

UNIVERSITE DE LIMOGES
Faculté de Pharmacie

ANNEE 1991

THESE N° 331

**ACTIVITE LACTASIQUE DES
BIFIDOBACTERIUM - LEUR INTERET
NUTRITIONNEL DANS LE CADRE
DE L'HYPOLACTASIE DE L'ADULTE**

T H E S E

POUR LE

**DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présentée et soutenue publiquement le 23 Septembre 1991

par

Brigitte PASSERAT

née le 7 Décembre 1961 à Brest (Finistère)

EXAMINATEURS de la THESE

Monsieur NICOLAS, *Professeur*PRESIDENT
Madame DESMAISON, *Maître de Conférences*JUGE
Madame BRUTUS, *Pharmacien*JUGE

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur **RABY**
- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur **GHESTEM** (1er Assesseur)
Monsieur **DREYFUSS**, Maître de Conférences (2e Assesseur)

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François-Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie
LEFORT des YLOUSES Daniel	Pharmacie Galénique
NICOLAS Jean-Albert	Bactériologie et Virologie, Parisotologie
LOUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

CELS René

A Monsieur Jean Albert **NICOLAS**
Professeur des Universités de Bactériologie et Virologie,
Parasitologie

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant la présidence de ce jury.

Je vous témoigne également ma reconnaissance pour m'avoir permis l'accès à votre Laboratoire Départemental et pour l'accueil qui m'y a été réservé.

A Madame Anne-Marie **DESMAISON**
Maître de conférences de Biochimie

Je vous remercie de m'avoir permis d'effectuer ce travail. Je vous suis reconnaissante des conseils et de l'assistance efficaces que vous m'avez prodigués dans l'élaboration de cette étude.

Veillez trouver ici l'assurance de ma respectueuse considération.

A Madame Anne-Marie **BRUTUS**

Pharmacien

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de faire partie des membres de ce jury, ainsi que de m'avoir permis de travailler à l'élaboration de cette thèse durant mon stage de fin d'études.

Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A mes Parents

Je dédie cette thèse à mes parents, que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance.

A mes soeurs

A ma famille

A mes amis

Je remercie mon père et ma soeur Nathalie qui ont participé à la réalisation technique de ce document.

A Monsieur Alain **MENU**DIER

Je tiens à vous témoigner mes sincères remerciements pour les conseils et l'aide que vous m'avez apportés lors de la mise au point de la culture des Bifidobacterium.

Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

Au Personnel du Laboratoire
Départemental

Je remercie tous ceux qui m'ont assistée dans cette
étude,

et tout particulièrement :

Madame Marie-Pascale **CHAMPAGNOL**

et

Madame Françoise **NOEL**

pour les nombreux conseils qu'elles m'ont prodigués.

A Madame Danièle **BRUNIE**

Je vous remercie de votre gentillesse et de votre
disponibilité.

A Madame Véronique **MOREAU**

Je vous remercie de votre gentillesse et de votre
disponibilité.



INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1 TAXONOMIE

2 IDENTIFICATION DES BIFIDOBACTERIUM

2.1 Identification du genre

2.2 Identification de l'espèce

3 MORPHOLOGIE

3.1 Généralités

3.2 Variation de la morphologie des Bifidobacterium en fonction de l'alimentation de l'hôte

3.3 Variation de la morphologie des Bifidobacterium en fonction de la composition du milieu de culture

3.4 Description des Bifidobacterium dans l'espace

3.5 Description des colonies

4 PHYSIOLOGIE

4.1 La respiration

4.2 Température et pH

5 LA PAROI CELLULAIRE

5.1 Description de la paroi cellulaire des Gram positifs

5.2 Description du peptidoglycane des Bifidobacterium

5.3 Description des polysaccharides des Bifidobacterium

5.4 L'acide téichoïque

6 L'ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE (A.D.N.) DES BIFIDOBACTERIUM

6.1 Etude de l'A.D.N.

6.2 Etude du plasmide

7 LES LIPIDES ET LES PHOSPHOLIPIDES CHEZ LES BIFIDOBACTERIUM

7.1 Les acides gras

7.2 Les phospholipides

7.3 Les glycolipides

8 METABOLISME

8.1 Métabolisme du glucose

8.2 Métabolisme du galactose

8.3 Métabolisme du fructose

9 FACTEURS BIFIDIGENES

9.1 Généralités

9.2 Le facteur BF1

9.3 Le facteur BF2

9.4 Autres facteurs bifidigènes

10 FACTEURS NUTRITIONNELS

10.1 Besoins en acides aminés

10.2 Besoins en vitamines

10.3 Besoins en minéraux

10.4 Besoins en bases

10.5 Besoins en sucres

11 LA CULTURE DES BIFIDOBACTERIUM

11.1 Milieux de base

11.2 Milieux sélectif et électif

11.3 Influence du milieu

12 L'HABITAT DES BIFIDOBACTERIUM

12.1 Généralités

12.2 Implantation chez le nouveau-né

12.3 Variation des espèces en fonction de l'âge

12.4 Survie des bifidobactéries dans l'estomac de l'homme

13 ROLE DES BIFIDOBACTERIUM

13.1 L'équilibre de la flore intestinale

13.2 Rôle des Bifidobacterium dans les diarrhées

13.3 Rôle des Bifidobacterium dans les troubles digestifs dus à l'antibiothérapie

13.4 Rôle dans les maladies du foie

13.5 Action hypocholestérolémiante

13.6 Prophylaxie de certaines tumeurs

13.7 Rôle des Bifidobacterium dans le système immunitaire

13.8 Rôle des Bifidobacterium dans la constipation

14 ACTIVITE ENZYMATIQUE DES BIFIDOBACTERIUM

14.1 La β -galactosidase

14.2 Autres activités enzymatiques

15 RAPPEL CONCERNANT L'INTOLERANCE AU LACTOSE ET LE DEFICIT EN LACTASE INTESTINALE

15.1 Déficit en β -galactosidase

15.2 La prévention

SECONDE PARTIE EXPERIMENTALE

1 MATERIEL ET REACTIFS

- 1.1 Les souches
- 1.2 Les réactifs

2 LE CHOIX DU MILIEU

- 2.1 Milieu sélectif
- 2.2 Milieu de base COLUMBIA
- 2.3 Milieu de base WILKIN-WEST
- 2.4 Milieu de base TRYPTICASE-PHYTONE-YEAST

3 OBTENTION D'UNE ATMOSPHERE ANAEROBIE

4 CULTURE ET ISOLEMENT DES DIFFERENTES SOUCHES

- 4.1 Culture de la souche lyophilisée
- 4.2 Culture des souches B et C à partir des laits fermentés
- 4.3 Culture de la souche D

5 PREPARATION D'UNE SUSPENSION BACTERIENNE ET DENOMBREMENT

- 5.1 Préparation d'une suspension bactérienne
- 5.2 Le dénombrement

6 DESCRIPTION DES COLONIES ET DES BACTERIES

- 6.1 Description des colonies
- 6.2 Description des bactéries

7 TECHNIQUES PERMETTANT DE MESURER L'ACTIVITE LACTASIQUE

- 7.1 Dosage du lactose et du galactose

7.2 Dosage de l'acide lactique

7.3 Dosage du glucose

8 ACTIVITE LACTASIQUE DE LA SOUCHE A à pH = 6,50

8.1 Protocole opératoire

8.2 Résultats des dosages

9 ACTIVITE LACTASIQUE DES SOUCHES B ET C à pH = 6,50

9.1 Protocole opératoire

9.2 Résultats des dosages de la souche B

9.3 Résultats des dosages de la souche C

10 ACTIVITE LACTASIQUE DE LA SOUCHE B EN FONCTION DU pH

10.1 Préparation de la gamme de pH

10.2 Protocole opératoire

10.3 Résultats des dosages

11 ACTIVITE LACTASIQUE DE LA SOUCHE D à pH = 6,50

11.1 Protocole opératoire

11.2 Résultats des dosages

12 ACTIVITE LACTASIQUE DE LA SOUCHE D EN FONCTION DU pH

12.1 Protocole opératoire

12.2 Résultats des dosages

13 ACTIVITE LACTASIQUE DANS LE YAOURT ENSEMENCE PAR LA SOUCHE D

13.1 Protocole opératoire

13.2 Résultats des dosages

DISCUSSION CONCLUSION



INTRODUCTION

I N T R O D U C T I O N

Les *Bifidobacterium* sont des bactéries que l'on retrouve dans les selles de l'homme mais aussi dans celles de nombreux animaux (SCARDOVI 1971).

La présence de *Bifidobacterium* dans les selles du nouveau-né est un signe de bonne santé. Les *Bifidobacterium* ont un rôle bénéfique en cas de diarrhée quelle que soit son origine (DISSART 1967), (ROMOND M.B. 1987b). Ils ont également un rôle hypocholestérolémiant et préviennent l'apparition de certaines tumeurs (RASIC 1983), (CUMMINS 1984).

Des études ont montré que ces *Bifidobacterium* possèdent une β -galactosidase dont l'activité est différente suivant les espèces (TOCHIKURA 1986).

L'hypolactasie ou déficit en lactase entraîne une intolérance au lactose dont les signes cliniques peuvent être graves. De nombreuses études effectuées sur les yaourts ont mis en évidence l'intérêt de leur consommation chez les sujets hypolactasiques (KOLARS 1984), (LEREBOURS 1989). Mais les laits fermentés peuvent également être utilisés dans l'hypolactasie (PASCAUD 1990) même si certains auteurs constatent que leur activité lactasique est faible par rapport à celle du yaourt (LEREBOURS 1989).

Notre étude a consisté à tester l'activité lactasique des *Bifidobacterium* isolés à partir de laits fermentés.

Dans une première étape nous avons isolé ces *Bifidobacterium* à partir de laits fermentés afin d'obtenir des souches pures de bifidobactéries. Il nous a fallu trouver un milieu adéquat, qui non seulement permet la culture des *Bifidobacterium* mais aussi inhibe la culture des autres bactéries.

Dans une seconde étape nous avons testé l'activité lactasique des *Bifidobacterium* en mettant en contact les souches pures de bifidobactéries et des solutions de lactose. Pour mesurer l'activité lactasique nous avons choisi de doser la disparition du lactose. Cependant dans certains cas, nous avons dosé l'apparition du galactose, du glucose et de l'acide lactique.

Avant de présenter et d'analyser nos résultats, nous présentons dans la première partie bibliographique les caractères morphologiques et physiologiques des *Bifidobacterium*. Nous discutons aussi de leur habitat et de leur rôle. Puis nous définissons rapidement l'hypolactasie et les moyens existants pour en prévenir les effets.

PREMIERE PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

- 1 - T A X O N O M I E

C'est au début du siècle que TISSIER met en évidence dans les selles des nouveaux-nés allaités par leur mère, des bactéries de forme particulière qu'il dénomme *Bifidus*, et plus précisément *Bacillus bifidus communis* ou *B.bifidus* (TISSIER 1900).

En 1924, ORLA JENSEN les regroupe dans le genre *Bifidobacterium*. A partir de 1954, les progrès technologiques permettent de différencier les bifidobactéries des *Lactobacillus* et de mettre en évidence plusieurs sortes de *bifidus*.

En 1957, DEHNERT reconnaît l'existence de multiples biotypes de *Bifidobacterium*. Il propose un schéma basé principalement sur la fermentation des hydrates de carbone pour leur identification et il met en évidence 5 espèces de bifidobactéries.

Cependant, la distinction entre les *bifidus* et les *Lactobacillus* reste encore difficile dans les années qui suivent et de nombreux auteurs les confondent, pensant qu'il s'agit d'une seule et même espèce. De ce fait le terme de *Lactobacillus bifidus* sera employé à tort dans la partie bibliographique, suite aux confusions faites par l'auteur cité. De nos jours, la différenciation est toujours difficile à faire et le nom de *Lactobacillus bifidus* est encore rencontré dans certains textes à la place de celui de *Bifidobacterium bifidum* (TOCHIKURA 1986), (BERNIER & al. 1988).

En 1953, REUTER se sert des différentes voies de fermentation des hydrates de carbone et des variations dans les caractères sérologiques des bifidobactéries pour mettre en évidence 6 espèces différentes qui sont :

- *Bifidobacterium bifidum*
- *Bifidobacterium breve*
- *Bifidobacterium liberorum*
- *Bifidobacterium lactensis*
- *Bifidobacterium adolescentis*
- *Bifidobacterium longum.*

En 1969, MITSUOKA met en évidence :

- *Bifidobacterium thermophilum*
- *Bifidobacterium pseudolongum.*

La même année SCARDOVI isole de la panse des vaches :

- *Bifidobacterium ruminale*
- *Bifidobacterium globosum.*

De cette façon, dans la huitième édition de "Bergey's Manual of Determination Bacteriologie", onze espèces de *Bifidobacterium* sont décrites et le genre est inclu dans la famille des Actinomycetaceae (ROGOSA 1974). Le genre comprend actuellement 26 espèces dont 10 sont considérées d'origine humaine et les 16 autres d'origine animale. La 26ème vient d'être décrite par LAUER en 1990 sous le nom de *Bifidobacterium gallicum* (LAUER 1990).

- 2 - IDENTIFICATION DES BIFIDOBACTERIUM

L'isolation de nouvelles espèces de bifidobactéries est encore fréquente, et si la distinction entre les *Lactobacillus* et les *Bifidobacterium* est relativement facile lorsque l'on possède le matériel adéquat, la différenciation entre les différentes espèces reste difficile.

- 2.1 - Identification du genre

La différenciation entre les *Lactobacillus* et les *Bifidobacterium* peut se faire en étudiant la composition de la paroi cellulaire (VEERKAMP 1971a), la composition en acide gras et en lipides (VEERKAMP 1971b), ou la composition en bases de l'acide désoxyribonucléique (SCARDOVI 1971) (cf § 6 et 7 de la présente partie).

La fermentation des hydrates de carbone peut aussi servir à distinguer les *Lactobacillus* des *Bifidobacterium*. La fructose 6-phosphate phosphocétolase étant l'enzyme clé des *Bifidobacterium* (SCARDOVI 1984), (SCARDOVI 1986).

La détection de l'enzyme fructose 6-phosphate phosphocétolase par réaction colorimétrique et la détermination à l'aide du profil enzymatique de souches de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus* ont démontré que les bifidobactéries possèdent une activité α -galactosidase, contrairement aux lactobacilles (ROY 1989).

- 2.2 - Identification de l'espèce

La détermination de l'espèce est beaucoup plus délicate comme le montrent les nombreux remaniements taxonomiques observés depuis les dix dernières années (SCARDOVI 1984), (SCARDOVI 1986), (ROMOND C. 1990a).

Depuis quelques années, la classification est basée sur la fermentation des hydrates de carbone (MITSUOKA 1982), (DE VRIES 1967), ou sur les procédés d'homologie A.D.N-A.D.N (SCARDOVI 1971). Mais on note une discordance entre ces deux types de classification. Si *Bifidobacterium adolescentis* et *Bifidobacterium dentium* sont deux espèces différentes pour SCARDOVI, ils correspondent à une seule et même espèce pour MITSUOKA. Or, il est maintenant reconnu que *Bifidobacterium dentium* est la seule espèce pathogène pour l'homme.

Ces deux techniques sont donc très aléatoires et actuellement une équipe de recherche, à Lille, tente de déterminer 150 caractères différents appartenant à quelques 500 souches de *Bifidobacterium* issues d'espèces différentes (ROMOND C. 1990a).

Ces techniques mises au point sont lourdes en manipulations pour les laboratoires, aussi utilise-t-on en première intention les propriétés de fermentation des oses. Mais l'interprétation des résultats reste délicate.

BIAVATI, en utilisant les relations d'hybridation A.D.N.-A.D.N. et en se basant sur les caractères morphologiques, la

température et le pH du milieu de culture, a permis la distinction entre *Bifidobacterium ruminantium* et *Bifidobacterium merycicum* (BIAVATI 1991).

Le fait qu'il n'existe pas de technique simple pour l'identification de l'espèce tient probablement à deux raisons. La première est que les anaérobies sont de découverte assez récente et la seconde est que les *Bifidobacterium* sont des espèces non pathogènes, mis à part *Bifidobacterium dentium* (ASSELIN 1988).

- 3 - M O R P H O L O G I E

- 3.1 - Généralités

La coloration de Gram appliquée aux cultures de bifidobactéries montre que les *Bifidobacterium* sont des bactéries Gram positif, immobiles et non sporulées.

Sa morphologie, comme son nom l'indique, est de forme bifide, c'est à dire qu'une des extrémités est en forme de Y, mais ceci n'est pas toujours le cas. Après la coloration de Gram on observe des bactéries ayant :

- la forme d'une simple baguette de taille variable.
- la forme d'une cellule courbée dont l'une des extrémités est quelquefois bifide.
- la forme d'une cellule droite présentant de nombreuses branches bulbeuses à l'une des extrémités.

Cette variation de la forme se retrouve d'une espèce à l'autre, mais aussi au sein d'une même espèce (NORRIS 1950), (HASSINEN 1951), (SCARDOVI 1986). Elle dépend en grande partie, in-vivo, de l'alimentation de l'hôte et, in-vitro, de la composition du milieu de culture, ce que nous verrons ultérieurement.

- 3.2 - Variation de la morphologie des *Bifidobacterium* en fonction de l'alimentation de l'hôte.

Pendant longtemps on a pensé que les *Bifidobacterium* ne se trouvaient que dans les selles des enfants nourris au sein

et qu'ils avaient une forme bifide. En effet cette forme était peu ou n'était pas retrouvée chez les enfants nourris au lait artificiel, par contre on y trouvait très fréquemment une forme droite que l'on appelait *Lactobacillus bifidus* (NORRIS 1950).

Certains chercheurs suggèrent alors pour la première fois que les *Lactobacillus bifidus* rencontrés dans les selles des enfants nourris au lait artificiel pourraient être des *Bifidobacterium* dont la morphologie est différente (HASSINEN 1951), (NORRIS 1950). NORRIS va jusqu'à proposer l'existence d'une mutation entre ces deux formes. Les *Lactobacillus bifidus* qui ont une forme bifide et qui se trouvent dans les selles des enfants nourris au sein, donnent par mutation, chez les enfants allaités au lait artificiel, une bactérie de forme droite qu'il appelle *Lactobacillus parabifidus* (NORRIS 1950).

L'hypothèse de cette mutation n'est pas reprise par les autres auteurs, mais la prédominance des formes bifides dans les selles des enfants nourris au sein est observée par de nombreux auteurs (TOMARELLI 1949), (GYLLENBERG 1958).

- 3.3 - Variation de la morphologie des *Bifidobacterium* en fonction de la composition du milieu de culture.

La composition du lait artificiel est différente de celle du lait maternel en bien des points et cette différence peut

expliquer que la forme bifide est retrouvée essentiellement dans les selles des enfants nourris au sein.

En effet, la présence du lait maternel dans le milieu de culture entraîne l'apparition d'une forme bifide (TOMARELLI 1949), (NORRIS 1950), (GLICK 1960), (VEERKAMP 1971a), (VEERKAMP 1983). Par contre si on le remplace par du lait de vache, on retrouve une forme droite (TOMARELLI 1949), (NORRIS 1950).

Des études ont déterminé dans un deuxième temps les facteurs nutritionnels nécessaires à la croissance des *Bifidobacterium*. GYORGY montre que le lait maternel peut être supplémente par des dérivés N-glucosamines et en particulier le N-acétyl-D-glucosamine. Mais la concentration relativement basse de ce composé dans le lait maternel ne lui permet pas d'expliquer le rôle spécifique que joue ce dernier dans l'obtention de la forme bifide (GYORGY 1955).

La culture de *Lactobacillus bifidus var. pennsylvanicus* sur des milieux contenant des concentrations différentes d' α, β , N-méthyl-N-acétyl-D-glucosamine dans une atmosphère contenant 90% d'azote et 10% d'oxyde de carbone à la température de 37°C montre une variation de la morphologie des *Bifidobacterium* en fonction de la concentration.

La forme bulbeuse ou noueuse est observée lorsque ce composé n'est pas présent ou lorsqu'il existe en très faible quantité (moins de 10 μ g pour 5 ml de milieu). Sa présence à une concentration plus élevée (100 μ g pour 5 ml de milieu)

entraîne l'apparition d'une forme bifide très marquée. Ce phénomène est retrouvé lorsque l'on fait varier la concentration en N-acétyl-D-glucosamine du milieu (GLICK 1960).

En 1972, HUSAIN teste les effets de 3 milieux différents sur la morphologie de *Bifidobacterium bifidum* (HUSAIN 1972).

Les trois milieux testés sont :

- un milieu régulier (MR) ou milieu de NORRIS qui est un milieu semi-synthétique.
- un milieu minimum (MM) ou milieu de HASSINEN.
- un milieu minimum modifié (MMM) qui correspond au milieu minimum enrichi en 17 acides aminés qui sont :
l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'alanine, l'arginine hydrochloride, l'asparagine, la glycine, la méthionine, la proline, la sérine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane, la tyrosine, la valine, la leucine, l'isoleucine et la lysine.

La concentration de chaque acide aminé est de 667 mg/l.

Les résultats obtenus sont les suivants :

- sur le milieu de NORRIS ou MR, les bactéries sont de forme incurvée et quelquefois bifide
- sur le milieu de HASSINEN ou MM, les bactéries présentent toutes un grand nombre de branches à l'une des extrémités
- sur le milieu minimum modifié ou MMM les bactéries sont de forme incurvée et quelquefois bifide
- L'addition dans le milieu de HASSINEN ou MM d'alanine,

d'asparagine, d'acide glutamique et de sérine entraîne l'apparition d'une forme incurvée et quelquefois bifide. Par contre, l'addition dans le milieu MM d'un seul de ces 4 acides aminés n'entraîne pas de variation de la forme

- La suppression d'un seul de ces 4 acides aminés dans le milieu minimum modifié ou MMM n'entraîne pas de modification de la forme.

