 0à 0.1 lue la longueur d'onde de 600 nm qui correspond à 10⁸ UFC / ml (**Kishor, 2005**).

Le principe de cette méthode consiste en une confrontation directe entre les souches lactiques ensemencées sur milieu MRS versus chaque souche pathogène ensemencée sur milieu Muller Hinton (**voir l'annexe**) semi-solide en double couche. Par diffusion de la substance inhibitrice on obtient une zone claire d'inhibition que l'on mesure pour évaluer le potentiel inhibiteur de la souche (**Fleming et al., 1975 ; Allende et al., 2007**). Les boites de pétri sont incubées à 37°C pendant 24h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (pré-diffusion) (**Doumandji et al., 2010**).

- **Analyse spectrophotométrique de la vitamine B12**

Des cultures de bactéries lactiques ont été préparées dans un milieu spécifique décrit par nous-mêmes et inspiré des milieux synthétiques commerciaux (Vitamin B₁₂ Lactobacillus assay broth de la firme Merck). Sa composition est donnée en annexe.

Les souches SS1, SS2, SL1, SL2 ont été choisies pour tester le pouvoir de production de vitamine B12 dans le milieu.

Les cultures bactériennes sont incubées à 25°C pendant 48h dans une ambiance anaérobique et en absence de lumière. Après incubation, 1 mg de KCN par 10 mL de culture (recouverte de papiers aluminium) est additionné afin de stabiliser et protéger la vitamine.

A froid, les surnageants bactériens sont récupérés après centrifugation à 5000 trs / 10 min et 1 mL de HCL 0.1 N et rajouter. Laisser 10 min et lire au spectrophotomètre à la longueur d'onde λ égale à 240 nm (en 3 fois). Le zéro de l'appareil est fixé par l'eau distillée prise comme blanc.

Les concentrations de vitamines B12 produites sont calculées à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée à la cobalamine (ampoule à injecter, 1000 µg/2ml) et est donnée en annexe.

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION.

IV.1. Résultats d'identification des isolats

IV.1.1. Pré-identification des souches

L'identification des souches isolées à partir de laits maternels et selle de bébé cultivés sur milieu MRS et MRS acidifié en surface, est basée sur des observations macroscopiques, microscopiques et sur des tests physicochimiques.

- **Caractères macroscopiques**

Les cultures obtenues sur les boîtes de Pétri sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille, l'aspect ainsi que la couleur des colonies (**Badis et al., 2006**).

L'étude de l'aspect macroscopique des souches probiotiques sur milieux MRS et MRS acidifié a révélé des colonies petites, moyennes et parfois grosses, rondes, blanchâtres avec un aspect lisse (**tableau 07**).

Tableau 07 : Résumé de l'observation macroscopique des souches isolées de lait maternels et de selle de bébé.

Source	Code	Forme	Aspect	Couleur	Milieu
Selle de bébé	SS1 → SS5	petite	lisse	blanchâtre	MRS
	SS6	moyenne	lisse	blanchâtre	MRS
	SS7	petite	lisse	blanchâtre	MRS
	SS8 et SS9	moyenne	lisse	blanchâtre	MRS
	SS10 et SS11	petite	lisse	blanchâtre	MRS
Lait maternels	SL1, SL2 et SL3	petite	lisse	blanchâtre	MRS
	SL4, SL7, SL8	grosse	lisse	blanchâtre	MRS
	SL9	moyenne	lisse	blanchâtre	MRS
	L2', L3', L4'	petite	lisse	blanchâtre	MRS acidifié
	L5'	moyenne	lisse	blanchâtre	MRS acidifié

Les isolats bactériens sont désignés selon un code composé de lettre et de numéro ; « SS » provenant de selle de bébé et « SL, L' » provenant respectivement des deux laits récoltés des mamans donatrices comme indiqué dans le **tableau 07**.

- **Caractères microscopiques**

L'aspect microscopique a révélé que les cellules sont Gram positives apparaissant sous différentes formes avec différents modes d'association. Des coques qui sont SL1, L2', L3', L4', L5' ou des bacilles SS1, SS2, SS3, SS4, SS5, SS6, SS7, SS8, SS9, SS10, SS11, SL2, SL3, SL4, SL7, SL8, SL9 : associées en paires ou en chaînes courtes et incurvées.

Bifidobacterium est un bacille à gram positif, immobile, avec une morphologie ramifiée. Elles peuvent être isolées, associées en longues chaînes ou en amas. Elles peuvent être courtes, régulières, fines avec des extrémités effilées, ovoïdes ou longues et légèrement courbées. Elles peuvent aussi former des protubérances et toutes sortes de ramifications. Les extrémités peuvent être légèrement fourchues ou spatulées.

Toutes les souches sont catalase et oxydase négatives. Nous avons retenu 22 isolats possédant les caractères décrits par la littérature comme étant des bactéries lactiques.

L'intestin du fœtus dans l'utérus est stérile. Dans les heures qui suivent la naissance, l'intestin est colonisé par des bactéries. Cette flore va dépendre de l'alimentation du bébé, mais aussi de la flore de la mère. La composition des selles des bébés va différencier selon qu'il est allaité ou non. Les selles des bébés nourris au lait maternel sont riches en bifidobactéries. De plus, lors de l'accouchement par voie vaginale la mère transmet sa flore à son nourrisson. C'est pourquoi il est important que la mère possède une flore intestinale saine et équilibrée. La prise de probiotiques durant la grossesse et plus spécialement avant l'accouchement va avoir une incidence bénéfique sur la flore intestinale de la mère ainsi que sur le développement de la flore intestinale de l'enfant.

Les nouveau-nés allaités au sein reçoivent des bactéries bénéfiques pour leur santé grâce au lait de leur mère. Mais la provenance de ces bactéries est surprenante, révèle une étude suisse. Les chercheurs ont mené des analyses génétiques auprès de 7 mamans et leur bébé. Ils ont été surpris de constater que les bonnes bactéries (probiotiques) se retrouvant dans le lait maternel

puis dans les selles des nourrissons étaient identiques à celles provenant des intestins des mamans.

Selon leur hypothèse, par un mécanisme encore inconnu, les probiotiques de la flore intestinale maternelle parviendraient donc à se frayer un chemin jusqu'aux glandes mammaires. Et de là, elles s'installeraient dans le système digestif du nourrisson.

La présence de ces micro-organismes dans l'intestin des bébés n'étonne cependant pas les chercheurs. Les intestins des enfants logent naturellement plusieurs centaines d'espèces de bonnes bactéries qui favorisent le bon fonctionnement de leurs systèmes digestif et immunitaire (**Jost et al., 2014**).

Dans une étude menée par l'équipe américaine de **Kozak et al. (2015)**, les bactéries suivantes peuvent, à la fois, exister dans les laits des mamans et dans les selles de leurs bébés : *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri* et *Enterococcus faecalis*. Ces bactéries ont été parmi 126 isolats appartenant aux genres *Bifidobacterium* sp, *Lactobacillus* sp, *Corynebacterium* sp, *Propionibacterium* sp, *Rothia* sp, *Enterococcus* sp, *Staphylococcus* sp et *Streptococcus* sp, prélevés des mamans ou de leurs bébés.



Figure 07 : Observation macroscopique de souche L5' cultivée sur milieu MRS acidifié.

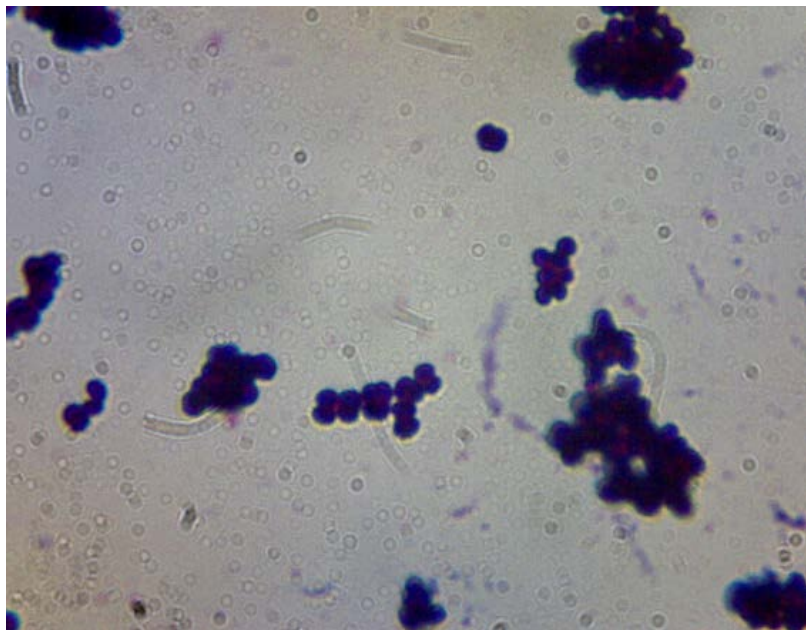


Figure 08 : Observation microscopique de souche L5' après coloration de Gram X1000.



Figure 09 : Observation macroscopique de la souche SL1 cultivée sur milieu MRS.



Figure 10 : Observation microscopique de souche SL1 après coloration de Gram X1000.



Figure 11: Observation macroscopique de la souche SS1 cultivée sur milieu MRS

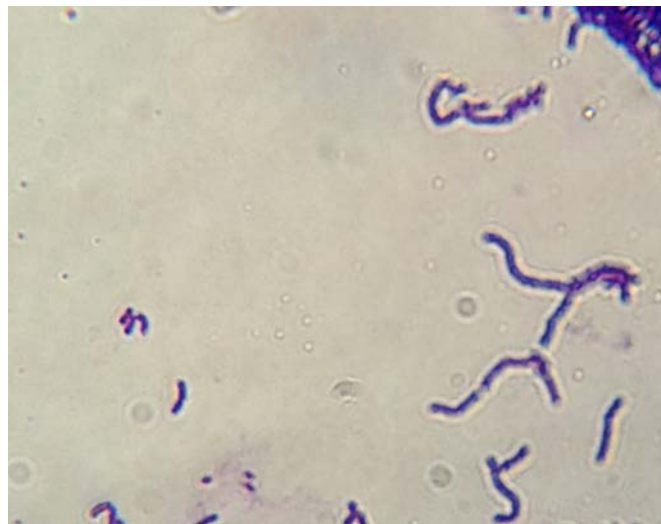


Figure 12 : Observation microscopique de la souche SS1 après coloration de Gram X1000.

