

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE SAAD DAHLAB – BLIDA

**FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES
DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES**

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE EN VUE DE
L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER ACADEMIQUE
EN SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
Filière : Sciences alimentaires
Spécialité : Nutrition et contrôle des aliments

Thème:

**Effet de l'association de probiotique et de spiruline sur le pouvoir
acidifiant et la cinétique de la croissance**

Présentée par:

CHERGUELAINÉ Amina

BOUSLIMANI Fatima Zohra

Devant le jury composé de :

M. S. A. RAMDANE.	MAA	USDB	Président
M ^{me} A. DOUMANDJI	MCA	USDB	Promotrice
M. D. AMALOU	MAA	USDB	Examineur
M. B. KADRI	MCB	USDB	Examineur

ANNEE UNIVERSITAIRE: 2010 - 2011

Remerciements

Nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la volonté et le courage pour accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciement à notre promotrice Mme DOUMANDJI Amel, qui a accepté de nous encadrer et qui nous a suivit pour réaliser ce modeste travail ;

Nous remercions vivement M. RAMDANE S. le président du jury qui nous a fait l'honneur d'accepter la mission qui lui a été confiée ;

Nous remercions les membres du jury M. AMALOU D. et M. KADRI B. d'avoir eu la gentillesse d'accepter d'examiner notre modeste travail ;

Nous remercions les membres de laboratoire de contrôle de qualité de l'industrie agro-alimentaire (I.A.A) de Sidi Abdelkader, pour leur aide appréciable;

Dédicace

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à dieu, tout puissant pour m'avoir donné le courage et la volonté de mener à bon voie.

Je dédie ce modeste travail à :

A mes chers parents, ma mère et mon père: pour leur compréhension, amour, patience et encouragement pendant toute ma vie,

A mes sœurs: Hayet, Yasmine et ma petite sœur Ikram,

A mes frères: Belkacem et Zakaria,

A tous mes camarades et amis

A tous ceux qui m'ont encouragé pour la réussite de ce mémoire et de ma vie surtout Aicha BENKHITHEB;

BOUSLIMANI Fatma Zohra.

Résumé

Notre étude a porté sur l'étude de l'effet de l'association de deux bactéries (*Bf. adolescentis* et spiruline) cultivées dans le lait écrémé sur l'évolution des comptes microbiens ainsi que sur l'évolution du pH.

Les résultats du suivi de l'évolution du pH du lait écréméensemencé ont montré une diminution du pH lorsque *Bf. adolescentis* et *Arthrospiraplatensis* sont cultivés seuls ou en association. Une forte acidification soit de 4,59 à temps 900mn, est observée lorsque le lait écrémé estensemencé par la spiruline seule.

La vitesse d'acidification est de 0,0023 UpH /min lorsque le lait est cultivé en spiruline seule (0,0023 pH /min). Cette activité est moindre lorsque *Bf. Adolescentis* est cultivée seule ou en association avec la spiruline soit respectivement à raison de 0,00173 pH /min et de 0,0022 pH /min.

Le suivi de la croissance des comptes des deux bactéries montre une évolution du nombre des comptes des UFC dans les trois cas (*Bf. adolescentis* seul, spiruline seule et les deux espèces en association), en effet après 24 heures nous obtenons les résultats suivants : $163 \cdot 10^7$ UFC/mL, $235 \cdot 10^7$ UFC/mL et $238 \cdot 10^7$ UFC/mL à 900mn respectivement.

Après 48 heures le nombre des UFC des deux bactéries (*Bf. adolescentis* seul, spiruline seule et les deux espèces en association) continue à augmenter et nous obtenons les résultats suivants : $231 \cdot 10^7$ UFC/mL, $350 \cdot 10^7$ UFC/mL et $366 \cdot 10^7$ UFC/mL respectivement.

Le temps de génération G est optimal lorsque les bifidobactéries sont en présence de spiruline soit 71,67 mn. Il atteint une valeur de 83,61mn lorsque la spiruline estensemencée seule. Le temps de génération est élevé lorsque la flore bifide est cultivée seule dans le lait écrémé soit 158,43 mn. L'optimisation de la croissance de la flore bifide est obtenue lorsqu'elle est en association avec la spiruline.

Mots clés: Spiruline, *Bf.adolescentis*, croissance, pH, traitement préventif, *in vitro*.

Summary

Our study related to the study of the effect of the association of two bacteria (*Bf.adolescentis* and spirulina) cultivated in the skimmed milk on the evolution of the accounts microbial like on the evolution of the pH.

The results of the follow-up of the evolution of the pH of sown skimmed milk showed a reduction in the pH when *Bf.adolescentis* and *Arthrospira platensis* are cultivated only or in association. A strong acidification is of 4, 59 in the time 100mn, is observed when skimmed milk is sown by the spiruline only.

The speed of acidification is of 0, 0023 UpH /min when milk is cultivated in spiruline only (0, 0023 pH /min). This activity is less when *Bf.adolescentis* is cultivated only or in partnership with the spirulina is respectively at a rate of 0, 00173 pH /min and of 0, 0022 pH /min.

The follow-up of the growth of the accounts of the two bacteria shows an evolution of the number of the accounts of the UFC in the three cases (*Bf.adolescentis* only, spirulina only and the two species in association), indeed after 12 midnight we obtain the following results: $163 \cdot 10^7$ UFC/mL, $235 \cdot 10^7$ UFC/mL and $238 \cdot 10^7$ UFC/mL with the time 100mn respectively.

After 48 hours the number of the UFC of the two bacteria (*Bf.adolescentis* only, spiruline only and the two species in association) continuous to increase and we obtain the following results: $231 \cdot 10^7$ UFC/mL, $350 \cdot 10^7$ UFC/mL and $366 \cdot 10^7$ UFC/mL respectively.

The generation time G is optimal when the bifidobacteries are in the presence of spiruline is 71, 67 mn. It reaches a value of 83,61mn when the spiruline is sown only. The generation time is high when the flora bifide is cultivated only in skimmed milk is 158, 43 mn. The optimization of the growth of the florabifide is obtained when it is in partnership with spirulina.

Key words: Spirulina, *Bf.adolescentis*, growth, pH, preventive medication, *in vitro*.

ملخص

دراستنا تقوم على مزيج من اثنين من البكتيريا (بيفيدوبكتيريا وسبيرولينا) نمت في الحليب الخالي من الدسم ودراسة تأثيرها على تطور درجة الحموضة وعدد المستعمرات الجرثومية. أظهرت نتائج الحموضة رصد الحليب الخالي من الدسم ، زيادة الحموضة في حين بيفيدوبكتيريا وسبيرولينا نمت وحدها. وهناك حموضة قوية 4.59 في الزمن 900 دقيقة ، لوحظ عند تلقیح الحليب الخالي من الدسم وحده مع السبيرولينا.

معدل التحمض هو 0.0023 درجة الحموضة / دقيقة عندما يزرع الحليب فقط في سبيرولينا (0.0023 درجة الحموضة / دقيقة). هذا النشاط هو أقل في حالة بيفيدوبكتيريا نمت وحدها أو بالاشتراك مع السبيرولينا على التوالي بمعدل 0.00173 درجة الحموضة / دقيقة ، ودرجة الحموضة 0.0022 / دقيقة. مراقبة حسابات تطور البكتيريا عدد من الوحدات المشكلة مستعمرات في الثلاث حالات (واحد بيفيدوبكتيريا وحدها، السبيرولين وحدها وكلا النوعين معا) ، سارية المفعول بعد 24 ساعة نحصل على النتائج التالية. 10^7 163 كفو / مل ، 10^7 235 كفو / مل على التوالي و 10^7 238 كفو / مل في ز 900 دقيقة. بعد 48 ساعة من عدد CFU كل من البكتيريا (البيفيدوبكتيريا وحدها ، السبيرولينا وحدها وكلا النوعين معا) اثبتت انها في تزايد مستمر ، و الحصول على النتائج التالية : 10^7 231 كفو / مل ، 10^7 350 كفو / مل و 10^7 366 كفو / مل على التوالي .

زمن الجيل هو الوقت الأمثل فيوجود بيفيدوبكتيريا مع سبيرولينا هو 71.67 دقيقة. بلغت قيمة 83.61 دقيقة في وجود السبيرولينا وحدها. الزمن يكون عاليا عندما تزرع الفيدوبكتيريا فقط في الحليب الخالي من الدسم ويتم تحقيق التحسين 158.43 دقيقة. يبلغ التطور الحد الامثل عندما يتم دمج البيفيدو بكتيريا مع السبيرولينا.

الكلمات الرئيسية : سبيرولينا ، بيفيدوبكتيريا ، النمو ، درجة الحموضة ، العلاج الوقائي ، في المختبر.

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Exemple de souches probiotiques sous forme d'aliments, de compléments alimentaires ou de médicaments.....	4
Tableau n°2 : Caractéristiques proposées comme critères pour aider à la sélection des micro-organismes potentiellement probiotiques.....	5
Tableau n°3 : Exemples de pourcentages de récupération de bactéries lactiques et bifido-bactéries probiotiques vivantes dans les selles après leur ingestion.....	7
Tableau n°4 : Etudes randomisées contrôlées de probiotiques pour prévenir des gastro-entérites aiguës chez des nourrissons ou enfants.....	9
Tableau n°5 : Etudes de l'effet de probiotiques pour prévenir la diarrhée du voyageur	10
Tableau n°6: Quelques caractères biochimiques de trois souches de Bifidobactéries.....	17
Tableau n°7 : Les espèces de Bifidobacteria et leurs origines.....	18
Tableau n°8 : Schéma d'identification des espèces du genre <i>Bifidobacterium</i> d'origine humaine.....	20
Tableau n°9: Taxonomie de la spiruline.....	25
Tableau n°10 : Composition en acides aminés (mg/100g de spiruline sèche).....	29
Tableau n°11 : Composition en acide gras de 100g de spiruline sèche.....	30
Tableau n°12 : Composition de la spiruline en vitamines (mg/Kg de matière sèche).....	31
Tableau n°13 : Composition de la spiruline en minéraux en mg/10g de spiruline sèche.....	32
Tableau n°14 : Teneurs en pigments en mg/10g de matière sèche de spiruline.....	32
Tableau n°15 : Analyse physico-chimique effectuées sur la matière première.....	37

Tableau n°16 : Les analyses microbiologiques effectuées sur la matière première....	42
Tableau n°17 :Les résultats des analysesphysicochimiques du lait écrémé.....	59
Tableau n°18 :Les résultats des analysesphysicochimiques de la spiruline.....	60
Tableau n°19 :Les résultats des analyses microbiologiques du lait écrémé.....	61
Tableau n°20 :Les résultats des analyses microbiologiques de la spiruline sèche.....	62
Tableau n°21 :Résultats de la sensibilité de <i>Bf. adolescentis</i> à l'égard des 6 antibiotiques.....	63
Tableau n°22 : Résultats de l'évolution de l'acidification du lait écrémé fermenté avec les bifidobactéries ou la spiruline seules ou en association.....	65
Tableau n°23 : Détermination des comptes moyens de <i>Bf. adolescentis</i> cultivé dans le lait écrémé après 24 heures.....	67
Tableau n°24 : Détermination des comptes moyens de <i>Bf. adolescentis</i> cultivé seule dans le lait écrémé après 48 heures.....	67
Tableau n°25 : Détermination des comptes moyens de la spiruline associée à la souche <i>Bf. adolescentis</i> cultivé dans le lait écrémé après 24 heures.....	68
Tableau n° 26 : Détermination des comptes moyens de spiruline associée à la souche <i>Bf. adolescentis</i> cultivé dans le lait écrémé après 48 heures.....	68
Tableau n° 27 :Détermination des comptes moyens des colonies de spiruline dans le lait écrémé après 24 heures.....	69
Tableau n°28 : Détermination des comptes moyens des colonies de spiruline dans le lait écrémé après 48 heures.....	69
Tableau n°29 : Calculs des variations de pH et des vitesses d'acidification (V pH) du lait écrémé fermenté avec les bifidobactéries ou la spiruline seules et en association.....	72
Tableau n° 30 : Calculs du temps de génération (G) et du taux de croissance (μ) de avec les bifidobactéries ou la spiruline seules et en association.....	73

Tableau n° 31: Calculs du temps de génération (G) et du taux de croissance (μ) de
avec les bifidobactéries ou la spiruline seules et en association.....73

Tableau n° 32: Résultat des analyses statistiques du pouvoir acidifiant de
bifidobactéries ou la spiruline seules et en association.....74

Tableau n° 33: Résultat des analyses statistiques de la cinétique de croissance des
bifidobactéries ou de la spiruline cultivés chacune seule et en association après 24
heures.....75

Tableau n° 34: Résultat des analyses statistiques de la cinétique de croissance des
bifidobactéries ou de la spiruline cultivés chacune seule et en association après 48
heures.....77

SOMMAIRE

Introduction générale	1
------------------------------------	---

Partie I : Etude bibliographique

Chapitre I :Les probiotiques

I-1. Définitions et généralités.....	3
--------------------------------------	---

I-2. Composition et sélection.....	4
------------------------------------	---

I-3.Pharmacologie des bactéries lactiques chez l'homme.....	5
---	---

I-4.Les effets démontrés.....	7
-------------------------------	---

Chapitre II :Les bifidobactéries

II-1.Historique.....	14
----------------------	----

II-2.Caractères généraux.....	14
-------------------------------	----

II-3.Métabolisme.....	15
-----------------------	----

II-4.Ecologie.....	17
--------------------	----

II-5.Spécificités biochimiques et culturelles.....	18
--	----

Chapitre III : La Spiruline

III-1.Historique	24
------------------------	----

III-2.Répartition géographique.....	24
-------------------------------------	----

III-3.biologie	25
----------------------	----

III-4.composition	27
-------------------------	----

III-5.Valeur nutritionnelle.....	32
----------------------------------	----

III -6.Conservation et conditionnement.....	34
---	----

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

➤ Problématique.....	36
I-1.Matériel.....	36
I-2.Méthodes.....	37
Chapitre II- Résultats et discussions	
II-1.Résultats des analyses microbiologiques et physicochimiques.....	56
II-2. Résultats de l'antibiogramme.....	59
II-3. Contrôle de la pureté des échantillons biologiques utilisés	60
II-4.Standardisation de l'inoculum.....	61
II-5.Mise au point du lait écrémé fermenté avec les bifidobactéries ou la spiruline seules ou en association.....	61
II-6. Les analyses statistiques.....	72
Conclusion générale	
Références bibliographiques	
Annexes	

SOMMAIRE

Introduction générale	1
------------------------------------	---

Partie I : Etude bibliographique

Chapitre I :Les probiotiques

I-1. Définitions et généralités.....	3
--------------------------------------	---

I-2. Composition et sélection.....	4
------------------------------------	---

I-3.Pharmacologie des bactéries lactiques chez l'homme.....	5
---	---

I-4.Les effets démontrés.....	7
-------------------------------	---

Chapitre II :Les bifidobactéries

II-1.Historique.....	14
----------------------	----

II-2.Caractères généraux.....	14
-------------------------------	----

II-3.Métabolisme.....	15
-----------------------	----

II-4.Ecologie.....	17
--------------------	----

II-5.Spécificités biochimiques et culturelles.....	18
--	----

Chapitre III : La Spiruline

III-1.Historique	24
------------------------	----

III-2.Répartition géographique.....	24
-------------------------------------	----

III-3.biologie	25
----------------------	----

III-4.composition	27
-------------------------	----

III-5.Valeur nutritionnelle.....	32
----------------------------------	----

III -6.Conservation et conditionnement.....	34
---	----

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

➤ Problématique.....	36
I-1.Matériel.....	36
I-2.Méthodes.....	37
Chapitre II- Résultats et discussions	
II-1.Résultats des analyses microbiologiques et physicochimiques.....	56
II-2. Résultats de l'antibiogramme.....	59
II-3. Contrôle de la pureté des échantillons biologiques utilisés	60
II-4.Standardisation de l'inoculum.....	61
II-5.Mise au point du lait écrémé fermenté avec les bifidobactéries ou la spiruline seules ou en association.....	61
II-6. Les analyses statistiques.....	72
Conclusion générale	
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui ont une influence favorable sur l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale. Ils font partie des micro-organismes qui intéressent les chercheurs (Roberfroidet *al.*, 2008).

La spiruline, l'algue bleu-verte, est aujourd'hui jugée comme un complément alimentaire. Le monde de la recherche médicale découvre que les nutriments de la spiruline (protéines de bonne qualité, équilibrée en acides gras, vitamines, antioxydants et minéraux) contribuent à lutter contre de nombreux problèmes de santé (Mani et *al.*, 2000).

En Algérie, la culture de la spiruline est au stade de la production artisanale et expérimentale. Monsieur HIRI Abdelkader a réussi à la faire déplacer de son environnement naturel (EL Guelta) vers un bassin de culture. Il dispose ainsi d'un bassin d'une superficie légèrement au-dessus de 20m² dans la région de Tamanrasset et produit 20 kg de spiruline sèche par an (M'hamed, 2005).

Le but de cette présente étude est de préconiser un complément alimentaire à base de spiruline et de probiotique pour un traitement préventif et thérapeutique afin de protéger la flore intestinale utile (effet de barrière).

Afin de réaliser cette étude, nous avons suivi les étapes suivantes :

- Un contrôle physicochimique et microbiologique de la matière première.
- Contrôle de la pureté des échantillons biologiques utilisés (Spiruline et bifidobactéries).
- Suivi de la cinétique de la croissance et du pH des bifidobactéries et de la spiruline seuls et en association dans du lait écrémé en fonction du temps.

A fin de réaliser cette présente étude, nous avons choisi les parties suivantes: une partie bibliographique, une partie expérimentale et une discussion et conclusion générale.

La partie bibliographique est composée de trois chapitres. Le premier chapitre traite les probiotiques. Le deuxième chapitre concerne les bifidobactéries et le dernier chapitre est orienté vers la spiruline.

La partie expérimentale présente deux chapitres. Le premier chapitre représente le matériel et les méthodes utilisées, le deuxième chapitre représente les résultats obtenus et ses interprétations.

I- Généralités

I-1 Définitions

Le terme d'alicament a été introduit à la fin du XX^{ème} siècle pour désigner des aliments ou composants alimentaires ayant des propriétés curatives ou préventives de certaines maladies. Ce terme n'est pas employé par les industriels de l'aliment ni du médicament qui de part et d'autre souhaitent garder une frontière nette entre les médicaments et les aliments. En Europe, les allégations faisant état de prévention, traitement ou guérison de maladies humaines ne sont pas autorisées pour des aliments. Le terme d'alicaments fonctionnels désigne des aliments ou produits alimentaires dont les propriétés spécifiques vont au-delà du simple effet nutritif associé aux éléments nutritifs qu'il contient et qui revendiquent des modifications physiologiques bénéfiques de l'organisme. Les allégations fonctionnelles de certains produits alimentaires sont autorisées dans un cadre strict. Il est par exemple possible pour un produit d'alléguer qu'il améliore l'absorption du calcium mais pas qu'il prévient l'ostéoporose. Aux Etats-Unis ou au Japon, où les allégations santé sont permises, les chewing-gums contre les caries côtoient des pilules « empêchant le cancer » ou les boissons « protégeant des maladies cardiovasculaires »... Ces produits de plus en plus développés vont de jus de fruit multivitaminés. Céréales aux fibres, œufs aux acides gras (oméga 3), barres vitaminées, lait enrichi en fer et en calcium à divers probiotiques tels des produits laitiers « au bifidus actif ».

Les définitions du terme probiotique ont évolué avec le temps et la réflexion des chercheurs, des industriels et des spécialistes de la communication au grand public. Lilly et Stillwell (1965) qui furent apparemment les premiers en 1965 à utiliser le terme choisirent des « facteurs promoteurs de croissance produits par des micro-organismes ». En 1974, Parker choisit d'élargir la définition à des « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore ». Cependant, Fuller reprocha à cette nouvelle définition d'inclure potentiellement les antibiotiques et proposa alors : « des micro-organismes ajoutés à l'alimentation et influençant de manière bénéfique l'animal hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale » (Fuller 1991). Trois éléments sont depuis venus influencer une révision de la définition. Le premier est que certains micro-organismes peuvent avoir des effets sur l'hôte sans nécessairement modifier sa flore (effets directs enzymatique ou par une immunomodulation). Les termes de « micro-organismes en transit » (Marteau, 1994) et « d'agents biothérapeutiques » (Elmer, 1996) étaient alors proposés. Ils apparaissaient plus « factuels » puisqu'ils ne préjugeaient pas d'un mécanisme d'action mais n'ont pas été retenus probablement du fait de la connotation très positive du terme probiotique. Le second est l'intérêt de certains industriels à ne pas labelliser « probiotique » des micro-organismes « génériques », tout particulièrement ceux du yaourt standard pour réserver ce label à des produits contenant des micro-organismes dont la valeur ajoutée justifie un coût supérieur. Le troisième était le désir de certains chercheurs et de nombreux industriels d'exclure de la définition les micro-organismes tués. En effet, si certains micro-organismes tués par la chaleur peuvent

exercer certains effets bénéfiques pour l'hôte, des travaux ont montré que ces effets étaient en règle générale moins marqués que ceux des micro-organismes ingérés vivants. La FAO et l'OMS ont établi récemment des lignes directrices pour l'utilisation du terme : « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte ».

I-2- Composition et sélection

Les probiotiques sont des micro-organismes ingérés vivants. Généralement, il s'agit de bactéries ou de levures présents soit dans les aliments, notamment les produits laitiers fermentés, soit dans les médicaments ou les compléments alimentaires. Dans ce dernier cas, la forme lyophilisée est la plus courante. Les genres bactériens les plus fréquemment retrouvés dans des préparations revendiquant des propriétés probiotiques sont *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Enterococcus faecium*, et *Saccharomyces*. Des exemples sont fournis sur le tableau 1. La qualité microbiologique des préparations commercialisées reste très variable, excellente pour certains et très insuffisante pour d'autres (Fasoli et al., 2003). Elle est désormais plus facile à étudier du fait des progrès en taxonomie et des méthodes moléculaires. Les produits de qualité médiocre doivent être dénoncés car ils discréditent les autres aux yeux des non spécialistes.

Plusieurs critères ont été proposés pour aider les industriels à rationaliser leur sélection des souches qui auraient les meilleures chances d'avoir des propriétés probiotiques (Saarela et al., 2000 ; Morelli, 2000 ; Dunne et al., 2001). Le lecteur doit néanmoins comprendre que ces critères ne permettent en rien d'exclure la possibilité d'effets probiotiques à des souches ne les ayant pas tous, voir n'en n'ayant aucun (tableau 2). Il ne s'agit donc pas d'un instrument permettant à une équipe de marketing de critiquer un produit concurrent aux options stratégiques différentes.

Tableau 1: Exemple de souches probiotiques sous forme d'aliments, de compléments alimentaires ou de médicaments.