Ces résultats sont résumés dans le tableau I ci-dessous:

Cette expérience confirme que les *Bifidobacterium* peuvent être maintenus sous une forme bifide ou une forme droite avec de nombreuses branches par simple manipulation du milieu.

**Tableau I : Culture et morphologie de Bifidobacterium bifidus dans différents milieux.
D'après Husain 1972**

MILIEU	MORPHOLOGIE
Milieu régulier (MR)	Forme incurvée et quelquefois bifide
Milieu minimum (MM)	Forme possédant de nombreuses branches
Milieu minimum modifié (MMM)	Forme incurvée et quelquefois bifide
MM+ acide Glu. + Ala. + Asp. + Ser.	Forme incurvée et quelquefois bifide
MM + Ala. MM + Asp.	Forme possédant de nombreuses branches
MMM + acide Glu. MMM + Ala. MMM + Asp. MMM + Ser.	} Identique au milieu MR

(- moins) (+ addition)

- 3.4 - Description des Bifidobacterium dans
l'espace

L'arrangement des bactéries sur un frottis est très variable. Les bactéries peuvent être disposées en V, en palissade, en étoile, en chaîne ou bien isolées (SCARDOVI 1986), (ROMOND M.B. 1987a), (ASSELIN 1988).

- 3.5 - Description des colonies

L'allure des colonies sur le milieu de culture est d'une grande diversité. Ces colonies peuvent avoir une forme ronde, convexe ou bien lisse avec des bords réguliers, ce qui traduit le caractère immobile de la bactérie.

La couleur des colonies peut être blanche ou crèmeuse, mais elle peut être beige avec un centre plus clair (SCARDOVI 1986), (ROMOND M.B. 1987a).

Ainsi, au pléomorphisme cellulaire s'ajoute celui des colonies, ce qui explique que la classification est basée soit sur la fermentation des hydrates de carbone, soit sur les procédés d'homologie A.D.N-A.D.N (SCARDOVI 1971), (MITSUOKA 1982).

On peut rajouter que cet aspect bifide n'est pas caractéristique de l'espèce et qu'il se retrouve chez d'autres bactéries telles que les Actinomyces et les Arthiobacters qui présentent elles aussi une forme bifide.

- 4 - P H Y S I O L O G I E

- 4.1 - La respiration

Les *Bifidobacterium* sont considérés comme des bactéries anaérobies strictes lors de leur découverte. Mais on s'aperçoit rapidement que certaines espèces sont aérotoleérantes à l'oxygène, tandis que d'autres y sont au contraire très sensibles (NORRIS 1950), (SCARDOVI 1986), (ROMOND C. 1990a). Toutes les espèces sont catalases négatives (SCARDOVI 1971).

- 4.2 - Température et pH

Ces deux paramètres sont difficiles à définir et varient d'une espèce à l'autre. Pour NORRIS, la culture des espèces bifides est pauvre à pH 6,00 et est absente à pH 5,60. Par contre, la culture des espèces possédant plusieurs branches à l'une des extrémités est maximum à pH 6,80 (NORRIS 1950).

Mais d'une façon générale, les conditions idéales à la survie des *Bifidobacterium* sont une température de 37°C et un pH égal à 5,00. Cependant les bactéries d'origine humaine préfèrent des températures allant de 36°C à 38°C, alors que les bactéries d'origine animale préfèrent des températures plus élevées, de l'ordre de 46°C (RASIC 1983). Cette température est proche de celle de la préparation du yaourt standard.

En dessous de 20°C, la culture des bifidobactéries n'est pas possible, de même qu'aux pH supérieurs à 8,00 et inférieurs à 5,00 , (VEERKAMP 1983), (ROMOND M.B. 1987a), (ASSELIN 1988) .

- 5 - LA P A R O I C E L L U L A I R E

- 5.1 - Description de la paroi cellulaire des Gram positifs

La paroi cellulaire des Gram positifs est constituée en grande partie d'un mucopeptide ou muréine, d'acide teichoïque et de chaînes polysaccharidiques reliées entre elles par des peptides courts.

Le mucopeptide est un polymère constitué de l'alternance de sous-unités de N-acétyl-glucosamine et d'acide N-acétyl-muramique réunies par des liaisons β 1-4. Les acides muramiques des différentes chaînes sont reliés par des peptides courts dont la composition varie d'une espèce à l'autre. Ces peptides courts sont à leur tour reliés par des structures parallèles constituées d'un ou plusieurs acide(s) aminé(s).

Les polylosides responsables de la spécificité antigénique des bactéries sont situés sur la paroi cellulaire. (JARVETZ 1973).

- 5.2 - Description du peptidoglycane des *Bifidobacterium*

L'étude de la paroi cellulaire des *Bifidobacterium* est importante car si elle permet de différencier les bifidobactéries des autres espèces de bactéries et en particulier des *Lactobacillus*, elle permet aussi de différencier les espèces les unes des autres (PREVOT 1970), (VEERKAMP 1971a).

En 1957, CUMMINS étudie la composition de la paroi cellulaire de huit espèces de *Bifidobacterium*. Il observe que l'alanine, l'acide glutamique et la lysine sont toujours présents. La sérine est souvent rencontrée, par contre la glycine, la thréonine et l'acide aspartique ne sont retrouvés que chez quelques espèces. (CUMMINS 1957)

Certains composés, comme la glucosamine et l'acide muramique sont quelquefois rencontrés, par contre la galactosamine ne l'est jamais. (CUMMINS 1957), (VEERKAMP 1983)

VEERKAMP étudie d'une façon très détaillée le mucopeptide de la paroi cellulaire des *Bifidobacterium*.

Selon lui, le mucopeptide de *Lactobacillus bifidus var. pennsylvanicus* comprend des polymères constitués d'acide N-acétyl-D-muramique et de N-acétyl-D-glucosamine. Les peptides courts qui relient les acides D-muramiques de ces différents polymères sont des tétrapeptides constitués d'alanine, d'isoglutamine et d'ornithine. L'acide aspartique et la sérine forment le pont adjacent au tétrapeptide. (VEERKAMP 1965), (VEERKAMP 1971a)

Le tétrapeptide de *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium liberorum*, *Bifidobacterium parvulorum* et *Bifidobacterium breve* contient de la lysine et le pont adjacent est constitué d'une simple molécule de glycine. *Bifidobacterium pseudolongum* et *Bifidobacterium thermophilus* contiennent de l'ornithine dans leur tétrapeptide (VEERKAMP 1971a).

- 5.3 - Description des polysaccharides des Bifidobacterium

La partie saccharidique de la paroi varie d'une espèce à l'autre. D'une manière générale le rhamnose, le galactose et le glucose sont les sucres les plus fréquemment rencontrés, mais leur concentration varie d'une espèce à l'autre (CUMMINS 1957), (POUPARD 1973), (HABU 1987).

Tableau II : Teneur en polysaccharides de la paroi cellulaire des Bifidobacterium.

D'après HABU 1987 Exprimée en nmol/mg

		E s p è c e			
		B. bifidum	B. breve	B. infantis	B. longum
Composé	Rhamnose	1,97	0	0	1,84
	Galactose	0	2,00	6,34	3,00
	Glucose	1,00	3,17	2,00	0

L'arrangement des polysaccharides dans l'espace est différent d'une espèce à l'autre ce qui permet de les identifier.

Un sucre rare le 6-déoxytalose est également rencontré dans la paroi cellulaire de *Bifidobacterium adolescentis* et plus particulièrement dans la partie extracellulaire du polysaccharide (NAGAOKA 1988).

- 5.4 - L'acide teichoïque

L'acide teichoïque est un constituant majeur de la paroi cellulaire des bactéries, mais il est rarement rencontré chez les bifidobactéries (POUPARD 1973). HABU le trouve en petite quantité chez *Bifidobacterium infantis* (HABU 1987).

On rencontre aussi un oligomère du manitol phosphate qui semble jouer le même rôle que l'acide teichoïque (VEERKAMP 1965), (VEERKAMP 1983).

- 6 - L'ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE (A.D.N.) DES
BIFIDOBACTERIUM

- 6.1 - Etude de l'A.D.N.

L'étude de l'acide désoxyribonucléique est importante car elle permet de distinguer les *Bifidobacterium* des *Lactobacillus*, mais aussi de les distinguer des autres espèces de bactéries.

L'analyse de l'A.D.N. par hydrolyse enzymatique montre que la valeur moyenne guanine + cytosine est de $60 \% \pm 0,33 \%$ pour les *Bifidobacterium* et est inférieure à 50% pour les *Lactobacillus* (WERNER 1963). Ces résultats sont confirmés par GASSER qui analyse la composition de l'A.D.N. de cinq espèces de *Bifidobacterium*. Ses résultats montrent que la teneur en cytosine et en guanine est de 58% . Cette valeur est supérieure à celle des *Lactobacillus* (GASSER 1968).

Les *Propionibacterium*, les *Catenabacterium* et les *Corynebacterium* ont une valeur moyenne inférieure à celle des *Bifidobacterium*. Toutefois la distinction entre les *Bifidobacterium* et les Actinomyces est difficile à faire si on se base sur l'A.D.N. (WERNER 1963).

Des relations d'homologie A.D.N. - A.D.N. ont été étudiées dans le genre *Bifidobacterium*. Plusieurs groupes génétiquement distincts sont reconnus, ce qui suggère une large divergence au sein des espèces. Ainsi, si *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium liberorum* et *Bifidobacterium lactensis*

forment l'un de ces groupes, aucune relation d'homologie n'est retrouvée au sein des différentes espèces de *Bifidobacterium bifidum* et de *Bifidobacterium adolescentis*.

On constate moins de 50 % d'homologie entre *Bifidobacterium longum* et *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium liberorum* et *Bifidobacterium lactensis* (SCARDOVI 1971).

Cette discordance au niveau des relations d'homologie A.D.N. - A.D.N. est aussi rencontrée pour les *Bifidobacterium* trouvés dans les selles des animaux, tels que *Bifidobacterium pseudolongum* et *Bifidobacterium suis*.

Cependant une certaine parenté est retrouvée entre les espèces humaines et animales. C'est le cas de *Bifidobacterium breve* et *Bifidobacterium thermophilum* ainsi que *Bifidobacterium longum* et *Bifidobacterium pseudolongum* (SCARDOVI 1971).

- 6.2 - Etude du plasmide

La présence d'un plasmide a été retrouvée chez 40 % des espèces de *Bifidobacterium breve*. Ce plasmide peut présenter cinq profils différents (IWATA 1989).

La présence de ce plasmide avait été précédemment mise en évidence chez *Bifidobacterium longum* (SGORBATI 1982), mais SGORBATI ne le retrouvait pas chez *Bifidobacterium breve*. Malgré tout, cette présence a été confirmée dans ce cas par électrophorèse sur gel agarose, par l'analyse de la fermentation des hydrates de carbone et par l'hybridation A.D.N.- A.D.N.

**- 7 - LES LIPIDES ET LES PHOSPHOLIPIDES CHEZ LES
BIFIDOBACTERIUM**

On rencontre chez les *Bifidobacterium* des acides gras, des phospholipides et des glycolipides.

Certains de ces composés ne sont pas retrouvés chez les *Lactobacillus*, d'autres le sont, mais à des concentrations différentes.

- 7.1 - Les acides gras

Les principaux acides gras des *Bifidobacterium* sont l'acide palmitique, l'acide myristique, l'acide stéarique et l'acide oléique. Les *Lactobacillus* possèdent peu d'acide stéarique. (VEERKAMP 1970), (VEERKAMP 1971 b).

- 7.2 - Les phospholipides

Les phospholipides rencontrés chez les *Bifidobacterium* sont :

- le triacyl-bis-(glycérolphosphoryl) glycérol
- le diphosphatidylglycérol
- le phosphatidylglycérol
- les polyglycérol phospholipides
- l'alanyl phosphatidylglycérol

Le diphosphatidylglycérol et le phosphatidylglycérol sont présents dans les deux genres. Les polyglycérolphospholipides, les lysodérivés et l'alanyl phosphatidylglycérol ne sont retrouvés que chez les *Bifidobacterium* (VEERKAMP 1971 b),

(POUPARD 1973).

Les polyglycérolphosphates des acides lipoteichoïques des *Bifidobacterium* ont un intérêt en systématique bactérienne. En effet les différences retrouvées au sein des espèces permettent d'envisager l'utilisation d'anticorps antiacides lipoteichoïques dans un but de sérogroupage des *Bifidobacterium* (ASSELIN 1988)

La valeur en phospholipides varie suivant la composition du milieu. Ainsi le taux de triacyl-glycérolphosphoryl diminue et le taux de phosphatidylglycérol augmente lorsque l'on rajoute du lait de femme dans le milieu (EXTERKATE 1969).

De même, de nombreux phospholipides ne sont pas détectés lorsque le pH du milieu est de 6,30 et sont retrouvés à des taux plus ou moins bas lorsque le pH est abaissé à 6,00 (EXTERKATE 1969).

Les phospholipides permettent de différencier les *Lactobacillus* des *Bifidobacterium* mais il est très difficile de s'en servir comme critère pour identifier les différentes espèces de *Bifidobacterium*, car leur composition dans la paroi cellulaire et dans le cytoplasme varie selon la nature du milieu et du pH (EXTERKATE 1969), (POUPARD 1973).

- 7.3 - Les glycolipides

Les glycolipides constituent un petit pourcentage des lipides totaux. Tous les glycolipides sont des galactolipides

car après hydrolyse seul le galactose est retrouvé par chromatographie (EXTERKATE 1969).

On retrouve un mono-, di- et trigalactosyldiglycérade, un monoacyl et un diacyl dérivés d'un monogalactosylglycérade et un monoacyl dérivé d'un digalactosyldiglycérade.

Les monogalactosyls et le digalactosylmonoglycérade sont détectés en petite quantité (EXTERKATE 1969), (POUPARD 1973).

- 8 - METABOLISME

- 8.1 - Métabolisme du glucose

- 8.1.1 - Utilisation du glucose

La fermentation du glucose par les *Bifidobacterium* est différente de celle observée chez les *Lactobacillus*, ce qui permet de faire la distinction entre les deux genres (DE VRIES 1967), (MITSUOKA 1982).

Les *Lactobacillus* fermentent le glucose selon deux voies. La première voie est la voie d'EMBDEN-MEYERHOFF mais la fructose 1-6 diphosphate aldolase, responsable de cette voie de dégradation n'est pas retrouvée chez les *Bifidobacterium*. Il en est de même de la glucose-6-phosphate déshydrogénase responsable de la dégradation du glucose par le shunt des hexoses monophosphates, qui est l'autre voie utilisée par les *Lactobacillus* (DE VRIES 1967).

Les *Bifidobacterium* utilisent le shunt du fructose 6-phosphate dont l'enzyme clé est une D-fructose-6-phosphate phosphocétolase qui clive le fructose-6-phosphate en acétyl phosphate et en érythrose 4-phosphate. Le fructose 6-phosphate et l'érythrose-4-phosphate grâce à une transaldolase donne du glycéraldéhyde-3-phosphate qui aboutit à du lactate (DE VRIES 1967), (SCARDOVI 1984), (SCARDOVI 1986).
(Voir schéma page suivante)

La fermentation du glucose produit 1,5 mole d'acétate et 1 mole de lactate via le pyruvate. Mais ce rapport théorique

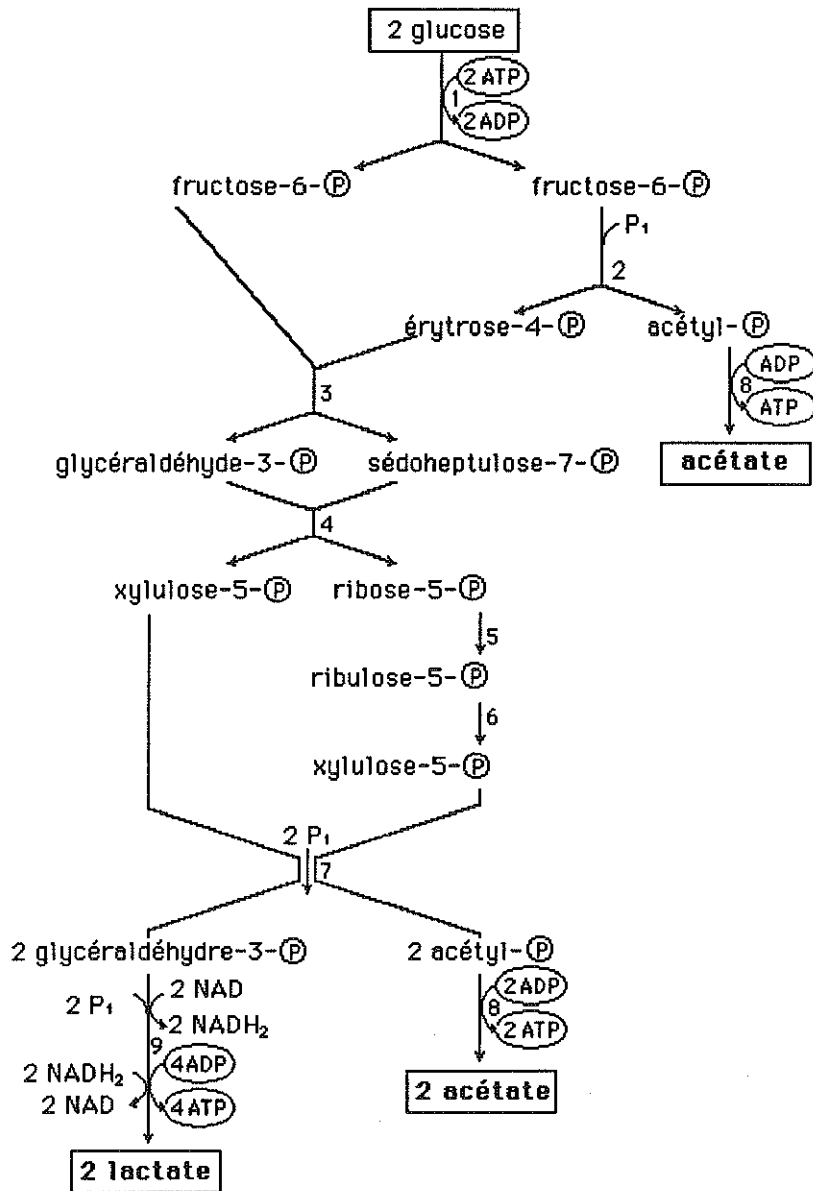


Figure 1 : DEGRADATION DES HEXOSES PAR LA VOIE DU FRUCTOSE-6-PHOSPHATE PHOSPHOCETOLASE

- Enzymes :
- 1 : hexokinase et glucose-6- phosphate isomérase
 - 2 : fructose-6-phosphate phosphocétalose
 - 3 : transcaldolase
 - 4 : transcétolase
 - 5 : ribose-5-phosphate isomérase
 - 6 : ribulose-5-phosphate 3-épimérase
 - 7 : xylulose-5-phosphate phosphocétalose
 - 8 : acétate kinase
 - 9 : enzymes de la voie homofermentaire.
- (ROMOND 1987a)

2 glucoses —> 3 acétates + 2 lactates
n'est pas retrouvé en pratique.

Lorsqu'on cultive des *Bifidobacterium* sur un milieu dont le substrat est soit du glucose, du lactose ou du galactose on s'aperçoit que les composés formés toujours rencontrés sont l'alcool éthylique, l'acide formique, l'acide lactique, mais leur concentration varie suivant l'hexose utilisé et l'espèce de *Bifidobacterium* cultivé (DE VRIES 1967), (DE VRIES 1968).

- 8.1.2. - Utilisation du pyruvate

Les *Bifidobactérium* utilisent l'acide pyruvique lors de la fermentation du glucose selon deux voies.

La première voie est une réduction du pyruvate en lactate grâce à une lactate déshydrogénase. La seconde voie est le clivage du pyruvate en acétyl-phosphate et en formate grâce à une enzyme "phosphoroclastique". L'acétyl-phosphate est ensuite réduit en alcool éthylique (SCARDOVI 1965), (DE VRIES 1968).

La voie utilisée par les *Bifidobacterium* dépend de l'espèce de *Bifidobacterium* mais aussi de l'ose utilisé comme substrat dans le milieu de culture. Trois facteurs vont influencer la bactérie dans son choix (DE VRIES 1968) :

- le premier est le taux de lactate déshydrogénase et d'enzyme "phosphoroclastique" dans le milieu.

- le second est la concentration en fructose 1,6-diphosphate dans le milieu, qui est le facteur d'activation de la lactate deshydrogénase.

- le troisième facteur est l'affinité de la lactate deshydrogénase et de l'enzyme "phosphoroclastique" envers le pyruvate.

Nous pouvons souligner dès maintenant que l'acide lactique formé est de type L, ce qui est très bénéfique pour la santé. Nous en reparlerons ultérieurement.

- 8.2 - Métabolisme du galactose

Les enzymes responsables du métabolisme du galactose sont la galactokinase, l'hexose 1-phosphate uridyltransférerase et l'UDP-galactose-4-épimérase.

Cette galactokinase convertit le galactose en galactose-1-phosphate qui, en présence d'UDP-glucose et grâce à l'uridyltransférerase donne du glucose-1-phosphate et de l'UDP-galactose.