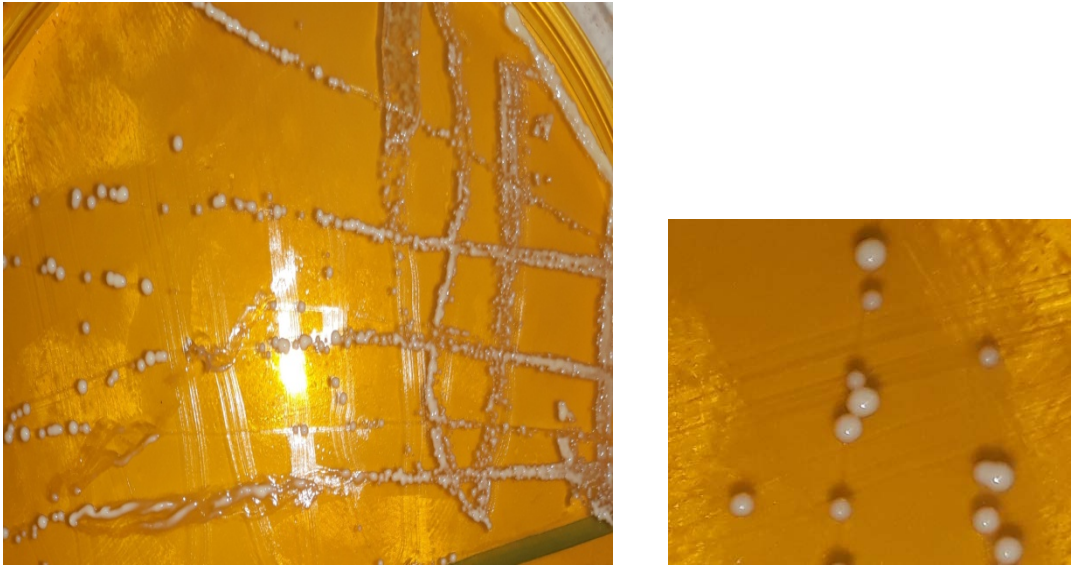


Figure 13: Observation macroscopique de la souche SS7 cultivée sur milieu MRS.



Figure 14 : Observation microscopique de la souche SS7 après coloration de Gram X1000.

IV.1.2. Résultats relatifs aux tests physiologiques et biochimiques

IV.1.2.1. Présence de l'enzyme de catalase

Pour l'identification des bactéries lactiques il est nécessaire d'appliquer le test de recherche d'enzyme catalase, généralement les bactéries lactiques sont dépourvues de cette enzyme, mais certaines souches peuvent donner des résultats aléatoires puisque certaines d'entre elles possèdent des pseudocatalases qui rendent la réaction positive (**Desmazeaud et De Roissart, 1994**).

Cette activité catalytique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau, par la mise en contact des colonies avec quelques gouttes d'eau oxygénée. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (**Guiraud, 2003**).

Après avoir effectué les examens de la recherche de la catalase, de l'oxydase et de la coloration de Gram, toutes les bactéries Gram positives, catalase et oxydase négatives sont présumées comme bactéries lactiques (**Kihal, 1996 ; Carr et al., 2002**).

Les isolats Gram positif, catalase et oxydase négatives sont retenus pour la suite de l'étude.

IV.1.2.2. Croissance sous conditions hostiles (Croissance à différentes température, pH, NaCl)

Le test de croissance à différentes températures (15, 37 et 45°C) est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Ce test est réalisé en bouillon MRS. La croissance est appréciée par un trouble du milieu après 24 heures d'incubation à 15, 37 et 45°C en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (**Hassaine, 2013**).

Le test de croissance à différentes températures a montré que les souches SS1 à SS11 et de SL1 à SL9 peuvent pousser entre 15° et 37°C : ce sont des bactéries mésophiles. Les souches provenant des laits maternels L2' ; L3' ; L4' et L5' ont pu pousser entre 15 et 45°C ce qui traduit leur caractère thermophile (**tableau 08**).

Nous avons remarqué que toutes les souches testées étaient capables de croître sur milieu MRS à pH = 5.4 ou 9.6 (**figure 15**) et (**tableau 08**).

Pour des concentrations croissantes en NaCl, tous les isolas poussent à 2.5, 4 et 6.5% de NaCl, exceptée la souche L3' (**figure 16, 17 et 18**) et (**tableau 8**).

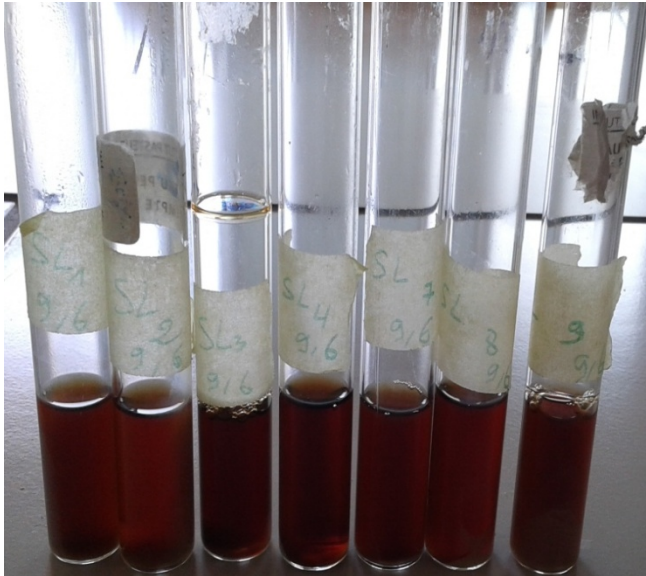


Figure 15 : Résultats du test de croissance à pH 9.6.

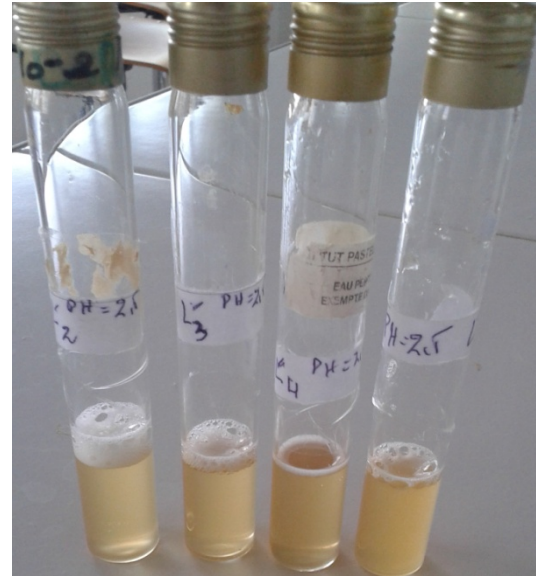


Figure 16 : Résultats du test de croissance à NaCl 2.5%.



Figure 17 : Résultats du test de croissance à NaCl 4%

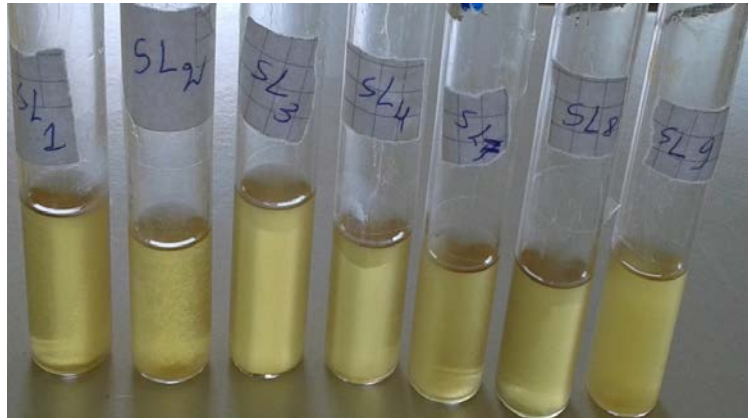


Figure 18 : Résultats du test de croissance à NaCl 6.5%

Tableau 08 : Résumé des tests physiologiques.

Souches provenant de selles de bébé	Croissance à différentes températures			Croissance à différentes concentrations de NaCl			Croissance à pH	
	15°C	37°C	45°C	2.5%	4 %	6.5%	5.4	9.6
SS1	+	+	-	+	+	+	+	+
SS2	+	+	-	+	+	+	+	+
SS3	+	+	-	+	+	+	+	+
SS4	+	+	-	+	+	+	+	+
SS5	+	+	-	+	+	+	+	+
SS6	+	+	-	+	+	+	+	+
SS7	+	+	-	+	+	+	+	+
SS8	+	+	-	+	+	+	+	+
SS9	+	+	-	+	+	+	+	+
SS10	+	+	-	+	+	+	+	+
SS11	+	+	-	+	+	+	+	+
Souches provenant de lait maternel	Croissance à différentes températures			Croissance à différentes concentrations de NaCl			Croissance à pH	
	15°C	37°C	45°C	2.5%	4 %	6.5%	5.4	9.6
SL1	+	+	-	+	+	+	+	+
SL2	+	+	-	+	+	+	+	+
SL3	+	+	-	+	+	+	+	+
SL4	+	+	-	+	+	+	+	+
SL7	+	+	-	+	+	+	+	+
SL8	+	+	-	+	+	+	+	+
SL9	+	+	-	+	+	+	+	+
L2'	+	-	+	+	+	+	+	+
L3'	+	-	+	+	-	-	+	+
L4'	+	-	+	+	+	+	+	+
L5'	+	-	+	+	+	+	+	+

+ : test positif ;

- : test négatif ;

IV.1.2.3. Production de dextrans

La production de dextrane a été mise en évidence sur milieu MSE qui est un milieu hypersaccharosé (Mayeux et al., 1962 ; Badis et al., 2005). Il est utilisé pour détecter la production des exopolysaccharides (la formation de colonies gluantes).

La production d'exopolysaccharides sur milieu saccharosé MSE est un critère important pour différencier entre les espèces de bactéries lactiques (Kheddid et al., 2006)

La formation de colonies larges, visqueuses et gluantes a été remarquée avec toutes les souches ; exceptée la souche L3' (figure 19 et 20), ce qui traduit probablement une production d'exopolysaccharides « EPS ».

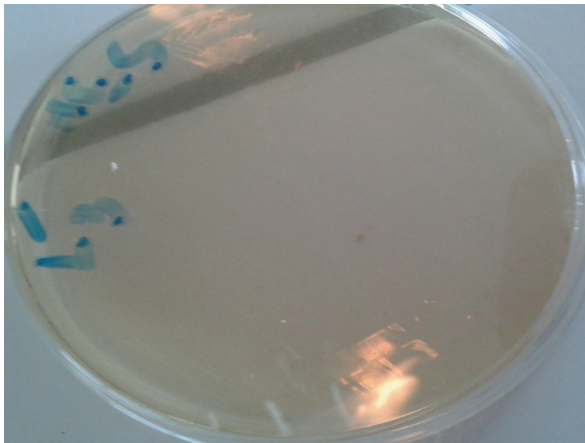


Figure 19 : Résultats négatif du test de résistance aux sels biliaires



Figure 20 : Résultats positif du test de résistance aux sels biliaires.

Les EPS produits par les bactéries lactiques peuvent améliorer aussi les propriétés rhéologiques des produits laitiers fermentés, en particulier, ceux obtenus par coagulation acide du lait (Duboc et Mollet, 2001).

L'augmentation des quantités d'EPS produites pourrait avoir des effets positifs sur la santé. Mis à part leur caractère prébiotique, les EPS ont été désignés comme étant candidats

potentiellement hypocholestérolémiants, immunomodulateurs, anti-tumoraux ou antiulcéreux (Badel et al., 2011).