Bactéries lactiques et pseudo-lactiques	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bf. lactis</i> Bb 12
	<i>Bf. animalis</i> DN 173 010
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. rhamnosus</i> souche GG
	<i>L. johnsonii</i> La1
	<i>L. casei</i> DN 114 001
	<i>L. casei shirota</i>
	<i>L. plantarum</i> 299
	<i>L. plantarum</i> 299v
	<i>L. reuteri</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i> SF 568
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> Nissle 1917
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i>

(Fasoli et al., 2003)

Tableau 2 : Caractéristiques proposées comme critères pour aider à la sélection des micro-organismes potentiellement probiotiques.

Absence de toxicité ou pathogénie
Possibilité de production en grande échelle
Possibilité de cryoprotection
Propriétés organoleptiques et technologiques
Résistance à l'aide
Résistance à la bile
Adhérence à diverses lignées de cellules intestinales et /ou au mucus
Production de substances d'intérêt (bactériocines...)

(Saarela et al., 2000 ; Morelli, 2000 ; Dunne et al., 2001)

II- Pharmacologie des bactéries lactiques chez l'homme

Le mode d'action des probiotiques est de mieux en mieux compris grâce à une approche pharmacologique. Cette dernière a pour buts d'identifier les principes actifs, décrire leur pharmacocinétique et démontrer les effets bénéfiques ou néfastes. Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de véhiculer des principes actifs (enzymes, composants de paroi, peptides ou nucléotides immunomodulateurs, protéines antibactériennes...) jusqu'à leur cibles d'action dans le tractus digestif.

II-1-Principes actifs

Les principes actifs des probiotiques ne sont pas les mêmes pour tous les effets. Certains sont bien établis, notamment des enzymes qui peuvent être actives dans l'intestin (ex : la lactase des bactéries lactiques). Certains autres sont reconnus par le système immunitaire ; ils incluent des peptides formylés, des lipo-polysaccharides, des peptidoglycanes composants de la paroi cellulaire et des nucléotides, notamment l'ADN GpG (Marteau et Shanahan, 2003). Certains principes actifs peuvent être naturellement présents dans des probiotiques et d'autres peuvent y être introduits par des techniques de génie génétique. Cantonnée jusqu'à peu aux études de laboratoire, cette recherche vient aussi de débiter chez l'homme pour traiter la maladie de Crohn (Steidler, 2003). Plus on connaîtra précisément les principes actifs et plus la recherche progressera pour développer des probiotiques plus actifs.

II-2-Pharmacocinétique (survie dans l'intestin- adhérence – colonisation)

La plus part des études de pharmacocinétique ont décrit le devenir des probiotiques ingérés, c'est-à-dire leur survie dans le tractus intestinal.

II-2-1 Méthodes d'étude

Des modèles *in vitro* peuvent aider à prédire la survie de probiotiques *in vivo* ou leur adhérence à l'épithélium ou au mucus intestinal (Lee et al., 2000 ; Ouwehand et al., 2001 ;

Servin et Coconnier, 2003 ; Marteau et Shanahan, 2003). Il est ainsi possible d'étudier la sensibilité de souche au pH ou aux concentrations d'acides biliaires. Plusieurs modèles ont aussi été développés dans lesquels la dynamique des processus d'acidification sécrétion gastrique, de sécrétion biliaire ou de transit intestinal peuvent être reproduites grâce à des programmes informatisés (Marteau et *al.*, 1997). Le meilleur moyen d'établir la pharmacocinétique des probiotiques dans le tractus gastro-intestinale est sa mesure *in vivo*. La majorité des études ont étudié la survie des probiotiques jusque dans les selles (Marteau et Shanahan, 2003).

II-2-2 Facteurs influençant la pharmacocinétique de probiotiques

La survie des probiotiques dépend de leur résistance intrinsèque, de facteurs liés à l'hôte et du vecteur alimentaire ou galénique dans ou avec lequel ils sont ingérés. La sécrétion acide gastrique constitue un facteur de défense majeur et la résistance à l'acide diffère fortement entre les micro-organismes (Cook, 1994 ; Simon et Gorbach, 1997). La bile, tout particulièrement les acides biliaires, est le second facteur important qui, par exemple, influence le pourcentage de survie de lactobacilles ou bifidobactéries ingérées (Simon et Gorbach, 1997 ; Marteau et *al.*, 1997). Des résultats expérimentaux suggèrent que le liquide pancréatique puisse aussi exercer un effet antimicrobien (Dronault et *al.*, 1999). L'influence d'autres sécrétions digestives, comme celles de mucus, n'est pas connue bien qu'il soit probable qu'elle soit significative sur des écosystèmes très localisés comme celui des cryptes intestinales. La motricité intestinale joue aussi un rôle de défense contre les infections gastro-intestinales et tout ralentissement du transit et du péristaltisme dans l'intestin grêle favorise la colonisation bactérienne chronique à ce niveau (Simon et Gorbach, 1997). L'équilibre de la flore et le devenir de probiotiques ingérés dépend aussi d'interactions microbiennes qui incluent la compétition pour des substrats ou pour des sites d'adhérence et les modifications de l'environnement par des sécrétions bactériennes comme celle de bactériocines (Simon et Gorbach, 1997).

II-2-3 Survie de probiotiques ingérées dans le tube digestif et colonisation

La survie de micro-organismes ingérées diffère entre genres microbiens, espèces et même parfois souches. Certains micro-organismes sont détruits dès leur passage dans l'estomac alors que d'autres ont une haute capacité de survie jusque dans les selles. Les bactéries du yaourt *Lactobacillus delbreckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* ont une résistance à l'acide faible et sont rapidement détruites en quelques minutes à des pH 1. Les concentrations de bactéries du yaourt viable parvenant au

duodénum chez les sujets sains ayant ingéré 430 g de yaourt contenant 10^7 UFC/ ml était d'environ 10^5 UFC/ ml au moment du pic (Pochart et al., 1999). Certains auteurs ont observés la survie de quelques bactéries du yaourt jusqu'à la fin de l'iléon terminal chez une partie des sujets volontaires étudiés mais ces bactéries n'ont jusqu'ici pas pu montrer une survie significative jusque dans les selles. *Lactococcus lactis*, une espèce bactérienne assez largement utilisée dans les produits laitiers fermentés, a aussi une survie faible dans l'intestin, du fait de sa sensibilité à l'acide et à la bile. Cette sensibilité a été mise à profit pour l'utiliser comme vecteur d'activité dans l'intestin (Drouault et al., 2002).

Certaines bifidobactéries, ingérées dans des produits laitiers fermentés, ont une survie très importante jusque dans les selles avec des concentrations fécales observées supérieures à 10^8 UFC/g, (Tableau 3) (Bouhnik et al., 1992 ; Kullen et al., 1997 ; Vesa et Pochart, 2000 ; Marteau et Shanahan, 2003)

Tableau 3 : Exemples de pourcentages de récupération de bactéries lactiques et bifidobactéries probiotiques vivantes dans les selles après leur ingestion.

Probiotique		% de survie
<i>Bifidobacterium sp.</i>		30
<i>L. plantarum</i> souche NCIB 8826		7
<i>L. acidophilus</i>		2 – 5
<i>L. rhamnosus</i> souche GG		1 – 5
<i>L. rhamnosus</i> souche GG	Gastroprotégé	1
<i>L. rhamnosus</i> souche GG	Lait fermenté	1
<i>L. rhamnosus</i> souche GG	capsules	2
<i>Lactococcus lactis</i> MG1363		1
<i>L. fermentum</i> souche KLD		0,5
<i>Lactococcus lactis</i> TC165.5		0,1 – 2
<i>L. reuteri</i>	capsules	0,01

(Bouhnik et al., 1992 ; Kullen et al., 1997 ; Vesa et Pochart, 2000 ; Marteau et Shanahan, 2003)

Résultat fourni dans la référence ou calculé à partir d'un poids de selles théorique de 150g /j.

III- Les effets démontrés

III-1-Amélioration de la digestion du lactose

Le premier effet démontré avec un haut niveau de preuve a été l'amélioration de l'intolérance au lactose et de la malabsorption de ce sucre par des bactéries lactiques et tout particulièrement celles du yaourt (Kolars et *al.*, 1984 ; Marteau et *al.*, 1990 ; De Vrese et *al.*, 2001). En pratique, le remplacement du lait par le yaourt conduit à une meilleure absorption et une meilleure tolérance chez les sujets présentant une intolérance au lactose (due au déclin physiologique de la catalase avec l'âge) et en cas d'intolérance secondaire à des entéropathies comme au cours de diarrhées persistantes (Boudraa et *al.*, 1990). Plusieurs travaux ont montré que la lactase de bactéries lactiques participait à la digestion du lactose dans l'intestin (De Vrese et *al.*, 2001).

III-2-Autres effets directs enzymatiques

Il a été montré que l'ingestion de *Saccharomyces cerevisiae* qui est une levure riche en saccharase aidait à la digestion du saccharose et supprimait les manifestations cliniques d'intolérance chez huit enfants déficients en saccharose (situation clinique exceptionnelle) recevant une charge orale de ce sucre (2 g/kg de poids) (Harms et Bertele-Harms , 1987). Dans un modèle porcin d'insuffisance pancréatique exocrine, un lactocoque génétiquement modifié pour libérer de la lipase améliorait la digestion des lipides (Drouault et *al.*,2002). Le gavage des rats par *Oxalobacter formigenes* (une bactérie capable de dégrader l'oxalate) diminuait l'excrétion urinaire d'oxalate et ceci fait l'objet de travaux pour la prévention de la lithiase rénale oxalique chez l'homme (Sidhu et *al.*, 2001).

III-3- Raccourcissement et prévention de gastro-entérites

Les gastro-entérites sont des affections très fréquentes puisque le risque pour un français est d'un épisode par an. Elles guérissent spontanément en quelques jours mais sont source d'arrêt de travail chez l'adulte et de gêne importante aussi bien chez les enfants que chez les adultes. Les formes les plus sévères exposent au risque de déshydratation et de mort, tout particulièrement chez les nourrissons et les personnes âgées (risque accru dans les pays les moins développés). Les agents microbiens en cause sont divers : virus (notamment le rotavirus chez le nourrisson) ou bactéries.

III-3-1-Effet curatif

L'utilisation de probiotiques ou de produits laitiers fermentés au cours des gastro-entérites aiguës est une pratique répandue. Des essais ont montré que plusieurs probiotiques raccourcissent significativement la durée de la diarrhée au cours de gastro-entérites (notamment à rotavirus) (van Niel et *al.*, 2002 ; Huang et *al.*, 2002 ; Gill, 2003).

III-3-2-Effet préventif

Des essais ont montrés un effet protecteur préventif de probiotiques sur le risque de diarrhée. Les premiers ont été réalisés chez les nourrissons hospitalisés pour de longues périodes. Leur objectif était une prévention de risque de diarrhée nosocomiale, notamment mais non exclusivement à rotavirus. Dans l'essai de Savedraa et *al.* (1994) Une association de *Bifidobacterium* sp et *Sc. thermophilus* ajoutés au lait usuel diminuait de moitié le risque de diarrhée nosocomiale (tableau 4) (Savedraa et *al.*, 1994). Dans l'étude de Szajewska et *al.* (2001), *L. rhamnosus* GG avait un effet préventif du même ordre de grandeur (Szajewska et Kotowska, 2001). Dans ces deux travaux, une prévention significative du risque de gastro-entérite à *Rotavirus* était observée.

Tableau 4 : Etudes randomisées contrôlées de probiotiques pour prévenir des gastro-entérites aiguës chez des nourrissons ou enfants :

Probiotique	Effet
<i>Bf. bifidum</i> + <i>Sc. thermophilus</i>	7 vs 31 % diarrhées nosocomiales
<i>L. rhamnosus</i> GG	6,7 vs 33% diarrhées nosocomiales
<i>L. rhamnosus</i> GG	25,4 vs 30,2 % rotaviroses nosocomiales (non significatif NS)
<i>L. rhamnosus</i> GG	5,2 vs 6,0 épisode de diarrhée/12 mois
<i>L. casei</i> souche DN- 114 001	23,4 vs 26,4 % de diarrhées sur 6 mois (NS)
<i>L. casei</i> souche DN – 144 001	15,9 vs 22 % de diarrhées sur 6 mois

(Savedraa et *al.*, 1994)

III-4- Effets au cours d'infections intestinales spécifiques et au cours de la diarrhée du voyageur

III-4-1- *Clostridium difficile*

Clostridium difficile est un bacille non invasif responsable d'un grand nombre de diarrhées survenant au cours d'antibiothérapies et de la majorité des colites pseudo – membraneuses (maladie rare mais grave). Ses caractéristiques, tout particulièrement sa commensalité possible et sa capacité à former des spores très résistantes, expliquent le risque de transmission nosocomiale et la fréquence des rechutes. Un essai randomisé contrôlé a montré que l'administration orale de *S. boulardii* diminuait de moitié le risque de rechute chez les sujets porteurs d'une infection à *C. difficile* ayant déjà rechuté (Macfarland et al., 1994).

III-4-2-*Helicobacter pylori*

H. pylori joue un rôle majeur pour favoriser les risques d'ulcère du duodénum et de l'estomac et de certains cancers et lymphomes gastriques. Plusieurs travaux ont bien montré l'existence d'un antagonisme *in vitro* entre certaines souches probiotiques, notamment de lactobacilles, et *H. pylori* (Felley et Michetti, 2003).

III-4-3- Diarrhée du voyageur

La diarrhée du voyageur est une situation très fréquente, affectant jusqu'à 50% des touristes dans certaines régions du monde ; son mécanisme est le plus souvent infectieux. La capacité de probiotiques pour prévenir la diarrhée du voyageur, a fait l'objet de six essais randomisés contrôlés (tableau 5, Gill, 2003).

Tableau 5 : Etudes de l'effet de probiotiques pour prévenir la diarrhée du voyageur

Probiotique	Efficacité
Lactinex	Non
<i>L. fermentum</i> KLD	Non
Lactobacilles	43 % vs 71%
<i>S. boulardii</i>	+
<i>L. rhamnosus</i> GG	-11 % (NS)
<i>L. rhamnosus</i> GG	3,9 % /j vs 7,4 %

(Gill, 2003)

III-5- Raccourcissement et prévention de diarrhées aux antibiotiques

Les antibiotiques entraînent fréquemment des effets indésirables digestifs, particulièrement la diarrhée (survenant sur plus de 5% des sujets). Les mécanismes sont multiples et incluent particulièrement la diminution de la capacité fermentaire du côlon et la diminution de l'effet de barrière avec émergence secondaire de micro-organismes pathogènes tels que *C. difficile*. Plusieurs essais randomisés contrôlés ont montré l'efficacité de souches probiotiques pour prévenir les perturbations digestives liées à l'antibiothérapie (Cremonini et al., 2002 ; D'Souza et al., 2002 ; Surawicz, 2003).

III-6- Prévention de la rechute de maladies inflammatoires de l'intestin

La maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique sont des affections sévères du tube digestif caractérisées par une inflammation chronique et récidivante ; elles affectent environ un sujet sur 1 000 en Europe. De nombreux travaux ont permis de découvrir ces dix dernières années que certains micro-organismes de la flore intestinale pouvaient jouer un rôle délétère pro-inflammatoire au cours des maladies inflammatoires du tube digestif (Marteau et Seksik, 2003). La présence d'une flore dans le côlon aggrave toutes les colites expérimentales chez l'animal et plusieurs arguments suggèrent fortement qu'il en soit de même chez l'homme au cours des maladies inflammatoires cryptogénétiques intestinales (MICI). Les arguments cliniques les plus convaincants sont observés dans la rechute postopératoire pré-anastomotique de la maladie de Crohn qui ne s'observe que si le flux fécal est maintenu sur l'anastomose ou si on installe le liquide iléal dans sa totalité mais pas si on instille un filtrat du liquide iléal (Rutgeerts et al., 1991). Des travaux expérimentaux ont montré que des probiotiques pouvaient aider à prévenir ou améliorer des colites expérimentales chez l'animal (Madsen et al., 1999 ; Marteau, Seksik et Shanahan, 2003 ; Dieleman et al., 2003). Aussi, des études cliniques ont-elles été entreprises. D'assez nombreux essais ouverts relatent l'effet positif de divers probiotiques dans des situations de MICI.

III-7- Diarrhées autres

Des probiotiques ont fait l'objet d'essais dans plusieurs situations cliniques compliquées de diarrhée de mécanismes divers. Plusieurs travaux ont montré une capacité significative de *S. boulardii* à réduire la diarrhée induite par l'alimentation entérale par

sonde. Dans une étude menée en double aveugle chez 128 malades en situation critique et nourris par sonde entérale, le traitement probiotiques diminuait le nombre de jours avec diarrhée de 189,9% à 14,4% ($p = 0,007$) (Bleichner et *al.*, 1997).

III-8- Syndrome de l'intestin irritable

Le syndrome de l'intestin irritable affecte plus de 15% de la population adulte et plus fréquemment la femme. Aucun traitement curatif n'est connu et les traitements symptomatiques sont souvent d'une efficacité seulement partielle de certaines souches probiotiques, d'autres ont été négatifs (Mertz, 2003). Deux essais contrôlés réalisés ont montré que *Bifidobacterium animalis* souche DN 173-010 raccourcissait le transit dans le côlon, particulièrement sigmoïde, chez la femme saine et ceci constitue une base significative pour espérer des effets sur la constipation. Le premier travail avait inclus des sujets des deux sexe et n'avait observé cet effet que chez la femme soumise à un régime par ailleurs normal (Bouvier et *al.*, 2001). Le second travail a donc porté spécifiquement chez des femmes saines et a confirmé que cette souche raccourcissait le transit colique (Marteau et *al.*, 2002).

III-9- Cancer du côlon et autres cancers

La flore intestinale et le système immunitaire jouent un rôle dans la cancérogenèse colique. Plusieurs études ont montré que certains probiotiques pouvaient diminuer l'activité d'enzymes, de mutagènes ou des acides biliaires secondaires dans les selles, qui pourraient être impliqués dans la cancérogenèse colique (Marteau et *al.*, 1993 ; Rafter, 2003). Un travail épidémiologique français a montré un moindre risque d'adénomes coliques de grande taille (ceux dont le risque de dégénérescence est le plus grand) chez les sujets consommant du yaourt plus de trois fois par semaine (Boutron et *al.*, 1996). Deux essais randomisés contrôlés japonais ont montré que l'administration orale de *L. casei* souche biolactis diminuait de manière significative le risque de récurrence de tumeur superficielle de la vessie chez l'homme (Aso et Akazan, 1992 ; Aso et *al.*, 1995).

III-10- Affections non gastro-entérologiques

III-10-1- Infections non digestives

Un essai préliminaire a suggéré que des sujets âgés recevant *L. casei* DN- 114001 puisse avoir des épisodes infectieux hivernaux aussi fréquents que le groupe contrôle mais

moins sévères (Turchet et *al.*, 2003). Un essai contrôlé montre une diminution des infections survenant après une transplantation hépatique chez les sujets recevant des fibres alimentaires et *L. plantarum* 299 par rapport à des sujets n'en recevant pas (Rayes et *al* 2002).

III-10-2- Allergies

Les travaux expérimentaux montrant la capacité de probiotiques à interférer avec le système immunitaire ont conduit à réaliser des essais contrôlés dans des maladies allergiques chez l'homme. Deux travaux ont montré que des probiotiques avaient une efficacité clinique dans l'eczéma atopique du nourrisson ou de l'enfant. Le premier a porté sur 27 enfants souffrants d'eczéma au moment du sevrage ; il a montré la supériorité d'un lait hydrolysé contenant *L. rhamnosus* GG par rapport à un lait hydrolysé contrôle (Majamaa et Isolauri, 1997). Le deuxième essai a montré la supériorité de l'association de deux souches de lactobacilles lyophilisés (*L. rhamnosus* 19070-2 et *L. reuteri* DSM 122460) pendant six semaines (Rosenfeldt et *al.*, 2003).

L'équipe d'Erica Isolauri en Finlande a été pionnière pour tenter de prévenir l'apparition de manifestation d'atopie par des probiotiques chez des nourrissons. Dans un essai le *L. rhamnosus* GG a été administré aux mères d'enfants à risque (car elles avaient elles même ou leurs maris des signes d'atopie) puis chez les nourrissons pendant 6 mois. Sur les 132 enfants suivis pendant 2 puis 4 ans, il a été observé une diminution de moitié du risque d'eczéma atopique soit : 23 % vs 46% à 2 ans (Kalliomaki et *al.*, 2001) et 26% vs 46% à 4 ans (Kalliomaki et *al.*, 2003a). D'autres travaux suggèrent aussi des modifications de la flore des enfants dont la pertinence est difficile à évaluer à ce jour (Kalliomaki et *al.*, 2003b). Enfin, un autre travail a rapporté que l'effet n'était observé qu'avec le probiotique ingéré vivant et non avec *L. rhamnosus* GG tué par la chaleur (Kirjavainen et *al.*, 2003).

I- Historique

Les espèces appartenant à la famille des bifidobactéries ont été désignées initialement par le nom de *Bacillus bifidus* (Tissier, 1900) car dans les années 1900, Tissier les a décrites et définies (Tissier, 1900). Il a isolé une bactérie anaérobie à partir des fèces d'un nourrisson, cette souche présentait une forme bifide, qu'il a appelé *Bacillus bifidus*. Puis par le nom de *Lactobacillus bifidus*. Dehnert (1957) a montré que ces bactéries sont trop diverses pour être regroupées dans une seule espèce. L'analyse de leur contenu (G+C) a fourni des valeurs de 55 à 67% trop éloignées de celles des lactobacilles qui sont inférieures à 55%. Ceci a confirmé la spécificité du genre *Bifidobacterium* (Sebald et al., 1965). L'intérêt s'est porté ensuite sur la description de ces espèces, en utilisant l'homologie ADN-ADN (Scardovi, 1986) et le profil de fermentation des carbohydrates (Mitsuoka, 1984).

II- Caractères généraux

Tous les membres du genre *Bifidobacterium* sont Gram positif, non mobiles, non sporulés, non-producteurs de gaz et anaérobie ; toutefois, certaines espèces et certaines biotypes tolèrent l'oxygène en présence de CO₂, catalase négative, sauf *Bifidobacterium indicum* et *Bifidobacterium asteroides*.

Il a été démontré que les bifidobactéries isolées de l'homme peuvent croître à des températures variant entre 36 et 38°C. En revanche, les espèces de *Bifidobacterium* isolées à partir d'animaux sont capable de croître à des température plus élevées soit 41 à 43°C, avec *Bf. thermacidophilum* présentant une croissance à la température maximale de 49,5°C (Dong et al., 2000). La température minimale de croissance pour les bifidobactéries n'est généralement pas en dessous avec l'exception notable de la *Bf. psychroaerophilum*, il a été montré qu'elle croit à 8 °C (Simpore et al., 2005).