Mais il existe une autre voie utilisant une pyrophosphorylase où le galactose-1-phosphate est transformé en glucose-1-phosphate. Cette pyrophospholyse peut être réalisée à pH acide ou neutre (ROMOND M.B. 1987a).

- 8.3 - Métabolisme du fructose

Bifidobacterium adolescentis, *Bifidobacterium longum*

et *Bifidobacterium thermophilum* sont caractérisés par leur facilité à pousser sur les fructo-oligosaccharides employés comme source de carbone. Ces 3 espèces possèdent une β -fructosidase ou inulase qui hydrolyse les fructo-oligosaccharides. Mais on observe que l'activité normale de la β -fructosidase dépend du degré de polymérisation du fructo-oligosaccharide.

Ces fructo-oligosaccharides sont retrouvés dans la farine d'artichaut que l'on peut utiliser comme source de carbone lors de la culture des *Bifidobacterium*. Ceci suggère que l'on peut utiliser la farine d'artichaut comme additif alimentaire pour stimuler la croissance des *Bifidobacterium* dans l'intestin, ce qui permet ensuite aux bifidobactéries d'exercer leurs effets bénéfiques sur la santé de l'homme (Mc KELLAC 1989). Ces fructo-oligosaccharides sont utilisés grâce à une β -fructosidase.

- 9 - FACTEURS BIFIDIGÈNES

- 9.1 - Généralités

Les *Bifidobacterium* sont des micro-organismes acidophiles qui dépendent de différents facteurs de croissance dénommés facteurs bifidigènes (ou bifidogènes). L'importance de ces facteurs a été mise en évidence pour la première fois par GYORGY. Il observe qu'un mutant de *Lactobacillus bifidus* ne peut pas être cultivé lorsque le lait de femme est absent du milieu de culture (GYORGY 1953).

Mais RAYNAUD en 1959 conteste les travaux de GYORGY et montre que la souche néotype *Bifidobacterium bifidum* de TISSIER nécessite des facteurs protéiques et non des sucres aminés. En fait, l'espèce *Bifidobacterium bifidum* se subdivise en deux variants : le variant "a", isolé surtout chez l'adulte et le variant "b", plus caractéristique du nourrisson.

Le variant "b" est absolument dépendant des dérivés lactosaminiques constitutifs des oligosaccharides du lait de femme, alors que le variant "a" trouve dans les hydrolysats de protéine les facteurs nécessaires à sa croissance.

Dans les années cinquante deux types de facteur bifidigènes sont connus: le facteur BF1 de GYORGY (GYORGY 1954) et le facteur BF2 de RAYNAUD (RAYNAUD 1959).

- 9.2 - Le facteur BF1

Le facteur BF1 est de nature oligosaccharidique et dérive

de la N-acétyl-glucosamine. Il est spécifique de *Bifidobacterium bifidum*. On le trouve dans le colostrum, le lait, le liquide amniotique ainsi que dans les glycoprotéines des groupes sanguins. WALCH a montré qu'en supplémentant du lait de vache avec du β -éthyl-N-acétyl-glucosaminide, il reconstitue une flore galactosidase Gram positive riche en *Bifidobacterium* dans le tube digestif du nouveau-né. Ce dérivé synthétique, image simplifiée des glucides du lait de femme stimule la prolifération des *Bifidobacterium* (WALCH 1956).

- 9.3 - Le facteur BF2

Le facteur BF2 est de nature protidique. Il est constitué de peptides obtenus par l'action d'une protéase sur la caséine. L'hydrolysat de caséine est de loin le plus actif des facteurs bifidigènes. LEVESQUE montre que son addition à raison de 20 000 U dans des préparations de lait de vache modifié entraîne une augmentation des bifidobactéries dans les selles des nouveaux-nés consommant ce lait modifié (LEVESQUE 1959).

- 9.4 - Autres facteurs bifidigènes

D'autres facteurs tels que les glycopeptides et les glycoprotéines ont pu être isolés du colostrum et du lait de femme. L'activité de ces structures serait liée à leur copule glucidique.

La caséine, facteur bifidigène par excellence, donne par hydrolyse des fractions contenant du galactose, de la

glucosamine et de la galactosamine possédant une activité bifidigène.

Il a été démontré, qu'in-vitro, *Bifidobacterium bifidum* ne peut identifier ses facteurs de croissance dans une molécule glycolysée complexe que dans la mesure où l'enchaînement des sucres lui permet de les reconnaître. La quantité des facteurs détectables dans un produit ne dépend pas seulement du nombre de résidus de N-acétylglucosamine mais également de la conformation de la chaîne oligosaccharidique. Ceci semble vérifié in-vivo (ROMOND M.B. 1990b).

- 10 - FACTEURS NUTRITIONNELS

- 10.1 - Besoins en acides aminés

Les *Bifidobacterium* sont, d'une façon générale, capables d'utiliser les sels d'ammonium comme seule source d'azote (SCARDOVI 1986). A ce sujet, il est peut-être envisageable d'imaginer que les bifidobactéries pourraient diminuer la teneur en ammoniaque du tube digestif, particulièrement augmentée lors des insuffisances hépatiques (ASSELIN 1988).

Certaines espèces telles que *Bifidobacterium suis*, *Bifidobacterium magnum* et *Bifidobacterium cuniculi* peuvent pousser sans apport d'azote organique. Dans ce cas de nombreux acides aminés tels que la thréonine, l'alanine, la valine et l'acide aspartique sont excrétés et ceci en quantité importante (SCARDOVI 1986).

Mais d'une façon générale la cystéine est le seul acide aminé nécessaire à la croissance des espèces de *Bifidobacterium*. Le glutathion est lui aussi indispensable. Les composés inactifs sont l'homocystéine, la méthionine, le mercaptoéthanol, l'acide thiopropionique, l'acide thiomalique. La cystéine nécessaire à la culture des *Bifidobacterium* ne peut pas être remplacée par la méthionine ou homocystéine (HASSINEN 1951).

- 10.2 - Besoins en vitamines

La culture des *Bifidobacterium* a permis de montrer que la biotine et le pantothénate de calcium sont nécessaires

(HASSINEN 1951). Mais ces vitamines ne sont nécessaires que chez certains *Bifidobacterium* que l'on retrouve dans les selles des enfants nourris au sein. On les appelle *Bifidobacterium* de type A. Les *Bifidobacterium* de type B sont rencontrés dans les selles des enfants nourris au biberon et la biotine n'est pas nécessaire pour leur culture, mais la stimule et ceci de façon importante. La riboflavine est indispensable à leur croissance (GYLLENBERG 1958).

La croissance des bifidobactéries est stimulée d'une façon générale par l'acide para-aminobenzoïque, l'acide folique et l'acide nicotinique (HASSINEN 1951), (GYLLENBERG 1958). L'activité de la pantéthine est approximativement égale à celle du pantothénate de calcium (HASSINEN 1951).

- 10.3 - Besoins en minéraux.

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

Les *Bifidobacterium* disposent de 4 modes d'incorporation du fer en fonction de la forme ionique et du pH du milieu (HASSINEN 1951).

Cette capacité est particulièrement intéressante en pathologie infantile. En effet la virulence des bactéries pathogènes dépend en partie de la disponibilité du fer dans le milieu mais également du pH du milieu ambiant. Chez le

nouveau-né allaité au sein, le pH acide des selles favorise le maintien du fer à l'état ferreux, forme facilement assimilée par *Bifidobacterium bifidum* au détriment des bactéries pathogènes. Le fer participerait également à la production d'acide acétique ce qui entraînerait une diminution du pH. Ceci pourrait expliquer la disparition des bactéries pathogènes chez les enfants nourris au sein (ROMOND M.B. 1987a).

- 10.4 - Besoins en bases

L'apport de guanine, d'uracile, d'adénine et de xanthine n'est pas obligatoire pour la croissance des *Bifidobacterium* (HASSINEN 1951), (GYLLENBERG 1958). Mais certaines espèces issues des selles des enfants nourris au biberon nécessitent la présence de bases dans leur milieu de culture (GYLLENBERG 1958).

- 10.5 - Besoins en sucres

La culture des *Bifidobacterium* sur un milieu de culture dépend de leur capacité à utiliser les différents sucres et il est intéressant de déterminer quels sont les sucres qui stimulent la croissance des *Bifidobacterium*. Le glucose, le galactose et le lactose sont utilisés par toutes les espèces grâce à une β -galactosidase mais dans des proportions variables selon les espèces (Mc KELLAC 1989).

- 11 - LA CULTURE DES BIFIDOBACTERIUM

- 11.1 - Milieux de base

De nombreux milieux ont été utilisés pour isoler et dénombrer les *Bifidobacterium*.

Les ingrédients utilisés sont très variables et vont du jus de tomate aux extraits de viande en passant par les laitages et les antibiotiques.

Mais s'il existe une multitude de milieux, aucun ne paraît être satisfaisant et les incertitudes concernant la classification sont peut-être dues à cette multitude de milieux utilisés. En effet la nature du milieu, la température et le pH jouent un rôle important dans la morphologie et dans la composition de la paroi cellulaire, des lipides, des phospholipides, ..., des *Bifidobacterium*.

Le premier milieu décrit est le milieu de NORRIS. Ce milieu est enrichi en acide folique et son pH est ajusté à 6,8 (NORRIS 1950). Les autres milieux de base utilisés pour l'isolation des *Bifidobacterium* contiennent du jus de tomate (HAENEL 1956), du sang de mouton (DEHNERT 1957), du lait de femme (DEHNERT 1957), de la peptone, du trypticase et de la phytone (OCHI 1964).

Pour HASSINEN, les *Bifidobacterium* poussent facilement sur un milieu simple constitué de lactose, d'acétate de sodium, d'acétate d'ammonium, de phosphate de potassium, de vitamine B, de cystéine, de biotine et de pantothénate de

calcium. Il rajoute de façon aseptique de l'acide ascorbique pour maintenir une oxydo-réduction favorable (HASSINEN 1951). Tous ces milieux sont peu utilisés de nos jours bien que certains ingrédients le soient encore.

Les milieux de base les plus couramment utilisés de nos jours sont le milieu Columbia (cf § 3.2 de la partie expérimentale), le milieu Wilkin-West (cf § 3.3 de la partie expérimentale), le milieu Brain Heart, le milieu Trypticase-phytone-Yeast (cf § 3.4 de la partie expérimentale), (BEERENS 1990), le milieu Y.N. 16 (MARA 1983), le milieu Y.N. 17 (RESNICK 1981) et le milieu B.I.M. 25 (MUNOA 1988) Ces milieux sont rendus sélectifs en rajoutant diverses substances.

- 11.2 - Milieux sélectif et électif

Les bifidobactéries exigent pour leur culture un milieu de base approprié, dit sélectif. Un milieu sélectif est un milieu qui ne permet pas la culture des Entérobactéries, des Acinetobacter, des Pseudomonas et autres bactéries Gram négatif. La culture des Lactobacillus, des moisissures et des levures est elle aussi supprimée.

Le milieu B.I.M. 25 a un degré de sélectivité plus important que le milieu Y.N. 16 et Y.N. 17 ainsi qu'un degré de toxicité plus faible. Ce milieu peut être utilisé pour rechercher des *Bifidobacterium* contenus dans de l'eau présumée potable. Les *Bifidobacterium* étant éliminés par les selles

leur présence sur le milieu de culture B.I.M. 25 est le signe d'une contamination de l'eau par ces dernières.

La sélectivité dans ce cas est obtenue par l'addition d'iodoacétate qui inhibe la croissance des autres bactéries (MUNOA 1988).

La sélectivité du milieu peut être obtenue en ajoutant dans le milieu de base (Columbia, T.P.Y.) de l'acide propionique à raison de 5 ml par litre de milieu. Le pH est ensuite ajusté à 5,00 par de la soude normale. Ce milieu a l'avantage d'être électif, ce qui donne des colonies plus grosses (BEERENS 1989), (BEERENS 1990).

Certains antibiotiques peuvent aussi être utilisés pour obtenir un milieu sélectif mais les résultats ne sont pas satisfaisants avec certaines espèces de *Bifidobacterium* (BEERENS 1989).

- 11.3 - Influence du milieu

La présence de caséine, d'acides gras insaturés tels que l'acide oléique et l'acide linoléique permet l'obtention d'une forme bifide. La présence d'acide désoxyribonucléique a aussi une grande importance (TOMARELLI 1949).

L'addition d'acide folique, de pancréatine, d'acide ascorbique et de vitamine B12 permet au contraire l'obtention d'une forme droite et sans branche (NORRIS 1950).

La présence de lait de femme dans le milieu intervient

dans la morphologie de la bactérie (GYORGY 1955) et modifie de façon considérable la composition en acides gras, en lipides et en phospholipides, (VEERKAMP 1970), (VEERKAMP 1971b).

Le pH joue un rôle important. Il intervient sur la morphologie de la bactérie ainsi que dans sa composition en lipides et en phospholipides (NORRIS 1950).

- 12 - L' H A B I T A T des B I F I B A C T E R I U M

- 12.1 - Généralités

Il est maintenant reconnu que si les *Bifidobacterium* sont retrouvés dans l'intestin de l'homme, on les trouve aussi dans les selles (*Bifidobacterium bifidum*), le vagin (*Bifidobacterium breve B.860*), la bouche (*Bifidobacterium dentium*), le pus (*Bifidobacterium breve*) ainsi que dans le tractus alimentaire de nombreuses espèces animales (*Bifidobacterium ruminale*) et dans les selles de nombreux animaux (*Bifidobacterium globosum*) (SCARDOVI 1971).

Si l'abeille possède une espèce qui lui est propre (*Bifidobacterium apis*), les autres espèces de *Bifidobacterium* sont retrouvées aussi bien chez l'homme que chez l'animal.

Dans l'estomac de l'homme, les bifidobactéries cohabitent avec de nombreuses bactéries anaérobies et aérobies comme les entérobactéries et les streptocoques (YUHARA 1983), (MITSUOKA 1984). La composition de la flore bifidobactérienne varie en fonction de la nourriture, de l'âge et de l'état de santé de l'animal et les bifidobactéries sont souvent les bactéries prédominantes de cette flore (YUHARA 1983).

- 12.2 - Implantation chez le nouveau-né

- 12.2.1- Implantation en fonction du mode d'accouchement

Durant sa vie foetale, le nouveau-né était dans un environnement stérile. A sa naissance il est contaminé en passant dans la voie vaginale. La colonisation du tube digestif est alors très rapide et débute le deuxième jour. Les bifidobactéries deviennent les bactéries prédominantes entre deux et cinq jours. L'enfant qui naît par césarienne ne peut pas se contaminer au contact de la flore vaginale ou fécale de sa mère, et l'implantation des bifidobactéries est beaucoup plus tardive (MITSUOKA 1984).

Dans ce cas, l'origine de la contamination reste incertaine car la composition de la flore est différente de celle existant dans l'air ambiant. De nombreux facteurs interviennent tels que le type d'alimentation, l'environnement et l'état physiologique du nouveau-né (MITSUOKA 1984).

- 12.2.2 - Implantation en fonction de la prématurité

Chez les prématurés nés par voie naturelle mais dont le poids est inférieur à la normale, les bifidobactéries ne deviennent prédominantes qu'au bout de dix à quinze jours (YUHARA 1983), (MITSUOKA 1984).

- 12.2.3 - Composition de la flore en fonction du poids de naissance

Chez les enfants ayant un poids normal on retrouve

Bifidobacterium breve, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis* et *Bifidobacterium longum*. Leur apparition est simultanée.

Par contre, chez un enfant né prématurément, il apparaît tout d'abord *Bifidobacterium breve*, puis plusieurs jours après *Bifidobacterium bifidum*. Ceci pourrait s'expliquer par l'imaturité des voies digestives, (YUHARA 1983), (MITSUOKA 1984). Ce phénomène est cependant contesté par certains auteurs qui ne trouvent aucune différence dans l'ordre d'implantation (BENNO 1984).

- 12.2.4 - Implantation en fonction du mode d'alimentation

Une étude comparative montre que si le nombre d'entérobactéries, de streptocoques et autres aérobies est plus élevé chez un enfant nourri au lait artificiel, il n'y a pas de différence significative en ce qui concerne le nombre de bifidobactéries sauf peut-être pour *Bifidobacterium bifidum* (YUHARA 1983).

Tableau III : Comparaison de la composition de la flore bifidobactérienne des enfants nourris au sein et de ceux nourris au lait artificiel.

D'après Yuhara 1983 Nbre de bactéries exprimées en log 10

ESPECES DE BIFIDOBACTERIUM	ENFANTS NOURRIS AU LAIT ARTIFICIEL	ENFANTS NOURRIS AU SEIN
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	9,3 ± 1,0	9,9 ± 0,6
<i>Bifidobacterium infantis</i>	10,2 ± 0,2	10,6 ± 0,4
<i>Bifidobacterium breve</i>	10,2 ± 0,7	10,7 ± 0,7
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	9,8 ± 0,9	9,6 ± 0,6
<i>Bifidobacterium longum</i>	9,5 ± 0,9	9,6 ± 0,8

- 12.3 - Variation des espèces en fonction de l'âge

A partir de 6 mois l'alimentation se diversifie entraînant un changement dans la composition de la flore bifide. Ceci conduit à la disparition de certaines espèces de *Bifidobacterium* tandis que d'autres espèces apparaissent. Chez l'adulte la flore est stable et elle n'est pas perturbée par les changements de régime alimentaire mais elle peut l'être par la prise d'antibiotiques. Chez les personnes âgées on observe une diminution de la flore bifide tandis que la flore putréfiante se développe (ROMOND C. 1987c). Ainsi *Bifidobacterium bifidum* et *Bifidobacterium infantis* se retrouvent surtout chez les enfants tandis que *Bifidobacterium adolescentis* et *Bifidobacterium longum* se rencontrent chez les adolescents et les personnes âgées avec toutefois une prédominance de *Bifidobacterium adolescentis* chez les personnes âgées (MITSUOKA 1984), (SCARDOVI 1986).

- 12.4 - Survie des bifidobactéries dans l'estomac de l'homme

La survie des bifidobactéries dans l'estomac de dix sujets sains a été mesurée par tubage après l'ingestion de produits du commerce contenant du yaourt associé à des *Bifidobacterium*. Cette survie est très variable suivant les produits mais en général on observe une bonne résistance des bifidobactéries vis à vis de l'acidité gastrique ce qui leur permet d'exercer leurs actions bénéfiques dans le tube digestif de l'homme (BERRADA 1989).

- 13 - R O L E D E S B I F I D O B A C T E R I U M

Tous les auteurs sont d'accord pour reconnaître que les *Bifidobacterium*, mis à part *Bifidobacterium dentium*, ont un rôle bénéfique sur la santé de l'homme (MITSUOKA 1989).

- 13.1 - L'équilibre de la flore intestinale

Les *Bifidobacterium* apparaissent dès la naissance au niveau du tube digestif du nouveau-né et sont ensuite présents à des taux plus ou moins variables, la flore digestive de l'homme pouvant être remplacée par une flore pathogène responsable de troubles digestifs.

Des études ont montré que le développement d'un certain type de bactéries intestinales inhibe l'apparition de bactéries dites pathogènes. Ceci serait dû à une compétition au sein des bactéries pour les facteurs de croissance (MITSUOKA 1985). Les *Bifidobacterium* auraient la capacité de l'emporter sur les autres bactéries et en particulier sur les espèces pathogènes telles que les colibacilles (MAYER 1974), (RASIC 1983), (MITSUOKA 1985), (MITSUOKA 1989). Ils auraient un effet antibactérien et antibiotique (MAYER 1974), (MITSUOKA 1985).

La présence de bifidobactéries dans le tube digestif provoque un abaissement du pH à la suite de la sécrétion d'acide lactique et d'acide acétique. Ce pH bas inhibe la croissance des bactéries pathogènes et stimule le péristaltisme intestinal (MITSUOKA 1985).

L'acide lactique sécrété est du type L+ alors que les *Lactobacillus* sécrètent de l'acide lactique du type D ou DL. La forme D ou DL est peu métabolisée par le nouveau-né, ce qui peut entraîner une acidose, une formation de méthémoglobine ou des perturbations neurologiques. Il est de ce fait déconseillé de donner des yaourts à des nouveaux-nés. La forme L+ est, elle, entièrement métabolisée et les laits fermentés ne représentent ainsi aucun danger (ROMOND M.B 1987b).

Pour certains auteurs l'action bénéfique des bifidus est due à la sécrétion de vitamines telles que la vitamine B1 et la vitamine B2 qui sont entièrement réabsorbées au niveau de l'intestin (LEVESQUE 1959), (MITSUOKA 1985). L'administration orale de *Bifidobacterium bifidum* à des nouveaux-nés de 1 à 2 mois à raison de 10⁹ cellules/jour entraîne des concentrations sanguines et urinaires élevées en vitamines telle que la thiamine (ROMOND C 1987c).

Lorsque le taux de bactéries pathogènes devient important ou prend le pas sur les bifidus, il se produit une putréfaction qui entraîne l'apparition d'ammoniaque, d'amine, d'indol et de phénol. L'absorption de produits laitiers contenant des bifidus va réguler le transit et jouer un rôle dans le maintien du taux de bifidus dans l'intestin (MAYER 1974), (MITSUOKA 1985).

- 13.2 - Rôle des *Bifidobacterium* dans les diarrhées

Les laits fermentés peuvent être utilisés en cas de

diarrhées et permettent d'éviter les troubles gastriques au cours des traitements par les antibiotiques.