Les EPS pourraient aussi, grâce à leur caractère enrobant, protéger les cellules probiotiques durant leur transit gastro-intestinal. Une possible relation entre la production d'EPS chez les bactéries et leur résistance à la bile ou leur tolérance à l'acidité, a été récemment établie (Alp et Aslim, 2010 ; Ziar et al., 2012).

IV.1.2.4. Type fermentaire

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé, il consiste à mettre en évidence la formation de CO₂ qui est piégé dans une cloche de Durham en milieu MRS bouillon modifié (sans le citrate et l'extrait de viande).

Ce test permet de différencier les isolats homolactiques des hétérolactiques après une incubation à 30°C pendant 24 à 72 heures.

Dans la présente étude nous avons constaté que toutes les souches isolées sont homofermentaires en fermentant le sucre en lactate. Ce type fermentaire est confirmé par l'absence du gaz CO₂ dans la cloche du durham (**figure 21**).

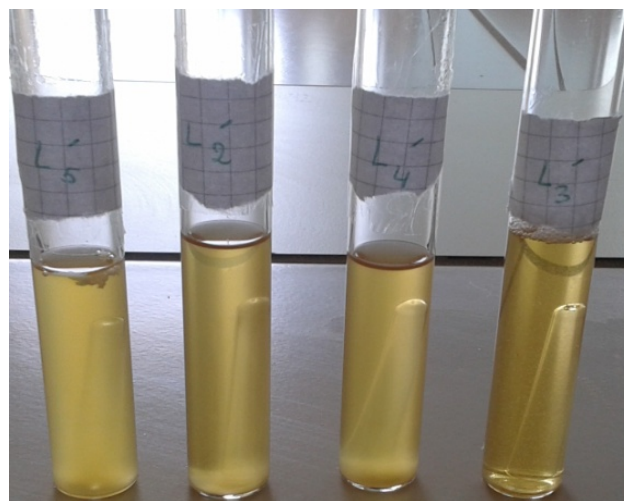


Figure 21 : Type fermentaire sur milieu MRS liquide glucosé contenant la cloche de Durham.

La voie homofermentaire conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée et les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétérofermentaires. Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les lactobacilles et les bifidobactéries (Thompson et al., 1994).

Le genre *Bifidobacterium* est anaérobie stricte, nitrate réductase et sa croissance nécessite une assez forte teneur en CO₂. Les bactéries appartenant à ce genre sont le siège d'une fermentation hétérolactique, c'est-à-dire la fabrication d'acide lactique associé à de l'acétate mais sans dégagement gazeux. *Bifidobacterium breve*, colonise le gros intestin des nourrissons mais la bactérie la plus représentative est *Bifidobacterium bifidum*, elle prédomine dans l'intestin du nouveau-né où elle facilite la digestion de la N-acétylglucosamine, présente dans le lait maternel. En effet, sa croissance serait stimulée par le lait maternel.

Les lactobacilles sont soit homofermentaires, produisant à partir du glucose plus de 85 % d'acide lactique, soit hétérofermentaires et produisant du CO₂, de l'acide lactique, de l'éthanol (et/ou de l'acide acétique) en quantités équimolaires

IV.1.2.5. Thermorésistance

Tous les isolats étaient thermorésistants (après traitement à 63.5C° pendant 30 min) ; exceptée la souche L4' qui était incapable de résister à cette haute température (**figure 22**).

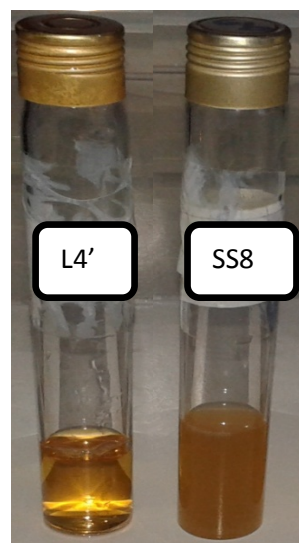


Figure 22 : Résultats du test de thermorésistance des souches L4' et SS8

IV.1.2.6. La production d'acétoïne

La production d'acétoïne est testée sur milieu Clark et Lubs. La pluparts de nos isolats produisent l'acétoïne. Les souches SS5, SL9, L3' et L4' donnent des résultats non décisifs qualifiés d'intermédiaire. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 9** et la **figure 23**.

Tableau 9 : Résultats du test de production d'acétoïne par les différents isolats.

La réaction		La souche
Positive	Selle de bébé	SS3, SS4, SS6, SS7, SS9, SS10, SS11,
	Lait maternel	SL1, SL2, SL3, L2',
Négative	Selle de bébé	SS1, SS2, SS8,
	Lait maternel	SL4, SL7, SL8, L5'
Résultat intermédiaire	Selle de bébé	SS5, SL9
+/-	Lait maternel	L3', L4'.

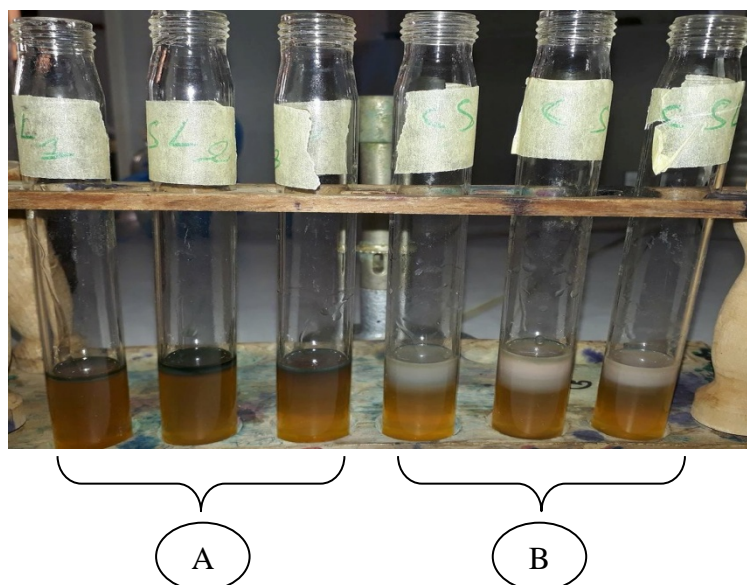


Figure 23 : Exemples des résultats obtenus dans le test de production de l'acétoïne (A : résultat positif ; B : résultat négatif).

Certaines bactéries lactiques peuvent, en plus de la production d'acide lactique participer à la formation de l'ouverture et produire des agents aromatisants tels que du diacétyl et de l'acétoïne. Ils sont donc des composants importants des cultures responsables de l'arôme dans la production de fromages à pâte mi-dure et de beurre.

IV.1.2.7. Résistance aux sels biliars

Toutes les souchesensemencées sur milieu MRS contenant de la bile développent une bonne croissance caractérisée par un trouble confirmant leur résistance aux effets délétères des sels biliars. La souche SS7 a affiché l'exception en affichant sa sensibilité à la bile (**figure 24**).

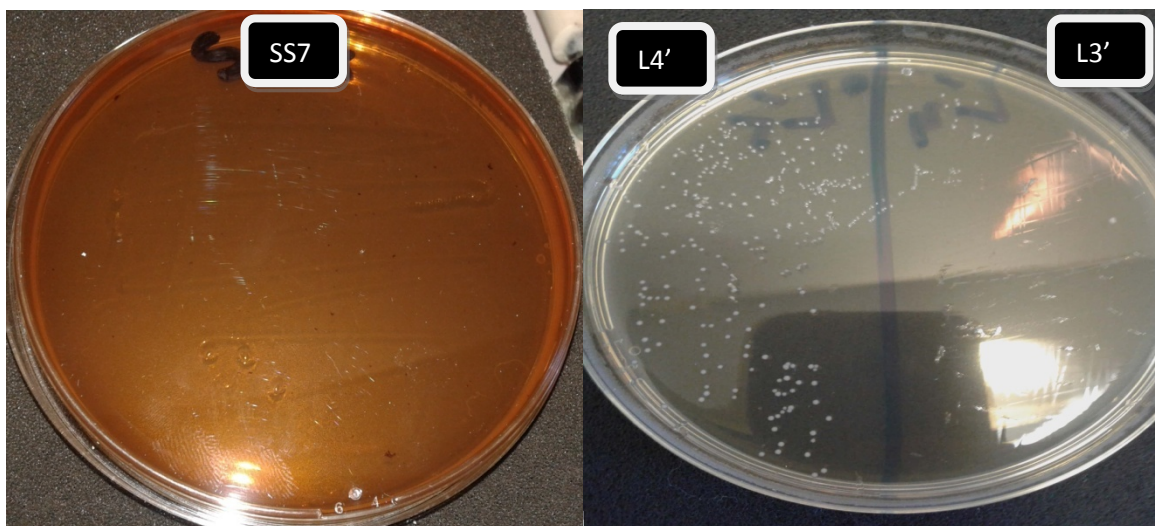


Figure 24 : Résultats du test de résistance aux sels biliars (SS7 : résultat négatif) et (L4', L3' : résultats positifs)

Etant donné que l'acidité gastrique et les sécrétions bilio-pancréatiques constituent les principaux mécanismes endogènes d'inactivation des bactéries probiotiques ingérées, l'exposition à des mélanges simulant ces conditions a été adoptée comme l'un des principaux tests *in vitro* en vue de la sélection des souches ayant un intérêt probiotique potentiel.

IV.1.2.8. Test de bleu de méthylène

Nos résultats ont montré que toutes les souches étaient incapables de réduire le colorant bleu de méthylène rajouté à 0.1 et 0.3% dans le lait (**figure 25**), confirmant leur caractère fermentaire anaérobique.

Ce test permet de mettre en évidence l'activité réductase du potentiel d'oxydoréduction durant la respiration chez certaines souches lactiques en vue de les considérées comme des levains lactiques (streptocoques).

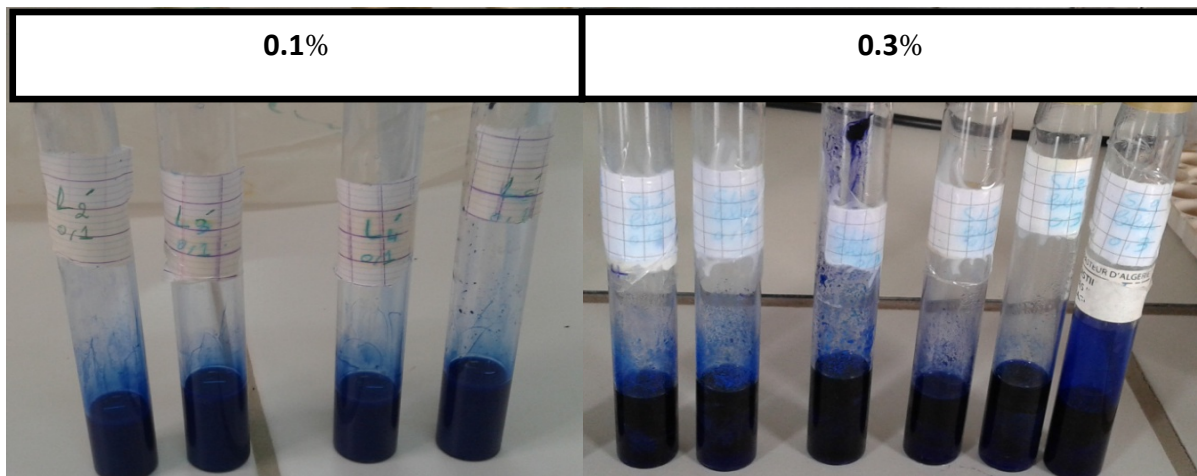


Figure 25 : Résultat du test de réduction de bleu de méthylène à 0.1 et 0.3%.