Leurs pH optimum de croissance est compris entre 6,5 et 7, mais elles ne croient pas à pH 4,5 - 5,0 ni à pH 8,0-8,5 (Scardovi, 1986). Les bifidobactéries ont une grande variété de forme : coccoïde, allongée avec des protubérances et des bifurcations, en culture fraîche, elles adoptent souvent une morphologie caractéristique en forme de Y.



Figure1: *Bifidobacterium animalis* (WWW.doctissimo.fr) (consulté en 2011)

III- Métabolisme

Toutes les espèces de bifidobactéries sont nitrates-réductase-négative, mais sont cependant capables de réduire les nitrates en présence d'hémine. On trouve dans la majorité des espèces des souches possédant une activité urease. L'ammoniaque est généralement utilisée comme source d'azote par toutes les espèces (Scardovi, 1986).

Le genre *Bifidobacterium* se différencie surtout par la voie métabolique originale qu'il emprunte pour fermenter les hexoses (voie de bifid shunt), en produisant 3 moles de lactate, 2 moles d'acétate, de faibles quantités d'acide formique, d'éthanol et d'acide succinique, mais pas de CO₂ comme la bactérie hétéro lactique. La mise en évidence de ces métabolites par chromatographie, ou par la caractérisation de l'enzyme clé du shunt, la fructose-6P-phosphocetolase (F6PPK), permet de différencier efficacement ces bactéries des autres genres. (Scardovi, 1986) (Figure 2).

L'acidification des sucres est considérée comme importante pour l'identification des bifidobactéries, mais pour des raisons inexplicées, elle peut donner des résultats différents selon le moment où les souches ont été isolées.

Les résultats obtenus par Sakata et *al.*, (2002) et portant sur 25 souches de *Bifidobacterium longum* (12 souches de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, 11 souches de *Bifidobacterium longum* subsp *longum* et 2 souches de *Bifidobacterium longum* subsp *suis*) sont présentés ci-dessous :

-Toutes les souches fermentent le fructose, le glucose, le lactose, le maltose, le mélibiose, le ribose, le raffinose et le saccharose.

-Aucune souche ne fermente l'amygdaline, le cellobiose et le glycérol.

-Toutes les souches du *Bf. biovar infantis* fermentent le ribose mais aucune souche ne fermente le L-arabinose.

-Toutes les souches du *Bf. biovar longum* fermentent le L-arabinose, le ribose et le D-xylose ; aucune souche ne fermente l'amidon, l'esculine, l'inuline, le mannitol, la salicine et le tréhalose.

-Les deux souches du *Bf. biovar* fermentent le L-arabinose, le mannose et le D-xylose ; aucune des deux souches ne fermente l'amidon, la dextrine, l'esculine, l'inositol, l'inuline, le mannitol, le mélézitose, le ribose, le sorbitol, la salicine ou le tréhalose. (<http://WWW.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/longum.html>).

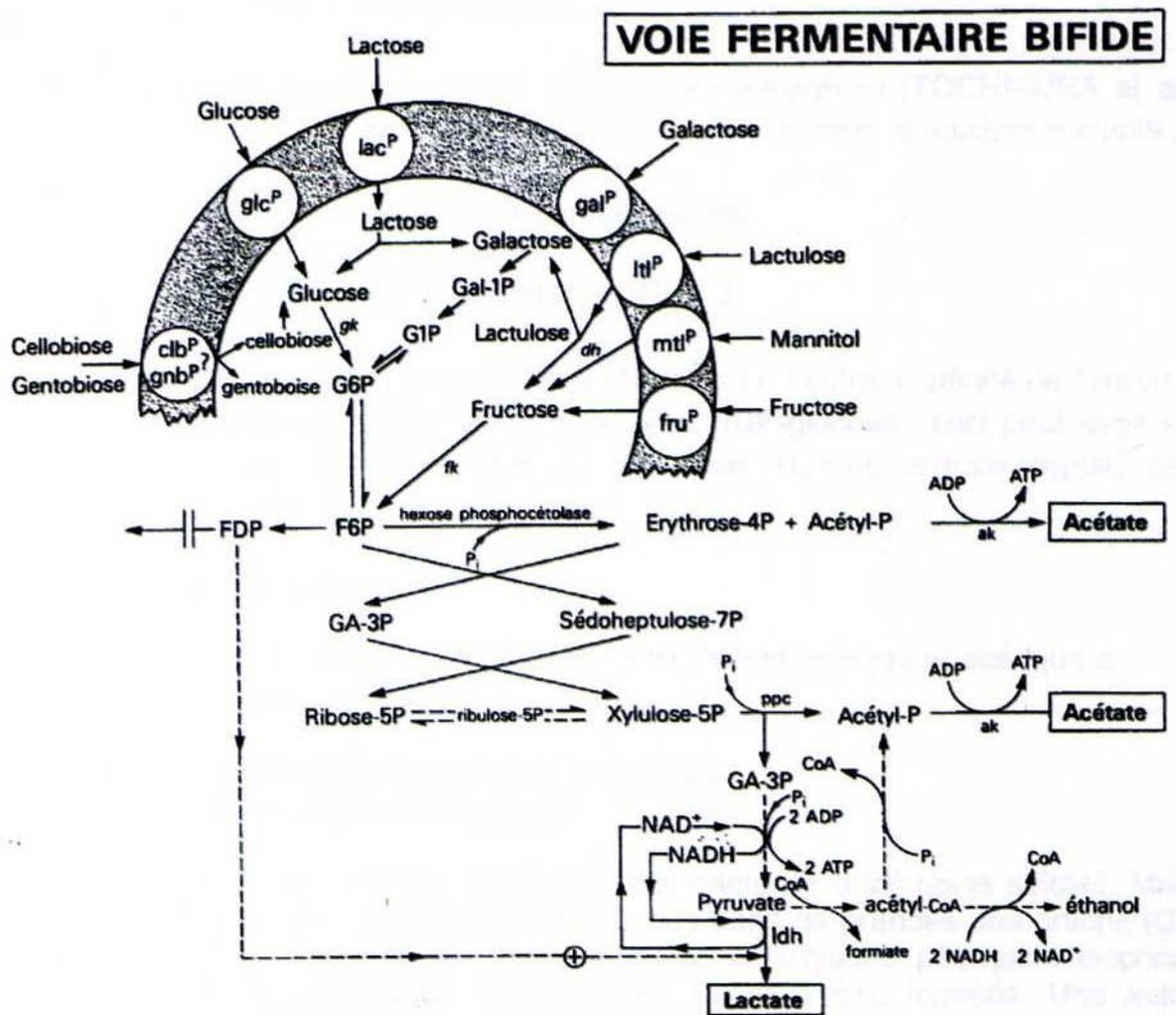


Figure N°2 : Transport et métabolisme des sucres par les bifidobactéries

(<http://WWW.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/longum.html>).

D'après Mattarelli et al. (2008), les principaux caractères bactériologiques permettant de différencier les trois sous-espèces sont les suivants (Tableau 6)

Tableau 6 : Quelques caractères biochimiques de trois souches de Bifidobactéries
(<http://WWW.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/longum.html>)

	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i>
Fermentation l'arabinose	+	-	+
Fermentation D-glucuronate	-	+	-
Fermentation mélézitose	+	-	-
Fermentation du ribose	+	+	-

VI- Ecologie

Chez l'Homme les bifidobactéries sont des commensaux de la bouche, de l'intestin, des branches et du vagin, chez l'animal ils sont surtout mis en évidence dans la flore intestinale. Elles ont été détectées dans la cavité buccale, la plus commune espèce *Bf. dentium* (Scardovi et Crociani, 1974), ce qui semble être impliqué dans la formation des plaques dentaires. Une analyse moléculaire des espèces bactériennes associées à l'enfance a révélé que les caries bifidobactéries pourraient être un contributeur majeur à l'apparition de caries profondes (Becker et al., 2001).

La microflore des nourrissons nourris uniquement au lait maternel est dominée par les bifidobactéries au cours de la première semaine, et il y a une diminution concomitante du nombre des *Enterobacteriaceae* (Yoshiota et al., 1983 ; Hopkins et al., 2001).

Les plus fréquemment détectées dans les fèces des espèces de nourrissons allaités sont *Bf. breve*, suivie par *Bf. infantis*, *Bf. longum* et *Bf. bifidum*, alors que dans les fèces des adultes la plupart des espèces détectées sont *Bf. adolescentis* et *Bf. catenulatum* (Matsuki et al., 1999).

Les bifidobactéries ont été trouvées dans les matières fécales des animaux tels que les lapins, les bovins, les souris, ainsi que les insectes (Tableau 7).

Tableau 7 : Les espèces de *Bifidobacterium* et leurs origines.

Espèce	Origine
<i>Bf. adolescentis</i>	L'intestin de l'adulte
<i>Bf. bifidum</i>	Les excréments de l'enfant.
<i>Bf. angulatum</i>	Les selles de l'homme.
<i>Bf. breve</i>	L'intestine du nourrisson.
<i>Bf. catenulatum</i>	L'intestin de l'adulte
<i>Bf. gallicum</i>	Les selles de l'homme.
<i>Bf. infantis</i>	L'intestine du nourrisson.
<i>Bf. longum</i>	L'intestin de l'adulte.
<i>Bf. pseudocatenulatum</i>	Les excréments de l'enfant.
<i>Bf. dentium</i>	Carie dentaire.
<i>Bf. lactis</i>	Yaourt.
<i>Bf. animalis</i>	Les excréments des animaux.
<i>Bf. boum</i>	Rumen des bovins.
<i>Bf. choerinum</i>	Excréments de porcs.
<i>Bf. cuniculi</i>	Fèces de lapin.
<i>Bf. gallinarum</i>	Excréments de poulet.
<i>Bf. suis</i>	Excréments de porcs.
<i>Bf. magnum</i>	Excréments du lapin.
<i>Bf. merycicum</i>	Rumen des bovins.
<i>Bf. pseudolongum subsp. Globosum</i>	Rumen des bovins.
<i>Bf. pseudolongum subsp. Pseudolongum</i>	Excréments de porcs.
<i>Bf. pullorum</i>	Fèces de poulet.
<i>Bf. ruminantium</i>	Rumen des bovins.
<i>Bf. saeculare</i>	Excréments du lapin.
<i>Bf. thermophilum</i>	Excréments de porcs.
<i>Bf. aerophilum</i>	Excréments porcins.
<i>Bf. psychroaerophilum</i>	Excréments porcins.
<i>Bf. thermacidophilum subsp. porcinum</i>	Fèces de porcelets.
<i>Bf. asteroides</i>	Excréments d'abeille.
<i>Bf. coryneforme</i>	Excréments d'abeille.
<i>Bf. indicum</i>	Excréments d'abeille.
<i>Bf. minimum</i>	Epuration des eaux usées
<i>Bf. subtile</i>	Epuration des eaux usées
<i>Bf. thermacidophilum subsp Thermacidophilum</i>	Eaux usées

VII- Spécificités biochimiques et culturelles

VII-1- Sensibilité à l'oxygène

Les bifidobactéries sont des bactéries anaérobies strictes. Mais la sensibilité à l'oxygène varie parmi les souches dans de grandes proportions (DeVrese et *al.*,2001). Les souches peu sensibles à l'oxygène pourraient disposer d'une faible activité catalasique détruisant les traces d'H₂O₂ formées. Une autre hypothèse explique l'absence de sensibilité

par le fait que la NADH oxydase de ces souches ne forme pas de H₂O₂. Chez les moyennement sensibles à l'oxygène, on observe souvent une accumulation de H₂O₂ qui bloque l'activité de la fructo-6-phosphate-phosphocétolase. Par contre, certaines extrêmement sensibles à l'oxygène n'accumulent pas d'H₂O₂. L'oxygène réprimerait la prolifération microbienne par l'intermédiaire d'un potentiel d'oxydoréduction trop élevé.

VII-2-pH et température

La plupart des bifidobactéries d'origine humaine poussent à une température optimale de 36 à 38°C (Rasick, 1983). Alors que celles d'origine animale supportent des températures plus élevées (43-45°C). En dessous de 20°C, leur croissance n'est plus détectable, ainsi qu'à des pH inférieurs à 5,0 ou supérieurs à 8,0 ; l'optimum étant compris entre 6,6 et 7.

VII-3-Milieus de culture

Elles se développent sur de nombreux milieux de culture en présence d'un agent réducteur tel que le chlorhydrate de cystéine ou l'acide ascorbique (Beerens., 1990).

Les bifidobactéries peuvent se développer sur d'autres milieux tels que le TPY (Trypticase peptone yeast) et le milieu Columbia Agar modifié par Beerens (1990). Ce dernier est sélectif et électif pour les bifidobactéries lorsque le pH est ajusté à 5 par l'action de l'acide propionique (Rasic, 1983). Il existe un 3^{ème} milieu appelé Bacto Brewn Anaerobic Agar Actinomyces Broth. Pour le dénombrement des bifidobactéries deux milieux sont utilisés. Le premier milieu, est le transgalactosylate oligo-saccharide (T.O.S) agar amélioré par le NPNL (mélange d'antibiotique, de sulfate de néomycine, de sulfate de paromomycine et d'acide nalidixique). Le second milieu, est le TOS agar modifié par le remplacement du TOS par L-arabinose.

Le milieu de culture utilisé pour l'isolement est MRS additionné à 5‰ de chlorhydrate de cystéine (Beerens, 1990), permet la réduction du potentiel d'oxydoréduction assurant ainsi une grande sélectivité pour les bactéries anaérobies strictes et donc un meilleur développement du genre *Bifidobacterium*.

VII-4-Spécificités biochimiques

Sur le plan biochimique, les bifidobactéries se différencient des autres espèces au niveau de la voie du Bifid-Shunt du fructose-6-P, en produisant 3 moles d'acétate pour 2 moles de lactate (Beerens, 1990). Le processus de la fermentation du glucose par

Bifidobacterium est présenté dans la figure 2 (Tamine et *al.*, 1995). Toutes les espèces de bifidobactéries sont nitrate-réductase négative (-) (pas de réduction des nitrates en nitrites) et catalase négative (-) à l'exception de *Bf. indicum* et de *Bf. asteroides* qui deviennent catalase positive(+) en présence d'air.

Les bifidobactéries représentent aussi d'autres caractères biochimiques comme :

-Non protéolytique (ne produit pas de H₂S)

-Absence de lipase et de phospholipase.

Les diverses espèces ou biotypes fermentent de façon constante le glucose, le lactose, le fructose, le galactose et le saccharose.

Un certain nombre de glucides sont fermentés de façon variable selon les biotypes (Tableau 8)

Tableau 8: Schéma d'identification des espèces du genre *Bifidobacterium* d'origine humaine. (Leclerc et *al.*, 1997)

1- Espèces mésophiles :	
<i>Bf. Bifidum</i>	Arabinose (-), xylose (-) Salicine (-), mannose (-)
<i>Bf. Infantis</i>	Mannitol(-), sorbitol (-) Inuline (+), tréhalose (+)
<i>Bf. Parvulorum</i>	Inuline (-), (ou plus lent), tréhalose (+) (lent)
<i>Bf. Breve</i>	Mannitol (+), sorbitol (+)
<i>Bf. Liberorum</i>	Arabinose (-), xylose (+) Salicine (+), Mannitol (+), mélézitose (+)(lent)
<i>Bf. Lactentis</i>	Salicine(-), Mannitol (+), Mélézitose (-)
<i>Bf. Adolescentis</i>	Arabinose (+), xylose (+), Salicine (+), Cellobiose (+)
<i>Bf. Longum</i>	Salicine (-), Cellobiose (-)
2- Espèces thermophiles :	
<i>Bf. Ruminale</i>	Arabinose (-), xylose (-)
<i>Bf. Pseudolongum</i>	Arabinose(+), xylose(+)

VII-7-Besoins nutritionnels

7-1-Besoins en acides aminés

Les bifidobactéries, à part quelques espèces d'origine animale, sont capables d'utiliser, comme seule source d'azote, les sels d'ammonium (Scardovi, 1986). Lorsqu'elles poussent en absence de source azotée organique, elles secrètent, en général, de grandes quantités d'acides aminés tels que thréonine, alanine, valine, acide aspartique.

7-1-Besoins en ions

Les besoins en ions ont surtout été étudiés chez *Bf. bifidum*. Cette espèce requiert pour cultiver la présence de fer, de magnésium et, à un moindre degré, de manganèse.

Le fer peut être présent sous ses deux formes :

- Fer ferreux : le fer ferreux est assimilé essentiellement à pH acide (Bezkorovainy et Ibrahim, 1993). Son incorporation est régie par plusieurs facteurs :
 - à faible concentration, le transport de la molécule dans la bactérie est sous la dépendance de la température et de la production d'une substance produite par le microorganisme.
 - à forte concentration, l'affinité du genre pour le fer diminue et l'incorporation devient indépendante de la température et des sécrétions bactériennes.

Le transport de la molécule dépendrait, dans les deux cas, d'une ATPase membranaire et son incorporation est inhibée compétitivement par le zinc.

- Fer ferrique: *Bf. bifidum* ne l'incorpore qu'à pH neutre. Dans ce cas, il possède deux systèmes d'assimilation selon le mode de présentation du fer. Sous forme monomère (en présence de citrate), le transport dépend de la température et de la présence d'une substance sécrétée par la bactérie, et est inhibé par différents inhibiteurs métaboliques. A l'inverse, la forme polymérique est incorporée sans que ces différents facteurs n'interviennent. Les deux systèmes sont saturables par le fer, indiquant ainsi la présence d'un transporteur associé à la membrane et (ou) un nombre limité de sites récepteurs à la surface de la bactérie.

Comparant le système de piégeage du fer chez *Bf. breve* à celui décrit chez *Bf. bifidum*, observent de grandes similitudes (affinité pour le fer ferreux, mécanisme de piégeage de type enzymatique sensible à la température, existence de deux systèmes de transport) mais aussi quelques différences (plus grande indépendance du système vis-à-vis d'une source exogène de carbone comme le lactose, le pH optimum d'activité 6,0 à 5,0). Les auteurs démontrent en outre la présence d'une ferri-réductase permettant de passer de l'état ferrique à l'état ferreux. Ils attribuent au nombre élevé de modèles d'incorporation du fer une signalisation fonctionnelle.

Les mécanismes d'assimilation du fer ferrique et du fer ferreux de forte affinité sont probablement destinés aux propres besoins de la bifidobactérie. Par contre, le modèle fer ferreux de faible affinité présente un intérêt dans la protection intestinale de l'enfant. En effet, la virulence des bactéries dépend souvent de la disponibilité en fer du milieu ambiant. Or, chez l'enfant nourri au sein, le pH des selles est voisin de 5 et l'environnement microbien anaérobie du tube digestif favorise la réduction du fer sous forme ferreux, qui peut alors être piégé par les bifidobactéries. La déplétion relative en ions qui en résulte, participerait à la protection observée dans ce groupe humain. Le pH bas, supporté moyen de lutte contre les bactéries invasives, est semble-t-il, généré par les bifidobactéries. Or, la production d'acide par ces bactéries est fonction de la concentration en fer du milieu (Bezkorovainy et Ibrahim, 1993), ce qui indiquerait que ce métabolisme dépend de ferrozymes. Cependant, aucune vérification *in vivo* n'a été faite jusqu'à ce jour mais le rôle conjoint des *Bifidobacterium* et du fer ne doit pas être négligé.

7-3-Besoins vitaminiques

Les besoins en vitamines des bifidobactéries ne dépendent pas de leur localisation écologique. Il n'y a pas d'exigences communes pour le genre et, même au sein des espèces humaines, les comportements sont très variables. Cependant, de nombreuses souches d'origine humaine sont capables de produire des vitamines (Deguchi et *al.*, 1935) qu'elles libèrent dans le milieu. Cette capacité est variable selon les espèces. Deguchi et *al.* (1935) distinguent ainsi trois groupes, sur la base de la production et de la libération de : thiamine, acide nicotinique et acide folique. *Bf. bifidum* et *Bf. infantis* les accumulent en grande quantité alors que *Bf. breve* et *Bf.*

longum sont faibles producteurs. Parmi ces derniers, il existe des souches ne synthétisant aucune vitamine, comme c'est le cas pour *Bf. adolescentis*.

Les procédés de régulation diffèrent entre ces trois groupes. Ainsi, l'apport de thiamine dans le milieu réduit le taux de thiamine accumulée en culture chez les souches faiblement productrices (*Bf. longum*), alors qu'il n'affecte pas celui de souches fortement productrices (*Bf. bifidum*).

III-1.Historique

La spiruline est un des primitifs organismes apparus sur la terre, il y a plus de 3,5 milliards d'années. Elle n'a pas évolué (Vidal, 2008).

Cette algue croît à l'état naturel dans des lacs saumâtres, saturés de soude, dans des régions chaudes de la terre.

Elle est découverte par les européens lors de la conquête de l'Amérique. Le conquistador Cortès rapportait que les Astèques promenaient à la surface du Lac Texcoco des filets à mailles très serrées pour récolter une sorte de boue colorée qu'ils faisaient sécher au soleil pour former ensuite des galettes appelées « **Tecuitlatl** » et qu'ils consommaient pour améliorer leurs performances lors d'activités physiques intenses (Vidal, 2008).

En Afrique, certaines tribus du Sahara, consomment depuis bien longtemps la spiruline, puisée dans des lacs et mares où elle croît à l'état naturel, sous forme de galette nommée « **Dihé** » (Vidal, 2008).

Une mission scientifique redécouvre la spiruline dans les années 40 au Tchad. Les études sur cette algue ne démarrent véritablement que dans les années 60. Dans les années 70, la spiruline devient appréciée dans les pays industrialisés du fait de ses excellentes propriétés nutritionnelles.

Par ailleurs, il est utile de mentionner les travaux menés par la **NASA** et l'Agence Spatiale Européenne quant à l'utilisation de la spiruline dans de futures stations spatiales (Falquet et Hurni, 2006).

III-2.Répartition géographique

La spiruline se développe préférentiellement dans des eaux chaudes, alcalines et riches en nutriments azotés et phosphorés. Plus communément, elle s'observe dans les eaux saumâtres, ainsi que dans les lacs salins de régions tropicales et semi-tropicales (Castenholz et al., 2001). Son caractère thermophile et ses besoins importants en lumière limitent son aire de répartition à une bande intertropicale située environ entre 35° de latitude Nord et 35° de latitude Sud.

Sa forte plasticité écologique permet de la retrouver à l'état naturel à la fois dans les lacs alcalins en Afrique (Tchad, Ethiopie et Tunisie), en Amérique latine (Mexique et Pérou),

en Asie du Sud (Inde, Sri Lanka et Thaïlande). Cet organisme est dit ubiquiste. Il est cependant beaucoup moins abondant en Amérique du Nord et en Europe.