L'absorption de bifidobactéries ou de lyophilisat de *Bifidobacterium bifidus* chez des enfants présentant des infections entériques à *Escherichia coli* entéropathogènes peut conduire à une élimination de ce germe dans 60 % des cas, ainsi qu'à un arrêt de la diarrhée et une reprise rapide du poids (SCHEEGANS 1966). Si on donne des bifidobactéries et du lactulose, l'effet favorable se produit dans 80 % des cas. Ceci serait dû à l'abaissement du pH (ROMOND M.B. 1987b).

Ces travaux sont repris et confirmés par TASSOVATZ qui montre que cette action n'est pas retrouvée avec les yaourts, par DISSART qui précise qu'il faut continuer le traitement au bifidus après l'arrêt de la diarrhée pendant quelques jours pour avoir un résultat satisfaisant (TASSOVATZ 1964), (DISSART 1967).

- 13.3 - Rôles des *Bifidobacterium* dans les troubles digestifs dus à l'antibiothérapie

L'absorption d'antibiotiques est souvent suivie chez l'enfant et chez l'adulte de diarrhées et de troubles digestifs très variés. L'absorption simultanée de bifidus et d'antibiotiques peut prévenir la diarrhée et maintenir un transit normal dans 83,42 % des cas (CASANOVA 1974), (ROMOND M.B. 1987b). Les yaourts n'ont aucun rôle dans la prévention des troubles digestifs dus à l'antibiothérapie (ROMOND C. 1987c).

L'antibiothérapie peut favoriser le développement de *Candida albicans* et l'association d'antibiotiques et de bifidus peut conduire à la disparition du *Candida albicans* pathogène, mais ceci n'est pas toujours observé (MAYER 1974).

- 13.4 - Rôle dans les maladies du foie

Dans le cas de maladies chroniques du foie comme la cirrhose, l'administration de *Bifidobacterium bifidum* additionné de lactulose peut aider au rétablissement de la flore intestinale souvent déséquilibrée par ce type de maladie. En effet des germes indésirables se mettent à proliférer et produisent des déchets toxiques issus du métabolisme protidique, tel l'ammoniac, que le foie est incapable de détoxifier. Il faut tenter d'éliminer chez de tels sujets, la masse de germes produisant ces déchets et ainsi épargner au foie la tâche de les métaboliser. Le traitement, qui consiste à remplacer une flore pathogène par une flore bénéfique semble plus salulaire que la destruction de la flore pathogène par l'antibiothérapie (RASIC 1983), (MITSUOKA 1985).

- 13.5 - Action hypocholestérolémiante

Les *Bifidobacterium* diminuent le taux de cholestérol chez le rat. Des essais ont été entrepris chez l'homme, mais à une échelle trop faible pour être significatifs. Le mécanisme est encore mal connu (MITSUOKA 1985).

- 13.6 - Prophylaxie de certaines tumeurs

Les *Bifidobacterium* possèdent une activité antitumorale (CUMMINS 1984), et immunostimulante (BREUILLAUD 1976).

L'implantation d'*Escherichia coli*, de *Streptococcus faecalis* et de *Clostridium* entraîne l'apparition de tumeurs chez 100 % des animaux.

L'effet tumorigène de cette association bactérienne est annihilé par l'addition de *Bifidobacterium longum*. L'explication se trouverait dans la possibilité enzymatique des *Bifidobacterium* à dégrader les N-nitrosamines par action enzymatique (ROMOND C. 1987c).

- 13.7 - Rôle des *Bifidobacterium* sur le système immunitaire

La consommation régulière de lait fermenté pourrait stimuler le système immunitaire de l'homme (RASIC 1983).

Mais cette activité antigénique serait due à la fraction polysaccharidique de *Bifidobacterium adolescentis*. Cette activité n'est jamais retrouvée avec des fractions riches en protéines tandis que les fractions riches en carbohydrates stimulent la synthèse de l'A.D.N. (GOMEZ 1988).

- 13.8 - Rôle des *Bifidobacterium* dans la constipation

Les *Bifidobacterium* vont entraîner une diminution du pH

ce qui conduit à une augmentation du péristaltisme et à un retour à un transit normal (MAYER 1974). Les laits fermentés peuvent ainsi être utilisés dans le traitement de la constipation chez la femme enceinte (EBISSAWA 1987).

La constipation chez l'homme provoque un phénomène de putréfaction et la formation de substances toxiques qui seraient responsables du cancer du côlon. On peut considérer que les *Bifidobacterium* en abaissant le pH contribuent indirectement à la prévention des cancers (MAYER 1974). Mais pour certains auteurs la disparition de la flore de putréfaction est due à la production d'acides aminés (LEVESQUE 1959).

Les *Bifidobacterium*, en évitant le développement exagéré de certaines bactéries telles que *Escherichia coli* et en luttant contre certaines infections, participent activement à la régulation du transit intestinal et, par là même, à la santé et au bien être de l'hôte. Mais toutes les espèces de *Bifidobacterium* ne produisent pas les mêmes effets. Les effets bénéfiques mis en évidence avec *Bifidobacterium bifidum* ne sont pas retrouvés avec les autres espèces de *Bifidobacterium* (ROMOND M.B. 1987b).

Les métabolites présents dans le lactosérum des laits fermentés sont tout aussi efficaces que la bactérie elle-même. Mais la solution idéale est la prise simultanée de *Bifidobacterium* et de facteurs bifidogènes (ROMOND C. 1987c).

- 14 - ACTIVITE ENZYMATIQUE DES BIFIDOBACTERIUM

- 14.1 - La β -galactosidase

Les *Bifidobacterium* possèdent une activité spécifique envers les glycosides qui n'est pas retrouvée chez les autres bactéries. L'analyse enzymatique de ces bactéries suggère que l'hydrolyse des glycosides est due à une β -D-galactosidase pour certaines espèces de *Bifidobacterium* et à une β -D-gluco-
sidase pour les autres espèces.

Il existe plusieurs types de β -D-galactosidase car celle qui hydrolyse le β -déshydrogénase-fucoside et que l'on trouve dans *Bifidobacterium longum* 401 ne permet pas l'hydrolyse du lactose et du lactulose (TOCHIKURA 1986).

La culture de *Lactobacillus bifidus* sur un milieu utilisant le lactose comme source de carbone possède une β -D-galactosidase qui hydrolyse les galacto-oligosaccharides contenus dans le lait de femme (TOCHIKURA 1986). Cette enzyme hydrolyse aussi le lactose et le lactulose (IWASAKI 1971).

On observe une différence de l'activité β -galactosidasi-
que chez *Bifidobacterium bifidum* et *Bifidobacterium longum* 401. La β -D-galactosidase de *Bifidobacterium longum* 401 ayant une plus haute affinité vis-à-vis du lactose que du lactulose. Le phénomène inverse est observé chez *Bifidobacterium bifidum*. Mais l'activité de la β -galactosidase varie aussi au cours du temps (NICOLAI 1984).

Le β -D-fucoside est, lui aussi, hydrolysé par les *Bifidobacterium* ce qui semble être une caractéristique des bifidobactéries. L'hydrolyse de ce sucre peut se faire soit grâce à la β -D-galactosidase soit grâce à la β -D-glucosidase (SAKAI 1989).

- 14.2 - Autres activités enzymatiques

A côté de cette activité β -D-galactosidasique, les *Bifidobacterium* possèdent une activité α -glucosidasique, β -D-glucosidasique et α -galactosidasique (ROY 1989).

L' α -glucosidase permet l'hydrolyse de l' α -D-glucoside. Cette activité n'a été retrouvée que chez *Bifidobacterium breve* 203 et *Bifidobacterium adolescentis* 304.

La β -D-glucosidase permet l'hydrolyse du β -D-fucosyl-glucose et du β -D-glucoside. Cette activité est retrouvée chez *Bifidobacterium breve* (SAKAI 1989), mais pas chez les autres espèces (TOCHIKURA 1986).

Les *Bifidobacterium* possèdent une β -fructosidase qui hydrolyse les fructo-oligosaccharides et une α -galactosidase qui hydrolyse le mélibiose et le raffinose (ROY 1989).

Après avoir étudié la morphologie et la physiologie des *Bifidobacterium*, nous allons faire un rappel concernant l'intolérance au lactose avant d'aborder la partie expérimentale.

- 15 - RAPPEL CONCERNANT L'INTOLERANCE AU LACTOSE ET
LE DEFICIT EN LACTASE INTESTINALE

-15.1 - Déficit en β -galactosidase

Le lactose présent dans les produits lactés n'est pas absorbé tel que par la muqueuse intestinale, mais doit être préalablement hydrolysé en glucose et en galactose par la lactase, qui est une glycoprotéine localisée dans la bordure en brosse des entérocytes. Cette lactase appartient au groupe des β -galactosidases.

A côté de la lactase on trouve dans l'entérocyte deux autres β -galactosidases :

- l'hétéro- β -galactosidase qui est cytosolique et qui hydrolyse certains hétéro- β -galactosides
- la β -galactosidase acide qui est lysosomiale et qui hydrolyse indifféremment les hétéro- β -galactosidases et le lactose (MONTREIL 1981), (FLOURIE 1987), (RAUL 1988).

Cependant le rôle de ces deux dernières enzymes, lors de la digestion du lactose, ne semble pas prépondérant même en cas de déficit en lactase (FLOURIE 1987).

Le lactose et son composé de dégradation, le galactose, sont deux glucides dont l'intérêt pour l'animal et l'homme est immense à la fois sur le plan métabolique et sur le plan biologique. Mais le déficit en lactase apparaît très tôt dans la plupart des populations humaines.

Il existe en fait 3 types de déficiences en lactase :

- le déficit congénital, très rare, qui se manifeste à la naissance (RAUL 1988), et qui se traduit par une diarrhée de fermentation qui apparaît dès les premiers jours de la vie. Il est dû à un déficit de la β -galactosidase, l'hétéro- β -galactosidase et la β -galactosidase lysosomiale sont présentes (FIEZAR 1981)

- le déficit secondaire qui apparaît à la suite d'une altération de la muqueuse intestinale (infection virale, maladie caelique, gastro-entérite...) (FIEZAR 1981), (RAUL 1988)

- le déficit primaire ou hypolactasie de type adulte touchant presque tous les mammifères adultes et 70 % de la population mondiale adulte, avec une prédominance pour les noirs et les jaunes. Dans ce cas, la β -galactosidase neutre n'est retrouvée dans la membrane microvillositaire qu'en proportion de son activité lactasique (FIEZAR 1981), (RAUL 1988). En conséquence, le lactose non hydrolysé s'accumule dans l'intestin et entraîne l'apparition de troubles digestifs tels que douleurs abdominales, diarrhées acides, vomissements (BRULE 1981), (RAUL 1988), (POIFFAIT 1989). Ces troubles sont dûs à la fermentation du lactose par la flore intestinale (FEVRIER 1981). Cependant certains sujets ne présentent aucun trouble particulier (FLOURIE 1987).

- 15.2 - La prévention

On pourrait retirer le lactose de l'alimentation. Mais si cela est simple chez l'adulte, on ne peut l'envisager chez

l'enfant. Plusieurs techniques peuvent pallier ce déficit.

L'utilisation de laits artificiels sans lactose, mais équilibrés en dextrine-maltose représente une solution.

On peut agir sur le tractus digestif en ingérant de façon simultanée du lait et des fibres alimentaires ce qui ralentit la vidange gastrique.

On peut manipuler la flore colique pour accroître sa capacité à digérer les sucres. De même, l'ingestion de lait au cours d'un repas réduit les quantités de lactose atteignant le côlon par rapport à une ingestion identique à jeun (FLOURIE 1987), (ANDREW 1990).

Enfin l'hydrolyse artificielle du lactose avant son ingestion permet de pallier cette insuffisance enzymatique. Le lactose peut être hydrolysé au sein même du lait par incubation avec une lactase ou par son addition juste avant l'ingestion. Cette lactase est apportée par des bactéries, les premières utilisées ont été *Escherichia coli* et *Aspergillus oryzae*, ou des levures (BRULE 1981), (FLOURIE 1987). Plus récemment la β -galactosidase de certains végétaux a été utilisée mais son action est spécifique (DICK 1990). L'hydrolyse du lactose peut-être obtenue par une technique utilisant l'immobilisation de la β -galactosidase (ANDREW 1990).



SECONDE PARTIE

EXPERIMENTALE

- 1 - M A T E R I E L et R E A C T I F S.

- 1.1 - Les souches

Nous avons testé l'activité lactasique de plusieurs souches de *Bifidobacterium*. Ces souches ont des origines diverses.

- La souche A est une souche lyophilisée commercialisée en pharmacie. Le fabricant indique qu'elle est constituée de *Bacillus bifidus* lyophilisés dans son milieu de culture et que l'excipient est du lait traité.

- Les souches B et C sont isolées à partir de laits fermentés. Les fabricants des produits B et C sont différents. La souche B est constituée de *Bifidobacterium longum*.

- La souche D constituée de *Bifidobacterium longum* nous a été remise par une laiterie. Cette souche se présente sous forme de granulés congelés et la fiche technique indique qu'elle a été isolée à partir de l'intestin humain. Son numéro de culture est Bb 12. Nous avons aussi testé l'activité lactasique d'un lait fermenté du commerceensemencé par la souche D.

- 1.2 - Les réactifs

Pour le dosage du lactose et du galactose nous avons utilisé le réactif Lactose/Galactose de BOEHRINGER/MANNHEIM référence 176303.

Pour le dosage de l'acide L lactique nous avons utilisé le réactif L Lactic Acid de BOEHRINGER/MANNHEIN référence 139084.

Pour le dosage du glucose nous avons utilisé la méthode à la glucose-oxydase GOD-PAP de BOEHRINGER/MANNHEIN référence 1004743.

- 2 - L E C H O I X D U M I L I E U

La culture des *Bifidobacterium* est rendue difficile par le fait que les bifidobactéries sont des bactéries fragiles, anaérobies et qu'il existe une grande variation des besoins au sein des différentes espèces de *Bifidobacterium* (BEERENS 1989), (BEERENS 1990).

Les laits fermentés étudiés contiennent trois bactéries: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* et *Bifidobacterium* (l'espèce exacte n'est pas indiquée par le fabricant pour la souche C). Nous avons utilisé, pour notre culture des milieux dits sélectifs. Un milieu sélectif est un milieu qui non seulement permet la culture des *Bifidobacterium* mais inhibe la culture des deux autres espèces de bactéries. Un tel milieu est constitué d'un milieu de base auquel on ajoute diverses substances afin de le rendre sélectif.

Nous avons essayé plusieurs milieux de base avant de nous décider pour le milieu T.P.Y. La sélectivité du milieu est obtenue par l'addition d'acide propionique et l'ajustement du pH à 5,00 (BEERENS 1989), (BEERENS 1990).

- 2.1 - Milieu sélectif

D'après BEERENS un pH de 7,00 n'est pas un facteur d'inhibition car il pousse sur le milieu des *Bifidobacterium* mais aussi d'autres bactéries comme les *Lactobacillus*. Un pH de 5,00 sans acide propionique entraîne le même résultat. Par contre l'association acide propionique + pH = 5,00 donne un

milieu sélectif et électif. Sélectif car seules les espèces appartenant au genre *Bifidobacterium* poussent et électif car la taille des colonies de la plupart des espèces de *Bifidobacterium* est augmentée. Une augmentation de la concentration en acide propionique à 10 pour 1 000 ne change en rien les résultats (BEERENS 1989), (BEERENS 1990).

La sélectivité des milieux que nous avons utilisés est obtenue en ajoutant 5 ml d'acide propionique pour 1 litre de milieu. Le pH du milieu est ensuite ajusté à 5,00 par une solution de soude normale. Une partie du milieu est ensuite autoclavée, mais nous n'avons constaté aucune différence entre un milieu autoclavé et un milieu non autoclavé.

- 2.2 - Milieu de base COLUMBIA

Le milieu COLUMBIA est le premier milieu de base que nous avons utilisé. Ce milieu est préparé à partir du milieu COLUMBIA (Pasteur Production) auquel on a ajouté 10 g d'agar pour 1 litre d'eau distillée. Le milieu est enrichi en acide propionique et le pH ajusté à 5,00.

Les colonies obtenues sont peu nombreuses et de très petite taille ce qui rend le repiquage difficile. Nous avons donc abandonné ce milieu de culture.

- 2.3 - Milieu de base WILKIN-WEST

Le milieu WILKIN-WEST (W.W.) est le second milieu que nous avons testé. Ce milieu est constitué de :

10 g de tryptone.
10 g de peptone de gélatine (Bio Mérieux).
5 g d'extrait de levure (Pasteur Production).
3 g de glucose.
5 g d'arginine.
5 g de pyruvate de sodium.
1 g de NaHCO₃.
0,5 g de cystéine.
5 ml de Tween 80 (solution à 5%)
10 ml d'hémine (solution aqueuse à 50 mg pour 100).
10 ml de vitamine K3 (solution aqueuse à 5 mg pour
100).
1 litre d'eau distillée.
10 g d'agar

Le milieu est enrichi en acide propionique et le pH est ajusté à 5,00. Ce milieu donne des résultats assez bons dans l'ensemble, mais ils sont peu reproductibles d'un repiquage à l'autre. Nous avons donc testé un troisième milieu de base.

- 2.4 - Milieu de base TRYTICASE-PHYTONE-YEAST

Le milieu TRYTICASE-PHYTONE-YEAST (T.P.Y.) a pour composition:

10 g de trypticase.
5 g de phytone.
5 g de glucose.
2,5 g d'extrait d'algues.
1 ml de Tween 80.

0,5 g d'hydrochlorate de cystéine.

2 g de K_2HPO_4 .

0,5 g de $MgCl_2, 6H_2O$.

0,25g de $ZnSO_4, 7H_2O$.

0,15 g de chlorure de calcium.

quelques traces de $FeCl_3$.

1 litre d'eau distillée.

15 g d'agar.

Le milieu est enrichi en acide propionique et le pH est ajusté à 5,00. Ce milieu donne de très bons résultats. Les colonies sont de taille importante et sont facilement repiquables.

Afin de disposer en permanence de milieu prêt à l'emploi nous l'avons réparti dans des flacons de 125 ml. Ces derniers sont autoclavés 15 minutes à 120°C. Ils sont ensuite gardés en chambre froide à + 4°C jusqu'à leur utilisation. Au moment de leur utilisation les flacons sont placés au bain-marie jusqu'à ce que la gélose fonde. La gélose est ensuite coulée dans des boîtes de Pétri. Lorsqu'elle est prise, les boîtes de Pétri sont placées à l'étuve à 37°C pour que la gélose sèche car l'ensemencement doit se faire sur des géloses bien sèches.

Le milieu T.P.Y. a été utilisé pour la culture et l'isolement des bifidobactéries à partir des laits fermentés ainsi que pour leur dénombrement dans les suspensions bactériennes utilisées lors des dosages.

- 3 - O B T E N T I O N d'une A T M O S P H E R E
A N A E R O B I E

Certaines espèces de *Bifidobacterium* sont des bactéries anaérobies strictes tandis que d'autres espèces sont aéroto-
lérantes à l'oxygène (NORRIS 1950), (SCARDOVI 1986). En ce
qui nous concerne, nous avons effectué la culture sous une
atmosphère anaérobie.

L'anaérobiose est obtenue grâce au réactif ANAEROCULT A
commercialisé par les laboratoires MERCK (référence 13829).
Ce réactif est placé dans un récipient pour anaérobiose ou
jarre.

L'ANAEROCULT A est constitué de Kieselguhr, de fer en
poudre, d'acide citrique et de carbonate de sodium. Ce réactif
est conçu pour une jarre dont la contenance est de 2,5 l.

Après humidification, l'ANAEROCULT A est introduit dans
la jarre dans laquelle on a mis au préalable les boîtes de
Pétri. Le côté comprimé de l'ANAEROCULT A doit être orienté
vers la paroi de la jarre. Immédiatement après la mise en
place de l'ANAEROCULT A dans la jarre celle-ci doit être
fermée de façon hermétique et placée à l'étuve à 37°C pendant
une durée de 4 jours.

L'ANAEROCULT A contient des composants qui fixent l'oxy-
gène libre de manière chimique et ceci après un temps assez
court. Ces composants produisent un milieu exempt d'oxygène
mais riche en gaz carbonique.

- 4 - C U L T U R E et I S O L E M E N T des
D I F F E R E N T E S S O U C H E S

- 4.1 - Culture de la souche lyophilisée

La souche A est une souche lyophilisée. La culture à partir du lyophilisat s'est révélée très difficile et, en conséquence, nous avons décidé de tester l'activité lactasique du contenu des sachets et non de la bactérie isolée.

Cependant nous avons constaté que les *Bifidobacterium* lyophilisés se régénèrent très bien dans le lait et qu'ils y survivent encore au bout de 4 jours lorsqu'ils sont placés dans une atmosphère anaérobie et du lait régénéré: un lait régénéré est un lait qui a été placé à 100°C pendant 20 minutes afin d'en chasser l'oxygène.

- 4.2 - Culture des souches B et C à partir des
laits fermentés

Les souches B et C ont été isolées à partir de laits fermentés. Le milieu T.P.Y. nous a permis d'obtenir très rapidement une souche pure de bifidobactéries.

Après ouverture du yaourt de façon stérile, celui-ci est battu à l'aide d'une cuillère afin d'obtenir un mélange fluide. On prélève alors des fractions de 0,5 ml de yaourt que l'on ensemence sur boîtes de Pétri. Les boîtes de Pétri sont placées dans des jarres qui sont elles mêmes mises à l'étuve à 37°C pendant 4 jours selon le processus précédemment décrit.

Au bout de 4 jours la jarre est ouverte. On effectue des Gram sur certaines colonies bien isolées pour vérifier la pureté de la culture, et d'autres colonies, elles aussi bien isolées, sont repiquées sur boîtes de Pétri. Ces boîtes sont placées dans la jarre qui est remise à l'étuve à 37°C pendant 4 jours. Ceci est effectué tous les 4 jours et permet la survie de la souche.