IV.1.2.9. Recherche de l'Arginine dihydrolase (ADH)

Sur milieu Möeller à l'arginine on observe que les isolats sont capables d'utiliser l'arginine et ré-alcalinisent le milieu, leurs colonies apparaissent blanchâtres. La couleur de l'indicateur de pH demeure inchangée (mauve) après 2 jours à 37°C (**figure 26**).

Toutes les souches dégradent le lactose en produisant de l'acide lactique, *Lactobacillus brevis* et *L. fermentum* sont capables d'utiliser l'arginine et réalcaliniser le milieu (cette enzyme libère l'ammoniac et la citruline à partir de l'arginine) et par conséquent, ils ont changé la couleur du milieu du jaune au violet qui est la couleur initiale et ils sont donc ADH positifs.

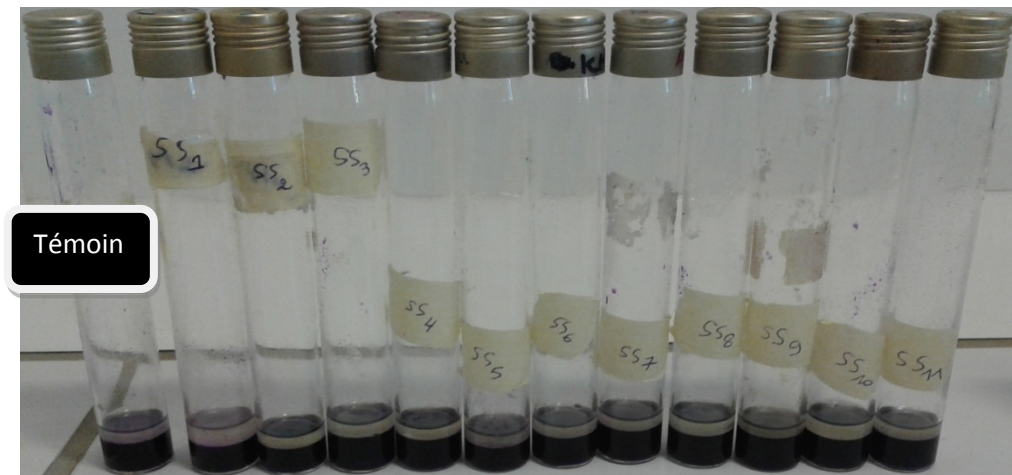


Figure 26 : Résultats du test de recherche de l'Arginine dihydrolase (ADH)

Par contre les autres lactobacilles sont incapables d'hydrolyser l'arginine contenu dans le milieu Möeller à l'arginine, le milieu est resté jaune donc ces derniers sont ADH négatifs.

IV.1.2.10. La production de CO₂ à partir de citrate

Toutes les bactéries non ont pas la capacité de production de gaz à partir de citrate, ceci est montré par l'absence de la fragmentation de la gélose dans le milieu lait citraté (Figure 27).

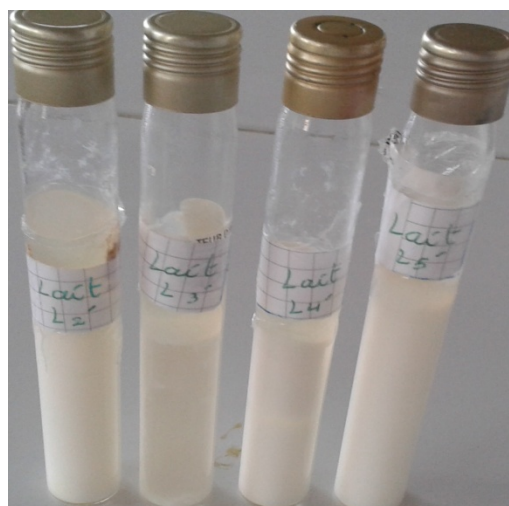


Figure 27 : Résultat de production de CO₂ à partir du citrate.

IV.1.2.11. Etude de l'activité antimicrobienne des souches isolées

Le pouvoir antimicrobien des isolats obtenus dans cette étude a été aussi étudié par la méthode des puits ; en les mettant en culture en présence des pathogènes suivants *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus cereus* (ATCC 10876) et *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Les zones d'inhibition produites sur milieu MRS sont illustrées dans le **tableau 10**.

Les résultats représentés dans le **tableau 10**, montrent que cinq souches parmi les onze isolées des selles de bébé et les souches isolées du lait maternel suivantes : de SL1 à SL4 et les souches L2' et L5', avaient les activités antibactériennes les plus intéressantes.

La souche SS8 exerce la plus forte activité contre *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (1.1 cm), suivie de SS3 (0.5 cm), SL1 (0.5 cm) et SL4 (0.4 cm), tandis que la souche SS11 n'a pu exercer aucune activité antimicrobienne vis-à-vis de cette souche pathogène.

Contre *Escherichia coli* ATCC 25922, c'est la souche SL1 (0.6 cm) qui a montré l'activité antimicrobienne la plus forte, suivie de SL4 et L2' (0.5 cm) ; tandis que les souches provenant des intestins de bébé révélèrent moins d'activité ; 0.4 cm ont été enregistré avec SS5.

Tableau 10 : Activité antimicrobienne des souches isolées vis-à-vis de certains pathogènes répertoriés.

Les souches isolées de selles de bébé	<i>B.</i> <i>subtilis</i>	<i>E.</i> <i>coli</i>	<i>Candida</i> <i>albicans</i>	<i>B.</i> <i>cereus</i>	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>
SS1	/	/	/	0.3cm	0.4cm
SS2	0.4cm	/	/	/	0.4cm
SS3	0.5cm	/	/	/	0.5cm
SS4	0.4cm	0.3cm	0.5cm	/	0.3cm
SS5	0.3cm	0.4cm	/	0.4cm	/
SS6	/	0.3cm	/	0.7cm	/
SS7	0.4cm	/	0.4cm	/	/
SS8	1.1cm	/	0.4cm	/	/
SS9	/	0.3cm	/	/	/

SS10	/	/	/	0.3cm	/
SS11	/	0.3cm	0.4cm	/	/
Les souches isolées de lait maternel	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. Aeruginosa</i>
SL1	0.5cm	0.6cm	/	/	/
SL2	/	0.3cm	/	/	0.9cm
SL3	/	0.3cm	/	0.3cm	0.9cm
SL4	0.4cm	0.5cm	0.3cm	/	1cm
SL7	0.3cm	0.3cm	0.3cm	/	0.4cm
SL8	0.3cm	0.3cm	/	0.3cm	0.4cm
SL9	/	0.4cm	0.3cm	/	/
L2'	/	0.5cm	0.4cm	/	/
L3'	/	0.4cm	0.3cm	/	0.3cm
L4'	0.3cm	0.3cm	/	/	0.5cm
L5'	/	0.3cm	0.4cm	0.4cm	/

Nous avons constaté que parmi les souches lactiques, L2' et L5' (0.4 cm) présentent l'activité antimicrobienne la plus élevée sur *Candida albicans* ATCC 10231. Bien que modeste, la souche fécale SS4 affiche 0.5 cm d'activité vis-à-vis de cette levure (**tableau 10**).

Les résultats de l'activité inhibitrice des souches lactiques vis-à-vis de *Bacillus cereus* ATCC 10876 (**tableau 10**) montrent que la souche SS6 (0.7 cm) exerce l'action antibactérienne la plus élevée, alors que la souche lactique L5' a montré une activité égale presque à la moitié (0.4 cm).

L'activité antimicrobienne la plus forte (1 cm) a été observée avec la souche SL4 contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, suivie de SL3 et SL2 (0.9 cm). A l'encontre de ce pathogène, les souches fécales SS7 et SS11 ne y sont pas actives et c'est seulement la souche SS3 qui s'est révélée la plus intéressante (0.5 cm) (**tableau 10**).

En effet, la capacité des bactéries bénéfiques à inhiber la croissance et la prolifération des micro-organismes pathogènes a été décrite comme l'une des caractéristiques des souches

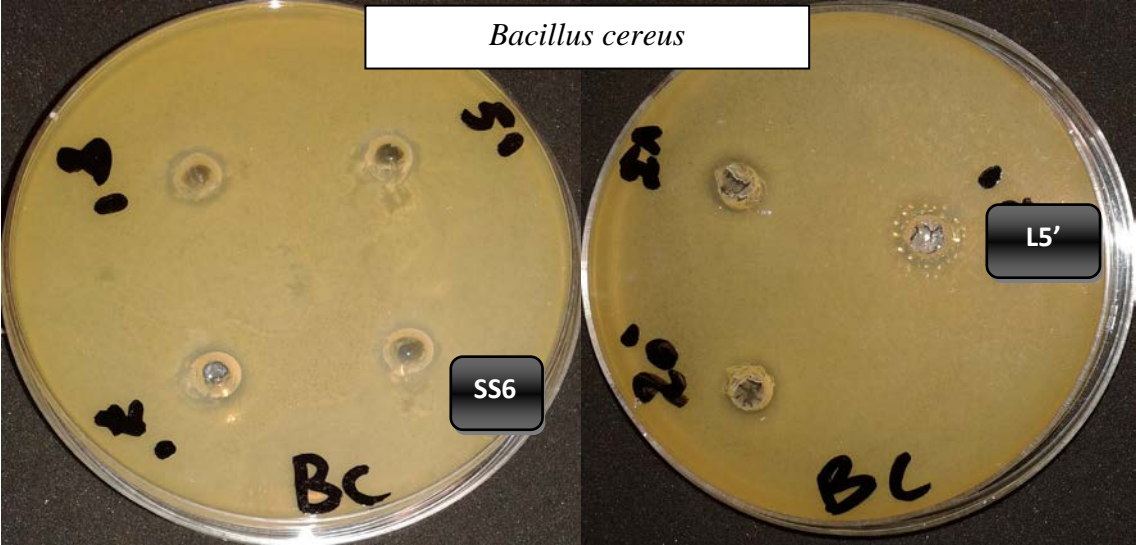
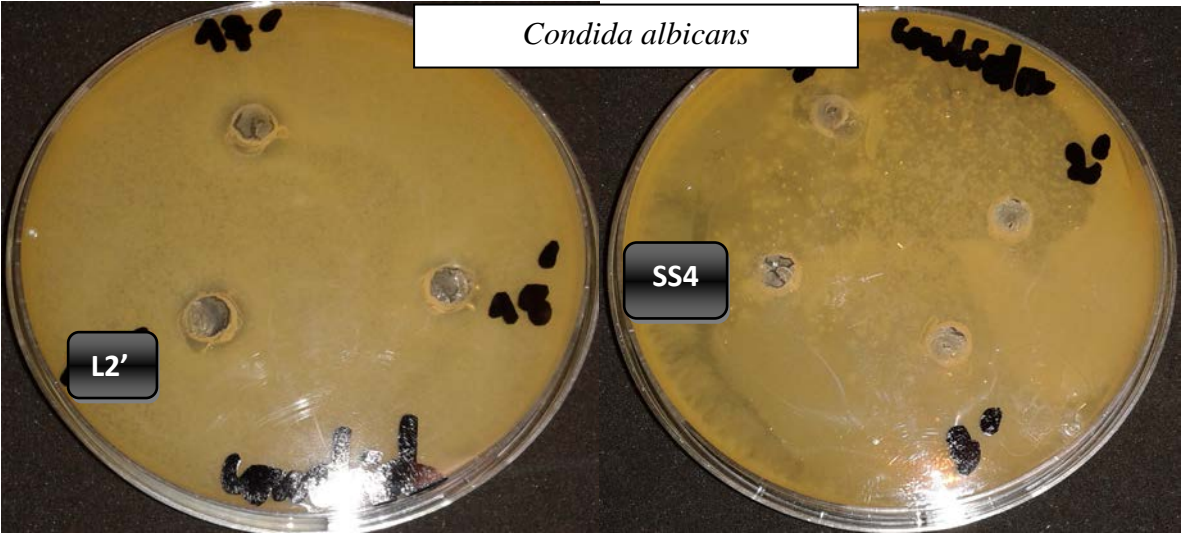
probiotiques. Cette activité antimicrobienne peut être multifactorielle et comprend la production de facteurs antimicrobiens tels que les bactériocines, les défensines, les acides gras à courtes chaînes, l'oxyde nitrique et le peroxyde d'hydrogène (**Penner et al., 2005**).