III-3. Biologie

III-3.1- Taxonomie

La spiruline est une cyanobactérie (anciennement désignée par le terme « algue bleue puis cyanophycée). Elle appartient donc au domaine des bactéries et se classe parmi les bactéries gram négatives. Les cyanobactéries forment l'essentiel des bactéries capables de photosynthèse avec production d'oxygène et peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires. (Charpy et al., 2008).

Tableau n°9: Taxonomie de la spiruline.

Règne	<i>Monera</i>
Sous règne	<i>Procaryota</i>
Phylum	<i>Cyanophyta</i>
Classe	<i>Cyanophyceae</i>
Ordre	<i>Nostocales (= Oscillatoriales)</i>
Famille	<i>Oscillatoriaceae</i>
Genre	<i>Arthrospira</i>
Sous genre	<i>Spirulina ou Arthrospira</i>
Espèce	<i>Arthrospira platensis, Maxima, Lonar</i>

(Vidalo, 2008).

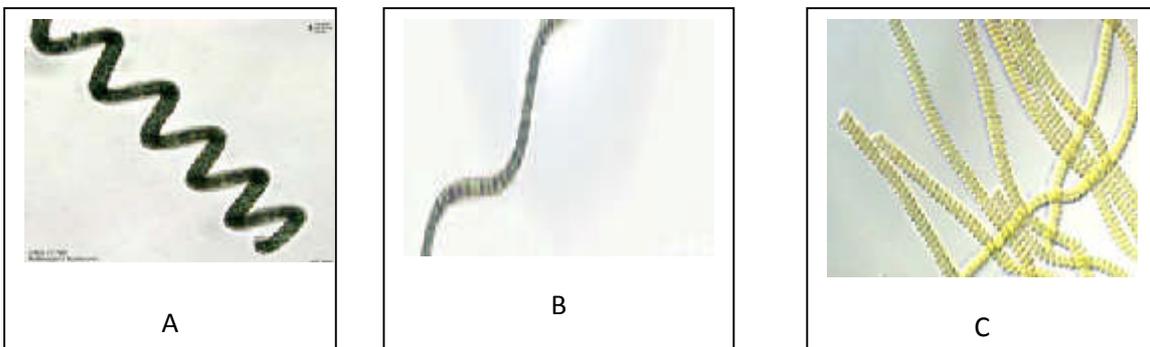
III-3.2- Morphologie et caractères généraux

La spiruline est une cyanophycée microscopique d'une longueur moyenne d'environ 250µm.

Elle est composée de filaments mobiles de 10 à 12 µm de diamètre non ramifiés et enroulés en spirale, généralement en 6 ou 7 spires. Cette forme hélicoïdale lui donnant l'allure d'un minuscule ressort lui a valu son appellation de « spiruline » (Geitler, 1932). Cependant les Spirulines présentent différentes formes (Figure n°3). On trouve des formes spiralées classiques, ondulées et parfois droites. Cette particularité est en relation directe

avec les conditions écologiques rencontrées dans leur habitat. Plus précisément, la Spiruline est constituée de cellules transparentes empilées bout à bout formant ainsi un filament ou trichome.

L'enroulement du trichome sur lui-même s'effectue suivant le sens des aiguilles d'une montre lorsqu'on regarde au dessus de la spirale. Les facteurs environnementaux tels la température auraient cependant une influence sur l'orientation de l'hélice, (Gerchwin et Belay, 2008). Cette morphologie typique lui permet de se déplacer dans l'eau en adoptant le mouvement d'une vis.



A = Forme spiralée (*Arthrospira fusiformis*) Image provenant du site www.utex.org,
B= Forme ondulée (*Spirulina maxima*) Image provenant du site www.utex.org,
C = *Arthrospira platensis* <http://www.nies.go.jp/biology/mcc/images/PCD4211/0049L.jpg>

Figure n°3 : Différentes formes prises par la Spiruline (Charpy et *al.*, 2008).

III-3.3-Cycle biologique

Le filament de Spiruline à maturité forme des cellules spéciales appelées nécriides. Elles se différencient des autres cellules par leur aspect biconcave et sont assimilées à des disques de séparation. A partir de ces derniers, le trichome se fragmente pour donner de nouveaux filaments de 2 à 4 cellules appelés hormogonies. Les hormogonies vont croître en longueur par division binaire et prendre la forme typique hélicoïdale. Le temps de génération maximal de la Spiruline est de l'ordre de 7 heures (Zarrouk 1966).

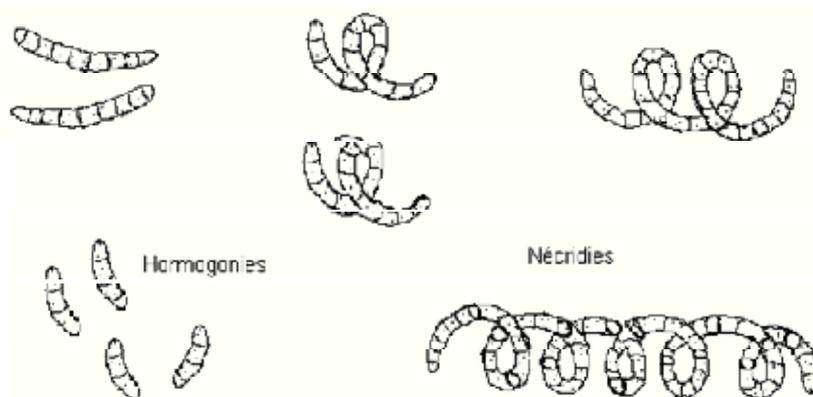


Figure n°4: Cycle biologique de la Spiruline (Balloni et *al.*, 1980).

III-3.4-Conditions physiques et chimiques de croissance

Pour se développer, la Spiruline a besoin d'éléments minéraux simples tels l'eau, les sels minéraux, le CO₂ et l'O₂ qu'elle puise directement dans son milieu tout en utilisant la lumière solaire comme source d'énergie grâce à son système pigmentaire. La spiruline croît dans des milieux naturels caractérisés par des eaux saumâtres, chaudes, alcalines (8 < pH < 11,5) et natronées (fortement concentrées en carbonates et bicarbonates) de la zone intertropicale.

En règle générale les phosphates, les carbonates, les nitrates et le fer, sont les éléments limitants de la production phytoplanctonique dans les milieux aquatiques. La spiruline se développe dans des eaux chaudes (28 à 40°C) et bénéficiant d'une intensité lumineuse élevée. Le vent joue un rôle important en créant une agitation qui favorise une dispersion homogène de la spiruline dans le milieu, et donc son exposition à la lumière. (Jourdan, 2006).

III-4.Composition

La composition de la spiruline dépend des éléments chimiques dont elle dispose dans le milieu. En milieu cultivé, il est possible de jouer sur les intrants et d'influer sur sa composition (Charpy et *al.*, 2008).

III-4.1-Glucides

Les glucides constituent globalement 15 à 20% de la matière sèche de la spiruline (Ciferri, 1983) avec très peu de glucides simples 7-8% (Richmand, 1992) ; ce sont le glucose, le fructose et le saccharose. On trouve aussi des polyols comme le glycérol, le mannitol et le sorbitol, mais surtout des glucides complexes (polymères) tels que des glucosanes aminés (1.9%) et des rhamnosanes aminés (9.7%) et du glycogène (0.5%) (Falquet et Hurni, 2006).

III-4.2-Protéines et acides aminés**a) Protéines**

La teneur en protéine de la spiruline est élevée. Elle représente 10 à 11% de sa masse humide, soit 60 à 70% de sa matière sèche (Clément, 1975, Fox, 1999). Ce pourcentage est bien plus élevé que celui du poisson (25%), du soja (35%), de la poudre de lait (35%) ou des céréales (14%) (Henrikson 1994).

La Spiruline est très riche en matières azotées et en contient deux fois plus que le soja, trois fois plus que la viande ou le poisson. Cette richesse est cependant à relativiser compte tenu de la faible quantité de Spiruline utilisée en complément alimentaire (<10g par jour) (Costa et *al.*, 2002).

b) Acides aminés

La spiruline contient tous les acides aminés essentiels qui représentent 47% du poids total des protéines et elle contient également tous les acides aminés non essentiels. (Burjard et *al.*, 1970).

Tableau n°10 : Composition en acides aminés (mg/100g de spiruline sèche).

Acides aminés essentiel	Teneur	Acides aminés non essentiel	Teneur
Isoleucine	3500	Alanine	4590
Leucine	5380	Arginine	4310
Lysine	2960	Acide aspartique	5990
Méthionine	1170	Cystine	590
Phénylalanine	2750	Acide glutamique	9130
Thréonine	2860	Glycine	3130
Tryptophane	1090	Tyrosine	2500
Valine	3940	proline	2300
Histidine*	1000	sérine	2760

*essentiel pour l'enfant

(Gerchwin et Belay, 2008).

III-4.3-Lipides et acides gras

✓ Lipides totaux

La teneur en lipides totaux de la spiruline varie de 6 à 13% (Xue et *al.*, 2002). On distingue les lipides saponifiables (83%) et insaponifiables (17%) contenant essentiellement des paraffines, des pigments et des stérols (Clément, 1975).

Les triglycérides sont rares, 0.3% et on détecte en outre 406 de phospholipides indéfinis (Gerchwin et Belay, 2008).

✓ Acides gras

La spiruline présente un rapport Oméga 6/ Oméga 3 le plus pertinent pour la physiologie humaine (Vidal, 2008) ; elle contient 17,43% d'acide linoléique (Oméga 3). Elle contient en plus 5,26% d'acide oléique (Oméga) (Singh et *al.*, 2005)(voir tableau n°11).

Tableau n°11: Composition en acide gras de 100g de spiruline sèche.

Acide gras	Taux(%)
Acide myristique (C14)	0.23
Acide palmitique (C16)	25.8
Acide palmitique (C16 :0)	46.07
Acide palmitoléique (C16 :1) oméga 6	1.26
Acide oléique (C18 :1) oméga 6	5.26
Acide linoléique (C18 :2) oméga 3	17.43
Autres acides	20.88

(Ogles et Pire, 2001).

III-4.4-Vitamines

La spiruline a également une teneur extrêmement élevée en vitamine A (Belay, 1997) et elle est la deuxième source de vitamines du groupe B après la levure de bière (Tokai et *al.*, 1987).

La spiruline est riche en vitamine B12 qui est la vitamine la plus difficile à obtenir dans un régime sans viande (végétarien), et aucun végétal courant n'en contient (la spiruline étant plus riche en vitamine B12 que le foie du bœuf) (Richmand, 1992) (Tableau n°12).

Tableau n°12 : Composition de la spiruline en vitamines (mg/Kg de matière sèche).

Vitamines	Teneur en (mg/Kg) de matière sèche	ANC*
β Carotène (pro-A)	1700	1.8
Thiamine (β 1)	55	1.3
Riboflavine (β 2)	40	1.6
Pyridoxine (β 6)	3	1.8
Cyanocobalamine (β 12)	0.4	0.0024
Acide ascorbique (C)	traces	110
Tocophérol (E)	190	12
Acide nicotinique (pp) ou β 3	118	14
Acide folique (β 9)	0.5	0.33
Biotine (H) (β 8)	0.4	0.05

(Tabutin et *al.*, 2002).

*Apport nutritionnels conseillés (ANC en mg/jour pour un adulte) par l'AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire et alimentaire).

III-4.5-Sels minéraux

La spiruline contient tous les minéraux essentiels (Babadzhanov et *al.*, 2004) comparée au riz, au blé, au maïs ou encore au soja. La spiruline contient 4 à 10 fois plus de potassium, 10 à 80 fois plus de sodium, et 70 fois plus de calcium que le lait (Vidal, 2008) (Tableau n°13).

Tableau n°13 : Composition de la spiruline en minéraux en mg/10g de spiruline sèche.

Minéraux	Teneur en (mg/10g) de MS	ANC (mg/jour)*
Calcium	13-140	900
Phosphore	67-90	750
Magnésium	20-29	360-420
Fer	5,80-18	9-16
Zinc	0,21-0,40	10-12
Cuivre	0,08-0,10	1,5-2
Chrome	0,028	0,55-0,65
Manganèse	0,25-0,37	5
Sodium	45	500
Potassium	64-154	3500

(Falquet et Hurni, 2006).

*les apports nutritionnels conseillés par l'AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire et alimentaire).

III-4.6-Pigments

La spiruline contient des chlorophylles, dont la chlorophylle A (typique des végétaux), des caroténoïdes dont le principal est le β -carotène, phycocyanine et la phycoérythrine (Tableau n°14).

Tableau n°14 : Teneurs en pigments en mg/10g de matière sèche de spiruline.

Pigments	Teneur en mg/10g de MS
Chlorophylles totales	115
Chlorophylle a	61-75
Caroténoïdes (orange)	37
Phycocyanine	1500-2000
Phycoérythrine (rouge).	2900-10000

(Pierloviisi, 2007).

III-5.Valeur nutritionnelle

Quand on examine la composition de la spiruline, on en déduit rapidement sa valeur nutritionnelle importante (figure n°5).

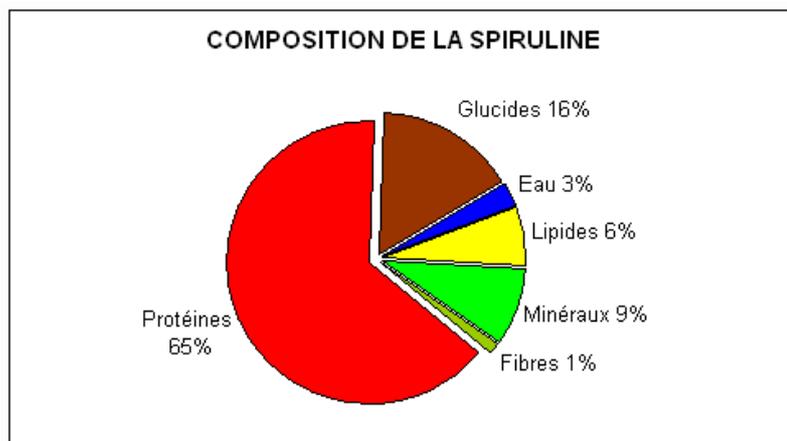


Figure n°5: composition de la spiruline (Vertelburkina, 2008).

La spiruline est le complément alimentaire idéal des régimes à base de céréales en raison de :

1. **Sa teneur en protéines très élevée :** 60 - 70% de son poids, soit 2 fois plus que dans le Soja et 3 fois plus que dans les viandes et poissons en général. De point de vue qualitatif, les protéines de la spiruline sont complètes, car tous les acides aminés essentiels y figurent. De plus, tous ces acides aminés essentiels se retrouvent en quantité équilibrée (Falquet, 1996).
2. **La présence de nombreux minéraux essentiels :** par sa teneur en Fer. La spiruline se révèle donc être d'un grand intérêt pour prévenir et traiter les anémies et aussi pour les végétariens, les sportifs, les femmes enceintes (Falquet, 1996).
3. **Sa composition en vitamines:** la Vitamine A (sous forme de précurseur: le β -carotène) est présente dans la spiruline en quantité particulièrement élevée (15 fois plus que dans la carotte). De plus, l'absence de rétinol (vitamine A libre) exclut un éventuel risque de surdosage, le β -carotène n'étant pas toxique par accumulation au contraire de la vitamine A.

On trouve également dans la spiruline : la vitamine E ainsi que toutes les vitamines du groupe B, dont la rare vitamine B12 qui est de loin la plus difficile à obtenir dans un régime sans viande car aucun végétal courant n'en contient ; or, la spiruline en contient 4 fois plus que le foie cru, longtemps considéré comme la meilleure source. (Falquet, 1996).

4. **Son apport en lipides essentiels :** renfermant notamment des acides gras des groupes ω -3 et ω -6 dont l'acide γ -linoléique, de haute valeur alimentaire bien que de source assez rare (Falquet, 1996).

III-5. Bienfaits de la spiruline pour la santé

Sa valeur nutritive est indéniable. Mais certaines vertus thérapeutiques vantées dans les publicités ne sont pas scientifiquement prouvées, des études restent à faire et coûtent très chers. Cette molécule ne pouvant être brevetée, elle n'intéresse guère les laboratoires pharmaceutiques. La spiruline ouvre des perspectives même dans le domaine de la lutte contre le cancer et le renforcement des défenses immunitaires, à confirmer cliniquement dans l'avenir. La spiruline est utilisée pour les vertus nutritionnelles et médicinales exceptionnelles qu'on lui attribue :

- Elle corrige les carences de l'alimentation moderne si pauvres en minéraux et vitamines (si on l'associe à de la vitamine C car elle en contient très peu, elle équilibre l'alimentation),
- Facilite l'élimination,
- Régule l'appétit, a un effet coupe-faim,
- Augmente l'énergie vitale,
- Améliore les échanges cellulaires,
- Accroît les défenses naturelles de l'organisme,
- Elle a des vertus antioxydantes qui permettent de lutter contre le stress oxydatif et le vieillissement cellulaires
- Protège les cellules du système sanguin,
- Favorise le bon cholestérol,
- Revitalise les os, la peau, les cheveux et les ongles,
- Favorise la prise de muscles,
- Lutte contre l'anémie et les carences en fer,
- Soigne l'asthénie,
- Augmente l'endurance physique et intellectuelle,
- Accélère la convalescence et aide à la récupération après une intervention chirurgicale ou un effort intense,
- Joue un rôle de purifiant et de nettoyant organique,

La spiruline **convient à tous** : enfants, adolescents, adultes, seniors, femmes enceintes ou allaitantes, sportifs, végétariens, en cours d'un régime amincissant, pour retarder Les effets du

vieillesse et atténuer la fatigue. La spiruline sert aussi de complément alimentaire pour les animaux (chiens, chats, chevaux, oiseaux de volière, poissons).

Consommer de la spiruline est un atout non négligeable pour faire face au problème de malnutrition (Michka, 1992).

III -6.Conservation et conditionnement

III -6.1- Conservation

La spiruline se conserve dans un endroit sec et à l'abri de la lumière durant deux ans maximum suivant la date de sa fabrication. Cependant, à l'abri total de la lumière et de l'humidité, elle peut se garder encore plus longtemps (Michka et Falquet, 2005).

III -6.2- conditionnement

La Spiruline sèche est broyée sous forme de poudre ou sous forme de paillettes et conservée dans un récipient étanche à l'abri de l'humidité et de la lumière. La spiruline peut être conditionnée dans des sachets, boîtes ou flacons sous formes de brindilles, de poudre, de gélules et de comprimés (Vidal, 2008).

Cette présente étude a été réalisée au niveau du laboratoire de contrôle de la qualité de l'industrie agro-alimentaire (I.A.A) de Sidi Abdelkader –Blida.

➤ **Problématique**

Les antibiotiques par leur effet bactéricide et/ou bactériostatique déséquilibrent la flore intestinale et peuvent induire une diarrhée en particulier par le fait de l'émergence de souches pathogènes. Certains de ces souches habituellement saprophytes peuvent devenir pathogènes comme *Klebsiella*, *Condida*, *Escherichia coli*. La fréquence des diarrhées secondaires à la prise. Le but de cette présente étude est de préconiser un complément alimentaire à base de spiruline pour un traitement préventif et thérapeutique afin de protéger la flore intestinale utile (effet barrière).

L'objectif de cette présente étude est de réaliser les étapes suivantes :

1. Préparation d'un complément alimentaire à base de spiruline et de probiotique.
2. Contrôle microbiologique et physicochimique de l'aliment.
3. Etude *in vitro* de l'évolution des comptes des bifidobactéries.

I-Matériel et Méthodes

I-1.Matériel

I-1.1-Matériel non biologique

Un matériel de routine présent dans les laboratoires d'autocontrôle (appareillage, verrerie, milieux de cultures, solutions et autres) (voir annexes 1, 2 et 3).

I-1.2-Matériel biologique

Notre travail commence par un contrôle microbiologique et physicochimique de la matière première (lait écrémé et spiruline).

- a) **Le lait écrémé** : poudre de lait (0%de matière grasse) est procurée par l'unité de Beni Tamou (Blida), dont le pays d'origine est la Belgique, lot N°16 emballé dans trois sachets stérile de papier Kraft et un sachet stérile en plastique, la date de fabrication est le : 01/01/2011 et la date de péremption est

le : 01/07/2012(l'échantillonnage est effectué d'une manière à obtenir des échantillons représentatifs du produit, c'est une opération qui demande le plus grand soin).

- b) **La spiruline** : est récoltée et séchée dans la région de Tamanrasset.
- c) **Une souche bifide** autochtone isolée en Algérie à partir ses selles d'un nourrisson allaité exclusivement au sein.

I-2.Méthodes

I-2.1-Analyses physico-chimiques

Le contrôle de la qualité physico-chimique a pour but d'analyser les matières premières, produits finis et produits intermédiaires en passant par les différents paramètres (pH, EST,.....).

Les analyses physico-chimiques effectuées sur la matière première sont motionnés dans le tableau n°15.

Tableau n°15: Les analyses physico-chimiques effectuées sur la matière première.

Matières à analyser	Poudre de lait	La spiruline
Analyses effectuées	-pH - Acidité titrable (°D) - Taux d'humidité H(%) - Taux de MS (EST) (%)	- pH - Acidité - Densité (D°) - Taux des cendres - Taux d'humidité H(%) - Taux de M S (EST) (%) - Taux de M G(%)

a) **Détermination du pH (selon NF V04-035)**

➤ **Principe**

Dispersion de la spiruline sèche dans l'eau distillée et mesure directe du pH à l'aide d'un pH mètre.

➤ **Mode opératoire**

Dans un bécher, on pèse $3 \pm 0,003$ g de l'échantillon

On ajoute 30 ml d'eau distillée fraîchement bouillie et refroidie

On mélange bien à l'aide d'une baguette de verre, jusqu'à complète dispersion de la prise d'essai

On introduit l'électrode dans l'échantillon, la mesure du pH est faite directement sur du Ph mètre.

b) Détermination de la teneur en eau (Taux d'humidité) (selon NA 666)

✓ **Définition**

On entend par la teneur en eau du lait sec ou de la spiruline sèche la perte de masse de ce produit lorsqu'il est soumis à dessiccation.

✓ **Principe**

Dessiccation à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ d'une quantité déterminée de produit jusqu'à une masse constante.

✓ **Mode opératoire**

-On place la capsule dans l'étuve au moins pendant 1 h à la température de $103 \pm 2^\circ\text{C}$.

-On laisse la capsule refroidir dans le dessiccateur à température ambiante pendant 30 min, puis on la pèse.

-On introduit rapidement 2 g de l'échantillon dans la capsule et pèse, puis place dans la capsule pendant 3 h dans l'étuve.

-On laisse la capsule refroidir dans le dessiccateur à température ambiante pendant 30 min puis on la pèse.

✓ **Expression des résultats**

La teneur en eau est exprimée en pourcentage en masse de produit est donnée par la formule :

$$H = (M_1 - M_2 / M_1 - M_2) * 100$$

H : la teneur en eau.