- 4.3 - Culture de la souche D

Nous n'avons pas effectué de culture sur la souche D, celle-ci nous étant remise pure. Nous avons toutefois effectué des dénombrements sur la souche D ce qui nous a permis de voir l'aspect des colonies et la morphologie des bactéries.

- 5 - P R E P A R A T I O N d'une S U S P E N S I O N
B A C T E R I E N N E et D E N O M B R E M E N T

- 5.1 - Préparation d'une suspension bactérienne

Afin d'éviter de poursuivre une culture lourde en manipulation nous avons décidé d'effectuer des suspensions bactériennes à partir des colonies de *Bifidobacterium* isolées sur boîtes de Pétri.

Pour cela nous avons prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur recourbée, les colonies de bactéries de plusieurs boîtes de Pétri que nous avons placé de façon stérile dans 10 ml d'eau physiologique. Après homogénéisation de la suspension nous l'avons répartie dans des tubes à hémolyse stériles par fraction de 2 ml. Ces tubes sont alors congelés à - 20°C jusqu'à leur utilisation.

Afin de disposer d'un nombre de tube suffisant nous avons pratiqué un repiquage de certaines colonies. Ceci nous a permis d'obtenir de nouveau un nombre de colonies suffisant pour pouvoir faire une nouvelle suspension bactérienne. Nous avons effectué 3 suspensions bactériennes avec les souches B et C. Nous avons ensuite testé l'activité lactasique de chaque suspension bactérienne que nous avons appelée lot n°1, lot n°2 et lot n°3

- 5.2 - Le dénombrement

Afin de connaître le nombre de bactéries dans nos

suspensions bactériennes nous avons effectué des dénombrements.

Un dénombrement est effectué le jour de la mise en suspension, jour J, puis deux dénombrements sont effectués en cours de conservation, soit à J+8 et à J+15. Nous avons effectué des dénombrements à J+8 et J+15 pour savoir si la congélation entraîne la mort des bactéries ce qui aurait pu expliquer une éventuelle diminution de l'activité lactasique.

Le dénombrement est effectué de la manière suivante : 1 ml de suspension bactérienne est placé dans 9 ml de tryptone sel, ce qui donne une dilution au dixième. Après homogénéisation de la suspension au VORTEX 1 ml est prélevé et est placé dans 9 ml d tryptone sel, on obtient une dilution au centième. On effectue ainsi des dilutions jusqu'à 10^{-6} . Un dixième de ml de chaque dilution est ensuiteensemencé par étalement sur une boîte de Pétri. Les boîtes de Pétri sont mises dans la jarre que l'on place à l'étuve à 37°C pendant 4 jours. Au bout de ces 4 jours les colonies sont comptées sur chacune des boîtes de Pétri de dilution différente. On peut ainsi connaître le nombre de bactéries dans la suspension bactérienne sachant qu'une bactérie donne une colonie.

Nous n'avons pas pu effectuer de dénombrement sur la souche A, la culture de cette souche étant difficile. Le fabricant indique que le nombre de bactéries vivantes est compris entre 1 million et 1 milliard.

**- 6 - DESCRIPTION des COLONIES et
des BACTERIES**

Le polymorphisme décrit par plusieurs auteurs (TOMARELLI 1949), (NORRIS 1950), (GLICK 1960), (VEERKAMP 1971a) a été observé ici.

- 6.1 - Description des colonies

Les colonies de la souche A que nous avons pu observer sont de très petite taille. De plus elles sont difficiles à identifier quand la culture n'est pas pure. La couleur des colonies est blanche. Le repiquage s'est révélé difficile et la culture a été abandonnée.

La souche B présente des colonies dont la taille peut atteindre 3 à 4 mm de diamètre, cette taille a tendance à croître lorsque la colonie est bien isolée. Les colonies sont d'un blanc crémeux avec un centre plus clair. La culture de ces colonies s'est révélée être la plus facile.

La souche C présente des colonies de petite taille d'environ 2 mm de diamètre, mais la taille a tendance à s'agrandir lorsque la colonie est bien isolée. La couleur des colonies est d'un blanc brillant.

La souche D présente des colonies de taille moyenne, mais certaines sont de petite taille. La couleur des colonies est d'un blanc mat.

Sur les boîtes de Pétri, les colonies sont rondes et lisses et ceci pour chacune des souches.

- 6.2 - Description des bactéries

L'observation de la morphologie des bactéries se fait après coloration de Gram. Les bifidobactéries sont des bactéries Gram positives.

Les bactéries de la souche A et B ont une forme caractéristique, c'est à dire qu'une des extrémités est en forme de Y. Cependant, les bactéries de la souche B sont beaucoup plus longues que celles de la souche A. On observe aussi des formes droites et des formes bifides aux deux extrémités dans chacune de ces deux souches.

Bactéries
de la
Souche B



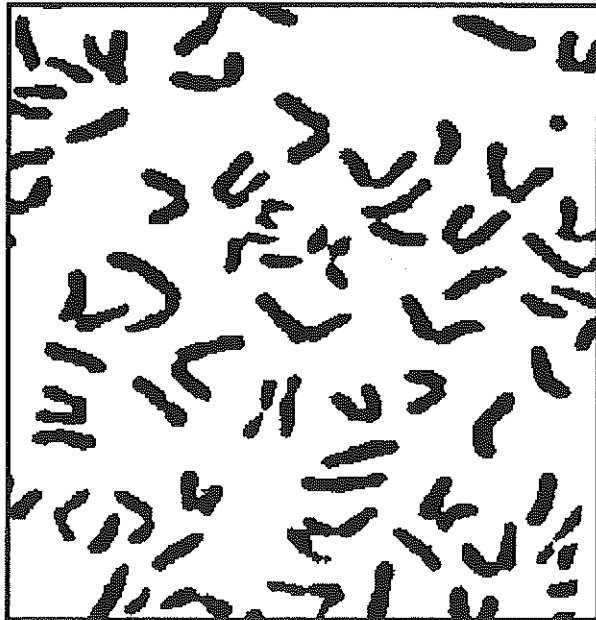
Les formes bifides dans la souche C sont rarement rencontrées. Les bactéries ont une petite taille et ressemblent

à de petits batonnets plus ou moins renflés au centre. Les bactéries sont rassemblées entre elles et forment une sorte de chapelet.

Bactéries

de la

Souche C

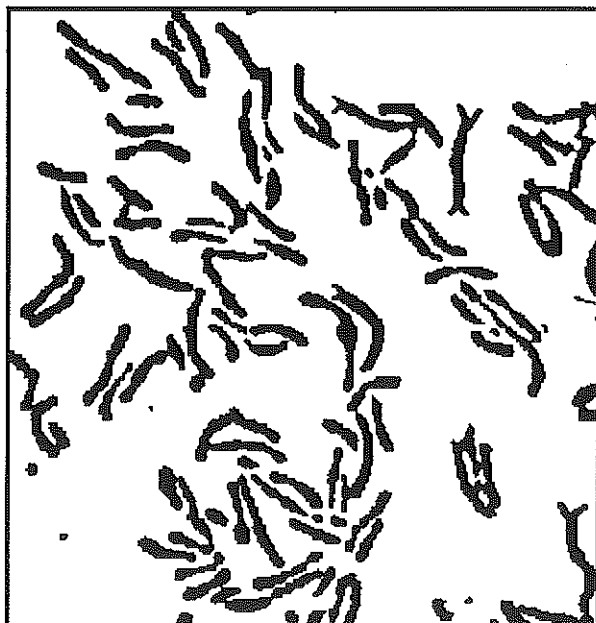


Les bactéries de la souche D ont soit une forme bifide, soit une forme droite. Mais les bactéries ont une forme renflée par rapport à la souche A et B. On observe aussi des bactéries bifides aux deux extrémités.

Bactéries

de la

Souche D



- 7 - TECHNIQUES PERMETTANT DE MESURER L'ACTIVITE
LACTASIQUE

La mesure de l'activité lactasique peut se faire en dosant le glucose libéré. Le taux de glucose est déterminé par le réactif à la glucose-oxydase-peroxydase (DAHLQUIST 1968).

On peut aussi la mesurer en dosant le taux de galactose apparu (KOLARS & al 1984).

Enfin la quantité de lactose disparu peut être utilisée pour cette mesure (KOLARS & al 1984).

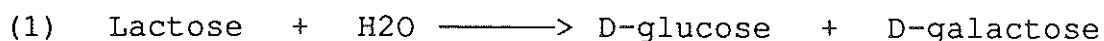
Lors de nos dosages, nous avons utilisé une méthode qui consiste à mesurer la quantité de lactose disparu et non pas l'apparition du glucose et/ou du galactose, car ces oses peuvent être utilisés par la bactérie. En effet, le calcul de l'activité lactasique à partir du galactose apparu n'est pas une méthode fiable, car son augmentation est de 10 à 30 % plus faible que la diminution simultanée du lactose (KOLARS 1984).

- 7.1 - Dosage du lactose et du galactose (Méthode
U.V. référence 176.303 BOEHRINGER)

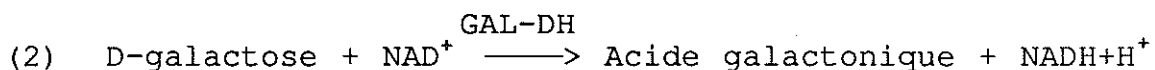
- 7.1.1 - Principe de la réaction

Le lactose est hydrolysé en D-glucose et D-galactose par une β -galactosidase en présence d'eau (1).

β -galactosidase



Ensuite le D-galactose est oxydé en acide galactonique par une β -galactose déshydrogénase (GAL-DH) en présence de nicotinamide-adénine dinucléotide (NAD) (2).



- 7.1.2 - Principe du dosage

Sur les échantillons, on effectue successivement deux réactions.

La première réaction est effectuée en présence de β -galactose déshydrogénase, ce qui permet de déterminer le taux de galactose dans le milieu.

Lors de la seconde réaction on ajoute successivement la β -galactosidase et la β -galactose déshydrogénase, ce qui permet de déterminer le taux de galactose présent et le taux du lactose hydrolysé.

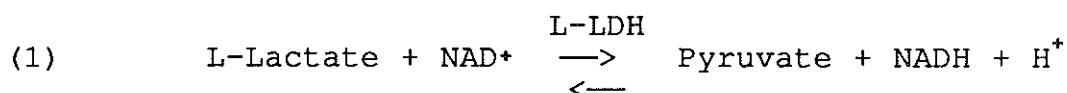
La différence d'absorption entre les deux réactions permet de déterminer le taux de lactose présent dans le milieu réactionnel.

La mesure de la densité optique se fait à 365 nm.

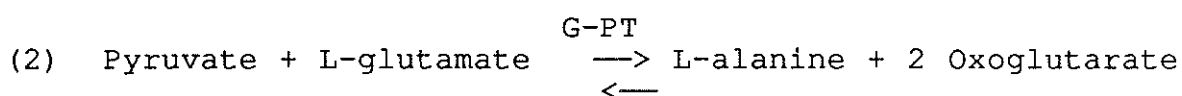
- 7.2 - Dosage de l'acide lactique (Méthode U.V. référence 139084 BOEHRINGER)

- 7.2.1 - Principe de la réaction

L'acide L-lactique est oxydé en pyruvate par la L-lactate déshydrogénase (L-LDH) en présence de NAD^+ (1).



L'équilibre de la réaction se fait presque exclusivement dans le sens Pyruvate \rightarrow Lactate, mais il peut être déplacé en faveur du Pyruvate et du NADH, H⁺, lors d'une réaction ultérieure catalysée par la glutamate pyruvate aminotransférase en présence de L-glutamate (2).



La quantité de NADH, H⁺ formée lors de la première réaction est proportionnelle à la quantité initiale d'acide L-lactique. Cette quantité de NADH-H⁺ est déterminée par la mesure de l'absorption à 365 nm.

- 7.2.2 - Principe du dosage

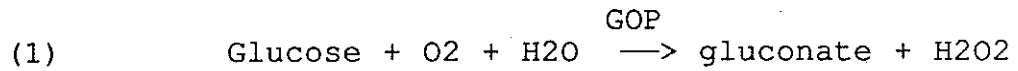
Sur les échantillons, on effectue successivement deux dosages.

Lors du premier dosage, on ajoute la G-PT ce qui permet à la seconde réaction de se faire et on dose le NADH, H⁺ éventuellement présent dans le milieu réactionnel.

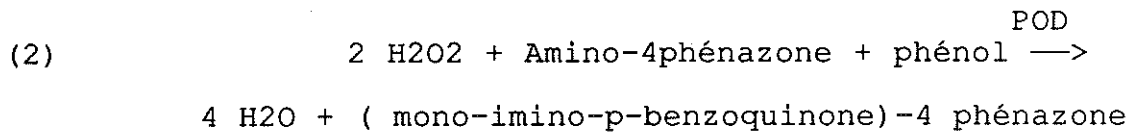
Lors du second dosage, on ajoute la L-LDH. La réaction (1) peut s'effectuer et il y a alors formation de NADH, H⁺ que l'on dose. Le taux de NADH, H⁺ est proportionnel à la quantité d'acide lactique dans le milieu réactionnel. La mesure de la densité optique se fait à 365 nm.

- 7.3 - Dosage du glucose selon la technique à la
glucose-oxydase GOP-PAP (référence 1004743)

Le glucose en présence de glucose oxydase (GOD) donne du
gluconate et de l'eau oxygénée (1).



La seconde réaction se fait en présence de la peroxydase
(POD) et donne un complexe coloré (2).



- 8 - A C T I V I T E L A C T A S I Q U E de la
S O U C H E A à pH = 6,50

- 8.1 - Protocole opératoire

La culture de la souche A s'étant avérée difficile nous avons travaillé directement à partir des sachets de bifidus lyophilisés.

Le fabricant indiquant que l'excipient contenu dans les sachets de bifidus lyophilisés est du lait traité, nous avons effectué dans un premier temps une chromatographie pour connaître la composition en oses de ces sachets. La chromatographie a montré la présence dans les sachets d'une concentration importante de lactose, mais n'a pas révélé la présence de galactose et de glucose.

Lors du dosage le contenu du sachet (environ 1 g) est dissout dans 100 ml de tampon phosphate pH = 6,50. Le tampon phosphate est obtenu à partir d'une solution de $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 \text{ H}_2\text{O}$ 0,1M à pH = 9,10 et d'une solution de KH_2PO_4 0,1M à pH = 4,50. Nous n'avons pas ajouté de lactose dans le tampon phosphate, la chromatographie nous ayant révélé la présence de lactose dans les sachets de lyobifidus.

Après homogénéisation du mélange, des fractions de 4 ml sont placées dans des tubes à hémolyse. Ces tubes sont mis à incuber dans un thermobloc à 40°C pendant une demi-heure (T=1/2 H) pour certains tubes et 1 heure (T=1 H) pour les autres.

Un témoin inactivé (T=0) est préparé par inactivation thermique à 100° C pendant 10 minutes. Il permet de connaître les concentrations en lactose et en galactose au temps T=0.

Nous avons choisi un pH de 6,50 et une température de 40°C car ce sont les conditions optimales de l'activité de la β -galactosidase présente dans les laits fermentés avec des *Bifidobacterium* (PASCAUD 1990). Nous avons voulu savoir si ces conditions sont retrouvées avec les souches pures des *Bifidobacterium*.

L'inactivation de l'enzyme est obtenue en plaçant les tubes dans un bain-marie bouillant pendant 10 minutes.

Le lactose et le galactose sont dosés selon la technique décrite précédemment. Avant chaque dosage on effectue une dilution au dixième du mélange.

- 8.2 - Résultats des dosages

Le poids moyen de poudre contenu dans un sachet de bifidus lyophilisé est environ de 1 g. La concentration moyenne en lactose au temps T=0 est de 0,93 g par sachet. Nous n'avons jamais retrouvé de galactose au temps T=0 ce qui est en accord avec le résultat de la chromatographie. Nous n'avons pas dosé le glucose et l'acide lactique.

La concentration en lactose diminue d'une façon plus ou moins régulière au cours du temps (Tableau IV page suivante).

Tableau IV : Taux de lactose au cours du temps dans les sachets de "Lyobifidus".
 Exprimé en g pour 1g de poudre contenu dans le sachet

		Temps d'incubation		
		T = 0	T = 1/2 Heure	T = 1 Heure
Taux de lactose	Dans le sachet N°1	0,94	0,90	0,90
	Dans le sachet N°2	0,91	0,88	0,87
	Dans le sachet N°3	0,95	0,94	0,90
Taux moyen de lactose dans le temps		0,93	0,91	0,89

L'activité lactasique sur une heure est identique quel que soit le sachet , mais elle varie énormément lors de la première demi-heure et de la seconde demi-heure. Une activité importante lors de la première demi-heure se caractérise par une activité plus faible lors de la seconde demi-heure et inversement (Tableau V).

Tableau V: Activité lactasique des sachets de bifidus lyophilisés au cours du temps.
 Exprimée en microkatal pour 1 g de poudre

Activité lactasique	lors de la 1ère 1/2 heure	lors de la 2ème 1/2 heure	sur une heure
Du sachet N°1	0,061	0	0,061
Du sachet N°2	0,046	0,015	0,061
Du sachet N°3	0,015	0,046	0,061

Nous n'avons pas observé de variation du pH au cours du temps. Ceci peut être expliqué par la faible quantité de lactose dégradé. La concentration de galactose est très faible et ne varie pas lors de la seconde demi-heure (Tableau VI).

Tableau VI : Variation du pH et de la concentration en galactose, en g, pour 1g de poudre lyophilisée, au cours du temps.

	Temps d'incubation		
	T = 0	T = 1/2 Heure	T = 1 Heure
Sachet N°1 pH galactose	6,50 0	6,50 $1,7 \cdot 10^{-3}$	6,50 $1,7 \cdot 10^{-3}$
Sachet N°2 pH galactose	6,54 0	6,54 $1,7 \cdot 10^{-3}$	6,53 $1,7 \cdot 10^{-3}$
Sachet N°3 pH galactose	6,55 0	6,55 0	6,54 $1,7 \cdot 10^{-3}$

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec les différentes souches nous avons tracé à chaque fois la courbe d'évolution du lactose exprimé en pourcentage.

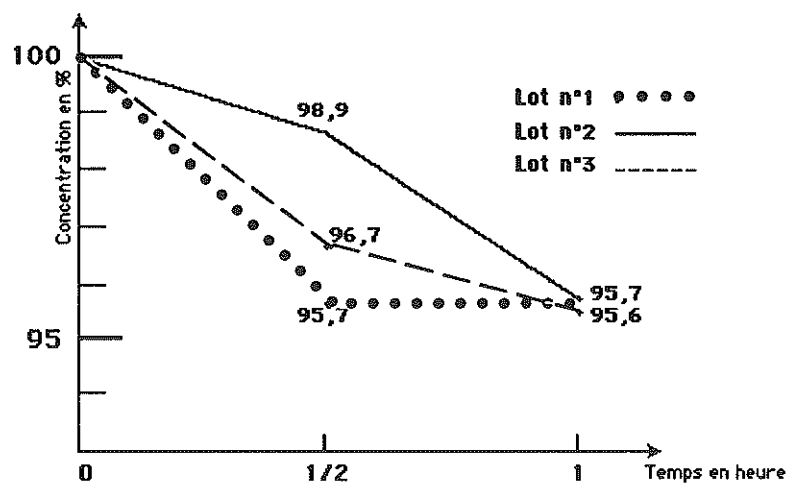


Figure 2 : Courbes d'évolution de la concentration de lactose en % au cours du temps pour la souche A.

- 9 - A C T I V I T E L A C T A S I Q U E des
S O U C H E S B et C à p H = 6,50

- 9.1 - Protocole opératoire

La mesure de l'activité lactasique sur les souches B et C est effectuée à partir des suspensions bactériennes préalablement congelées.

Après décongélation, la suspension bactérienne est placée dans des tubes à hémolyse par fraction de 1 ml additionné de 1 ml de " tampon phosphate lactosé " à p H = 6,5. Le tampon phosphate est obtenu à partir d'une solution de KH_2PO_4 0,1M à p H = 4,50 et d'une solution de $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$ 0,1M à p H = 9,10. Nous avons ajouté dans ce tampon phosphate du lactose de façon à obtenir une concentration de 36,032 g/l.

Le protocole opératoire est le même que celui utilisé pour la souche A en ce qui concerne la température d'incubation, la technique d'inactivation de l'enzyme et la réalisation du témoin inactivé.

Une fois le mélange refroidi, on mesure le p H, puis on effectue le dosage du galactose et du glucose selon les méthodes précédemment décrites. Avant d'effectuer le dosage du lactose toujours selon la méthode précédemment décrite une dilution au 1/20 est effectuée.

- 9.2 - Résultats des dosages de la souche B

Les dénombrements des bactéries pratiqués sur la souche

B à J, J+8, J+15 ont montré qu'il y a une diminution du nombre de bactéries au cours du temps de conservation (Tableau VII)
Ces chiffres représentent le nombre de bactéries dans 1 ml de suspension bactérienne.

**Tableau VII : Evolution du nombre de bactéries par ml au cours du temps dans les différents lots de suspension bactérienne dans la souche B, conservés par congélation à -20° C.
Exprimé en log 10**

		Dosage effectué à :		
		J	J+8	J+15
Numéro du lot	Lot N°1	6,38	6,32	6,25
	Lot N°2	6,25	6,07	5,97
	Lot N°3	6,20	5,97	5,87

Cette diminution du nombre de bactéries n'influe en rien sur la dégradation du lactose, la quantité de lactose dégradé en 1 heure étant approximativement la même lors des dosages effectués au cours de la conservation de la suspension bactérienne. Ceci permet de supposer que l'enzyme reste active et que la congélation ne l'altère pas (Tableau VIII page suivante).