(**Gibson et Wang, 1994 ; cités par Gagnon et al., 2003**) ont rapporté que l'activité antagoniste de plusieurs espèces de bifidobactéries (principalement *B. infantis* et *B. longum*) envers les agents pathogènes à Gram positif et négatif était liée à la capacité de la souche testée à excréter des substances antimicrobiennes qu'à la production d'acide.

La majorité des médecins préconise l'allaitement du nourrisson pour de nombreuses raisons : le lait maternel contient les nutriments en quantités adaptées au système digestif fragile du nouveau-né, les anticorps contenus dans le lait confèrent une défense immunitaire dont le nourrisson est dépourvu et la mère et son nouveau-né partagent un moment privilégié.

Il ya un grand intérêt dans l'impact des bactéries lactiques sur la santé. Maintenant une nouvelle étude de la Faculté de santé et société, Université de Malmö, en Suède, montre que l'apparition de *Lactobacillus reuteri* dans le corps favorise la santé. Cette bactérie sprobiotique e retrouve naturellement dans le lait maternel chez certaines femmes (**Romeo et al., 2011**).

En plus de tout cela, une équipe canadienne a montré que cette bactérie présente dans le lait maternel, *Lactobacillus reuteri*, aurait un effet apaisant sur les muscles du système digestif. La présence de cette bactérie dans l'intestin aurait pour conséquence de réduire les symptômes de divers troubles comme les inflammations du tube digestif ou la constipation. Les nourrissons, souvent sujets à des troubles de cet ordre, bénéficient alors naturellement de l'aide du microorganisme.



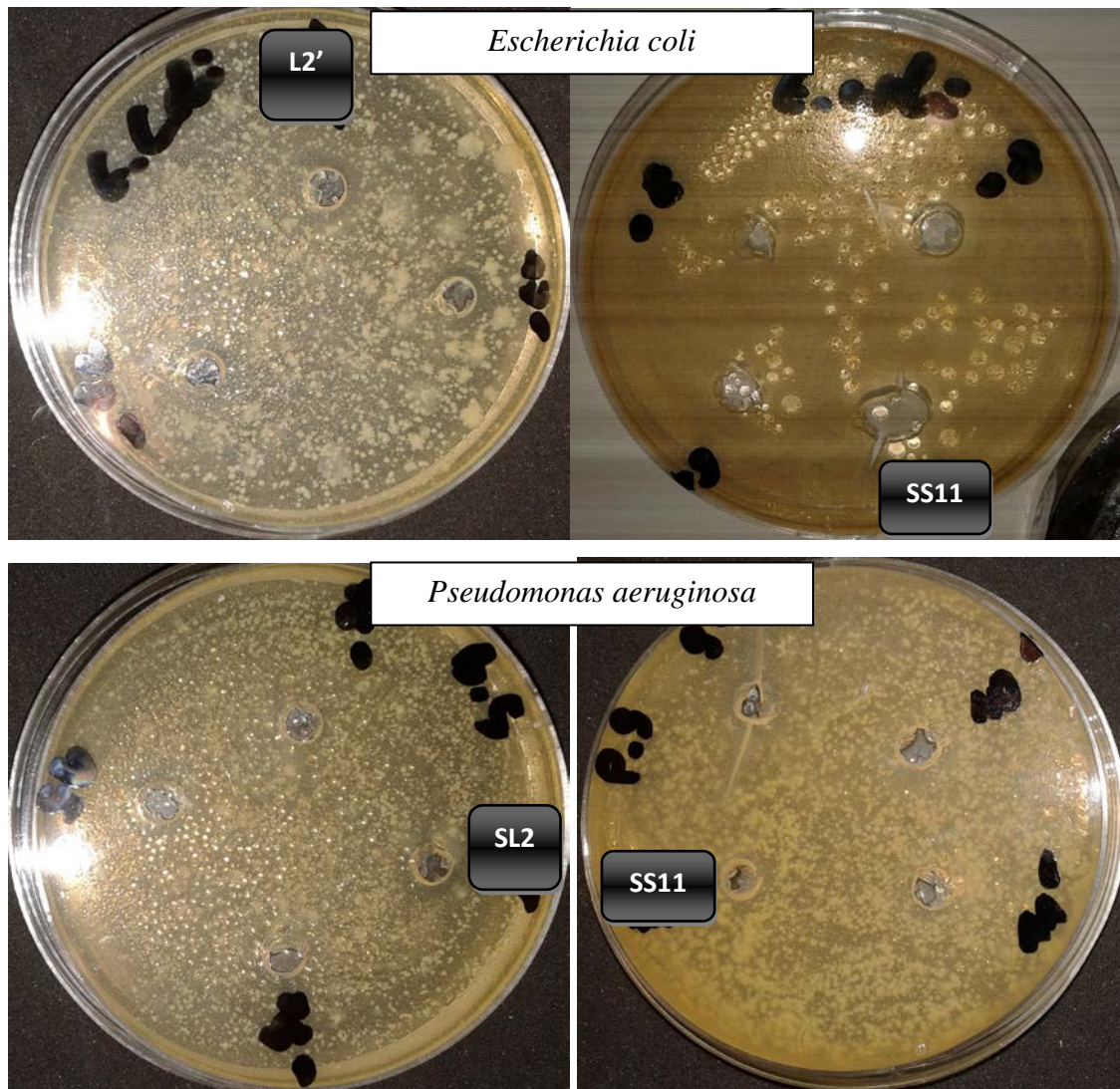


Figure 28 : Résultats des études de l'activité antimicrobienne

IV.1.2.12. Analyse spectrophotométrique de la vitamine B12

Lorsque l'on consomme la vitamine B12 sous forme de complément alimentaire, le dosage peut aller jusqu'à 5000 μg , ce qui est bien éloigné de la dose recommandée de 2,4 μg journalière. En parallèle, la vitamine B12 contenue dans un comprimé n'est pas totalement absorbée par l'organisme (Watanabe et al., 2014).

Les micro-organismes qui sont capables de réaliser la synthèse de la vitamine B12 sont peu nombreux et peu productifs dans les milieux naturels, lesquels sont peu favorables (concurrence d'autres micro-organismes pour les nutriments, présence de cobalt insuffisante, température inadéquate, etc.).

Pour concentrer la vitamine B12 en quantités suffisantes, les systèmes digestifs de certains animaux favorisent une symbiose bactérienne adéquate (grâce à des organes de fermentation), mais pas chez l'espèce humaine. Ce déficit humain est heureusement compensé par l'activité bactérienne de certaine communauté symbiotique « les probiotiques ».

Dans l'intestin des récepteurs Cubam (spécifiques à la vitamine B12) sont situés à l'extrémité de l'iléon. C'est là que le facteur intrinsèque va aider la vitamine B12 à franchir la membrane intestinale et va pouvoir circuler dans le sang pour accomplir ses différentes missions (**Lawrence et al., 1977**).

Les études sur la capacité des probiotiques à produire la vitamine B12 suggèrent la possibilité d'absorption à partir des intestins vers le sang, sans avoir besoin d'une première assimilation gastrique (bénéfique pour les personnes souffrant de l'anémie pernicieuse ou encore maladie de Biermer, les personnes âgées de plus de 50 ans)

Dans la présente étude, le dosage de la vitamine B12 disponible (relarguée) dans le milieu de culture bactérien permet de distinguer si les souches SS1, SS2, SL1, SL2 (sélectionnées les meilleures en terme de résistance aux sels biliaires et d'antagonisme vis-à-vis des souches pathogènes testées) seraient capables de produire la vitamine B12. L'avantage de cette méthode est sa sensibilité importante, ce qui permet de quantifier de très faibles teneurs en vitamine B12.

Les résultats de la lecture des surnageants (culot bactérien écarté) par spectrophotométrie à longueur d'onde : $\lambda = 240 \text{ nm}$, sont indiqués sur le **tableau 11**.

Tableau 11 : Les quantités disponibles en vitamines B12 bactérienne produites par nos souches sélectionnées.

Les souches	SL1	SL2	SS1	SS2
Répétition 1	0.249	0.452	0.361	0.376
Répétition 2	0.251	0.454	0.351	0.395
Répétition 3	0.252	0.458	0.362	0.39
Moyennes	0.25066667	0.45466667	0.358	0.387
Absorbance (DO)	0.02866667	0.23266667	0.136	0.165
ET	0.00152753	0.00305505	0.00608276	0.00984886
Quantité Vit B12* ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.3743514	0.3804102	0.3775392	0.3784005

* Les quantités sont calculées selon la courbe d'étalonnage réalisée à la Cobalamine et est donnée en annexe.

La mise en place des méthodes d'analyse spectrophotométrique de la vitamine B12 va permettre de mesurer la concentration en vitamine B12 produite par nos souches étudiées. La précision de la méthode a été vérifiée par des mesures de trois reliquats sur tous les échantillons.

Pour les concentrations de vitamine B12 produites, nous avons noté 0.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ par SL1, 0.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ produite par SL2, 0.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ par SS1 et 0.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ par SS2. Ces quantités sont très identiques et y sont vraisemblablement intéressantes et représentent $\frac{1}{4}$ de la quantité moyenne absorbée dans la journée (1,5 μg pourvu que les aliments et produits consommés tout au long de la journée contiennent de la vitamine B12) (Watanabe, 2007).