M 0 : la masse en (g) de la capsule.

M 1 : la masse en (g) de la capsule et de la prise d'essai avant dessiccation.

M 2 : la masse en (g) de la capsule et de la prise d'essai après dessiccation.

❖ **L'extrait sec total**

$$\text{EST} = 100 - \text{H}\%$$

c) **Détermination de l'acidité titrable**

➤ **Principe**

Le principe consiste à mesurer l'acide lactique, elle est déterminée par titrage volumique à l'aide d'une solution alcaline (Guiraud, 1998).

➤ **Mode opératoire**

On introduit dans un bécher 10ml de l'échantillon à analyser puis on titre avec un titrage avec une solution sodique (N/9) en présence de 2-3 gouttes de phénol phtaline à 1%, jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle.

d) **Détermination du taux des cendres totales**

➤ **Principe**

Destruction des matières organiques d'une prise d'essai par chauffage à une température de 550°C en présence d'éthanol, jusqu'à l'obtention d'une masse constante.

➤ **Mode opératoire**

On pèse 2 g de spiruline dans une capsule.

On verse 2 ml d'éthanol sur la prise d'essai et on enflamme durant 2h

On refroidit et on humidifie les cendres avec quelques gouttes d'eau et on chauffe à nouveau dans le four à moufle durant 1h

On transfère la capsule dans le dessiccateur et on la laisse refroidir à la température ambiante et on pèse.

➤ **Expression des résultats:**

$$C = (M_2 - M_0) * 100 / (M_1 - M_0) * 100 / 100 - H$$

C : taux des cendres totales

M₀ : la masse en grammes de la capsule vide

M₁ : la masse en grammes de la capsule et la prise d'essai

M₂ : la masse en grammes de la capsule et les cendres totales

H: la teneur en eau exprimée en pourcentage.

e) Détermination de la matière grasse (par Soxhlet selon ISO 659)

➤ **Principe**

L'extraction de la matière grasse avec un solvant (l'éther de pétrole), puis l'élimination du solvant et la matière grasse.

➤ **Mode opératoire**

- Dans une capsule en verre, on pèse 5 à 10g de la spiruline sèche.
- On met la capsule dans l'étuve réglée à 103±2°C pendant 2 heures.
- On retire la capsule et on la met dans le dessiccateur.
- Après refroidissement, mettre la spiruline dans une cartouche d'extraction.
- L'extraction de la matière grasse se fait par 150ml de l'éther de pétrole qui dissout graduellement la matière grasse ; le solvant contenant la matière grasse retourne dans le ballon par déversements successifs causés par un effet de siphon dans le coude latéral.
- Une fois l'extraction terminée, l'éther de pétrole et la matière grasse sont récupérés.
- Laisser refroidir dans le dessiccateur.

- Peser le bécher contenant la matière grasse (figure).

➤ **Expression des résultats**

$$\% \text{ lipides} = \frac{p1 - p2}{p} * 100$$

P : prise d'essai.

P1 : poids du ballon vide.

P2 : poids du ballon avec la matière grasse.

I.2.2-Les analyses microbiologiques

Pour les analyses microbiologiques, ces dernières ont été effectuées dans des conditions stériles (autour du bec bunsen).

Avant d'entamer les analyses, on prépare les solutions mères et les dilutions décimales.

❖ **Préparation des dilutions décimales**

Pour la spiruline liquide et le lait liquide, prélever à l'aide d'une pipette stérile 25 ml de la spiruline liquide ou le lait liquide puis lui additionner 225 ml d'eau physiologique dans un flacon stérile, on obtient la dilution 10^{-1} .

Pour le lait en poudre et la spiruline sèche, peser aseptiquement 25 g dans un récipient stérile et taré ; ajouter ensuite 225 ml d'eau physiologique pour obtenir la dilution 10^{-1} , puis homogénéiser en agitant avec les mains.

Toutes les manipulations s'effectuent avec un maximum de précision et de manière aseptique.

A l'aide d'une nouvelle pipette pasteur stérile, prélever 1 ml de la dilution 10^{-1} précédente et l'introduire dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique. Le tube est agité manuellement pour rendre la dilution homogène et on obtient une dilution de 1/100 ou 10^{-2} . On jette la pipette utilisée au bout d'une fois. On procède de la même manière pour les autres dilutions.

Les analyses microbiologiques effectuées sur la matière première sont motionnés dans le tableau n°16.

Tableau n°16: Les analyses microbiologiques effectuées sur la matière première.

Matières à analyser	Poudre de lait*	La spiruline**
Analyses effectuées	- Germes aérobies mésophiles totaux à 30°C (GAMT) -Coliformes totaux et thermo tolérants. -Staphylococcus aureus. -Salmonella. -Levures et moisissures. - <i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs à 46°C.	- Germes aérobies mésophiles totaux à 30°C (GAMT) -Coliformes fécaux - <i>Staphylococcus aureus</i> -Salmonelles -Les sulfito- réducteurs et <i>Clostridium perfringens</i>

* Les germes recherchés dans le lait entier Selon le journal officiel (N° 35 correspondant au 27 Mai 1998),

** Les germes recherchés dans la spiruline selon Jourdan, (2006).

a) Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux (GAMT) (selon NA 1207)

Il s'agit de l'ensemble des microorganismes capables de se multiplier en aérobiose à des températures optimales de croissance comprises entre 20° et 45°C.

✓ Principe

La croissance de la plupart des bactéries est favorisée par les substances nutritives apportées par la peptone, les facteurs de croissance de l'extrait de levure et le glucose utilisé comme source énergétique.

✓ Mode opératoire

- A partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-3} , on porte aseptiquement 1 ml dans une boîte de pétrie vide, stérile et codifiée.

- On complète avec 20 ml de gélose PCA fondue puis refroidie à 45°C.
- On fait par la suite des mouvements circulaires en forme de 8 pour bien mélanger l'inoculum avec la gélose.
- On laisse solidifier sur pailleasse.
- L'incubation se fait à 30°C pendant 72h (figure n°6).



Figure n°6 : Recherche des germes aérobies mésophiles totaux (gélose PCA).

✓ **Lecture et dénombrement**

Les colonies de GAMT se présentent sous forme lenticulaire. On ne dénombre que les boites renfermant entre 15 et 1580 colonies. On multiplie par la suite le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution, puis on effectue la moyenne du nombre des colonies entre les différentes dilutions.

b) Recherche et dénombrement de coliformes totaux

Ils appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*, ceux sont des bacilles Gram-, asporulés, oxydase-, aéro-anaérobies facultatifs, capables de se développer en présence des sels biliaires, et de fermenter le lactose avec production de gaz. Ces bactéries sont vivantes naturellement dans l'intestin, la présence de ces germes dans le produit à analyser traduit une contamination fécale récente (Giraud, 1998).

✓ **Technique**

A l'aide d'une pipette stérile, on prélève 1 ml de chaque dilution (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), on l'ensemence dans des boites de pétries stériles puis compléter avec environ 20 ml de gélose désoxycholate fondu et refroidi faire ensuite des mouvements circulaires pour permettre de mélanger l'inoculum avec la gélose.

Après refroidissement, on incube les boîtes à 37°C pendant 24h.

✓ **Lecture**

Le nombre des colonies doit être compris entre 30 et 300 (Giraud et Galzy, 1980).

c) Recherche et dénombrement des coliformes fécaux

Les coliformes fécaux (*Escherichia coli*) sont des bacilles Gram-, aéro-anaérobie facultatifs, thermo-tolérants, fermentent le lactose et produisent de l'indole à 44°C (Bourgeois et Leveau, 1980).

✓ **Technique**

On suit les mêmes étapes pour le dénombrement des coliformes totaux mais les boîtes sont incubées à 44°C pendant 24 heures.

✓ **Lecture**

Dénombrer les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies.

d) Recherche et dénombrement des *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une coque Gram+, catalase+, aéro-anaérobie ; il métabolise le glucose par la voie fermentative.

Staphylococcus aureus est l'espèce la plus fréquemment impliquée dans des infections d'origine alimentaire (Bonney et al., 2002).

✓ **Principe**

Le principe repose sur l'aptitude des *Staphylococcus aureus* à réduire le tellurite (colonies noires), à entraîner la protéolyse du jaune d'œuf (halo clair autour des colonies), et à opacifier la zone de protéolyse (activité des lipases).

Le milieu est rendu inhibiteur vis-à-vis des autres bactéries par le chlorure de lithium et le tellurite de potassium.

✓ **Mode opératoire**

- A partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-3} , on porte aseptiquement 1 ml dans une boîte de pétrie vide, stérile et codifiée.
- On complète avec 20 ml de gélose Baird Parker fondue puis refroidie à 45°C.

- On fait par la suite des mouvements circulaires en forme de 8 pour bien mélanger l'inoculum avec la gélose.
- On laisse solidifier sur paillasse.
- L'incubation se fait à 37°C pendant 24h (figure n°8).

✓ **Lecture et dénombrement**

Les staphylocoques à coagulase positives présumés forment des colonies noires et produisent sur ce milieu opaque :

- Un halo clair autour de la colonie qui correspond à une zone de protéolyse (éclaircissement du jaune d'œuf).
- Des zones opaques qui peuvent apparaître plus tardivement dans le halo clair ; elles sont dues à l'action de lipase.

On ne dénombre que les boîtes renfermant entre 15 et 150 colonies.



Figure n°7 : Recherche des *Staphylococcus aureus* (gélose Baird Parker).

e) **Recherche des Salmonelles**

✓ **But**

La recherche de ces germes est très importante, car leur effet est très fréquemment mis en cause dans les toxi-infections collectives.

✓ **Principe**

Le sucre extrait de levure et de peptone constitue la gélose Hektoen qui favorise l'isolement des bactéries du genre *Salmonella* qui sont en effet des entérobactéries pathogènes, ce milieu est rendu sélectif par la présence des sels piliers qui inhibent le développement des proteus (Bourgeois et Leveau, 1980).

✓ **Mode opératoire :**

La recherche des Salmonelles se fait en trois étapes.

- **Pré enrichissement**

Introduire 25ml de l'échantillon à analyser dans 100 ml de BLMT puis incuber à 37°C pendant 24 heures

- **Enrichissement**

Prélever 1 ml de milieu de pré-enrichissement et le mettre dans 10 ml de milieu SFB puis incuber à 37°C pendant 24 heures.

- **Isolement**

A partir de milieu SFB positif (présentant un trouble microbien), ensemercer par tri une boîte de pétrie contenant la gélose Hektoen. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures.

- ✓ **Lecture**

Les Salmonelles se présentent sous forme de colonies de couleur bleue verdâtre avec un centre noir. Les résultats sont exprimés par la présence ou l'absence de germes.

f) Recherche et dénombrement des levures et moisissures (selon ISO 6611)

- ✓ **Principe**

La croissance des levures et moisissures est favorisée par les substances nutritives apportées par l'extrait de levure et le glucose utilisé comme source énergétique.

- ✓ **Mode opératoire**

- On transfère 1 ml de la suspension mère dans une boîte de pétrie vide, stérile et codifiée.
- On transfère 1 ml de chaque dilution dans une boîte de pétrie vide, stérile et codifiée.
- On coule 12 à 15 ml de milieu OGA fondu et refroidi à 45°C.
- On homogénéise et on laisse solidifier sur paillasse.

- On incube à 25°C pendant 5 jours.

✓ **Lecture et dénombrement**

Les colonies des levures à celle des bactéries, elles sont brillantes, rondes et bombées alors que celle des moisissures ont un aspect velouté et sont plus grandes.

g) **Recherche des anaérobies sulfito- réducteurs et *Clostridium perfringens* (selon ISO 15213)**

✓ **Principe**

Le principe du milieu Viande- Foie Sulfit Fer repose sur l'aptitude des bactéries anaérobies sulfito-réductrices à réduire les sulfites de sodium en sulfure de fer, responsable de la coloration noire de colonies, en anaérobiose à 46°C.

✓ **Mode opératoire :**

Préparer et stériliser la gélose base.

Après leur refroidissement à 44°C ajouté (pour 20 ml de la gélose base) :

- 0.5 ml d'une solution aqueuse de sulfite de sodium à 5% préparée aseptiquement.
- Quelques gouttes d'une solution aqueuse de sel se fer à 5% préparée aseptiquement.

Prendre 1 ml de la solution mère et 1 ml de chaque dilution dans des tubes stériles.

Les tubes vont subir un chauffage à 80°C pendant 10 min puis un refroidissement brutal (sous l'eau de robinet).

Ajouter 18 ml de milieu VF complet en surfusion

Mélanger sans faire des bulles d'air. Laisser solidifie.

Après solidification. Les tubes sont incubés à 46°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) pendant 24 à 48 heures en anaérobiose (dans une jarre d'anaérobiose).

✓ **Lecture et interprétation**

Les spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices sont noires (Figure n°8.).



Figure n°8 : Recherche des ASR à 46°C dans la spiruline sèche.

I.2.3-Recherche des résidus des antibiotiques (méthode de diffusion des puits)

✓ But

Un antibiogramme permet de tester sur milieu de culture, l'action de molécules antibiotiques sur une souche bactérienne.

- Les bifidobactéries

✓ Principe

Il s'agit de mettre en évidence l'aspect qualitatif des résidus des antibiotiques dans les produits alimentaires d'origine animale (selon la méthode de Kundrat).

✓ Mode opératoire

○ Repiquage

1. Préparation de la gélose nutritive : faire fondre la gélose nutritive ou bien la gélose Columbia dans un bain Marie puis laisser refroidir à 45°C.
 2. 1 ml de la souche bactérienne estensemencé en masse dans la gélose en surfusion à 45°C.
 3. Les boîtes de Pétri sont incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24 à 48h.
- ##### **○ Deux colonies sontensemencées dans un bouillon nutritif puis incubé dans un étuve à 37°C pendant 18h.**

- 1ml de la souche bactérienne préalablement ensemencée dans le bouillon nutritif (B.N.) est cultivé en masse dans la gélose nutritive en surfusion (autour du bec bunsen).
- Partager la gélose dans quatre boites de Pétrie.
- Creuser des puits dans chaque boite de Pétrie de 4mm à l'aide d'une pipette Pasteur.
- On met les disques d'antibiotique (Pénicilline, Oxacilline, Ampicilline, Erythromycine, Acide nalidixique et Clindamycine) dans chaque boite de pétrie puis on les laisse dans un haute à flux laminaire pendant 4 à 6h pou permettre diffuser les antibiotiques.
- Incubation à 37°C pendant 18h.

➤ **Lecture et interprétation**

A la fin de l'incubation, les zones d'inhibition ressortent plus nettement grâce au virage de couleur de la gélose.

- **La spiruline**

➤ **Principe**

Il s'agit de mettre en évidence l'aspect qualitatif des résidus des antibiotiques dans les produits alimentaires d'origine animale (selon la méthode de **Kundrat**).

➤ **Mode opératoire**

- **Activation de la spiruline** : On ajoute 0,2 % de bicarbonate de sodium dans 1000ml d'eau distillée.
- On prend 100 ml du mélange et le chauffe dans un bécher de 50 à 60°C pendant 20 à 30 minutes.
- Après refroidissement à 30min, on ajoute 2 à 4 g de spiruline puis homogénéiser.

- Dans un bécher de 100ml On met 10ml du mélange puis on met en surfusion la gélose nutritive.
- Partager la gélose dans quatre boîtes de Pétrie.
- On met les disques d'antibiotique (Pénicilline, Oxacilline, Ampicilline, Erythromycine, Acide nalidixique et Clindamycine) dans chaque boîte de Pétrie puis on les laisse dans un haute à flux laminaire pendant 4 à 6h pour permettre diffuser les antibiotiques.
- Incubation à 37°C pendant 18h.

➤ **Lecture et interprétation**

A la fin de l'incubation, les zones d'inhibition ressortent plus nettement grâce au virage de couleur de la gélose.

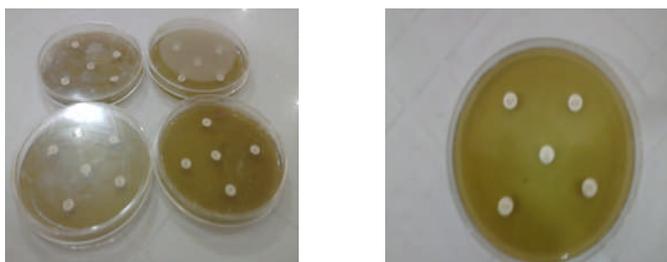


Figure n°9: La recherche des résidus des antibiotiques dans la spiruline.

I.2.4-Contrôle de la pureté des échantillons biologiques utilisés (Spiruline et Bifidobactéries)

On vérifie la pureté de notre souche en réalisant des tests rapides:

- ❖ **Observation sous microscope optique** de l'aspect des cellules bactériennes obtenues dans chaque culture (la forme bifide sous forme Y pour les bifidobactéries et la forme spirale pour la spiruline).
- ❖ **Réalisation de la coloration de Gram**

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui mise au point le protocole en 1884. C'est une coloration que permet de

mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et voila les différentes étapes de cette coloration:

1. Coloration par le violet de Gentiane. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute, rincer à l'eau déminéralisée.
2. Etaler le Lugol et laisser agir 20 secondes ; Rincer à l'eau distillée.
3. Déclaration à l'alcool: verser goutte à goutte l'alcool sur la lame incline, et surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Rince avec l'eau distillée.
4. Recoloration à la fuchsine, laissé agir de 30 secondes à 1 minute. laver doucement à l'eau distillée, sécher la lame.
5. Observer avec une goutte d'huile à immersion objectif 100.

La perméabilité plus grande des bactéries à Gram négative à l'alcool permet la décoloration donc les bactéries vont être colorées en rose .les bactéries à Gram positif restent colorées en violet ou mauve (Wilson, 2008) pour la spiruline. On fait une observation microscopique et une coloration de Gram sur une spiruline liquide ou fraiche (Figure n°10et 11).



Figure n°10 : spiruline sèche.



Figure n°11 : spiruline liquide.

❖ **Réalisation du test de la catalase (pour *Bf. adolescentis* et spiruline)**

Sur une lame de verre propre, déposer une goutte de H₂O₂, puis la mettre en contact avec une colonie isolée. Prélèvement directement avec une anse en plastique stérile à usage unique;

- ✓ S'il ya effervescence, la bactérie possède une catalase.
- ✓ Si rien n'est observable. La bactérie ne possède pas l'enzyme (Rene, 2003).

I.2.5-Standardisation de l'inoculum

Afin de travailler dans des conditions contrôlées en termes de population bactérienne, la standardisation de l'inoculum est jugée indispensable.

On prélève une colonie dans 9 ml de lait écrémé. On incube à 37°C pendant 18 h.

Après l'incubation, On réalise les dilutions décimales dans l'eau physiologique et on ensemence à partir des 03 dernières dilutions (10⁻¹ 10⁻² et 10⁻³) sur gélose Columbia (Delcenserie, 2002) (figure n°12).



Figure n°12: Standardisation de l'inoculum de *Bf. adolescentis*.

I.2.5- Suivi de la cinétique du pH et de la croissance des bifidobactéries et de la spiruline en fonction du temps

✓ **But**

Suivre la cinétique des bifidobactéries et de la spiruline seules et en association en fonction de la variation du pH.

✓ **Mode opératoire**

- La première étape : préparation du lait

On prépare 500 ml de lait écrémé (0% de matière grasse), on verse environ 10 ml d'eau distillée dans l'agitateur (l'agitateur est déposé sur une plaque chauffante à 40°C), on ajoute 45 g de lait en poudre et on fait agiter par le barreau magnétique de l'agitateur jusqu'à l'obtention d'une solution homogène puis on rajoute de l'eau distillée afin d'obtenir un volume de 500 ml de lait écrémé (figure n°13).



Figure n°13: Préparation du lait écrémé

On prend le lait obtenu (500 ml), et à l'aide d'une pipette graduée et stérile et dans une zone stérile (en utilisant le bec bunsen) on prépare trois gammes qui sont les suivantes :

- 9 tubes à essai contenant chacun 8 ml de lait écrémé.
- 9 tubes à essai contenant chacun 9 ml de lait écrémé.
- 9 tubes à essai contenant chacun 9 ml de lait écrémé.

Les tubes des trois gammes doivent être bien fermés pour éviter toute contamination.

Autoclaver pendant 10 mn à 110 °C (en évitant la réaction de Maillard).

Laisser refroidir pour éviter le choc thermique.

Congeler à -18°C.

- Deuxième étape
 - Après décongélation à température ambiante de 2 tubes de lait écrémé à raison de 9 ml. 2 colonies de bifidobactéries sontensemencées dans ces derniers, puis incubés pendant 18 heures à 37°C.

- Après 18 heures on prépare
 - 9 tubes de (9 ml de lait écrémé + 1 ml de Bifidobactéries prélevé des deux tubes préparés précédemment).
 - 9 tubes de (9ml de lait écrémé + 1 ml de spiruline liquide).
 - 9 tubes de (8 ml de lait écrémé + 1 ml de spiruline liquide + 1 ml de bifidobactéries prélevé des deux tubes préparés précédemment) (figure n°14)



Figure n° 14 : Un tube de chaque essai avant de les incubé à 37°C

- Les tubes à essai sont incubés à 37°C (figure n°15). Une mesure de pH et un dénombrement sont réalisés toutes les 100 minutes.



Figure n°15 : Un tube de chaque essai après incubation à 37°C pendant 24 heures.

- On prend (mesure) le pH à l'aide d'un pH mètre.
 - Pour la cinétique de croissance :
- ✓ Après avoir incubé ces tubes pendant 24 heures à 37°C, on doit faire d'abord des dilutions décimales chaque 100 mn, on prend trois tubes de ces trois essais (un tube du lait écrémé + les bifidobactéries, un deuxième tube du lait écrémé + spiruline et un troisième tube du lait écrémé + les bifidobactéries + la spiruline), on prélève 1ml de chaque tube et on le met dans un autre tube

contenant 9 ml d'eau physiologique, ce qui nous donne trois tubes de 10^{-1} de chaque essai.

- ✓ on fait les dilutions décimales à chacun de ces tubes jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-9} , donc on obtient trois gammes de dilutions (chaque gamme de 10^{-1} jusqu'à 10^{-9}).
- ✓ on prend des trois dernières dilutions (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}) 1ml de chacune, on le met dans une boîte de pétrie à l'aide d'une pipette pasteur et on rajoute de la gélose nutritive (anaérobie stricte) (figure n°17), on met ces boîtes dans l'étuve à 37°C et on fait le dénombrement après 24 heures puis après 48 heures. (tout le travail doit être devant le bec bunsen).



Figure n°16 : Les boîtes de Pétrie avant incubation à 37°C pendant 24h puis 48h.

✓ **Lecture**

Retenir les boîtes contenant un nombre de colonies compris entre 30 à 300 colonies (les colonies présentent une forme ronde lenticulaire et de couleur jaune claire) (figure n°17).