Les chiffres donnés par le tableau VIII représentent la moyenne des résultats obtenus lors des dosages effectués à J, J+8 ou J+15 pour les lots n°1 et n° 2 après une demi-heure, une heure et deux heures d'incubation à 40° C et à pH = 6,50.

Tableau VIII: Taux de lactose en g/l au cours du temps à J, J+8 et J+15 pour la souche B.

		Dosage effectué à :		
		J	J+8	J+15
Temps d'incubation	Lot n° 1			
	T = 0	17,34	17,97	17,69
	T = 1/2 H	15,52	15,45	15,31
	T = 1 H	12,79	12,93	14,61
	T = 2 H	10,21	10,07	8,81
	Lot n° 2			
	T = 0	17,76	17,50	17,90
	T = 1/2 H	16,85	16,40	16,92
T = 1 H	13,91	13,80	13,98	
T = 2 H	11,88	11,89	12,02	

Le dosage du lactose, du galactose et du glucose ainsi que la mesure du pH sont effectués au bout d'une demi-heure (T=1/2 H), d'une heure (T=1 H) et deux heures (T=2 H) d'incubation à 40°C et à pH = 6,5 (Tableau IX page suivante). Ce tableau donne la moyenne des résultats des dosages effectués au cours de la conservation de la suspension bactérienne dans les lots n° 1 et n° 2.

La diminution du taux de lactose est toujours plus importante au cours de la première heure d'incubation de même que la diminution du pH. (cf. Tableau IX page suivante).

Tableau IX : Variation du pH et de la concentration en lactose, galactose et glucose en g/l dans les lots n° 1 et n° 2, au cours du temps, pour la souche B.

	Temps d'incubation			
	T = 0	T = 1/2 Heure	T = 1 Heure	T = 2 Heures
Lot n° 1				
Lactose	17,66	15,42	13,44	9,69
Galactose	0	0,16	0,27	0,45
Glucose	0	0,02	0,08	0,29
pH	6,50	6,42	6,20	6,01
Lot n° 2				
Lactose	17,72	16,72	13,89	11,93
Galactose	0	0,15	0,26	0,40
Glucose	0	0,02	0,07	0,30
pH	6,50	6,45	6,21	6,05

Le taux de galactose apparu au cours du temps est supérieur au taux de glucose apparu dans le même temps. La mesure du pH met en évidence une acidification du milieu réactionnel.

Les valeurs de l'activité lactasique sont données dans le tableau X ci-dessous.

Tableau X : Activité lactasique de la souche B à pH = 6,5 en microkatal pour 100 ml de suspension bactérienne.

		Activité lactasique		
		Lors de la 1ère heure	Lors de la 2ème heure	Au cours des 2 heures
N° du lot	Lot N°1	0,325	0,289	0,307
	Lot N°2	0,295	0,151	0,223

L'activité lactasique est calculée à partir des concentrations de lactose obtenues au cours du temps. Elle est exprimée en micromole de lactose dégradée par seconde pour 100 ml de suspension bactérienne (microkatal/100 ml). L'activité lactasique de la souche B est maximale au cours de la première heure (cf. Tableau X).

Grâce aux dénombrements que nous avons effectués nous avons pu calculer l'activité lactasique pour 100 millions de bactéries. Nous avons choisi cette valeur car 1 g de yaourt comprend approximativement cette quantité de bactéries (PASCAUD 1990). Cette activité est de 0,14 pour le lot n°1 et de 0,16 pour le lot n°2.

Les courbes de la dégradation du lactose pour les lots n° 1 et n° 2 exprimées en pourcentage sont représentées ci-dessous. Les pourcentages sont calculés à partir des moyennes de la concentration en lactose du tableau IX.

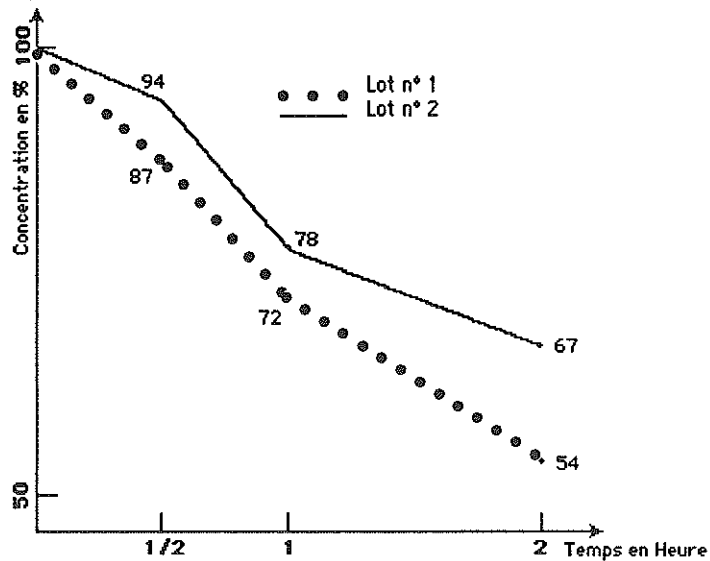


Figure 3 : Courbes d'évolution de la concentration de lactose en % au cours du temps pour la souche B.

Les courbes indiquant le taux d'apparition en g/l du galactose et du glucose sont les suivantes :

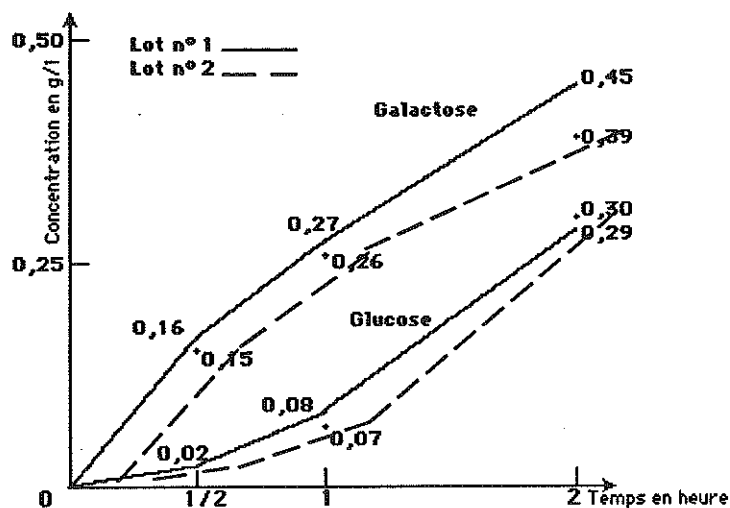


Figure n° 4 : Courbes d'évolution de la concentration en glucose et galactose en g/l au cours du temps pour la souche B.

- 9.3 - Résultats des dosages de la souche C

Les dénombrements montrent qu'il y a comme pour la souche B une diminution importante du nombre de bactéries au cours du temps (Tableau XI).

Tableau XI : Evolution du nombre de bactéries par ml au cours du temps dans les différents lots de suspension bactérienne dans la souche C, conservés par congélation à -20° C.

Exprimé en log 10

		Dosage effectué à :		
		J	J+8	J+15
N° du lot	Lot N°1	5,95	5,90	5,84
	Lot N°2	6,04	5,99	5,89

Le dosage du lactose, du galactose, du glucose ainsi que la mesure du pH sont effectués au bout d'une demi-heure (T=1/2 H), une heure (T=1 H) et deux heures (T=2 H) d'incubation à 40°C et pH = 6,50.

Comme pour la souche B nous n'avons pas noté de grandes différences dans la dégradation du lactose à J et J+8, nous n'avons donc pas effectué de dosage à J+15. La dégradation du lactose pour la souche C est aussi plus importante lors de la première heure d'incubation à 40°C (Tableau XII). Ce tableau donne la moyenne des résultats obtenus pour les lots n° 1 et n° 2 à J et à J+8.

Tableau XII: Taux de lactose en g/l au cours du temps à J et J+8 pour la souche C.

		Dosage effectué à :	
		J	J+8
Temps d'incubation	Lot n°1		
	T = 0	18,67	18,84
	T = 1/2 H	16,85	17,06
	T = 1 H	15,94	15,31
	T = 2 H	13,42	13,49
	Lot n°2		
	T = 0	18,81	17,69
	T = 1/2 H	17,13	16,15
T = 1 H	15,38	15,31	
T = 2 H	14,68	14,61	

Le dosage du galactose et du glucose montre que les concentrations en glucose sont supérieures à celles obtenues avec la souche B tandis que les concentrations en galactose sont inférieures. La mesure du pH montre que l'acidification du milieu est moins importante avec la souche C (Tableau XIII). Ce tableau représente la moyenne des résultats des dosages effectués au cours de la conservation de la suspension bactérienne dans les lots n°1 et n° 2.

Tableau XIII : Variation du pH et de la concentration en lactose, galactose et glucose en g/l dans les lots n° 1 et n° 2, au cours du temps, pour la souche C.

	Temps d'incubation			
	T = 0	T = 1/2 Heure	T = 1 Heure	T = 2 Heures
Lot n° 1				
Lactose	18,75	16,95	15,62	13,45
Galactose	0	0,02	0,07	0,18
Glucose	0	0,13	0,25	0,41
pH	6,50	6,49	6,42	6,30
Lot n° 2				
Lactose	18,25	16,64	15,34	14,64
Galactose	0	0,01	0,07	0,15
Glucose	0	0,11	0,23	0,30
pH	6,50	6,48	6,42	6,35

Le calcul de l'activité lactasique obtenu à partir des concentrations en lactose montre qu'elle est maximale au cours de la première heure comme pour la souche B (Tableau XIV page suivante).

Tableau XIV : Activité lactasique de la souche C à pH = 6,5 en microkatal pour 100 ml de suspension bactérienne.

		Activité lactasique		
		Lors de la 1ère heure	Lors de la 2ème heure	Au cours des 2 heures
N° du lot	Lot N°1	0,241	0,167	0,204
	Lot N°2	0,224	0,053	0,138

L'activité lactasique pour 10^8 bactéries est de 0,25 pour le lot n°1 et de 0,28 pour le lot n°2. Cette activité est supérieure à celle obtenue avec la souche B mais l'écart entre les deux lots est plus important.

A partir des taux de lactose du tableau XIII, nous avons tracé les courbes de la dégradation du lactose exprimée en pourcentage.

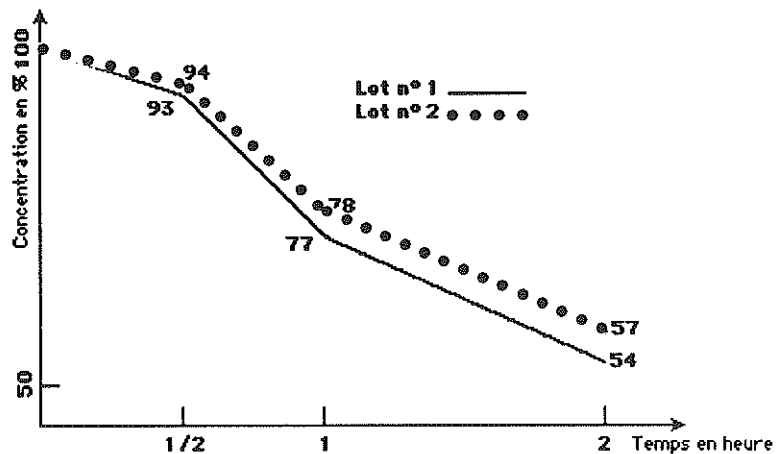


Figure 5 : Courbes d'évolution de la concentration de lactose en % au cours du temps pour la souche C.

Les courbes de l'apparition du galactose et du glucose exprimées en g/l sont les suivantes :

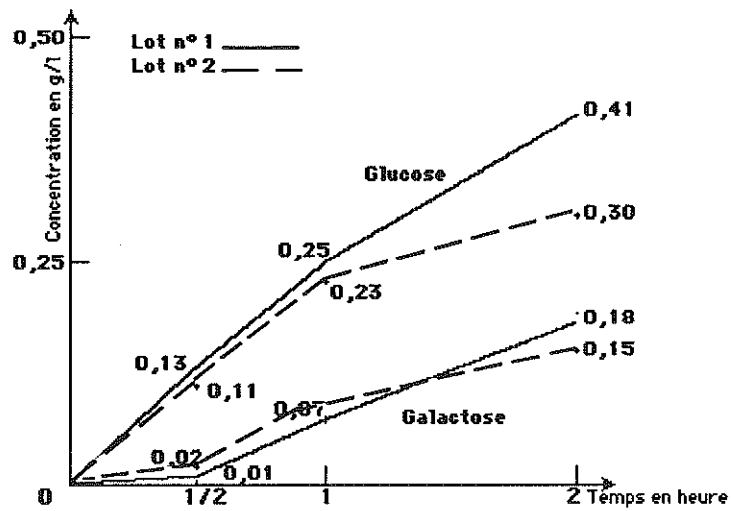


Figure n° 6 : Courbes d'évolution de la concentration en glucose et galactose en g/l au cours du temps pour la souche C.

- 10 - A C T I V I T E L A C T A S I Q U E de la
S O U C H E B en F O N C T I O N du p H

Ces dosages sont réalisés avec le lot n° 3 de la souche B. Nous avons testé l'activité lactasique des *Bifidobacterium* dans une gamme de pH allant de 7,50 à 5,50 afin de vérifier si le pH optimum de la bactérie isolée est le même que le pH de la bactérie dans un lait fermenté (PASCAUD 1990).

- 10.1 - Préparation de la gamme de pH

La gamme de pH a été préparé grâce à la solution de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,1M pH = 9,10 et à la solution de KH_2PO_4 0,1M pH = 4,50 . Nous avons réalisé des tampons phosphates à pH = 7,50, pH = 7,00, pH = 6,50, pH = 6,00, pH = 5,50 .

Dans chaque tampon phosphate nous avons ensuite ajouté du lactose monohydraté de façon à obtenir une solution à 36,032 g/l. Pour chaque tampon phosphate nous avons réalisé 20 ml de " tampon phosphate lactosé " à 36,032 g/l.

- 10.2 - Protocole opératoire

Pour chaque solution de " tampon phosphate lactosé " nous avons effectué un dosage. Pour cela nous avons mis en contact 0,5 ml de suspension bactérienne décongelée et 0,5 ml d'un des tampon phosphate. Chaque tube est mis à incuber à 40°C dans un thermobloc pendant 1 heure (T=1 H). Nous n'avons pas mesuré l'activité lactasique après une heure d'incubation, le but du dosage étant de déterminer le pH optimum et l'on sait d'après

les dosages précédents que l'activité lactasique est maximale lors de la première heure d'incubation pour la souche B.

Le protocole opératoire est le même que celui utilisé pour la souche A en ce qui concerne la température d'incubation, la technique d'inactivation de l'enzyme et la réalisation du témoin inactivé.

Avant de doser le lactose et le galactose selon les méthodes précédemment décrites on réalise une dilution au 1/20.

- 10.3 - Résultats des dosages

Les résultats obtenus montrent que la dégradation du lactose est maximale à pH = 6,00 . Elle reste toutefois importante à pH = 6,50 et pH = 7,00 (Figure n° 7).

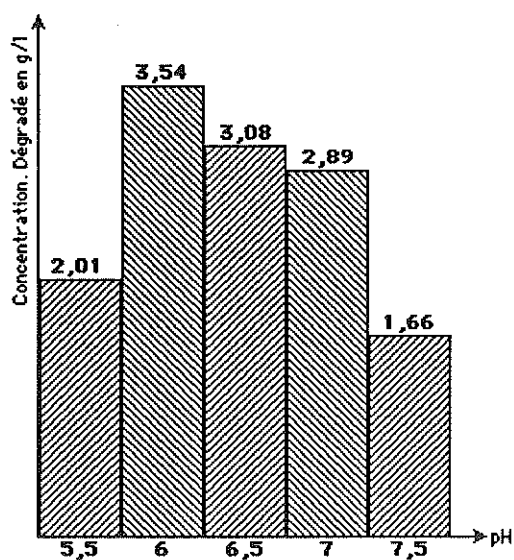


Figure 7 : Histogramme représentant le taux de lactose dégradé, en g/l, après 1 heure d'incubation à 40°C et pH variable pour la souche B.

Ceci n'est pas en accord avec les résultats attendus (PASCAUD 1990). Mais cette diminution du pH optimum est probablement due au fait que nous avons travaillé à partir de *Bifidobacterium* isolés. En effet, il est reconnu que l'activité de la β -galactosidase de *Streptococcus thermophilus* est maximale à pH = 7,00 (DENNIS 1987). Et cette bactérie est présente dans les laits fermentés. L'activité lactasique des laits fermentés semble due aux deux bactéries.

L'activité lactasique des *Bifidobacterium* (Tableau XV ci-dessous et Figure n° 8 page suivante) est beaucoup plus importante dans les pH acides que dans les pH basiques. Ceci est très important car la β -galactosidase des *Bifidobacterium* pourra agir sur une longueur, du tube digestif, beaucoup plus importante que la β -galactosidase des *Streptococcus* et ainsi l'hydrolyse du lactose sera plus importante.

Tableau XV : Activité lactasique en fonction du pH pour la souche B au bout d'une heure, en microkatal pour 100 ml de suspension bactérienne.

		Activité lactasique	
		Pour le lot n° 3	Pour 100 millions de bactéries
pH	7,5	0,127	0,08
	7,0	0,222	0,13
	6,5	0,132	0,14
	6,0	0,272	0,17
	5,5	0,155	0,09

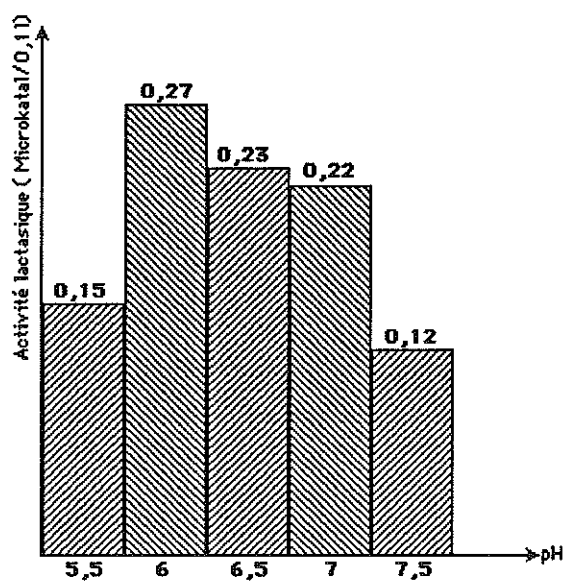


Figure 8 : Activité lactasique en fonction du pH pour la souche B, après une heure d'incubation, en microkatal pour 100 ml de suspension bactérienne.

- 11 - A C T I V I T E L A C T A S I Q U E de la
S O U C H E D à p H = 6,50

- 11.1 - Protocole opératoire

La souche D étant une souche congelée nous avons changé de protocole opératoire pour les dosages.

Dans un premier temps nous avons préparé 500 ml d'une solution de tampon phosphate à p H = 6,50 à partir de la solution de $\text{Na}_2\text{P}_04,12\text{H}_2\text{O}$ 0,1M p H = 9,10 et de la solution de KH_2P_04 0,1M p H = 4,50 . Nous avons ensuite ajouté du lactose monohydraté dans ce tampon phosphate. La concentration en lactose est de 36,032g/l.

Afin de respecter les conditions opératoires utilisées par la laiterie lors de la fabrication de ses laits fermentés, nous avons mis 150 mg de *Bifidobacterium* dans 500 ml de " tampon phosphate lactosé ". Après homogénéisation du mélange nous l'avons réparti dans des tubes à hémolyse par fraction de 3 ml que nous avons congelé à -20°C jusqu'au moment de leur utilisation.

Avant de commencer les dosages proprement dits nous avons recherché s'il y avait du lactose et du galactose dans la souche congelée. Pour cela nous avons mélangé 75 mg de *Bifidobacterium* et 250 ml de tampon phosphate non lactosé. Le mélange est inactivé tout de suite. Les dosages se sont révélés négatifs.

Après décongélation les tubes sont mis à incuber à 40°C

directement dans le thermobloc pendant 1 heure (T=1 H), 2 heures (T=2 H), 3 heures (T=3 H) ou 4 heures (T=4 H). La laiterie nous ayant indiqué que le temps de fermentation de ses laits fermentés est de 5 heures, nous avons dans certains cas testé l'activité lactasique sur 5 heures.

Le protocole opératoire est le même que celui utilisé pour la souche A en ce qui concerne la température d'incubation, la technique d'inactivation de l'enzyme et la réalisation du témoin inactivé.

Sur certains échantillons nous avons dosé le galactose, le glucose et l'acide lactique selon les méthodes précédemment décrites. Avant d'effectuer le dosage du lactose selon la méthode de BOEHRINGER nous avons prélevé 0,6 ml que nous avons dilué au vingtième.

- 11.2 - Résultats des dosages

La moyenne des résultats montre que la quantité de lactose dégradé au cours du temps est très importante tandis que l'apparition de galactose et de glucose reste faible et que le taux de glucose est supérieur au taux de galactose.

Comme pour la souche B et C on a une acidification du mélange qui dans ce cas est importante. Nous avons donc décidé de doser l'acide lactique que nous avons retrouvé en petite quantité (Tableau XVI page suivante).

Tableau XVI : Variation du pH et de la concentration en lactose, galactose, glucose et acide lactique en g/l au cours du temps pour la souche D.