Conclusion

Dans cette étude, une recherche des bactéries lactiques à partir du lait maternel et de selles de bébé, a été effectuée, dans le but de sélectionner des souches à potentiel probiotique produisant la vitamine B12.

Dans le but d'identifier les isolats sélectionnés à effet probiotique, une caractérisation morphologique basée sur les observations macroscopique et microscopique et des tests biochimiques ont été réalisés.

Cette approche est effectuée par les étapes suivantes :

L'isolement des souches de lait maternel et de selles de bébé, la purification des isolats présumés lactiques, l'identification phénotypique par les tests usuels : Gram, catalase, type fermentaire et résistance aux conditions physiques.

Les résultats obtenus dans le cadre de la détermination du statut probiotique des isolats nous a mis en évidence une très bonne croissance en présence du pH acide et de la bile à 0.3%, reflétant surtout une caractéristique probiotique très recherchée « la résistance à l'hostilité digestive » ; surtout pour nos isolats d'origine lait maternel. L'activité antimicrobienne de ces isolats a démontré une possible action élargie contre les souches pathogènes.

Par manque d'éléments constitutifs du milieu spécifique pour la production bactérienne de la vitamine B12, seulement les souches les plus performantes sur le plan probiotique (SS1, SS2, SL1, SL2) étaient sujettes à l'analyse estimative.

D'une manière synthétique, les résultats obtenus dans cette étude sont résumés dans les points suivants :

- Les souches L2', L3', L4' et L5' sont probablement des souches *Enterococcus*, La meilleure température de croissance pour ces souches est à 45°C (sont des thermophiles), vues qu'elles se développent moins à 37°C.
- La souche SL1 est probablement une souche *Enterococcus*, La meilleure température de croissance pour cette souche est à 37°C, c'est une souche mésophile, mais elle tolère les températures élevées (45°C).

- Les souches SS1, SS2, SS3, SS4, SS5, SS6, SS7, SS8, SS9, SS10, SS11 sont probablement des souches de bifidobactéries ; SL2, SL3, SL4, SL7, SL8 et SL9 seraient probablement des *Lactobacillus*.
- L'analyse spectrophotométrique nous a calculée une quantité égale au ¼ de la quantité moyenne couvrant nos besoins journaliers.

Finalement, il faudrait noter que cette étude est la première à notre connaissance permettant d'isoler des souches du lait maternel et mettant en évidence une production bactérienne de la vitamine B12. Toutefois, comme tout travail de recherches utile, il serait intéressant de le compléter par :

- Une étude approfondie sur l'identification et la mise en évidence des caractéristiques probiotiques des différentes souches.
- Une étude plus qualitative que quantitative du pouvoir bactérien de production de la vitamine B12.

Les références bibliographiques

Adlerberth, I., E. Lindberg, N. Aberg, B. Hesselmar, R. Saalman, I. Strannegard and A. Wold (2006). "Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle." *Pediatrics Research* 59: 96-101.

Alais (1975). Charles, société d'édition et de publicité agricoles industrielle et commerciale., 3 :807p.

ALAIS .C, (1984) : Sciences du lait : Principes des techniques laitières- 4e éd- Paris SEPAIC 814p.

Albert. M. J., Mathan . V. I & Baker .S. J. (1980). Vitamin B12 synthesis by human small intestinal bacteria. *Nature* 283, 781-782 (21 February 1980). doi:10.1038/283781a0

Alis van der Aa Kühle et Lene Jespersen. (2003). *The Taxonomic Position of Saccharomyces boulardii as Evaluated by Sequence Analysis of the D1/D2 Domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 Region and the Mitochondrial Cytochrome- c Oxidase II Gene. Systematic and Applied Microbiology*, vol. 26, no 4, 2003, p. 564-571.

Allende A, Marin A, Buendía B, Tomás-Barberán F, Gil MI (2007) . Impact of combined post-harvest treatments (UV-C light, gaseous O₃, superatmospheric O₂ and high CO₂) on health promoting compounds and shelf-life of strawberries. *Postharvest Biology and Technology*. 46:201–211.

Amrouche, T. (2005). Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries: analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires impliqués. University of Laval, Canada, PhD thesis.

Andrès E, Loukili NH, Noel E, et coll. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CAMJ* 2002; 171: 251-60.

Andrès E, Affenberger S, Vinzio S, et coll. Carences en vitamine B12 chez l'adulte : étiologies, manifestations cliniques et traitement. *La revue de la médecine interne* 2005; 26: 938-46.

Andrès E, Federici L, Affenberger S, et coll (2007). B12 deficiency : A look beyond pernicious anemia. *J Fam Pract*; 56: 537-42.

Andres J Picazo-Tadeo, Francisco J (2009). Sáez-Fernández, Francisco González-Gómez : Applied Economics ; 41 :615-628.

Anonyme 13 : **ASSOCIATION VÉGÉTARIENNE DE FRANCE : B12** – Fiche 8/V3/2014.

Anonyme 6 : **Beyond Vegetarism. Comparative Anatomy and Physiology Brought Up to Date.** Are Humans Natural Frugivores/Vegetarians, or Omnivores/Faunivores ? (Page consultée le 21 octobre 2010.) www.beyondveg.com/billings-t/comp-anat/comp-anat-1a.shtml

Anonyme 11 : **Commission fédérale de l'alimentation. Avantages et désavantages d'une alimentation végétarienne pour la santé.** Rapport des experts. Berne: Office fédéral de santé publique, 2006.

Anonyme 10 : **Gouvernement du Québec. Institut national de la santé publique du Québec.** La consommation alimentaire et les apports nutritionnels des adultes québécois. (consultée le 10 janvier 2011.) www.inspq.qc.ca/pdf/publications/931_RapportNutritionAdultes.pdf

Anonyme 3 : **Les diététistes du Canada.** Tous droits réservés. Ce document peut être imprimé intégralement. Usage commercial interdit, 2014.

Anonyme 7 : **Les diététistes du Canada.** Tous droits réservés. Ce document peut être imprimé intégralement. Usage commercial interdit, 2017.

Anonyme 2 : **Les vitamines. Support de Cours (Version PDF) 2011.** Collège des Enseignants de Nutrition Université Médicale Virtuelle Francophone, France : 4-11.

Anonyme 4 : **National Institutes of Health. Office of Dietary Supplements, Vitamin B12.** (Page consultée le 21 octobre 2010.) <http://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminB12-HealthProfessional/>

Anonyme 5 : **Institute of Medicine. Food and Nutrition Board (1998).** Dietary Reference Intakes : Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC : National Academy Press.

Anonyme 9 : **Santé Canada. Alimentation et nutrition. Valeur nutritive de quelques aliments usuels.** (consultée le 21 octobre 2010.) www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/fiche-nutri-data/nutrient_value-valeurs_nutritives-tc-tm-fra.php

Anonyme 1: **Science Daily et Environmental Microbiology, 2013).**

Anonyme 8 : **U.S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service.** National Nutrient Database for Standard Reference. (consultée le 21 octobre 2010.) www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl

AXELSSON L., (2004). Classification and physiology. In : Lactic acidbacteria: Microbiological and functional aspects ((Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. NewYork.1-66.

Bäckhed, F., H. Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. F. Semenkovich and J. I. Gordon (2004). "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage." Proceedings of the National Academy of Sciences 101(44): 15718-15723.

Badel, S., Bernandi, T., and-michaurd, P. (2011). New perspectives for *lactobacilli* expolyssacchrides. Biolechnol. Adv.29, 54-66.

BADIS, A., LAOUABDIA-SELLAMI, N., GUETARNI, D., KIHAL, M., OUZROUT, R., (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales (Arabia et Kabile). In0 scien.tech. 23 : 30-37.

BADIS, A., LAOUABDIA-SELLAMI, N., GUETARNI, D., KIHAL, M., OUZROUT, R., (2006). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales (Arabia et Kabile). In0 scien.tech. 23 : 30-37.

BELARBI FATMA. (2011). Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes.P:2-7.

Bernalier-Donadille A. (2004). Principales fonctions métaboliques de la flore intestinale de l'homme. In : Rambaud JC, Buts JP, Conthier G, Flourié B, eds. Flore microbienne intestinale. Montage : John Libbey Eurotext : 61-80.

Bhushan. B., Tomar. SK., Chauhan . A. (2017). Techno-functional differentiation of two vitamin B₁₂ producing *Lactobacillus plantarum* strains: an elucidation for diverse future use., Food Chem.,Nov 1;234:494-501.

Birn, H. (2006). The kidney in vitamin B12 and folate homeostasis: characterization of receptors for tubular uptake of vitamins and carrier proteins. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 291, F22–F36.

BOURGEOIS, C., MESCLE, J et ZUCCA, J. (1996). Microbiologie alimentaire, aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments .tome1.Edition: Toc, Lavoisier. . pp: 272-293.

Broadasky, T.F., Lewis, C., Eble, T.E.(1976). Bioautographic thin layer chromatographic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat. *J Chromatogr*, (123): 33-44.

Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. (2012). The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr* ., 96:544–551.

Campeotto F, Waligora-Dupriet A, Doucet-Populaire F. (2007). Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né. *Gastroentérologie Clinique et Biologique.*,31:533-542.

CARR, F. J., CHILL, D. ET MAIDA, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey *Critical Rev. Microbiol.* 28: 281-370.

Chatelier A. (2003). Macrocytose et carence en acide folique et en vitamine B12 : savez-vous toujours bien les distinguer ? *Le Médecin du Québec* .; 38(10): 62-9.

Collège des Enseignants de Nutrition (Les vitamines). © Université Médicale Virtuelle Francophone - Date de création du document 2010-2011. (Version PDF).

Coudeyras s and C. (2010). Forestier, “Microbiote et probiotiques: impact en santé humaine,” *Can. J. Microbiol.*, vol. 56, no. 8, pp. 611–650.

Dali-Youcef N, Andrès E. (2009). An update on cobalamin deficiency in adults. *Q J Med.*; 102: 17-28.

Delamare J, Garnier M. (2006). Dictionnaire illustré des termes de médecine, 29e édition. Paris : Maloine.

Dellaglio, F., DeRoissart, H., Torriani, S., Curk, M. C., Janssens, D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. DeRoissart, H. et Luquet, F. M., Loriga Uriage, France.

DE ROISSART et LUQUET., (1994). Properties of nisin Z and distribution of its gene Nis Z in *Lactococcus lactis* Appl. Environ. Microbiol., 59, 213-218.

DESMAZEAUD.M. (1994).les bactéries lactiques dans l'alimentations humaines utilisation et innocuité .cahier agriculture P-331-340.

Doré J, Corthier G.(2010). Le microbiote intestinal humain. Gastroentérologie Clinique et Biologique.;34(4):7-16.

DOUMANDJI. S. et CHAKALI G., (2010). Composition et structure des arthropodes échantillonnés grâce à la technique des pots Barber à Souf (Sahara). Journées prot. Vég., 19 - 21avril 2010, Dép. Zool. agro. for., Inst. nati.agro., El Harrach, p. 165.

Ducluzeau R, Raibaud P. (1979-1995). Écologie microbienne du tube digestif : ces microbes qui nous protègent. Masson éd., Paris. France.

Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. The American Journal of Clinical Nutrition., 73(2):386-392.

Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E. and Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. Science, 308, 1635-1638.

FAO/OMS (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS) .Working Group Report. Cordoba, Argentina.

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

Farnworth E.R. (2008). Kefir: from folklore to regulatory approval. *J. Nutraceuticals Funct. Med. Foods.*

Fleming H.P., Etechells J.L., Costilow R. N., (1975). Microbite inhibition by an iso late of pediococcus from cucumber Brines. *Appl Microbiol.*,30(6) : 1040-1042.

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

Fuller R. (1991). Probiotics in human medicine. *Gut.* 32: 439-442.

Fumio Watanabe, Yukinori Yabuta, Tomohiro Bito, and Fei Teng ; (2014). Vitamin B12-Containing Plant Food Sources for Vegetarians. *Nutrients.*6 (5): 1861–1873. Published online 2014 May 5. doi: 10.3390/nu6051861. PMID: PMC4042564

Garvie E.I. (1986). Gram positive cocci genus *Leuconostoc* in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol II. 9th edit. The Williams and Wilkins Co Baltimore : 1071 – 1075.

Gbassi, G. K. & Vandamme, T. (2012). Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*, 4 (1), 149–163.

Ghazi F., DE. Henni, Z. Benmchernene et M. (2004). Kihal. Phenotypic and Whole Cell Protein Analysis by SDS-PAGE for Identification of Dominants Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 4 ; 78-87.

Gilliland SE & Speck ML. (1977). Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food borne pathogens in associative culture. *J food Prot* 40, 820-823.

Giraffa G., Carminati D., Neviani E., (1997). Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Prot.*, 60: 732-737.

Gollado C. (2009). La flore intestinale, un mode vivant à préserver. *Journal de pédiatrie et de puériculture.* ; 22, pages 102-106.

Goldin, B.R. (1986). In situ bacterial metabolism and colon mutagens. *Annu Rev Microbiol*, 40, 367-393. 5.

Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., and Salminen, S. (1992). Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 37, 121-128.

Goossens, D., Jonkers, D., Stobberingh, E., van den Bogaard, A., Russel, M. and Stockbrugger, R. (2003). Probiotics in gastroenterology: indications and future perspectives. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 15-23.

Goulet O. (2009). La flore intestinale : un monde vivant à préserver. *Journal de pédiatrie et de puériculture*.;22:102-106.

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

Gras-Le Guen C, Launay E, Colas H, Potel G, Caillon J. (2011). Microbiote intestinal et antibiothérapie périnatale. *Journal des Anti-Infectieux*.;13(2):103-108.

Grosdidier R., (2010). Les infos de l'Association Française de Médecine Orthomoléculaire. janv. 2010 .N°31.

Guiraud, J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. p : 310-321.

GUIRAUD J.P. (2003). Microbiologie alimentaire. Edition DUNOD.

HADDIE J.M., (1986). Other streptococci. In : *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.). 1 : 1070.

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

ACM, Raangs GC, et al. (2000). Analyse of intestinal flora developement in brast-fed infant by using molecular identification and detection methodes .*J Pediatre Gstroenterol*

Nutr, 30,61-67.

HASSAN A.N. ET FRANK J.F., (2001). Starter Cultures and their use. In: *Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.

HO T.N.T., N. TUAN N., DESCHAMPS A. ET CAUBET R., (2007). Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology. 134-142.

Holzapel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JHJ (1998). Overview of gut flora and probiotics. Intl J Food Microbiol., 41: 85-101.

Jean-Christoph Lagire, DESC de Maladie Infactieuse et Tropicale 10avril 2017.IHU Méditerranée Infaction, Marseille, Microbiotedijestivedoce , jean-christophie.lagier @univ-amu.fr .

Jerome, J. P., James, T. S., Stephen, L. (2004). Microbiologie. *Ed. Dunod.* Paris.P 479.

Jose M, Saavedra MD. (2007). Use of probiotics in paediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical aspects. Nutr. Clin. Pract. 22: 351–365.

JOFFIN, Christiane. (1999). JOFFIN, Jean-Noël. Microbiologie alimentaire. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine. Biologie technique. (ISBN 2-8661-7342-2). Page 21.

Journal of Perinatology. (2011). pages 31, 63–69.

Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Rochat F, Chassard C. (2014). Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. Environ Microbiol. ;16 (9):2891-904.

KAMM .K., HOPPE S., BREVES G., SCHRODER B. (2004). Effects of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* on the neurochemistry of myenteric neurones in pig jejunum SCHEMANN *Neurogastroenterol Motil* 16, 53–60.

Khalid, N.M. et Marth, E.H. (1990). Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *Rev. Dairy Sci.* 73 : 158-167.

Khan, S.H. and Ansari, F.A. (2007). Probiotics-The friendly bacteria with market potential in global market. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 20(1): 76-82.

KHEDID K., FAID, M., MOKHTARI, A., SOULAYMANIA ET ZINEDINE, A.(2006).Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco.*Microbiol.Res.*10 : 10-16. bacteria and yeast.

KIHAL, M., (1996). Etude de la production du dioxyde de carbone par leuconostoc mesentéroïdes, élément d'application en technologie fromagère type fromage bleu thèse de Doctorat d'Etat, Université d'Oran.

Kimberly Kozak, Duane Charbonneau, Rosemary Sanozky-Dawes & Todd Klaenhammer. (2015). Characterization of bacterial isolates from the microbiota of mothers' breastmilk and their infants, Gut Microbes, 6:6, 341-351.

Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G ;(1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology vol. 41,103-125.

Kreger -Van Rij, N.J. (1984). The yeast, a Taxonomic Study, Elsevier Biomedical.

Kunz C & Roudloff S (1993). Biological functions of oligosaccharides in human milk. Acta paediatr 82, 903-912.

Labrecque, M.H. (2003). Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène. Mémoire, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université LAVAL. p : 19- 24.

Larpen J-P., (1996) b. Laits et produits laitiers non fermentés In Microbiologie alimentaire: Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Bourgeois C.M., Mesclé J.F., Zucca J. Tome1, Tec & Doc, Lavoisier, pp: 272-294.

Larpen-Gourgaud Monique, Michaux Odile, Larpen J.P, Desmasure Nathalie, Desmazeaud Michel, Mangin Irène, Masson Florence, Montel M.C. et Tailliez Patrick., (1997). Les ferments lactiques et bactéries apparentées In Microbiologie alimentaire Techniques de laboratoire. Larpen J-P. Tec&Doc, Lavoisier, pp: 199-255.

Larsen HR. Summaries of the latest research concerning vitamin B12. (Page consultée le 22 octobre 2010.) www.yourhealthbase.com/vitamin_B12.html.

LECLERC H., GAILLARD F L. ET SIMONET M., (1994). Les grands groupes de bactéries. In : Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. DOIN. Paris. 445.

Leclerc M, Juste C, Blottière H, Doré J. (2007). Microbiote intestinal : un univers méconnu.;42(2):22-27.

Leveau, J.-Y. and Bouix, M. (1993) Les bactéries lactiques. In Microbiologie industrielle : Les micro-organismes d'intérêt industriel. Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 170-375.

Liévin-Le Moal V, Servin . (2006). The front line of enteric host defence against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucin, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(2): 315-337.

Li . P, Gu . Q, Yang . L, Yu . Y, Wang . Y. (2007). *Appl Microbiol Biotechnol.* ;101(2):697-709.

Lilly, D.M. & Stillwell, R.H. (1965). Probiotics: Growth promoting factors produced by micro-organisms. *American Journal of Science* 147: 747-748.

Lindi, J.K., O'Neill, C. and McLaughlin, J. (2006). Do probiotics have a therapeutic role in gastroenterology? *World J Gastroenterol*, 12, 5447-5457.

Lindberg, E., I. Adlerberth, B. Hesselmar, R. Saalman, I.-L. Strannegard, N. Aberg and A. E. Wold. (2004). "High rate of transfer of *Staphylococcus aureus* from parental skin to infant gut flora." *Journal of Clinical Microbiology* 42(2): 530-534.

Luquet, F.M. et Corrieu, G. (2005). Bactéries lactiques et probiotiques. Edition Lavoisier, Paris. 307 pages.

Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR .(1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 1035-1045.

MAYEUX, J.V., SANDINE, W.E., AND ELLIKER, P.R., (1962). A selective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Science*, 45: 655-656.

Mercier, C. (1997). Transgènes et modification quantitative et/ou qualitative de la composition de lait à de fins nutritionnels. *In* : Frennd G. (Ed), intérêts nutritionnels et diététique du lait de chèvre. *Nord-France*. p : 169-177.

Metchnikoff. E., (1907). *Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction.* In: *The prolongation of life: Optimistic studies.* W. Heinemann, London: 161-183.

Metchnikoff., E. (1908). *The prolongation of life: optimistic studies.* New York and London: G.P. Putnam's Sons editions.

Moreau MC. (2004). Influence de la microbiologie intestinale sur l'immunité é de l'hôte : conditions physiologiques. *In* : Rambaud JC, Buts JP, Conthier G, Flourié B, eds. *Flore microbienne intestinale.* Montage : John Libbey Eurotext : 131-49.

Nowrouzian, F., B. Hesselmar, R. Saalman, I. Strannegard, N. Aberg, A. Wold and I. Adlerberth. (2003). "Escherichia coli in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage." *Pediatric Research* 54: 8-14.

Ogier J.C., E. Casalta, C. Farrokh et A. Saihi. Safety assessment of dairy microorganisms : The *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126(2008) 286-290.

O'Hara, A.M. and Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7, 688-693.

Oh CR, Brown DL. (2003). Vitamin B12 deficiency. *American Family Physician.*; 67(5).

Oh R, Brown DL.(2004). Use of metformin is a cause of vitamin B12 deficiency. *Author Reply – Am Fam Physician.*; 69: 264-6.

Olivares M, Diaz-Ropero MP, Martin R, Rodriguez JM, Xaus J.(2006).Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol.*, 101:72–79.

Olivier Goulet, (2009). Effets de *Saccharomyces boulardii* dans le traitement et la prévention des diarrhées de l'enfant.

O'sullivan L., Ross R.P. ET Hill C. (2002).Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84, 593-604.

Organisation des Unies pour L'alimentation et L'Agriculture 1995 (F.A.O, 1995). Lait, produits laitiers et nutrition humaine.

Orla-Jensen, S. (1919). The lactic acid Bacteria. *Mem.Acad.Roy.Sci.*

5,81-197.

Parracho H, McCartney AL, Gibson R. (2007). Probiotics and prebiotics in infant nutrition. *Proc. Nutr. Soc.* 66: 405–411.

Penner et al., 2005).

Perez, P. F., J. Dore, M. Leclerc, F. Levenez, J. Benyacoub, P. Serrant, I. Segura-Roggero, E. J. Schiffrin and A. Donnet-Hughes (2007). "Bacterial Imprinting of the Neonatal Immune System: Lessons From Maternal Cells?" *Pediatrics* 119(3): e724-732.