Figure n°17 : La lecture des résultats après incubation à 37°C

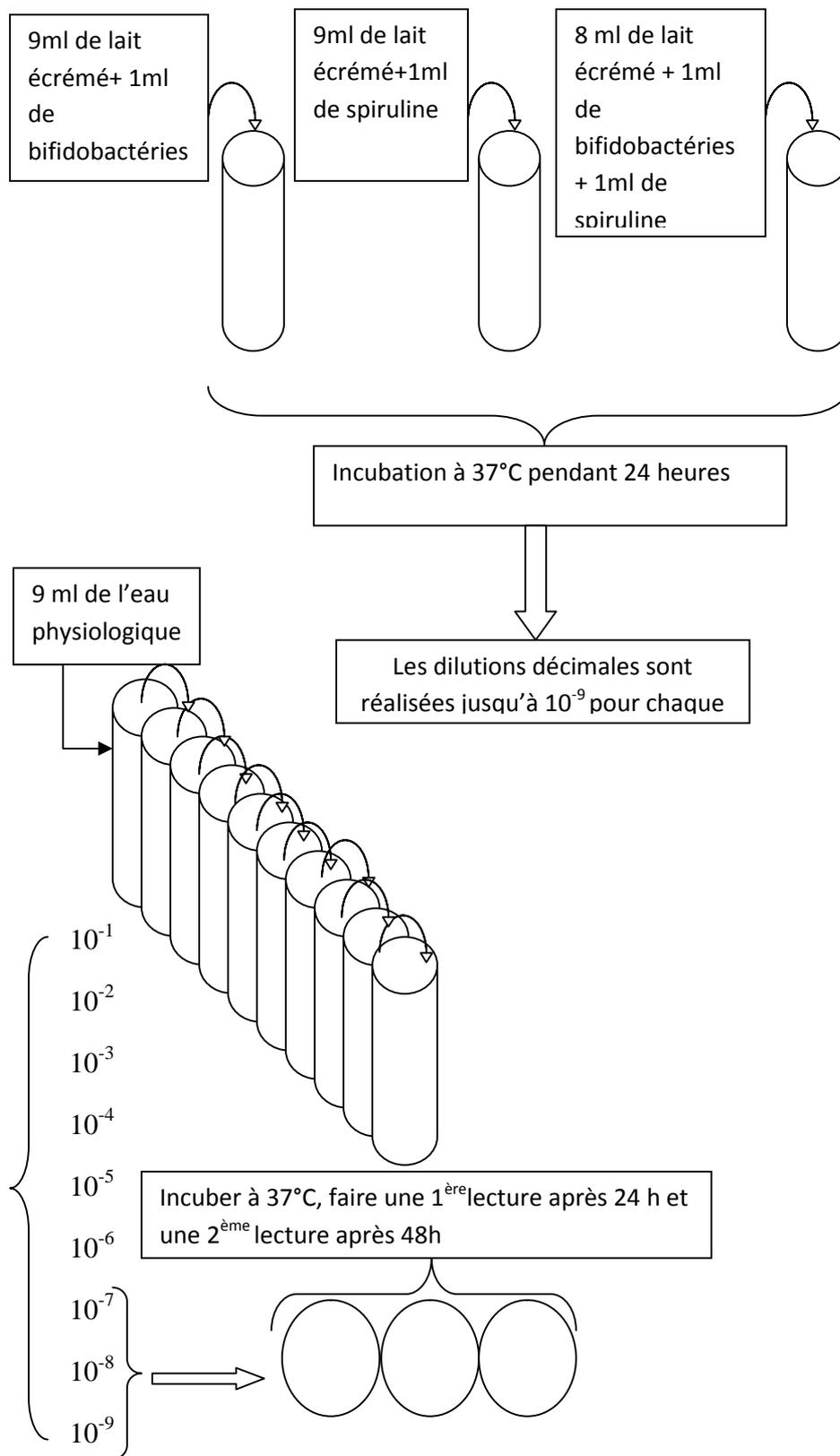


Figure n° 18: Schéma de la caractérisation de la flore bifide et de la spiruline dans le lait écrémé.

II- Résultats et interprétations

II-1. Résultats des analyses microbiologiques et physicochimiques

II-1.1 Les analyses physicochimiques

Les tableaux suivants résument les résultats des analyses physicochimiques du lait écrémé et de la spiruline.

a) Le lait écrémé

Tableau n°17 : Les résultats des analyses physicochimiques du lait écrémé.

Paramètres	Echantillon	Norme Algérienne
pH	6,92	6-7
Acidité titrable (D°)	13	12-14
Taux d'humidité H (%)	4,5	3-5
Taux de MS (EST) (%)	95,5	95-97

Selon le journal officiel de la république Algérienne N° 35-1998.

Les résultats des analyses physicochimiques du lait écrémé (Tableau n°17) révèlent une conformité du lait écrémé par rapport aux normes algériennes.

Ces résultats montrent une bonne qualité physico-chimique du lait écrémé, ce qui confirme que le lait écrémé a une reconstitution parfaite, avec un respect de conditionnement de stockage durant la période de conservation.

b) La Spiruline**Tableau n°18** : Les résultats des analyses physicochimiques de la spiruline.

Paramètres	Echantillon	D'après Jourdan, 2006
pH	7,02	7-9
Acidité	0,030	≤0,055
Taux des cendres	6,15	6-8
Taux d'humidité (H%)	5,20	6-8
Taux de M S (EST) (%)	94,80	>92
Taux de M G(%)	0	Max 6%

(Jourdan, 2006).

D'après les résultats des analyses physicochimiques de la spiruline (Tableau n°17), nous remarquons une conformité de la valeur d'humidité (5,20%) et extrait sec (94,80%) aux normes ce qui signifie les bonnes conditions de séchage et de stockage de la spiruline.

Les valeurs mesurées de notre spiruline (pH, acidité, taux des cendres et taux de matière grasse) sont proches de celle rapportée par Zarrouk, (1966 in Jourdan, 2006).

II-1.2-Les analyses microbiologiques

Les résultats des analyses microbiologiques exprimées en germes/g du lait écrémé et de la spiruline sont indiqués dans les tableaux ci-dessous.

a) Le lait écrémé

Tableau n°19: Les résultats des analyses microbiologiques du lait écrémé.

Germe	Echantillon	Norme
GAMT à 30°C	abs	2.10^5 - 2.10^6
Coliformes totaux	abs	1-10
Coliformes fécaux	abs	Abs
<i>Staphylococcus aureus</i>	abs	Abs
<i>Clostridium</i> Sulfito-Réducteur	abs	Abs
Levures et moisissures	abs	Abs
<i>Salmonella</i>	abs	Abs

Selon le journal officiel de la république Algérienne N° 25-1998(JORA).

D'après les résultats des analyses microbiologiques du lait écrémé (Tableau n°19).

L'absence totale des germes indicateurs de contamination fécale à savoir coliformes totaux et coliformes fécaux.

L'absence totale des germes pathogènes (*Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et les *Clostridium* Sulfito-Réducteur) et l'absence totale des levures et moisissures.

Selon Gills (1997), les qualités technologiques du lait écrémé dépendent des modalités de leurs fabrications et des conditions de stockage.

Ces résultats sont conformes aux normes J.O.R.A 1998, ceci est dû au bon respect des règles d'hygiène qui se présente au niveau de laboratoire.

b) La Spiruline

Les résultats des analyses microbiologiques de la spiruline sont mentionnés dans le tableau n°19.

Tableau n°20 : Les résultats des analyses microbiologiques de la spiruline sèche.

Germe	Echantillon	D'après Jourdan, 2006
GAMT à 30°C	abs	10 ⁴
Coliformes totaux	abs	<10
Coliformes fécaux	abs	Abs
<i>Staphylococcus aureus</i>	abs	Abs
<i>Clostridium Sulfito-Réducteur</i>	abs	Abs
Levures et moisissures	abs	Abs
<i>Salmonella</i>	abs	Abs

(Jourdan, 2006).

D'après les résultats des analyses microbiologiques de la spiruline (Tableau n°20).

Une absence totale des germes pathogènes et les levures et moisissures.

Cela s'explique par du fait des conditions extrêmes de culture de la spiruline qui ne favorisent pas la prolifération de ces germes.

On peut conclure que la spiruline utilisée est de très bonne qualité microbiologique, elle peut être consommée directement sans cuisson sans portée préjudice à la santé du consommateur.

II-2. Résultats de l'antibiogramme

Les zones d'inhibition se présentent sous forme de bandes qui délimitent les zones sensible, intermédiaire et résistante. Les résultats de la sensibilité de *Bf. adolescentis* à l'égard des 6 antibiotiques sont représentés dans le tableau ci-dessous.

II-2.1--*Bf. adolescentis*

Les résultats de la sensibilité de *Bf. adolescentis* à l'égard des antibiotiques sont mentionnés dans le tableau n°20

Tableau n°21 : Résultats de la sensibilité de *Bf. adolescentis* à l'égard des 6 antibiotiques

Zone d'inhibition ATB	1	2	3	4	Moyenne (mm)	
Acide nalidixique(NA)	21	26	22	24	23,25	Sensible
Pénicilline(P)	25	28	28	28	27,25	Sensible
Oxacilline(OX)	--	< 6	--	< 6	< 6	Résistante
Clindamycine(CM)	10	11	11	11	10,75	Intermédiaire
Ampicilline(AM)	20	22	22	23	21,75	Sensible
Erythromycine(E)	23	26	23	24	24	Sensible

La souche bifideprésente une sensibilité envers divers antibiotiques Pénicilline, Erythromycine, Acide nalidixique et Clindamycine. Le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 23,25 et 27,25mm. De plus elle est résistante vis à vis de l'Oxacilline ($d < 6$ mm) et elle est intermédiaire envers le Clindamycine (10,75mm).

II-2.2-Spiruline

D'après Les résultats de la sensibilité de la spiruline à l'égard des 6 antibiotiques : L'absence totale des zones d'inhibition montre que notre spiruline présente une résistance aux antibiotiques étudiés.

II-3. Contrôle de la pureté des échantillons biologiques utilisés

II-3.1-Observation sous microscopique

Bf. adolescentis est apparu sous forme de petits bâtonnets incurvés en forme V, alors que la spiruline apparaît sous forme d'un filament vert en spirale.

II-3.2-Coloration de Gram

La coloration de Gram a donnée des bactéries colorées en violet, donc *Bf. adolescentis* est une **Gram positif**.

La paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool (il n'y a pas une décoloration) car elle est composée d'une couche de peptidoglycanes ce qui explique la couleur violet, alors que la spiruline est apparue rose ; ce qui prouve que la spiruline est une cyanobactérie à **Gram négatif**.

II-3.3-Test de catalase

L'enzyme de catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée qui résulte de l'oxydation par l'oxygène de l'air.

Les résultats de test de catalase ont montrés que *Bf.adolescentis* est une bactérie catalase négatif, car il n'y a pas de dégagement gazeux.

L'absence de bulles dans le test catalase de la spiruline montre qu'elle est catalase positive.

II-4.Standardisation de l'inoculum

La souche bactérienne utilisée, selon le protocole établi dans cette étude, a été standardisée à 32 germes /g.

II-5.Mise au point du lait écrémé fermenté avec les bifidobactériesou la spiruline seules ou en association

II-5.1-Evolution du pH du lait écrémé fermenté avec avec les bifidobactéries ou la spiruline seules ou en association

Nous avons utilisé le lait écrémé (0% de matière grasse) à raison de 45g de poudre de lait écrémé et on la rajouté de l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un volume de 500 ml du lait écrémé, dont nous l'avons contrôlé auparavant de point de vue stérilité et pH.

Le pH du lait écrémé préparé aseptiquement est de : **6,92**.

Le pouvoir acidifiant élevé est un caractère qui caractérise les bifidobactéries du fait de leur capacité à produire à la fois de l'acide acétique et de l'acide lactique (voie hétéro fermentaire) ; ce qui est à l'origine de l'abaissement du pH dans le lait fermenté ou enrichi. En effet les bifidobactéries produisent ces deux acides organiques dans un ratio molaire de 3 moles de lactate et 2 moles d'acétate et cela en

métabolisant une grande variété d'hexose par le cycle du fructose-6-phosphate. La spiruline aussi a le même pouvoir acidifiant.

Les résultats du suivi de l'évolution du pH dans le lait écrémé cultivé avec *Bf.adolescentis* seule, avec *Bf. adolescentis* enrichi avec la spiruline et avec la spiruline seule toutes les 100 mn (le temps de génération théorique des bifidobactéries est de 100mn) pendant 15 heures et après 24 heures, sont présentées au niveau du tableau 22 et la figure n° 19.

Tableau 22: Résultats de l'évolution de l'acidification du lait écrémé fermenté avec les bifidobactéries ou la spiruline seules ou en association

Temps	Evolution du pH du lait écrémé enrichi par <i>Bf. adolescentis</i> seule ou la spiruline seule ou les deux		
	Lait écrémé enrichi avec <i>Bf. adolescentis</i>	Lait écrémé enrichi avec la spiruline	Lait écrémé enrichi avec (<i>Bf.adolescentis</i> + spiruline).
T ₀	6,78	6,7	6,57
T ₁	6,70	6,48	6,22
T ₂	5,66	5,86	5,62
T ₃	5,54	5,63	5,33
T ₄	5,42	5,44	4,66
T ₅	5,39	4,66	4,64
T ₆	5,31	4,63	4,64
T ₇	5,28	4,62	4,62
T ₈	5,22	4,59	4,60

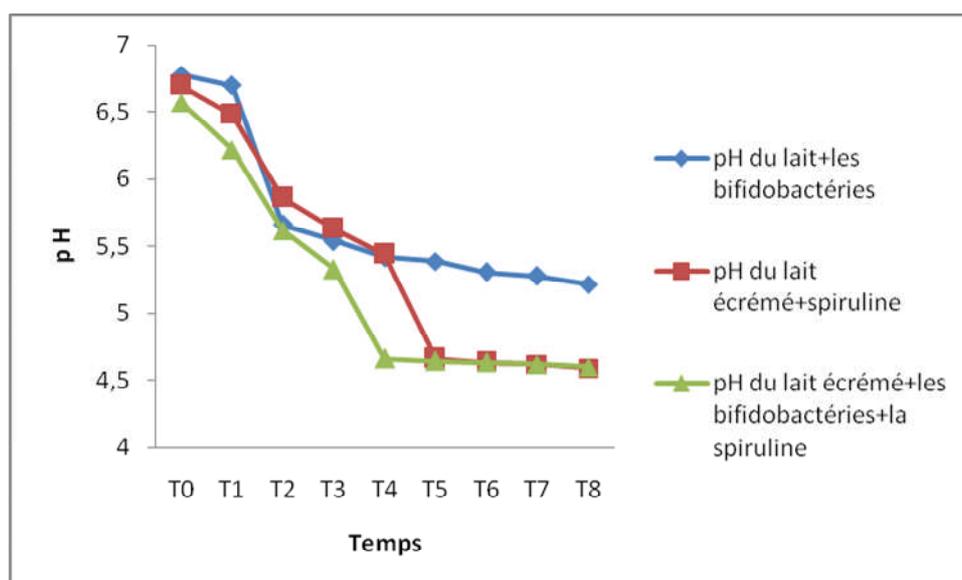


Figure n°19 : l'évolution de l'acidification du lait écrémé fermenté avec les bifidobactéries ou la spiruline seules ou en association

Chaque 100 mn nous avons constaté un abaissement du pH, après 15 heures le pH atteint les valeurs de :

- 5,22 pour le lait écrémé fermenté avec *Bf. adolescentis*.
- 4,60 pour le lait écrémé fermenté avec *Bf. adolescentis* plus la spiruline.
- 4,59 pour le lait écrémé fermenté avec la spiruline seule.

Ainsi nous observons un abaissement du pH dans les trois milieux, cet abaissement est dû à la production de l'acide lactique et acétique, ce qui indique que *Bf. adolenscentis* et la spiruline ont la capacité de produire ces deux acides dans le lait. Nous observons aussi que le pH du lait fermenté avec *Bf. adolescentis* est de 5,22, le pH décroît plus pour le lait fermenté avec de la flore bifide plus la spiruline pour atteindre 4,60, cette diminution continue encore jusqu'à la valeur de 4,59 pour le lait contenant de la spiruline seule, donc la spiruline seule produit beaucoup plus d'acide que la flore bifide ou que l'association des deux.

Le pH le plus bas est celui du lait écrémé enrichi par la spiruline seule qui est de 4,59 ce qui implique que la production des acides lactiques est plus forte dans ce milieu par rapport aux autres deux milieux, cette production qui est liée au métabolisme des hexoses donc ce milieu favorise mieux la fermentation et par conséquent la coagulation du lait comparé aux deux autres milieux.

On peut conclure que la spiruline seule favorise la fermentation du lait et par conséquent la coagulation du lait.

II-5.2-Evolution des comptes des deux bactéries (*Bf. adolescentis* et spiruline) dans le lait écrémé contenant de la spiruline seule, de la spiruline associée à *Bf. adolescentis* et de la souche *Bf. adolescentis* seule.

Les bifidobactéries y compris celle qu'on vient d'étudier (*Bf. adolescentis*) sont caractérisées par un pouvoir de croissance élevé, théoriquement, leur temps de génération est de 100mn. Les résultats du suivi de la cinétique de croissance de la souche bifide, de la spiruline ou des deux au même temps dans le lait écrémé toutes les 100 mn pendant 15 heures, après 24 heures et après 48 heures sont présentés au niveau des tableaux 23, 24, 25, 26, 27 et 28, et des figures et 10 et 20

Tableau n°23: Détermination des comptes moyens de *Bf. adolescentis* cultivé dans le lait écrémé après 24 heures.

Temps	Nombre des colonies de <i>Bf. Adolescentis</i>					
	Nombre des UFC /ml			Log du nombre des UFC/ml		
	Dilutions décimales			Dilutions décimales		
	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
T ₀	24	14	08	08,38	09,14	09,90
T ₁	77	32	14	08,88	09,50	10,14
T ₂	108	58	50	09,03	09,76	10,70
T ₃	110	63	54	09,04	09,80	10,73
T ₄	120	66	60	09,07	09,82	10,78
T ₅	130	113	96	09,11	10,05	10,98
T ₆	154	81	80	09,18	09,91	10,90
T ₇	159	98	87	09,20	09,99	10,94
T ₈	163	129	120	09,21	10,11	11,08

Tableau n°24: Détermination des comptes moyens de *Bf. adolescentis* cultivé seule dans le lait écrémé après 48 heures.

Temps	Nombre des colonies de <i>Bf. Adolescentis</i>					
	Nombre des UFC /ml			Log du nombre des UFC/ml		
	Dilutions décimales			Dilutions décimales		
	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
T ₀	150	95	58	09,17	09,97	10,76
T ₁	155	126	107	09,19	10,10	11,03
T ₂	161	128	91	09,20	10,11	10,96
T ₃	166	132	111	09,22	10,12	11,04
T ₄	170	157	134	09,23	10,19	11,13
T ₅	191	178	163	09,281	10,25	11,21
T ₆	194	186	170	09,287	10,27	11,23
T ₇	227	192	185	09,35	10,28	11,27
T ₈	231	209	198	09,36	10,32	11,29

Tableau n°25: Détermination des comptes moyens de la spiruline associée à la souche *Bf. adolescentis* cultivé dans le lait écrémé après 24 heures.

Temps	Nombre des colonies de spiruline et la souche <i>Bf. Adolescentis</i>					
	Nombre des UFC /ml			Log du nombre des UFC/ml		
	Dilutions décimales			Dilutions décimales		
	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
T ₀	28	26	15	08,44	09,41	10,17
T ₁	50	37	30	08,69	09,57	10,48
T ₂	68	49	35	08,83	09,69	10,54
T ₃	70	55	40	08,84	09,74	10,60
T ₄	81	73	50	08,90	09,86	10,70
T ₅	134	123	81	09,12	10,09	10,91
T ₆	154	95	88	09,18	09,97	10,94
T ₇	225	112	82	09,35	10,05	10,91
T ₈	235	117	105	09,37	10,07	11,02

Tableau n°26: Détermination des comptes moyens de spiruline associée à la souche *Bf. adolescentis* cultivé dans le lait écrémé après 48 heures.