	Temps d'incubation				
	T = 0	T = 1 heure	T = 2 heures	T = 3 heures	T = 4 heures
Lactose	35,99	26,97	20,91	17,13	14,62
Galactose	0	0,35	0,46	0,61	0,64
Glucose	0	0,62	1,21	1,40	1,93
Acide Lactique	0	0,28	0,31	0,37	0,40
pH	6,50	6,40	6,23	6,17	6,13

L'activité lactasique, comme pour les autres souches, est maximale la première heure (Tableau XVII).

Tableau XVII: Activité lactasique de la souche D à pH = 6,5 en microkatal pour 100 ml de suspension bactérienne.

	Lors de la 1ère heure	Lors de la 2ème heure	Lors de la 3ème heure	Lors de la 4ème heure	Sur les 4 heures
Activité Lactasique	0,695	0,467	0,291	0,193	0,407

Les dénombrements effectués montrent qu'il y a 6,77 (log. décimal) bactéries dans 150 mg de *Bifidobacterium* congelés, ce qui donne une activité lactasique de 0,11 pour 10^6 bactéries.

- 12 - A C T I V I T E L A C T A S I Q U E de la
S O U C H E D en F O N C T I O N du pH

- 12.1 - Protocole opératoire

Comme pour la souche B nous avons préparé une gamme de pH allant de pH = 8,00 à pH = 5,00 . Nous avons élargi notre gamme de pH, les *Bifidobacterium* ayant une légère activité lactasique à pH = 7,50 et pH = 5,50 lors de nos précédents dosages avec la souche B.

Nous avons ajouté dans chaque tampon phosphate du lactose monohydraté de façon à obtenir des solutions à 36,032 g/l. Après homogénéisation du mélange on ajoute des *Bifidobacterium* dans chaque " tampon phosphate lactosé ". La solution obtenue est ensuite congelée dans des tubes à hémolyse stériles par fraction de 1 ml.

Lors du dosage les tubes sont mis directement à incuber à 40°C dans un thermobloc pendant 1 heure (T=1 H), 2 heures (T=2 H) et 5 heures (T=5 H).

Le protocole opératoire est le même que celui utilisé pour la souche A en ce qui concerne la température d'incubation, la technique d'inactivation de l'enzyme et la réalisation du témoin inactivé.

Avant d'effectuer le dosage du lactose selon la méthode précédemment décrite nous avons prélevé 0,50 ml que nous avons dilué au vingtième.

- 12.2 - Résultats des dosages

Nous avons suivi l'évolution du pH au cours du temps et nous avons constaté une acidification du milieu. Cette diminution est surtout importante aux pH où la β -galactosidase est très active (Tableau XVIII).

Tableau XVIII: Variation du pH dans la souche D au cours du temps.

		Temps d'incubation			
		T = 0	T = 1 heure	T = 2 heures	T = 5 heures
pH	8,0	8,00	7,94	7,90	7,90
	7,5	7,50	7,49	7,23	7,45
	7,0	7,00	7,00	6,88	6,86
	6,5	6,50	6,45	6,24	6,09
	6,0	6,00	5,81	5,51	5,20
	5,5	5,50	5,44	5,25	5,10
	5,0	5,00	4,90	4,70	4,67

Les dosages du lactose montrent une diminution de sa concentration au cours du temps. Cette diminution est toujours plus importante lors de la première heure et elle est pratiquement nulle entre la deuxième et la cinquième heure d'incubation. La moyenne des résultats obtenus met en évidence que la dégradation du lactose est maximale à pH = 6.50 mais la dégradation reste importante à pH = 6,00 et pH = 7,00 ainsi qu'aux pH acides. Elle est très faible aux pH basiques et est presque nulle à pH = 8,00 (Figure n° 9 page suivante).

Le pH optimal de la β -galactosidase de la souche D est différent de celui de la β -galactosidase de la souche B bien

que ces deux souches soient du *Bifidobacterium longum*.

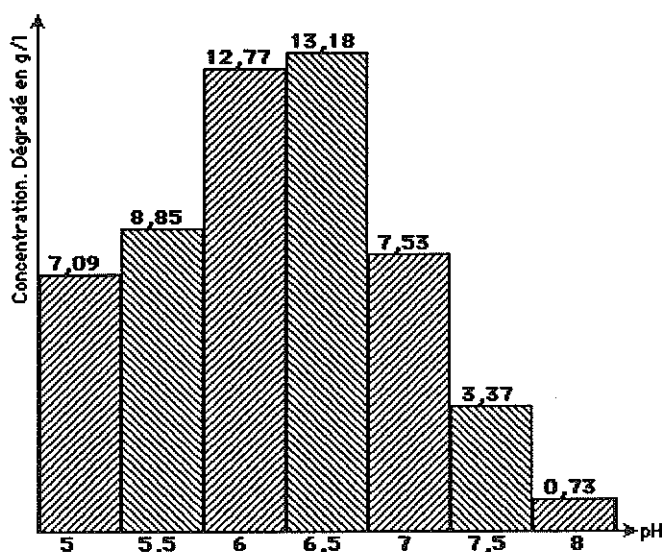


Figure 9 : Histogramme représentant le taux de lactose dégradé, en g/l, après 1 heure d'incubation à 40°C et pH variable pour la souche D.

L'activité lactasique est maximale à pH = 6,50 (Figure n° 10).

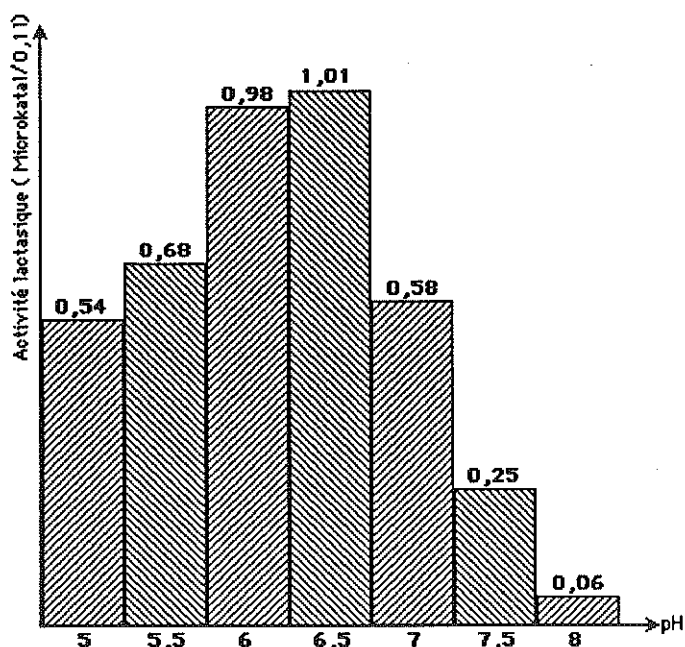


Figure 10 : Activité lactasique en fonction du pH pour la souche D, après une heure d'incubation, en microkatal pour 100 ml de suspension bactérienne.

Quel que soit le pH, cette activité lactasique est maximale la première heure. Cependant, lorsqu'elle est très importante la première heure, elle est très faible la seconde heure. On observe aussi qu'aux pH basiques l'activité de la β -galactosidase est faible lors des deux premières heures mais elle se maintient lors des 3 heures qui suivent. Par contre aux pH acides l'activité lactasique est moindre lors des 3 dernières heures d'incubation (Tableau XIX).

Tableau X I X : Activité lactasique au cours du temps en fonction du pH, pour la souche D, en microkatal pour 100 ml de suspension bactérienne.

		Activité lactasique			
		Pour la souche D			Pour 10 ⁸ bactéries
		Lors de la 1ère heure	Lors de la 2ème heure	Sur 5 heures	Sur 1 heure
pH	8,0	0,056	0,113	0,069	0,031
	7,5	0,259	0,074	0,098	0,055
	7,0	0,580	0,500	0,220	0,095
	6,5	1,010	0,107	0,237	0,179
	6,0	0,980	0,470	0,236	0,162
	5,5	0,680	0,124	0,187	0,113
	5,0	0,540	0,165	0,149	0,090

- 13 - A C T I V I T E L A C T A S I Q U E dans
le Y A O U R T E N S E M E N C E par la
S O U C H E D à pH = 6,50

- 13.1 - Protocole du dosage

Nous avons pesé 5 g de produit laitier auquel nous avons ajouté un volume suffisant de $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$ 0,1M pour obtenir un pH égal à 6,50. A l'aide d'un ULTRA-TURAX le mélange a été homogénéisé. Le volume est ensuite complété à 20 ml grâce au tampon phosphate 0,1M pH = 6.50. Des fractions de 4 ml de ce milieu réactionnel sont ensuite mises à incuber à 40°C pendant 1 heure et 2 heures.

L'inactivation se fait par chauffage à 100°C pendant 10 minutes.

Parallèlement on effectue un témoin inactivé en mélangeant 5 g de produit laitier avec 20 ml d'eau distillée. Après homogénéisation à l'ULTRA-TURAX, le mélange est chauffé à 100°C pendant 10 minutes.

Avant de réaliser les dosages du galactose, du glucose, du lactose et de l'acide lactique suivant les méthodes précédemment décrites nous avons filtré le mélange et avant de doser le lactose et le galactose nous avons dilué le filtrat au 1/20 ème.

- 13.2 - Résultats des dosages

Comme pour la souche D, nous avons dosé la concentration

de galactose, de glucose, de lactose et d'acide lactique au cours du temps. Nous avons aussi mesuré le pH (tableau XX).

Les dosages sont effectués au bout d'une heure (T=1 H) et deux heures (T=2 H).

Tableau XX : Variation du pH et de la concentration en lactose, galactose, glucose et acide lactique en g/l au cours du temps pour le yaourt.

	Temps d'incubation		
	T = 0	T = 1 heure	T = 2 heures
Lactose	29,68	21,42	13,59
Galactose	2,47	5,45	10,38
Glucose	0,47	1,94	2,51
Acide Lactique	9,77	13,66	18,91
pH	6,50	6,39	6,34

A partir des concentrations de lactose nous avons calculé l'activité lactasique. Cette dernière est également plus importante lors de la première heure d'incubation. Mais contrairement aux résultats obtenus avec la souche D isolée elle reste encore élevée lors de la seconde heure (Tableau XXI).

Tableau XXI: Activité lactasique du yaourt à pH= 6,5 en microkatal pour 100 g de produits laitiers.

Yaourtensemencé avec la souche D.

	Lors de la 1ère heure	Lors de la 2ème heure	Au cours des deux heures
Activité Lactasique	0,636	0,603	0,619

Les courbes de la dégradation du lactose et de l'apparition du galactose et du glucose exprimées en g/l sont les suivantes:

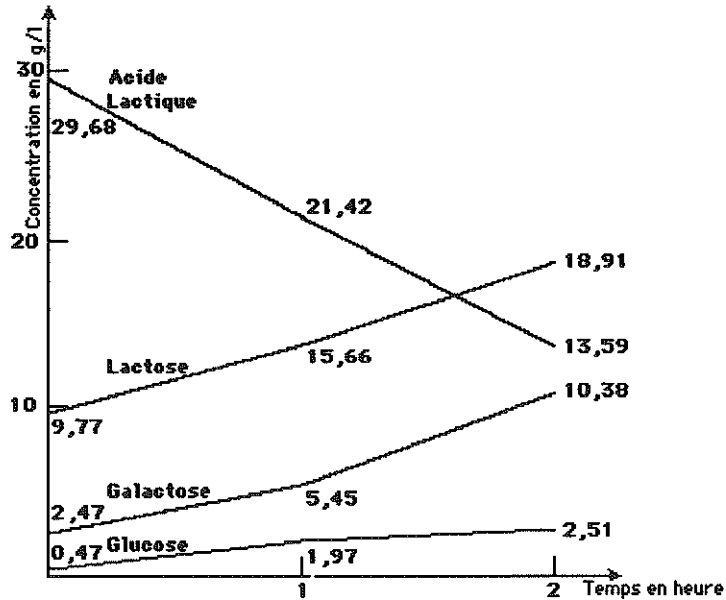


Figure 11 : Courbes d'évolution de la concentration en lactose, galactose, glucose et acide lactique en g/l pour le yaourt.

DISCUSSION CONCLUSION

D I S C U S S I O N C O N C L U S I O N

L'absorption de produits laitiers a une action bénéfique sur la santé de l'homme. Ils apportent des protides, des glucides, des vitamines et du calcium. Mais cette absorption peut être limitée à la suite du déficit en β -galactosidase que présentent certaines personnes. L'ingestion de produits laitiers et plus particulièrement de lactose chez ces sujets est suivie de troubles digestifs importants. Une carence d'apport alimentaire en produits laitiers se caractérise par une hypocalcémie qui peut avoir des conséquences graves. L'utilisation d'une lactase exogène permet l'absorption de produits laitiers et donc de protéines et de calcium.

Une équipe américaine a cependant démontré que l'ingestion de yaourt entraîne une diminution du lactose non assimilé et une augmentation de l'activité lactasique du contenu du duodénum. Cette activité est liée à la présence dans le yaourt de ferments vivants, nombreux et actifs (KOLARS 1984).

L'hydrolyse artificielle du lactose est retenue pour pallier cette déficience. La β -galactosidase pouvant être apportée par des bactéries et en particulier par des *Bifidobacterium*.

Les *Bifidobacterium* ont un rôle bénéfique sur le bien-être et la santé de l'homme et ceci à tous les âges. Il est reconnu que leur diminution dans l'estomac de l'homme peut entraîner une augmentation de la flore pathogène qui exerce

alors ses effets néfastes.

Il a été démontré que l'absorption des laits fermentés par des *Bifidobacterium* est plus bénéfique que l'absorption du yaourt (TOCHIKURA 1986) bien que LEREBOURS constate que l'activité lactasique d'un lait fermenté par *Bifidobacterium* est très faible par rapport à celle du yaourt (LEREBOURS 1989).

Nos dosages ont eu pour but de tester l'activité lactasique des *Bifidobacterium* isolés. Nous avons testé :

- Une souche A qui est lyophilisée
- Une souche B et une souche C qui sont isolées à partir de laits fermentés
- Une souche D congelée
- Un yaourtensemencé par la souche D.

Le milieu utilisé pour l'isolement des souches B et C est le milieu TRYPTICASE-PHYTONE-YEAST. Ce milieu est rendu sélectif par l'addition d'acide propionique. Le pH est ensuite ajusté à 5,00 par de la soude normale. Après l'obtention d'une souche pure, les bactéries sont mises en suspension dans de l'eau physiologique. Dans un premier temps nous avons ajouté à ces suspensions bactériennes une " solution tampon lactosé " à pH = 6,50. Ce mélange est mis à incuber à 40° C pendant des temps différents.

Nos dosages montrent une diminution du taux de lactose au cours du temps d'incubation. Cette diminution est constante

lors des dosages effectués à différents temps de la conservation des souches. La β -galactosidase n'est pas affectée par la congélation, puisqu'on retrouve une activité lactasique plusieurs mois après la mise à -20° C de la suspension bactérienne. La lyophilisation ne dégrade pas non plus la β -galactosidase.

Nous avons mis en évidence que chaque souche possède sa propre activité lactasique à pH = 6,50. Ceci est en accord avec les résultats de TOCHIKURA qui montre que l'activité lactasique des laits fermentés varie selon la souche utilisée pour l'ensemencement (TOCHIKURA 1986). Mais, quelle que soit la souche utilisée, l'activité est maximale lors de la première heure, et persiste encore au bout de cinq heures d'incubation à 40° C.

Le métabolisme du lactose par la lactase fournit du glucose et du galactose, nous avons dosé ces deux oses au sein du milieu réactionnel. Ces derniers sont retrouvés quelle que soit la souche, mais en très petite quantité.

Nous savons que les *Bifidobacterium* sont capables de métaboliser le glucose par le shunt du fructose-6-phosphate. Cette fermentation produit en bout de chaîne de l'acide lactique et de l'acide acétique (SCARDOVI 1984), (SCARDOVI 1986). Nous avons dosé l'acide lactique que nous avons retrouvé en quantité plus ou moins importante. Cette acidité du milieu est confirmée par la diminution du pH au cours du temps d'incubation.

Les *Bifidobacterium* sont capables de métaboliser le galactose (ROMOND M.B. 1987a), ceci explique la faible quantité de galactose retrouvé dans le milieu. Nous n'avons pas dosé les composés du métabolisme du galactose. Ceci aurait été intéressant afin de vérifier cette hypothèse.

Les résultats des dosages montrent aussi une différence dans les concentrations en glucose et en galactose, après incubation, au sein des différentes souches.

Le métabolisme du lactose de la souche B donne plus de galactose que de glucose (cf Tableau IX). Ceci est retrouvé au niveau de la souche D (cf Tableau XVI). Par contre le taux de galactose est inférieur au taux de glucose dans la souche C (cf Tableau XIII).

Le pH étant plus bas au sein des souches B et D au bout de deux heures d'incubation, (cf Tableaux IX et XVI), on peut suggérer que le taux d'acide est plus important et donc que le métabolisme du glucose par les *Bifidobacterium* est plus rapide au sein de ces deux souches.

La petite quantité de glucose retrouvé dans nos milieux réactionnels est peut-être un aspect négatif de l'utilisation des *Bifidobacterium* car le glucose est un élément énergétique important pour le métabolisme de l'homme et il semble que la bactérie l'utilise pour son propre compte.

Dans un second temps, nous avons fait varier le pH du milieu afin de vérifier que la β -galactosidase a bien une

activité maximale à pH = 6,50. La β -galactosidase des laits fermentés contenant des bifidus a une activité maximale à ce pH (PASCAUD 1990). Nous avons, par la même occasion, déterminé la zone de pH où la β -galactosidase est la plus active.

Le pH optimum de la β -galactosidase de la souche B isolée est de 6,00; il est de 6,50 pour la souche D, bien que ces deux souches soient constituées de *Bifidobacterium longum*. Cette différence peut être expliquée par le fait qu'il existe plusieurs variants de *Bifidobacterium longum* (SCARDOVI 1971) et nous ne savons pas si nous sommes en présence des mêmes variants.

La β -galactosidase, au vu de nos résultats, a une activité plus importante à pH acide qu'à pH basique. L'activité lactasique est pratiquement nulle à pH = 8,00 mais reste relativement élevée à pH = 5,50.

Le pH du milieu a également tendance à s'acidifier comme précédemment et plus l'activité lactasique est forte plus le pH a tendance à diminuer en fin de dosage. Cette diminution du pH est caractérisée par la formation d'acide lactique et ceci quel que soit le pH de départ du milieu réactionnel (cf Tableaux XVIII et XIX).

Le fait que la lactase des *Bifidobacterium* ait une activité maximale à pH acide est important. Au niveau du système digestif, la zone où le pH est acide s'étend du duodénum au jéjunum. La β -galactosidase des *Bifidobacterium* va pouvoir

commencer l'hydrolyse du lactose au niveau du duodénum où le pH est compris entre 4,00 et 6,00. Cette hydrolyse se poursuit dans le jéjunum où le pH est compris entre 6,00 et 7,00. La lactase des *Bifidobacterium* est active sur une portion du tube digestif beaucoup plus importante que celle où agit la lactase des autres bactéries lactiques. En effet, il est maintenant reconnu que la lactase de *Streptococcus thermophilus* est active à pH = 7,00 (KOLARS 1984).

La culture des *Bifidobacterium* est importante à pH = 5,00. On peut en déduire que les bifidobactéries ne sont pas altérées par l'acidité qu'elles rencontrent au niveau de l'estomac, ce qui constitue un second élément favorable à l'utilisation des *Bifidobacterium* dans l'hypolactasie. BERRADA a mesuré la survie des *Bifidobacterium* dans l'estomac et a montré que cette survie est variable selon les espèces. Il met en évidence que l'on peut ingérer aussi bien la bactérie isolée que la bactérie dans un lait fermenté (BERRADA 1989).

Nous n'avons cependant pas effectué de dosage de l'activité lactasique de la β -galactosidase dans les conditions physiologiques existant dans le corps humain. Mais il semble que l'utilisation de la lactase de *Bifidobacterium* peut pallier le déficit en lactose rencontré chez l'homme lors de l'hypolactasie.

L'utilisation de laits fermentés à *Bifidobacterium* a bien sa raison d'être dans l'hypolactasie. La présence de deux espèces de bactérie possédant une lactase permet une meilleure hydrolyse du lactose ingéré par l'homme.



BIBLIOGRAPHIE

R E F E R E N C E S B I B L I O G R A P H I Q U E S

- ANDREW P. BAKKEN and CHARLES G. HILL.
Use of novel immobilized β -galactosidase reactor to hydrolyse the lactose constituent of skim milk.
Biotechnology and Bioengineering 1990, Vol 36, pp 293-309.
- ASSELIN D.
Effet de l'ingestion des laits fermentés au *Bifidobacterium longum* sur la flore intestinale humaine.
Thèse de Doctorat de l'Université de CAEN 1988.
- BEEERENS H.
Milieu sélectif et électif de culture des *Bifidobacterium*.
Les laits fermentés. Actualité de la recherche. Congrès International. Edition John Libbey Eurotext 1989, p 59.
- BEEERENS H.
An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium*.
Letters in Appl. Microbiol. 1990, 11, pp 135-157.
- BENNO Y., SAWADA K. and MITSUOKA T.
The intestinal microflora of infants. Composition of fecal flora in breast fed and bottle fed infants.
Microbio. Immunol. 1984, 28, pp 975-986.
- BERNIER J.J., ADRIAN J., VIDON N.
Les aliments dans le tube digestif.
Les bactéries et les aliments dans le côlon. Paris Doin
Edition 1988, pp 381-387.
- BERRADA N., LAROCHE G., LEMELAND J.F. ET TONETTI H.
Survie de bifidobactéries dans l'estomac de l'homme.
Les laits fermentés. Actualité de la recherche. Congrès International. Edition John Libbey Eurotext, 1989, pp 259- 260.
- BIAVATI B., MATTARELLI P.
Bifidobacterium ruminantium sp. nov. and *Bifidobacterium merycium* sp. nov. from the rumens of Cattle.
Int. J. Syst. Bacteriol. 1991, 41, pp 163-168.
- CUMMINS C.S., GLENDENNING O.H., HARRIS.
Composition of the cell wall of *Lactobacillus bifidus*.
Nature 1957, 180, pp 337-338.
- CUMMINS C.S.
Immune modulation agents and their mechanisms.
Fernichel, and chirigos eds 1984, pp 163-190.
- DAHLQUIST A.
Assay of intestinal disaccharidases.
Analyt. Biochem. 1968, 22, pp 99-107.