PILET M.F., MAGRAS C., FEDERIGHI M., (1998). Bactéries lactiques. In : Manuel de bactériologie alimentaire (Sutra L., Federighi M., Jouve J.L.). Polytechnica. Paris. 235-260.

PILET M.F., MAGRAS C., FEDERIGHI M., (2005). Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.

Pol, D. (1996). Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire. ellipses édition marketing S.A, Paris. 15, p : 20-38, 42-57, 141-151.

Pompei, A.; Cordisco, L.; Amaretti, A.; Zanoni, S.; Raimondi, S.; Matteuzzi, D.; Rossi, M. (2007). Administration of folate-producing bifidobacteria enhances folate status in Wistar rats. *J. Nutr.*, 137, 2742–2746.

POT B., (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 1-106.

Prescott, Harly. Et Kelin. (2007). Microbiologie. 2ème Ed. Boeck-wesmael. Bruxelles.

Qin .,JJ. et al., (2010). *Nature* 464 , 59-65. doi:10.1038/nature08821.

Rafter, J. (2002). Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *Br J Nutr*, 88 Suppl 1, S89-94.

Rao, D.R.; Reddy, A.V.; Pulusani, S.R.; Cornwell, P.E.(1984). Biosynthesis and utilization of folic acid and vitamin B12 by lactic cultures in skim milk. *J. Dairy Sci.* 1984, 67, 1169–1174.

RICHARD.V.J.,(1990). Production de lait cru de bonne qualité bactériologique. *MicrobHyg-alim* 2 (1) : 30-33.

Rodrigues A.C.P., Cara D.C., Fretez S.H.G.G, Cunha F.Q, Vieira E.C., Nicoli J.R. and Vieira L.Q. (2000). *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice.

***Roger LC, McCartney (2005).** Prebiotics and the infant microbiota. In: « Probiotics and prebiotics, scientific aspects ». Caister. Academic Press éd., Wymondham. pp.196 - 211.

Rokka, S. & Rantamaki, P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, 231 (1), 1–12.

Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, Fonden R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland SE, Mattila-Sandholm T. (1998). Demonstration of safety of probiotics - A review. *Int. J. Food. Microbiol.* 44(1-2): 93-106.

Salminen, S., Wright, A. V., Ouwehand, A. (2004). Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.

Sandine W.E., Radich P.C., Elliker P.R., (1972). Ecology of the lactic streptococci. A review. *J. Milk Food. Techn.*, 35: 176-185.

scardovi, V.,(1986). Section 15. Irregular nonsporing. Gram-positive rods. Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924. In: Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E., Sharpe and J.G. Holt (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th Edn., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 2: p 1418-1434.

Schrier LS. Physiology of vitamin B12 and folic acid deficiency. UpToDate 2011.

Scardovi, V. (1986). Genus *Bifidobacterium*. Dans *Bergey's manual of systematic bacteriology*. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt. Baltimore, *Williams and Wilkinson Publishing*. 2:1418-1434.

***Sergi, R. (1997).** L'intestin grêle le reflet de notre image santé. In, p. 13.

Shah N. P & Ding, W. K. (2007 et 2010). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 72 (9), M446–M450.

Sherman J.M., (1937). The streptococci. *Bacterial. Rev.*, 1: 3 -97.

Singleton. (2005). The critical period hypothesis: A coat of many colours. *International Review of Applied Linguistics*, 43, 269-286.

Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM) Annual Meeting 3 Feb,(2016). Maternal Diet Alters the Breast Milk Microbiome and Microbial Gene Content.

Solis G, de Los Reyes-Gavilan CG, Fernandez N, Margolles A, Gueimonde M.(2010). Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe* ., 16:307–310.

STILSM.E.and Holzapfl w.H. (1997),*Int.J.food Microbiol .*,36:1-29. Th. Méd. Vét., Dakar, 1997, n09, III p.

Strozzi, G.P.; Mogna, L. (2008). Quantification of folic acid in human feces after administration of Bifidobacterium probiotic strains. *J. Clin. Gastroenterol. ,* 42, S179–S184.

Taga, M.E., Larsen, N.A., Howard-Jones, A.R., Walsh, C.T. and Walker, G.C. (2007). BluB cannibalizes flavin to form the lower ligand of vitamin B12. *Nature* 446, 449–453.

TAMIME A.Y., (2002). Microbiology of starter cultures. In: *Dairy microbiology handbook* (Robinson R.K.). 3e Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.

Tannock GW.(2003). Probiotics: Time for a Dose of Realism. *Curr. Issues. Intest. Microbiol.* 4: 33-42.

THOMPSON J.K, M.A COLLINS. ET W.D. MERCER., (1994) . Characterisation of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ 450. *J. Appl. Bacteriol*, 80 338– 348.

Tortora, G., Funke, B. R., Case, C.L., Martin, L., (2003). Introduction à la microbiologie. (Ed). ERPI. Paris, p 4-869.

Vaughan EE, Mollet B, Devos WM. (1999). Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel. *Cur. Opin. Biotechnol.* 10: 505-510.

VIGNOLA C L.,(2002). Science et technologie du lait : Transformation du lait – Montréal : presse internationale polytechnique .p 600.

Villarrea, M.R. (2006). Digestive system diagram URL http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Digestive_system_diagram_en.svg.

Wegkamp, A.; Teusink, B.; de Vos, W.M.; Smid, E.J. (2010). Development of a minimal growth medium for *Lactobacillus plantarum*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 50, 57–64.

westerbeek E. A., Van den Berg A., Lafeber H. N., el al. (2004). The intestinal bacterial colonisation in preterm infants : a review of the literature. *Clin Nutr*, 25,361-368,2006.

Wilson, M. (2008). *Bacteriology of Humans*. London, BlackwellPublishing Ltd.

Watanabe. F. (2007). Vitamin B12 sources and bioavailability. *Exp Biol Med* (Maywood). 232 (10):1266-74.

Zittoun J, Zittoun R.(1999). Modern clinical testing strategies in cobalamin and folate deficiency. Sem Hematol .; 36: 35-46.

La composition des différents milieux d'isolement et d'identification utilisés :

➤ La gélose MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Composition	g/l
Peptone	10g
Extrait de viande	8g
Extrait de levure	4g
Glucose	20g
Acétate de sodium trihydraté	5g
Citrate d'ammonium	2g
Tween 80	1ml
Hydrogénophosphate de potassium	2g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0.2g
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0.05g
Agar-agar	15g

pH= 6.5 et 5.4

Autoclavage 120°C pendant 20min

➤ Milieu MES (Mayeux et al., 1962)

Composition	g/l
Tryptone	10g
Gélatine	2.5g
Extrait de levure	5g
Saccharose	100g
Glucose	5g
Citrate de sodium	1g
Azide de sodium	75mg
Agar-agar	15g

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C :6,9

➤ Eau physiologique peptonée

Composition	g/l
Chlorure de sodium	9g
Peptone	0.5g
Eau distillé	950ml

pH= 7. Autoclavage 120°C pendant 20min

➤ Clark et Lubs

Composition	g/l
Peptone	5g
Phosphate dipotassique	5g
Glucose	5g
Eau distillé	950ml

pH =7.4. Autoclavage 120°C pendant 20min

➤ Milieu Muller Hinton (Muller et Hinton, 1941)

Composition	g/l
Infusion de viande de bœuf	300ml
Peptone de caséine	17.50g
Amidon de maïs	1.50g
Agar-agar	15g
Eau distillé	1l

pH du milieu prêt à l'emploi 25°C : 7.4

Autoclavage 120°C pendant 20min

➤ Na Cl (2.5, 4 et 6.5%)

Composition	g/l
Glucose	5g
Extrait de viande	5g
Peptone	15g
Na Cl	25g
Na Cl	40g
Na Cl	65g

Autoclavage 120°C pendant 20min

➤ Gélose blanche

Composition	g/l
Agar-agar	15g
Eau distillé	1l

pH= 7.5

Autoclavage 120°C pendant 20min

➤ Le bleu de méthylène

Composition	g/l
Lait écrémé	5ml
bleu de méthylène	0.1% et 0.3%

➤ Teste de production de CO₂ à partir de citrate

Composition	g/l
Lait écrémé	10.5ml
Citrate	10%

➤ Le milieu Moller à l'arginine

Composition	g/l
Peptone pepsique	5g
BCP	0.01g
Extrait de viande	5g
Rouge de crésole	0.005
Glucose	0.5g
Pyridoxal	0.005g
L'arginine	10g

pH= 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20min

➤ Gélose nutritive

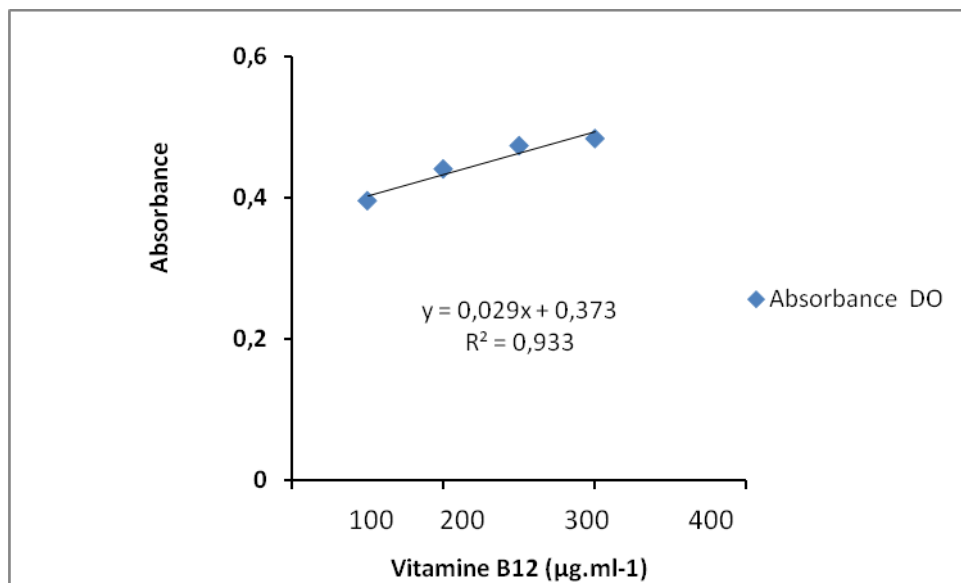
Composition	g/l
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar-agar	15g

pH= 7.4. Autoclavage 120°C pendant 20min

Composition	g/l
Glycose	40g
Peptone	1g
Acide folique	200ug
Pyridoxal	8,5mg
K ₂ Hpo ₄	1g
Sulfate de Fr ⁺²	20mg
K Hpo ₄	1g
Sulfate de sodium	400mg
Sulfate de manganate	20mg
Acétate de sodium	20mg
Na Cl	2mg
Twine 80	2ml
Acide ascorbique	4g

PH= 5.4 à 5.8. Autoclavage 120°C pendant 20min

➤ Courbe d'étalonnage



Chapitre I:

Les

probiotiques

Chapitre III:
Matériel et
méthode

Chapitre II:

La vitamine

B12

Introduction

Chapitre IV: Résultats et discussion

Conclusion

*Les références
bibliographiques*