Temps	Nombre des colonies de spiruline et de la souche <i>Bf. adolescentis</i>					
	Nombre des UFC /ml			Log du nombre des UFC/ml		
	Dilutions décimales			Dilutions décimales		
	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
T ₀	133	118	66	09,12	10,071	10,81
T ₁	192	183	118	09,28	10,26	11,07
T ₂	209	189	145	09,32	10,27	11,16
T ₃	225	195	150	09,35	10,29	11,17
T ₄	241	189	174	09,38	10,27	11,24
T ₅	274	266	258	09,43	10,42	11,41
T ₆	279	272	264	09,44	10,43	11,42
T ₇	341	289	274	09,53	10,46	11,43
T ₈	350	290	279	09,54	10,46	11,44

Tableau n° 27: Détermination des comptes moyens des colonies de spiruline dans le lait écrémé après 24 heures

Temps	Nombre des colonies de spiruline					
	Nombre des UFC /ml			Log du nombre des UFC/ml		
	Dilutions décimales			Dilutions décimales		
	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
T ₀	64	51	46	08,80	09,70	10,66
T ₁	125	70	44	09,09	09,84	10,64
T ₂	160	74	61	09,20	09,86	10,78
T ₃	170	89	79	09,23	09,94	10,89
T ₄	175	96	88	09,24	09,98	10,94
T ₅	190	140	119	09,27	10,14	11,07
T ₆	196	182	159	09,29	10,26	11,20
T ₇	324	247	190	09,51	10,39	10,27
T ₈	338	303	219	09,52	10,48	11,34

Tableau n°28: Détermination des comptes moyens des colonies de spiruline dans le lait écrémé après 48 heures

Temps	Nombre des colonies de spiruline					
	Nombre des UFC /ml			Log du nombre des UFC/ml		
	Dilutions décimales			Dilutions décimales		
	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
T ₀	160	156	143	09,20	10,19	11,155
T ₁	209	94	63	09,32	09,97	10,799
T ₂	260	113	98	09,41	10,05	10,99
T ₃	273	143	205	09,43	10,155	11,31
T ₄	287	165	158	09,45	10,217	11,198
T ₅	298	173	162	09,47	10,238	11,209
T ₆	340	198	177	09,53	10,296	11,247
T ₇	356	255	208	09,55	10,406	11,318
T ₈	366	320	250	09,56	10,50	11,397

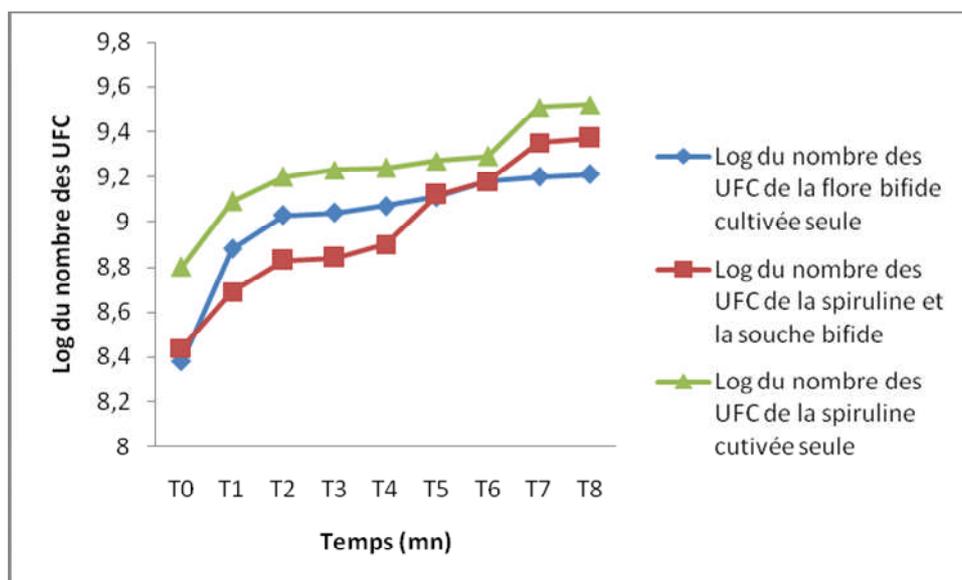


Figure n° 20 : La cinétique de croissance du Log du nombre des UFC des trois cas après 24 heures

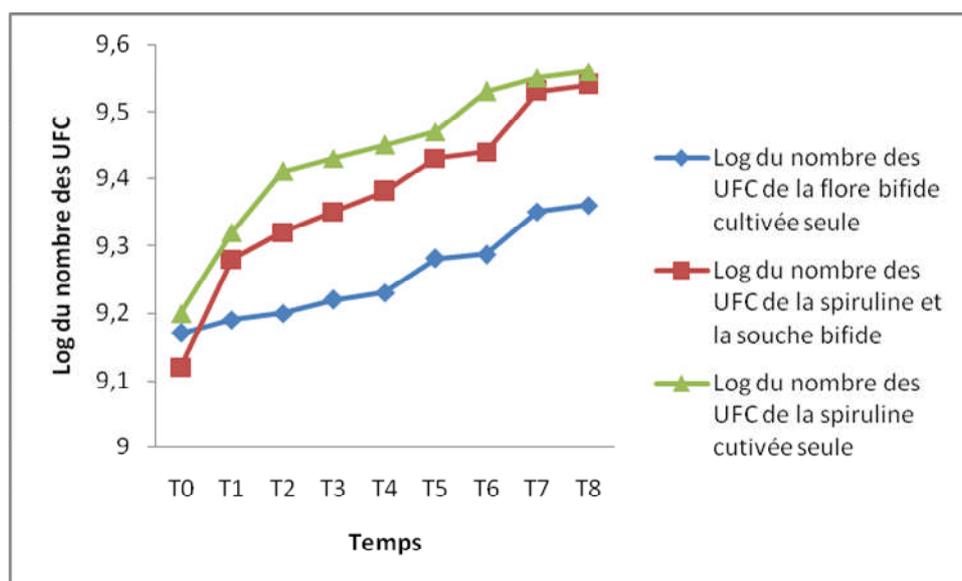


Figure n° 21: La cinétique de croissance du Log du nombre des UFC des trois cas après 48 heures

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que le nombre des UFC de *Bifidobacterium adolescentis* et de spiruline que ce soit chacune cultivée seule ou en association augmente dans les trois cas en les ajoutant au lait écrémé, en effet après 24 heures nous obtenons les résultats suivants :

- ✓ 163 colonies de *Bf. adolescentis* dans le lait fermenté par la souche bifide seule.

- ✓ 235 colonies de bifidobactéries et spiruline dans le lait fermenté par les deux en association.
- ✓ 238 colonies de spiruline dans le lait fermenté par la spiruline seule.

Après 48 heures le nombre des UFC des deux bactéries continue à augmenter et nous obtenons les résultats suivants :

- ✓ 231 colonies de *Bf. adolescentis* dans le lait fermenté par la souche bifide seule.
- ✓ 350 colonies de bifidobactéries et spiruline dans le lait fermenté par les deux en association.
- ✓ 366 colonies de spiruline dans le lait fermenté par la spiruline seule.

II-5.3-Discussion

D'après les résultats obtenus nous remarquons que la culture de l'espèce *Bf. adolescentis* dans le lait écrémé enrichi avec la spiruline donne de meilleurs résultats sur l'effectif des colonies que dans le lait écrémé fermenté avec la souche bifide (*Bf. adolescentis*) seule alors que la culture de la spiruline seule dans le lait écrémé donne un résultat plus meilleur.

Nous avons remarqué que le temps T_8 est le meilleur temps dans lequel on note la croissance la plus élevée des deux espèces dans les trois cas, après 24 heures et après 48 heures mais reste toujours la croissance des bifidobactéries la plus faible par rapport à celle des bifidobactéries associées à la spiruline, ces dernières, à leur tour ont une croissance plus faible que celle de la spiruline cultivée seule dans le lait écrémé.

Les bifidobactéries seules croissent difficilement dans le lait, et il est nécessaire d'incorporer des sources d'azote facilement assimilable (amino-acide, peptide) car ces bactéries n'ont pas d'activité protéolytique (Barascu, 2006). Et comme on a cité auparavant dans le chapitre spiruline, la spiruline est riche en protéines à raison de 70%, donc les bifidobactéries cultivées seules dans le lait écrémé et qui n'ont pas assez d'azote assimilable pour qu'elles l'utilisent dans sa croissance ont une croissance plus faible à celle des bifidobactéries cultivées en association avec la spiruline, ces bifidobactéries utilisent la source protéique facilement assimilable présente dans la spiruline (tous les acides aminés et les protéines) sans oublier que la spiruline est riche en vitamines et en minéraux (surtout sa forte teneur en fer) ce qui aide la souche bifide à sa croissance .

On peut conclure que la culture de la spiruline avec la souche bifide a un effet bénéfique de point de vue croissance de cette souche.

On a remarqué une meilleure croissance de la spiruline cultivée seule dans le lait écrémé que les deux autres milieux car la spiruline elle-même est très riche en nutriments contrairement aux bifidobactéries ce qui a permis d'utiliser ces nutriments pour améliorer sa croissance, donc et comme conclusion, on peut dire qu'on peut fabriquer des alicaments à base de spiruline seule, ces alicaments ont non seulement un effet sur l'apport nutritionnel élevé qu'apporte la spiruline aux enfants malnutris, aux femmes enceintes, aux sportifs, et à toute personne ayant subi des travaux nécessitant une bonne nutrition mais aussi aux malades qui souffrent de troubles digestifs étant donné que la spiruline joue le même rôle que la flore bifide avec sa capacité de dégrader le lactose en acide lactique et acétique avec un avantage d'une biomasse plus importante que celle des bifidobactéries.

II-5.4-Etude des variations des pH, des vitesses d'acidification, des temps de génération et du taux de croissance de bifidobactéries ou la spiruline seules et en association

Les calculs des variations de pH (Δ pH), des vitesses d'acidification (V pH), du temps de génération (G) et du taux de croissance (μ) de *Bf. adolescentis* et de spiruline cultivées dans le lait écrémé chacune seule ou en association sont mentionnés dans les tableaux 26, 27 et 28.

Δ pH : pH initial – pH final

V pH: Vitesse d'acidification (en pH / mn) Δ pH/ Δ T

G = T.log 2 / (Log N_f – Log N_i) (min), avec T l'intervalle de temps entre T_1 et T_0 .

μ = 1/ G (h^{-1})

Log N_f : Logarithme du nombre des UFC obtenu au temps final (T_8)

Log N_i : Logarithme du nombre des UFC obtenu au temps initial (T_0)

Tableau n°29: Calculs des variations de pH et des vitesses d'acidification (V pH) du lait écrémé fermenté avec les bifidobactéries ou la spiruline seules et en association

Milieu de fermentation	Δ pH	V pH
Lait écrémé + <i>Bf. adolescentis</i>	01,56	0,00173
Lait écrémé + la spiruline	2,11	0,0023
Lait écrémé + <i>Bf. adolescentis</i> + spiruline	01,97	0,0022

D'après les résultats mentionnés sur le tableau N° 26 la vitesse d'acidification du lait fermenté par la spiruline seule qui est de 0,0023 pH /min est la plus grande par rapport à celles des bifidobactéries cultivées seules et des bifidobactéries cultivées avec la spiruline, qui sont respectivement 0,00173 pH /min et 0,0022 pH /min, on peut conclure que le pouvoir acidifiant de la spiruline cultivée seule est plus grand que celui des deux autres milieux et par conséquent son activité fermentaire est optimale.

Tableau n° 30: Calculs du temps de génération (G) et du taux de croissance (μ) de avec les bifidobactéries ou la spiruline seules et en association

Milieu de fermentation	G (mn)			μ (mn ⁻¹)		
	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Lait écrémé + <i>Bf. adolescentis</i>	36,26	31,03	25,51	0,027	0,032	0,039
Lait écrémé + la spiruline	41,81	38,59	44,26	0,024	0,026	0,022
Lait écrémé + <i>Bf.adolescentis</i> + spiruline	32,37	45,61	35,41	0,031	0,022	0,028

Tableau n° 31: Calculs du temps de génération (G) et du taux de croissance (μ) de avec les bifidobactéries ou la spiruline seules et en association

Milieu de fermentation	G (mn)			μ (mn ⁻¹)		
	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Lait écrémé + <i>Bf. adolescentis</i>	158,43	86,01	56,79	0,0063	0,011	0,017
Lait écrémé + la spiruline	83,61	97,10	124,39	0,0119	0,0103	0,0080
Lait écrémé + <i>Bf.adolescentis</i> + spiruline	71,67	77,38	47,78	0,014	0,013	0,021

Selon les tableaux 30 et 31, on constate que le temps de génération (le temps nécessaire pour que une cellule mère donne deux cellules filles) était plus court après 24 heures (pour les trois milieux) par rapport au temps de génération après 48 heures car après 48 heures les besoins de ces deux souches pour se diviser ont été épuisés par la division et la croissance donc la division prend un temps plus long surtout pour le cas de la flore bifide seule 158,43 mn, alors que pour les deux autres cas le temps de génération augmente mais d'une valeur moins importante (83,61mn pour la spiruline seule et 71,67 mn pour la flore bifide associée à la spiruline) étant donné que la spiruline est très riche en nutriments (vitamines, protéines, minéraux..).

II-6. Les analyses statistiques

On doit lire les valeurs de F_{th} sur le tableau de Fisher-Snédecor (Table de F en annexe 4), on a deux facteurs à étudier le facteur temps et le facteur espèce (la flore bifide seule, la flore bifide + spiruline, la spiruline seule) ainsi que l'interaction entre les deux facteurs.

II-6.1-Analyse statistique du pouvoir acidifiant de bifidobactéries ou la spiruline seules et en association

Une étude statistique a été réalisée par le logiciel STATI ITCF sur l'effet du temps et de l'espèce (spiruline seule, spiruline + bifide, bifide seule) sur le pouvoir acidifiant.

Tableau n° 32 : Résultat des analyses statistiques du pouvoir acidifiant de bifidobactéries ou la spiruline seules et en association

Source de la variabilité	F_{obs}	F_{th}	P	E.T	C.V
VAR. totale					
VAR. temps	63831,98	2,88	0,0000		
VAR. espèce	23092,28	5,06	0,0000	0,01	0,2%
VAR. interaction	1883,11	2,09	0,0000		
VAR. résiduelle					

On remarque que

L'écart type résiduel E.T = 0,01 ce qui indique que l'essai des deux facteurs est précis ainsi que de leur interaction.

La probabilité $p= 0,0000$ dans les cas donc les trois facteurs (temps, espèce et interaction) sont très hautement significatifs et il y a présence de groupes homogènes dans les trois cas.

✓ Facteur temps de fermentation ($T_0, T_1, T_2, T_3, T_4, T_5, T_6, T_7, T_8$) :

On remarque que $F_{obs}= 63831,98$ alors que $F_{th}= 2,88$ donc F_{obs} est nettement supérieur à F_{th} alors on peut conclure que le facteur temps a un effet sur le pouvoir acidifiant de la souche bifide, de la spiruline et des deux souches au même temps.

✓ Facteur espèce (la souche *Bf. adolescentis* seule, La souche *Bf. adolescentis* + spiruline, spiruline seule) :

On remarque que $F_{obs} = 23092,28$ alors que $F_{th}= 5,06$ donc F_{obs} est nettement supérieur F_{th} alors on peut conclure que le facteur espèce a un effet sur le pouvoir acidifiant de la souche bifide, de la spiruline et des deux souches au même temps.

✓ L'interaction entre les deux facteurs précédents :

On remarque que $F_{obs} = 1883,11$ alors que $F_{th}=2,09$ donc F_{obs} est nettement supérieur à F_{th} alors on peut conclure que l'interaction entre les deux facteurs a un effet sur le pouvoir acidifiant de la souche bifide, de la spiruline et des deux souches au même temps.

II-6.2-Analyse statistique de la cinétique de croissance des bifidobactéries ou de la spiruline cultivés chacune seule et en association après 24 heures

Tableau n° 33 : Résultat des analyses statistiques de la cinétique de croissance des bifidobactéries ou de la spiruline cultivés chacune seule et en association après 24 heures

Source de la variabilité	F_{obs}	F_{th}	P	E.T	C.V
VAR. totale					
VAR. espèce	7773499,00	5,43	0,0000		
VAR. temps	5854545,50	3,23	0,0000	0,07	0,0%
VAR. interaction	387323,66	2,71	0,0000		
VAR. résiduelle					

On remarque que

L'écart type résiduel $E.T = 0,07$ ce qui indique la précision de l'essai des deux facteurs ainsi que l'essai de leur interaction.

La probabilité $p = 0,0000$ dans les trois cas donc les deux facteurs (temps, espèce) et leur interaction sont très hautement significatifs et il y a présence de groupes homogènes dans les trois cas.

- ✓ Facteur espèce (la souche *Bf. adolescentis* seule, La souche *Bf. adolescentis* + spiruline, spiruline seule) :

On remarque que $F_{obs} = 7773499,00$ alors que $F_{th} = 5,43$ donc F_{obs} est nettement supérieur à F_{th} alors on peut conclure que le facteur espèce a un effet sur la cinétique de croissance de la souche bifide, de la spiruline et des deux souches au même temps et cela après 24 heures.

- ✓ Facteur temps de fermentation ($T_0, T_1, T_2, T_3, T_4, T_5, T_6, T_7, T_8$)

On remarque que $F_{obs} = 5854545$ alors que $F_{th} = 3,23$ donc F_{obs} est nettement supérieur à F_{th} alors on peut conclure que le facteur temps a un effet sur la cinétique de croissance de la souche bifide, de la spiruline et des deux souches au même temps.

- ✓ Facteur interaction entre les deux facteurs précédents :

On remarque que $F_{obs} = 387323,66$ alors que $F_{th} = 2,71$ donc F_{obs} est nettement supérieur à F_{th} alors on peut conclure que l'interaction entre les deux facteurs a un effet sur la cinétique de croissance de la souche bifide, de la spiruline et des deux souches au même temps.

II-6.3-Analyse statistique de la cinétique de croissance de *Bf. adolescentis* cultivée seule sur le lait écrémé, de la spiruline cultivée seule sur le lait écrémé et des deux cultivées au même temps sur le lait écrémé après 48 heures

Tableau n° 34 : Résultat des analyses statistiques de la cinétique de croissance des bifidobactéries ou de la spiruline cultivés chacune seule et en association après 48 heures.

Source de la variabilité	F _{obs}	F _{th}	P	E.T	C.V
VAR. totale					
VAR. espèce	8122057,50	5,53	0,0000		
VAR. temps	3150210,80	3,29	0,0000	0,08	0,0%
VAR. interaction	224249,19	2,77	0,0000		
VAR. résiduelle					

On remarque que

L'écart type résiduel E.T = 0,08 ce qui indique que l'essai des deux facteurs est précis ainsi que de leur interaction.

La probabilité $p= 0,0000$ dans les cas donc les trois facteurs (temps, espèce et interaction) sont très hautement significatifs et il y a présence de groupes homogènes dans les trois cas.

✓ Facteur temps de fermentation (T₀, T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆, T₇, T₈) :

On remarque que F_{obs}= 3150210,80 alors que F_{th}= 3,29 donc F_{obs} est nettement supérieur à F_{th} alors on peut conclure que le facteur temps a un effet sur la cinétique de croissance de la souche bifide, de la spiruline et des deux souches au même temps après 48 heures.

✓ Facteur espèce (la souche *Bf. adolescentis* seule, La souche *Bf. adolescentis* + spiruline, spiruline seule) :

On remarque que F_{obs} = 8122057,50 alors que F_{th}= 5,53, donc F_{obs} est nettement supérieur à F_{th} alors on peut conclure que le facteur espèce a un effet sur la cinétique de croissance de la souche bifide, de la spiruline et des deux souches au même temps après 48 heures.

✓ L'interaction entre les deux facteurs précédents :

On remarque que F_{obs} = 224249,19 alors que F_{th}= 2,77 donc F_{obs} est nettement supérieur à F_{th} alors on peut conclure que l'interaction entre les deux facteurs a un effet sur la cinétique de croissance de la souche bifide, de la spiruline et des deux souches au même temps.

Conclusion générale

Notre étude réalisée est basée sur la comparaison entre l'effet de la souche bifide cultivée seule dans le lait écrémé et l'effet de la spiruline seule cultivée dans le lait écrémé, ainsi que l'effet de la combinaison des deux espèces, pour avoir une meilleure dégradation des aliments et par conséquent une meilleure digestion.

Deux espèces ont fait l'objet de cette présente étude (*Bifidobacterium adolescentis* et *Arthropsira platensis*) qui sont cultivées dans le lait écrémé en culture seule ou en association. Le contrôle de la pureté des souches a montré que ces dernières sont exemptes de contamination microbienne.

La souche bifide présente une sensibilité envers divers antibiotiques (Pénicilline, Erythromycine, Acide nalidixique et Clindamycine). Le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 23,25 et 27,25 mm, en plus elle est résistante vis à vis de l'Oxacilline ($d < 6$ mm) et elle est intermédiaire envers le Clindamycine (10,75mm) alors que la spiruline présente une résistance envers tous les antibiotiques étudiés.

Une optimisation de la croissance ainsi que le pouvoir acidifiant a été obtenu dans le lait écrémé cultivé avec de la spiruline seule et ceci après 24 heures et après 48 heures d'incubation par rapport aux deux autres essais. Ainsi le temps de génération augmente chez la spiruline après 48 heures d'une manière moins importante que celui des bifidobactéries seules et des bifidobactéries associées à la spiruline.

Alors les industriels peuvent exploiter les propriétés de cette micro algue dans l'industrie des produits laitiers et préparer un alicament à base de spiruline pour faciliter la digestion des malades ayants des troubles digestifs donc on peut conclure qu'il intéressant d'utiliser la spiruline qui est un produit biologique dans la lutte thérapeutique ou préventive vis-à-vis des maladies d'origine alimentaire.

En perspectives il serait intéressant d'étudier l'effet thérapeutique et préventif *in vivo* de la spiruline seul et en association avec les bifidobactéries. Etudier le criblage de la spiruline envers les germes pathogènes.

TABLE DES MATIERES

Introduction générale	1
-----------------------------	---

Partie I : Etude bibliographique

Chapitre I : Les probiotiques

I-1. Définitions et généralités.....	3
I-2. Composition et sélection.....	4
I-3. Pharmacologie des bactéries lactiques chez l'homme.....	5
I-3.1-Principes actifs.....	5
I-3.2-Pharmacocinétique (survie dans l'intestin- adhérence – colonisation).....	5
a) Méthodes d'étude.....	5
b) Facteurs influençant la pharmacocinétique de probiotiques.....	6
c) Survie de probiotiques ingérées dans le tube digestif et colonisation.....	6
I-4. Les effets démontrés.....	7
I-4.1- Amélioration de la digestion du lactose.....	7
I-4.2- Autres effets directs enzymatiques.....	8
I-4.3- Raccourcissement et prévention de gastro-entérites.....	8
a) Effet curatif.....	8
b) Effet préventif.....	9
I-4.4- Effets au cours d'infections intestinales spécifiques et au cours de la diarrhée du voyageur.....	9
❖ <i>Clostridium difficile</i>	9
❖ <i>Helicobacter pylori</i>	10
❖ Diarrhée du voyageur.....	10
I-4.5- Raccourcissement et prévention de diarrhées aux antibiotiques.....	10
I-4.6- Prévention de la rechute de maladies inflammatoires de l'intestin.....	10

I-4.7- Diarrhées autres	11
I-4.8- Syndrome de l'intestin irritable.....	11
I-4.9- Cancer du côlon et autres cancers.....	12
I-4.10- Affections non gastro-entérologiques.....	12
❖ Infections non digestives.....	12
❖ Allergies.....	12

Chapitre II : Les bifidobactéries

II-1.Historique.....	14
II-2.Caractères généraux.....	14
II-3.Métabolisme.....	15
II-4.Ecologie.....	17
II-5.Spécificités biochimiques et culturales.....	18
II-5.1- Sensibilité à l'oxygène.....	18
II-5. 2-pH et température.....	19
II-5.3-Milieus de culture.....	19
II-5.4-Spécificités biochimiques.....	19
II-5.5-Besoins nutritionnels.....	21
a) Besoins en acides aminés.....	21
b) Besoins en ions.....	21
c) Besoins vitaminiques.....	22

Chapitre III : La Spiruline

III-1.Historique	24
III-2.Répartition géographique.....	24
III-3.biologie	25

III-3.1-Taxonomie.....	25
III-3.2-Morphologie et caractères généraux.....	25
III-3.3-cycle biologique.....	26
III-3.4-conditions physiques et chimiques de croissance.....	27
III-4.composition	27
III-4.1-Glucides	28
III-4.2-protéines et acides aminés.....	28
III-4.3-Lipides et acides gras.....	29
III-4.4-Vitamines.....	30
III-4.5-Sels minéraux.....	31
III-4.6-Pigments.....	32
III-5.Valeur nutritionnelle.....	32
III-5.1-Sa teneur très élevée en protéine.....	33
III-5.2- Sa composition en minéraux essentiels et oligoéléments.....	33
III-5.3- Sa composition en vitamine.....	33
III-5.4- Son apport en lipides essentiels.....	33
III -6.Conservation et conditionnement.....	34
III -6.1- Conservation	35
III -6.2- conditionnement	35

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

➤ Problématique.....	36
I-1.Matériel.....	36

I-1.1-Matériel non biologique.....	36
I-1.2-Matériel biologique.....	36
I-2.Méthodes.....	37
I-2.1-Analyses physico-chimiques.....	37
a) Détermination du pH.....	37
b) Détermination de la teneur en eau.....	38
c) Détermination du taux des cendres totales	39
d) Détermination de l'acidité titrable.....	39
e) Détermination de la matière grasse.....	40
I.2.2-Les analyses microbiologiques.....	41
❖ Préparation des dilutions décimales.....	41
a) Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux (GAMT)...	42
b) Recherche et dénombrement de coliformes totaux	43
c)Recherche et dénombrement des coliformes fécaux.....	44
d) Recherche et dénombrement des Staphylococcus aureus.....	44
e)Recherche des Salmonelles.....	45
f) Recherche et dénombrement des levures et moisissures.....	46
g) Recherche des anaérobies sulfito- réducteurs et <i>Clostridium perfringens</i>	47
I.2.3-Recherche des résidus des antibiotiques (méthode de diffusion des puits)	48
➤ Les bifidobactéries	48
➤ La spiruline.....	49
I.2.4-Contrôle de la pureté des échantillons biologiques utilisés (Spiruline et Bifidobactéries).....	50
❖ Observation sous microscope optique.....	50

❖ Réalisation de la coloration de Gram.....	50
❖ Réalisation du test de la catalase (pour <i>Bf. adolescentis</i> et spiruline).....	52
I.2.5-Standardisation de l'inoculum	52
I.2.6- Suivi de la cinétique du pH et de la croissance des bifidobactéries et de la spiruline en fonction du temps.....	52
Chapitre II- Résultats et discussions	
II-1.Résultats des analyses microbiologiques et physicochimiques.....	56
II-1.1Les analyses physicochimiques.....	56
a) Le lait écrémé.....	56
b) La Spiruline.....	57
II-1.2-Les analyses microbiologiques.....	57
a) Le lait écrémé.....	57
b) La Spiruline.....	58
II-2. Résultats de l'antibiogramme.....	59
II-2.1-- <i>Bf. Adolescentis</i>	59
II-2.2-Spiruline.....	60
II-3. Contrôle de la pureté des échantillons biologiques utilisés	60
II-3.1-Observation sous microscopique.....	60
II-3.2-Coloration de Gram.....	61
II-3.3-Test de catalase.....	61
II-4.Standardisation de l'inoculum.....	61
II-5.Mise au point du lait écrémé fermenté avec les bifidobactéries ou la spiruline seules ou en association.....	61
II-5.1-Evolution du pH du lait écrémé fermenté avec avec les bifidobactéries ou la spiruline seules ou en association.....	61

II-5.2-Evolution des comptes des deux bactéries (<i>Bf. adolescentis</i> et spiruline) dans le lait écrémé contenant de la spiruline seule, de la spiruline associée à <i>Bf. adolescentis</i> et de la souche <i>Bf. adolescentis</i> seule.....	65
II-5.3-Discussion.....	69
II-5.4-Etude des variations des pH, des vitesses d'acidification, des temps de génération et du taux de croissance de bifidobactéries ou la spiruline seules et en association.....	70
II-6. Les analyses statistiques.....	72
II-6.1-Analyse statistique du pouvoir acidifiant de bifidobactéries ou la spiruline seules et en association.....	72
II-6.2-Analyse statistique de la cinétique de croissance de bifidobactéries ou de la spiruline seules et en association.....	73
II-6.3-Analyse statistique de la cinétique de croissance de <i>Bf. adolescentis</i> cultivée seule sur le lait écrémé, de la spiruline cultivée seule sur le lait écrémé et des deux cultivées au même temps sur le lait écrémé après 48 heures.....	74

Conclusion générale

Références bibliographiques

Annexes

Matériel utilisé

1. Verrerie

Boîtes de Pétri

Pipettes Pasteur de 1 et 2 ml.

Pipettes graduées : 5ml, 10ml, 25ml

Tubes à essais de 25 ml.

Flacons de 250 ml.

Becher de 500 ml.

Ballon jauge de 1000 ml.

Lame de microscope.

Micro-pipette.

Erlenmeyer.

2. Appareillage

Bain Marie

Bec bunsen

Réfrigérateur pour stocker les milieux de culture et les échantillons.

Etuves d'incubation réglées à 37°C et 44°C.

Balance de précision.

Porte tubes.

Poupinelle pour stériliser à 120°C et 180°C.

Anse de platine.

Microscope optique.

3. Produits et réactifs

Alcool.

Alun de fer.

Sulfite de sodium.

Réactif BLMT.

4. Milieux de culture

Les milieux de cultures utilisés sont fournis par l'institut Pasteur :

4.1. Milieux solides

Gélose P.C.A.

Gélose Hecktoen.

Gélose Braid-Parker BP.

Gélose Viande-Foie VF.

Gélose Sabouraud.

Gélose desoxycholate à 1‰.

Gélose nutritive.

Gélose TDYM

4.2. Milieux liquides

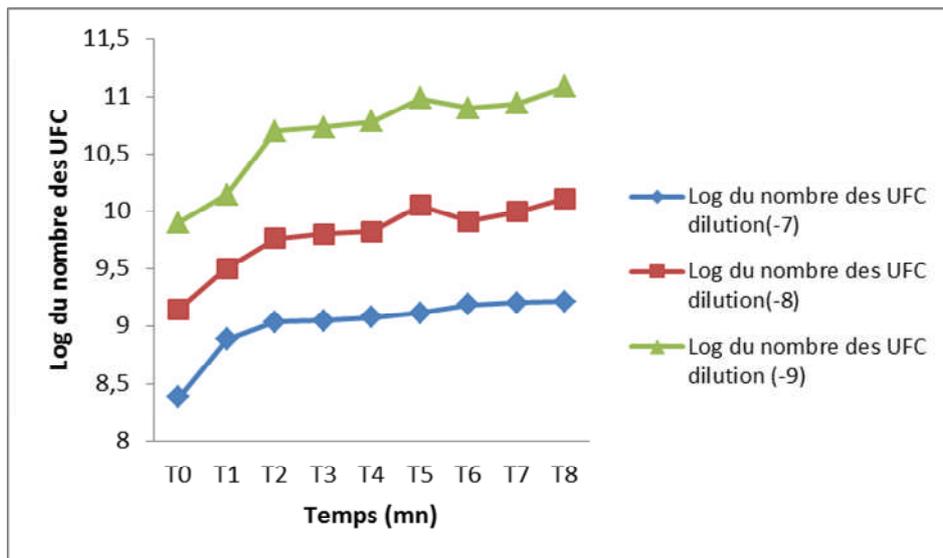
Milieu Schubert.

Milieu de Roth.

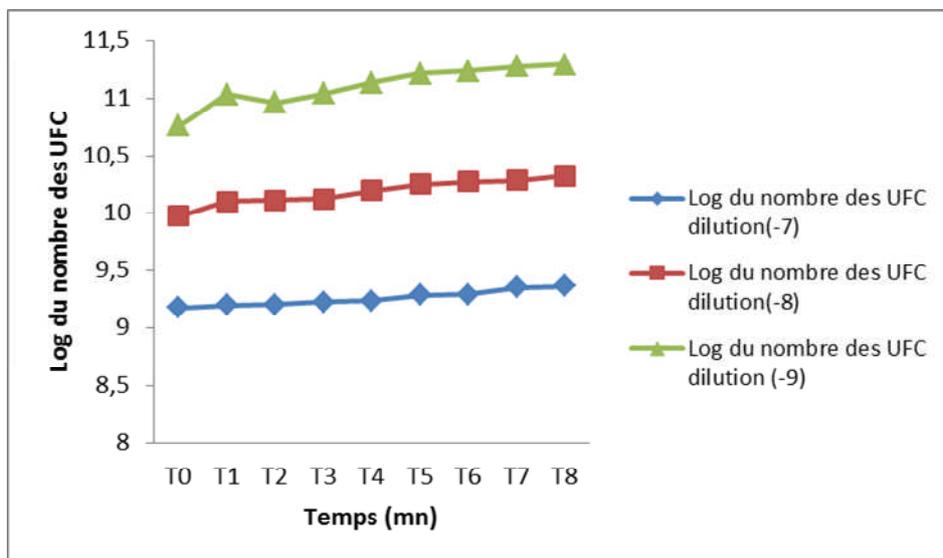
Milieu d'Eva Lizky.

Bouillon nutritif.

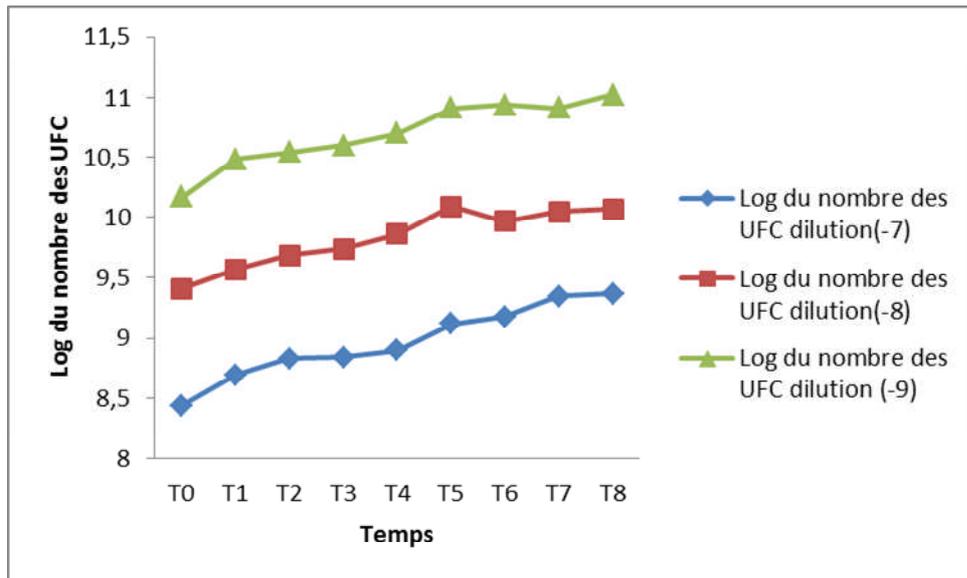
Eau physiologique à 9% (9 g de NaCl dans 1 litre d'eau distillée).



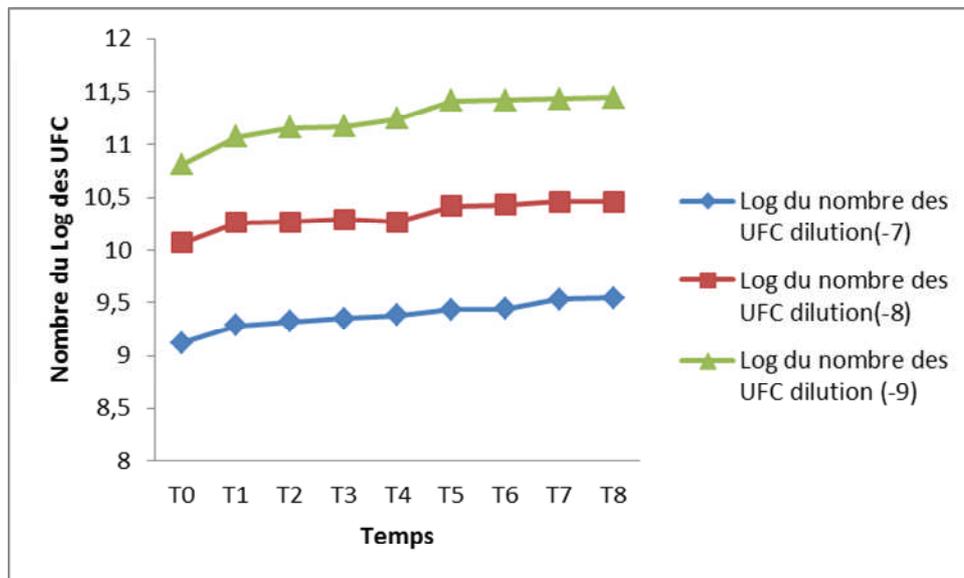
Evolution des comptes de *Bf. adolescentis* cultivé dans le lait écrémé après 24 heures en fonction du temps



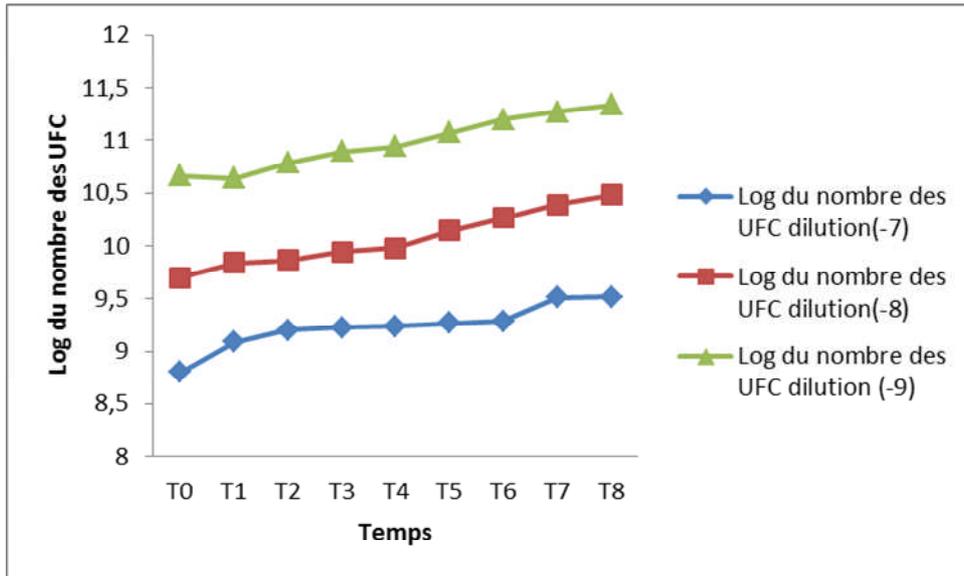
Evolution des comptes de *Bf. adolescentis* cultivé dans le lait écrémé après 48 heures en fonction du temps



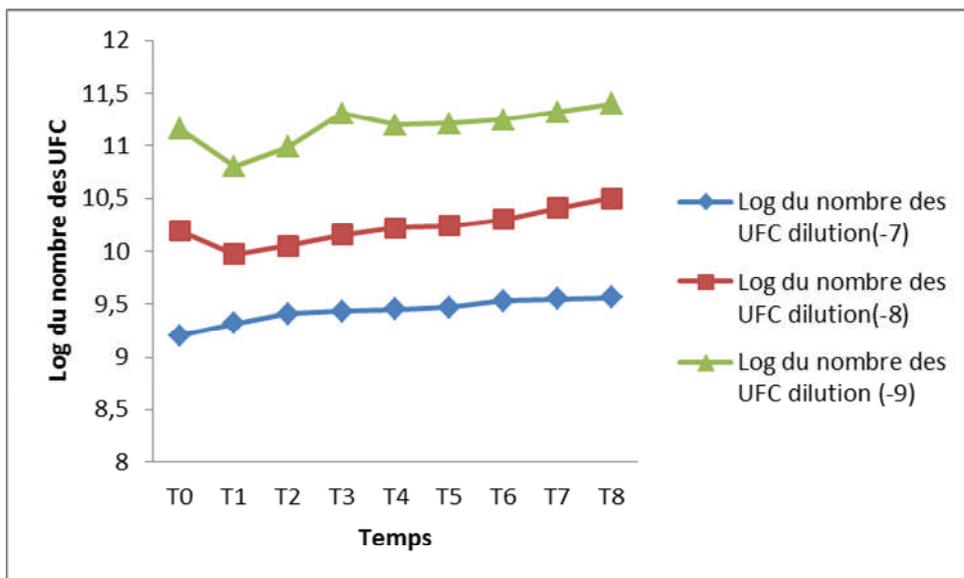
Evolution des comptes de *Bf. adolescentis* en association avec la spiruline cultivée dans le lait écrémé après 24 heures.



Evolution des comptes de *Bf. adolescentis* en association avec la spiruline cultivée dans le lait écrémé après 48 heures.



Evolution des comptes d'*Arthropsira platensis* cultivé dans le lait écrémé après 24 heures en fonction du temps



Evolution des comptes d'*Arthropsira platensis* cultivé dans le lait écrémé après 48 heures en fonction du temps

Tableaux des analyses de la variance:

Tableau 1: Analyse de la variance du pouvoir acidifiant de *Bifidobacterium adolescentis* et de la spiruline cultivés seules ou en association dans le lait écrémé.

Source de la variabilité	S.C.E	DDL	CM	F	P	E.T	C.V
VAR. totale	42,75	80	0,53				
VAR. temps	37,19	8	4,65	63831,98	0,0000		
VAR. espèce	3,36	2	1,68	23092,28	0,0000	0,01	0,2%
VAR. interaction	2,19	16	0,14	1883,11	0,0000		
VAR. résiduelle	0,00	54	0,00				

Tableau 2: Analyse de la variance de la cinétique de croissance de *Bifidobacterium adolescentis* et de la spiruline cultivés seules ou en association dans le lait écrémé après 24 heures

Source de la variabilité	S.C.E	DDL	CM	F	P	E.T	C.V
VAR. totale	317502,62	53	5990,62				
VAR. espèce	71976,84	2	35988,42	7773499,00	0,0000		
VAR. temps	216835,02	8	27104,38	5854545,50	0,0000	0,07	0,0%
VAR. interaction	28690,64	16	1793,17	387323,66	0,0000		
VAR. résiduelle	0,13	27	0,00				

Tableau 3: Analyse de la variance de la cinétique de croissance de *Bifidobacterium adolescentis* et de la spiruline cultivés seules ou en association dans le lait écrémé après 48 heures.

Source de la variabilité	S.C.E	DDL	CM	F	P	E.T	C.V
VAR. totale	260612,36	53	4917.21				
VAR. espèce	94005,30	2	47002.65	8122057,50	0,0000		
VAR. temps	145843,09	8	18230,39	3150210,80	0,0000	0,08	0,0%
VAR. interaction	20763,81	16	1297,74	224249,19	0,0000		
VAR. résiduelle	0,16	27	0,01				

Les valeurs de $F_{5\%}$ sont indiquées en caractère ordinaire, tandis que celles de $F_{1\%}$ sont en caractère gras.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	25	30	40	50	100	∞
1	4.052	4.999	5.403	5.625	5.764	5.854	5.923	5.981	6.022	6.056	6.082	6.102	6.117	6.128	6.136	6.142	6.147	6.151	6.154	6.156	6.158	6.159	6.160	6.160	6.160	6.160
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.36	19.38	19.40	19.41	19.42	19.43	19.43	19.44	19.44	19.44	19.44	19.44	19.44	19.44	19.44	19.44	19.44	19.44	19.44	19.44
3	10.13	10.35	10.48	10.57	10.63	10.67	10.70	10.72	10.74	10.75	10.76	10.76	10.77	10.77	10.77	10.77	10.77	10.77	10.77	10.77	10.77	10.77	10.77	10.77	10.77	10.77
4	7.71	7.91	8.03	8.12	8.18	8.22	8.25	8.27	8.29	8.30	8.31	8.31	8.32	8.32	8.32	8.32	8.32	8.32	8.32	8.32	8.32	8.32	8.32	8.32	8.32	8.32
5	6.61	6.79	6.90	6.98	7.04	7.08	7.11	7.13	7.15	7.16	7.17	7.17	7.18	7.18	7.18	7.18	7.18	7.18	7.18	7.18	7.18	7.18	7.18	7.18	7.18	7.18
6	5.99	6.14	6.25	6.33	6.39	6.43	6.46	6.48	6.50	6.51	6.52	6.52	6.53	6.53	6.53	6.53	6.53	6.53	6.53	6.53	6.53	6.53	6.53	6.53	6.53	6.53
7	5.59	5.74	5.84	5.92	5.97	6.01	6.03	6.05	6.06	6.07	6.07	6.08	6.08	6.08	6.08	6.08	6.08	6.08	6.08	6.08	6.08	6.08	6.08	6.08	6.08	6.08
8	5.32	5.46	5.55	5.62	5.67	5.71	5.73	5.75	5.76	5.77	5.77	5.78	5.78	5.78	5.78	5.78	5.78	5.78	5.78	5.78	5.78	5.78	5.78	5.78	5.78	5.78
9	5.12	5.26	5.34	5.41	5.45	5.48	5.50	5.51	5.52	5.52	5.53	5.53	5.53	5.53	5.53	5.53	5.53	5.53	5.53	5.53	5.53	5.53	5.53	5.53	5.53	5.53
10	4.96	5.10	5.17	5.24	5.28	5.31	5.33	5.34	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35
11	4.83	4.96	5.03	5.09	5.13	5.15	5.16	5.17	5.17	5.17	5.17	5.17	5.17	5.17	5.17	5.17	5.17	5.17	5.17	5.17	5.17	5.17	5.17	5.17	5.17	5.17
12	4.73	4.86	4.92	4.98	5.02	5.04	5.05	5.06	5.06	5.06	5.06	5.06	5.06	5.06	5.06	5.06	5.06	5.06	5.06	5.06	5.06	5.06	5.06	5.06	5.06	5.06
13	4.65	4.78	4.84	4.89	4.93	4.95	4.96	4.96	4.96	4.96	4.96	4.96	4.96	4.96	4.96	4.96	4.96	4.96	4.96	4.96	4.96	4.96	4.96	4.96	4.96	4.96
14	4.58	4.71	4.76	4.81	4.84	4.86	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87
15	4.52	4.65	4.70	4.75	4.78	4.80	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81	4.81
16	4.47	4.60	4.65	4.70	4.73	4.75	4.76	4.76	4.76	4.76	4.76	4.76	4.76	4.76	4.76	4.76	4.76	4.76	4.76	4.76	4.76	4.76	4.76	4.76	4.76	4.76
17	4.43	4.56	4.61	4.66	4.69	4.71	4.72	4.72	4.72	4.72	4.72	4.72	4.72	4.72	4.72	4.72	4.72	4.72	4.72	4.72	4.72	4.72	4.72	4.72	4.72	4.72
18	4.40	4.53	4.58	4.63	4.66	4.68	4.69	4.69	4.69	4.69	4.69	4.69	4.69	4.69	4.69	4.69	4.69	4.69	4.69	4.69	4.69	4.69	4.69	4.69	4.69	4.69
19	4.37	4.50	4.55	4.60	4.63	4.65	4.66	4.66	4.66	4.66	4.66	4.66	4.66	4.66	4.66	4.66	4.66	4.66	4.66	4.66	4.66	4.66	4.66	4.66	4.66	4.66
20	4.35	4.48	4.53	4.58	4.61	4.63	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64

* Nombre de degrés de liberté de la variance à comparer avec celle de l'erreur (N-1, N-2, Traitement).
 ** Nombre de degrés de liberté de la variance de l'erreur

Table de F