DEHNERT.

Untersuchung über die Gram Positive Stuhlflora der Brustmilchkindes.

Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. 1957, Abt. 1 orig. 169, pp 66-79.

DENNIS A. and SAVAIANO.

Milk intolerance and microbe containing dairy foods.

J. Dairy Sci. 1987, 70, pp 397-406.

DE VRIES W. and GERBRANDY J.

Carbohydrate metabolism in Bifidobacterium bifidum.

Biochim. Biophys. Acta. 1967, 136, pp 415-425.

DE VRIES W. and STOUTHAMER A.H.

Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol and xylose by Bifidobacteria.

J. Bacteriol. 1968, Vol 92 n°2, pp 472-478.

DICK A.J. and K.C. SMITH.

Quercetin glucosides and galactosides: Substrates and inhibitors of apple β -galactosidase.

J. Agri. food chem. 1990, Vol 38 n°4, pp 926-931.

DISSART.

Nouveautés thérapeutiques, considérations sur le traitement des entérocolopathies aiguës et chroniques.

Lyon médical de 1967.

EBISSAWA E., ASSARI T., TAKEDA S.

Utilisation de lait fermenté additionné de bifidus actif chez la femme enceinte.

M. C. D. Premier colloque Monte-Carlo 1987, tome 16 n°3, pp 8-10.

EXTERKATE F.A., and VEERKAMP J.H.

Biochemical changes in Bifidobacterium bifidum var. penn. after cell wall.

Biochim. Biophys. Acta. 1969, 176, pp 65-77.

FLOURIE B., FLORENT C.H., DESJIEUX J.H., RAMBAUD J.C.

Déficit en lactase et intolérance au lactose.

Méd. Nutr. 1987, XXII, pp 367-371.

GASSER F. and MANDEL M.

Deoxyribonucleic acid base composition of the genus Lactobacillus.

J. Bacteriol. 1968, 96, pp 580-588.

GLICK M.C., TSALL, FZILLIZEN and MUDD S.

Morphological changes of L. Bifidus var. penn. produced by a cell wall precursor.

Biochim. Biophys. Acta. 1960, 37 (2), pp 361-363.

- GOMEZ E. and MELGAR M.M.
Exocellular products from *Bifidobacterium adolescentis* as immunomodifiers in the lymphoproliferative responses of mouse splenocytes.
F.E.M.S. Microbiol. Letters 1988, 56, pp 47-52.
- GYLLENBERG H. and CARLBERG G.
The nutritional characteristics of the bifid bacteria of infants.
Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 1958, 44, pp 287-292.
- GYORGY P.
A hitherto unrecognized biochemical difference between human milk and cow's milk.
Pediatrics 1953, 11, pp 98-108.
- GYORGY P., NORRIS R.F. and ROSE C.S.
Bifidus factor I.
Arch. Biochem. Biophys. 1954, 48, p 193.
- GYORGY P., and C.S. ROSE.
Microbiological studies on growth factor for *L. bifidus* var. *pennsylvanicus*.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1955, 90, pp 219-223.
- HABU Y., NAGAOKA M. YOKOKURA T.
Structural studies of cell wall polysaccharides from *Bifidobacterium breve* YIT 4010 and *Bifidobacterium* species.
J. Biochim. 1987, 102, pp 1423-1432.
- HAENEL H., MULLER BEUTHOW W.
Vergleichende Quantitative Untersuchungen über Keimzahlen in den Faeces des Menschen und einiger Wirbeltiere.
Zentralblatt für Bakteriologie, Para, Infek und hygiene 1956, Abt 1 orig 1956. pp 123-133.
- HASSINEN J.B., DURBIN G.T., TOMARELLI R.M. and BERNHART F.W.
The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*.
J. Bacteriol. 1951, 62, pp 771-777.
- HUSAIN I., POUPARD J.A. AND NORRIS R.F.
Influence of nutrition on the morphology of a strain of *Bifidobacterium bifidum*.
J. Bacteriol. 1972, 111, pp 841-844.
- IWATA M. and MORISMITA T.
The presence of plasmids in *Bifidobacterium breve*.
Letters in Appl. Microbiol. 1989, 9, pp 165-168.
- JARVETZ E., MELNICK J.L.
Micrologie médidale. Edward A. ADELBERG.
Librairie Malousse S.A. Paris 1973.

KOLARS J.C., LEVITT.

Yogurt an autodigesting source of lactose.
N. Engl J. Med. 1984, 310, pp 1-3.

LAUER E.

Bifidobacterium gallicum sp. nov. isolated from human feces.
Int. J. Syst. Bacteriol. 1990, 40, pp 100-102.

LEREBOURS E., BERRADAN, COLIN R.

Disponibilité du lactose ingéré sous différentes formes de produits laitiers fermentés.

Les laits fermentés. Actualité de la recherche. Congrès International. Edition John Libbey Eurotext. 1989, pp 223-227.

LEVESQUE.

Les problèmes du *Bacillus Bifidus*.
Ann. Péd. 1959, pp 36-38.

MARA D.D., and ORAGUI J.I.

Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human fecal pollution.

J. Appl. Bacteriol. 1983, 55, pp 349-357.

MAYER.

Maintien de l'équilibre microbien naturel dans le tube digestif.

Méd. Hyg. 1974 n° 119.

Mc KELLAC R.C. and MODLER H.W.

Metabolism of fructo-oligosaccharides by *Bifidobacterium* spp.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989, 31, pp 537-541.

MITSUOKA T.

Vergleichenche Untersuchungen über die Bifidobakterien aus dem Verdauungstrakt von Menschen und Tieren.

Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. 1969, Abt. 1 orig. 210, pp 52-64.

MITSUOKA T.

Recent trends in research on intestinal flora.

Bifidobacteria microflora. 1982, 1, pp 3-24.

MITSUOKA T.

Taxonomy and ecology of *Bifidobacteria*.

Bifidobacteria microflora. 1984, vol 3 (1), pp 11-28.

MITSUOKA T.

The secret of *Bifidobacteria* that protect of health.

Bifidobacteria microflora 1985, pp 1-11.

MITSUOKA T.

Bifidobacterium microecology.

Les laits fermentés. Actualité de la recherche. Congrès International. Edition John Libbey Eurotext. 1989, pp 41-48.

MONTREIL J.

Voies métaboliques du lactose et du galactose.
Med. et Nutr. 1981, XVII, pp 163-166.

MUNOA F.J. and PARES R.

Selective medium for isolation and enumeration of Bifidobacterium spp.
App. Environ. Microbiol. 1988, pp 1715-1718.

NAGAOKA M. and MUTO M.

Structure of 6-deoxytalose-containing polysaccharide from the cell wall of Bifidobacterium adolescentis.
J. Biochem. 1988, 103, pp 618-621.

NORRIS R.F, FLANDRES T., TOMARELLI R.M. and GYORGY P.

The isolation and cultivation of Lactobacillus bifidus. A comparison of branched and unbranched strains.
J. Bacteriol. 1950, 60, pp 681-696.

OCHI Y., MITSUOKA T., SEGA T.

Untersuchungen über die Darmflora des Huhnes.
Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. 1964, Abt. orig 193, pp 80-95.

ORLA JENSEN.

La classification des bactéries lactiques.
Lait 4 1924, pp 468-474.

PASCAUD H.

Composition glucidique et activité lactasique des " laits fermentés ". Intérêt de leur consommation dans l'hypolactasie de l'adulte.
Thèse de Doctorat de l'Université de LIMOGES 1990.

POIFFAIT A., ADRIAN J.

Le métabolisme du galactose.
Méd. Nut. 1989, 25 n°5, pp 279-293.

POUPARD J.A., HUSAIN I. and NORRIS R.F.

Biology of the Bifidobacterium.
Bact. Rev. 1973, 37, pp 136-165.

PREVOT.

Importance of the biochemical composition of the cell wall as a taxonomic characteristic.
Int. J. Syst. Bacteriol. 1970, 20, pp 539-540.

RASIC J.

Bifidobacteria and their rôle.
Experientia 1983, p 539.

RAUL F.

Intolérance au lactose et déficit en lactase intestinale: aspects physiopathologiques, nutritionnels et biochimiques.
Nutr. Clin. Metabo. 1988, 2, pp 65-75.

RAYNAUD M.

Le facteur bifidus 2.

Ann. Pédiatrie 1959, 241, pp 8-23.

RESNICK I.G., and LEVIN M.A.

Quantitative procedure for enumeration of Bifidobacteria.

Appl. Environ. Microbiol. 1981, 42, pp 427-432.

REUTER G.

Vergleichenche Untersuchungen über die Bifidus-Flora im Säuglings und Erwachsenenstuhl.

Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. 1953, Abt. 1 orig 191, pp, 486-507.

ROGOSA M.

Genus III Bifidobacterium Orla-Jensen.

In Bergey's Manual of determinative bacteriology 8e Edition William and Wilkins 1974, 669-679.

ROMOND M.B.

Bifidobacterium et facteurs bifidogènes. Etudes de modèles animaux permettant l'analyse de leurs interactions.

Thèse de Doctorat de l'Université de PARIS XI 1987a.

ROMOND M.B. et ROMOND C.

Les Bifidobacterium leur écologie et leur importance en santé humaine.

M. C. D. Premier Colloque de Monte-Carlo 1987b, tome 16 n°3, pp 2-5.

ROMOND C., COLOMBEL J.F., NEUT C.

Effet du lait fermenté à Bifidobacterium longum sur les troubles digestifs et les altérations de la flore intestinale sous antibiothérapie.

M. C. D. Premier Colloque de Monte-Carlo 1987c, tome 16 n°3, pp 6-7.

ROMOND M.B.

Etudes des interactions hôte Bifidobacterium chez la souris axénique. Caractéristiques partielles des facteurs bifidogènes du contenu intestinal.

Can. J. Microbiol. 1990b, vol 36, pp 286-291.

ROY D., WARD P.

Rapid characterisation of Bifidobacterium ssp using enzymatic and biochemical methods.

Les laits fermentés. Actualité de la recherche. Congrès International. Edition John Libbey Eurotext, 1989, p 281.

ROY D., CHEVALIER P. and WARD P.

Sugars fermented by Bifidobacterium infantis ATCC 27920 in relation to growth and α -galactosidase activity.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 1991, 34, pp 653-655.

SAKAI K., TACHIKI T., KUMAGAI H.
Synthesis of β -D-fucosylglucose by β -D-glucosidase I of *Bifidobacterium breve*.
Agric. Biol. Chem. 1989, 53, pp 313-318.

SCARDOVI V. and TROVATELLI L.D.
The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in genus *Bifidobacterium*.
Ann. Microbiol. 1965, 15, pp 19-29.

SCARDOVI V., TROVATELLI L.D. and ZANI G.
Deoxyribonucleic acid homology relationship among species of the genus *Bifidobacterium*.
Int. J. Syst. Bacteriol. 1971, 21, pp 276-294.

SCARDOVI V.
The genus *Bifidobacterium*.
The Prokaryote. A Handbook on habits, isolation, and identification of bacteria. Springer. Verlag, New-York 1984, Chap 149, pp 1951-1960.

SCARDOVI V.
Genus *Bifidobacterium* Orla Jensen.
In *Bergey's Manual of systematic bacteriology* Vol. 2, first Edition the Williams and Wilkins 1986, pp 1418-1434.

SGORBATI B., SCARDOVI V.
Plasmids in the genus *Bifidobacterium*.
J. Gen. Microbiol. 1982, 128, pp 2121-2131.

TASSOVATZ D., KRAGOUYEVITCH D.
L'entérocolite aiguë bactérienne chez le nourrisson. Essai de traitement par le bacille bifidus.
Ann. de pédiatrie 1964, n°22, pp 291-297.

TISSIER.
Recherches sur la flore intestinale des nourrissons.
Thèse de l'Université de PARIS 1900.

TOCHIKURA T. and SAKAI K.
p-nitrophenyl glycoside-hydrolysing activities in *Bifidobacteria* and characterization of β -D-galactosidase.
Agric. Biol. Chem. 1986, 50, pp 2279- 2286.

TOMARELLI R.M. and NORRIS R.F.
The nutrition of variants of *Lactobacillus bifidus*.
J. Bio. chem. 1949, 181, pp 879-888.

VEERKAMP J.H., LAMBERT R. and SAITOY.
The composition of the cell wall of *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus*.
Arch. Biochem. Biophys. 1965, 112, pp 120-125.

VEERKAMP J.H.

Biochemical changes in Bifidobacterium var. penn. after wall inhibition. Fatty acid composition.
Biochim. Biophys. Acta. 1970, 210, pp 267-275.

VEERKAMP J.H.

The structure of the cell wall peptidoglycan of Bifidobacterium bifidum var.penn.
Arch. Biochem. Biophys. 1971a, 143, pp 204-211.

VEERKAMP J.H.

Fatty acid composition of Bifidobacterium and Lactobacillus strains.
J. Bacteriol. 1971b, 108, pp 861-867.

VEERKAMP J.H., HOELEN and DEM CAMP.

The structure of mannitol teichoic acid from Bifidobacterium bifidum var. penn.
Biochim. Biophys. Acta. 1983, 755, pp439-451.

WALCH E.

Zur frage der Beeinflussbarkeit der Darmflora des Säuglings durch. N-acetyl-D-glucosamin-derivate.
Dtsch. Med. Wschr. 1956, 81, pp 661-664.

WERNER H and SEELIGER H.P.R.

Die Diagnostik der Bifidusbakterien und ihre Abgrenzung Gegen Morphologische ähnliche Keime.
Aerztl. Lab. 1963, 11, pp 357-367.

WEI-JEN, DENNIS A.

A method for determining β -galactosidase activity of Yogurth cultures in skim milk.
J. Dairy Sci. 1989, 72, pp 351-359.

YUHARA T., ISOJIMAS and MITSUOKA T.

On the intestinal flora of bottle fed infant.
Bifidobacteria Microflora 1983, 2, pp 33-39.

A N N E X E S B I B L I O G R A P H I Q U E S

BREUILLAUD, LEMONIE.

Rev. Inst. Pasteur Lyon 1976, 9, pp 213-232.

BRULE G.

Hydrolyse du lactose.

Journée d'étude lactose-galactose. Paris 29/01/1981. Centre national de coordination des études et recherches sur la nutrition et l'alimentation (C.N.E.R.N.A.) Organisateur J.Adrian.

CASANOVA.

Etude clinique de lyobifidus dans la prévention des phénomènes dysmicrobismes provoqués par l'antibiothérapie. Compte rendu d'une étude menée à MARSEILLE 1974.

FEVRIER C. AUMAITRE A.

Utilisation du lactose par les animaux d'élevage.

Journée d'étude lactose-galactose. Paris 29/01/1981. Centre national de coordination des études et recherches sur la nutrition et l'alimentation (C.N.E.R.N.A.) Organisateur J.Adrian.

FIEZAL J. et OGIER H.

Intolérances aux sucres.

Journée d'étude lactose-galactose. Paris 29/01/1981. Centre national de coordination des études et recherches sur la nutrition et l'alimentation (C.N.E.R.N.A.) Organisateur J.Adrian.

IWASAKI T. and YOSHIOKA Y.

Nippon nogekagaku Kaishi 1971, 45, p 207.

NICOLAI H. and ZILLIKEN F.

Microbios Lett. 1984, 25, p 29.

ROMOND C., ROMOND M.B.

Produits fermentés par Bifidobacterium.

Compte rendu du C.P.C.I.A. de Paris 1990a.

SCHEEGANS E., HAARSCHER A.

Sem. Hop. Paris 1966, 42,26/27, pp 457-462.

T A B L E D E S M A T I E R E S

G E N E R A L E

T A B L E D E S M A T I E R E S

	Page
INTRODUCTION.....	16
PREMIERE PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	19
1 TAXONOMIE.....	20
2 IDENTIFICATION DES BIFIDOBACTERIUM.....	22
2.1 Identification du genre.....	22
2.2 Identification de l'espèce.....	23
3 MORPHOLOGIE.....	25
3.1 Généralités.....	25
3.2 Variation de la morphologie des Bifidobacterium en fonction de l'alimentation de l'hôte.....	25
3.3 Variation de la morphologie des Bifidobacterium en fonction de la composition du milieu de culture.....	26
3.4 Description des Bifidobacterium dans l'espace.....	30
3.5 Description des colonies.....	30
4 PHYSIOLOGIE.....	31
4.1 La respiration.....	31
4.2 Température et pH.....	31
5 LA PAROI CELLULAIRE.....	33
5.1 Description de la paroi cellulaire des Gram positifs.....	33
5.2 Description du peptidoglycane des Bifidobacterium.....	33
5.3 Description des polysaccharides des Bifidobacterium.....	35
5.4 L'acide téichoïque.....	35

6 L'ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE (A.D.N.) DES BIFIDOBACTERIUM.....	37
6.1 Etude de l'A.D.N.	37
6.2 Etude du plasmide.....	38
7 LES LIPIDES ET LES PHOSPHOLIPIDES CHEZ LES BIFI- DOBACTERIUM.....	39
7.1 Les acides gras.....	39
7.2 Les phospholipides.....	39
7.3 Les glycolipides.....	40
8 METABOLISME.....	42
8.1 Métabolisme du glucose.....	42
8.1.1 Utilisation du glucose.....	42
8.1.2 Utilisation du pyruvate.....	44
8.2 Métabolisme du galactose.....	45
8.3 Métabolisme du fructose.....	45
9 FACTEURS BIFIDIGENES.....	47
9.1 Généralités.....	47
9.2 Le facteur BF1.....	47
9.3 Le facteur BF2.....	48
9.4 Autres facteurs bifidigènes.....	48
10 FACTEURS NUTRITIONNELS.....	50
10.1 Besoins en acides aminés.....	50
10.2 Besoins en vitamines.....	50
10.3 Besoins en minéraux.....	51
10.4 Besoins en bases.....	52
10.5 Besoins en sucres.....	52

11 LA CULTURE DES BIFIDOBACTERIUM.....	53
11.1 Milieux de base.....	53
11.2 Milieux sélectif et électif.....	54
11.3 Influence du milieu.....	55
12 L'HABITAT DES BIFIDOBACTERIUM.....	57
12.1 Généralités.....	57
12.2 Implantation chez le nouveau-né.....	58
12.2.1 Implantation en fonction du mode d'accouchement.....	58
12.2.2 Implantation en fonction de la pré- maturité.....	58
12.2.3 Composition de la flore en fonction du poids de naissance.....	58
12.2.4 Implantation en fonction du mode d'alimentation.....	59
12.3 Variation des espèces en fonction de l'âge.	60
12.4 Survie des bifidobactéries dans l'estomac de l'homme.....	60
13 ROLE DES BIFIDOBACTERIUM.....	61
13.1 L'équilibre de la flore intestinale.....	61
13.2 Rôle des Bifidobacterium dans les diarrhées	62
13.3 Rôle des Bifidobacterium dans les troubles digestifs dûs à l'antibiothérapie.....	63
13.4 Rôle dans les maladies du foie.....	64
13.5 Action hypocholestérolémiante.....	64
13.6 Prophylaxie de certaines tumeurs.....	65
13.7 Rôle des Bifidobacterium dans le système immunitaire.....	65
13.8 Rôle des Bifidobacterium dans la constipa- tion.....	65

14	ACTIVITE ENZYMATIQUE DES BIFIDOBACTERIUM.....	67
14.1	La β -galactosidase.....	67
14.2	Autres activités enzymatiques.....	68
15	RAPPEL CONCERNANT L'INTOLERANCE AU LACTOSE ET LE DEFICIT EN LACTASE INTESTINALE.....	69
15.1	Déficit en β -galactosidase.....	69
15.2	La prévention.....	70
	SECONDE PARTIE EXPERIMENTALE.....	72
1	MATERIEL ET REACTIFS.....	73
1.1	Les souches.....	73
1.2	Les réactifs.....	73
2	LE CHOIX DU MILIEU.....	75
2.1	Milieu sélectif.....	75
2.2	Milieu de base COLUMBIA.....	76
2.3	Milieu de base WILKIN-WEST.....	76
2.4	Milieu de base TRYPTICASE-PHYTONE-YEAST.....	77
3	OBTENTION D'UNE ATMOSPHERE ANAEROBIE.....	79
4	CULTURE ET ISOLEMENT DES DIFFERENTES SOUCHES....	80
4.1	Culture de la souche lyophilisée.....	80
4.2	Culture des souches B et C à partir des laits fermentés.....	80
4.3	Culture de la souche D.....	81
5	PREPARATION D'UNE SUSPENSION BACTERIENNE ET DENOMBREMENT.....	82
5.1	Préparation d'une suspension bactérienne...	82
5.2	Le dénombrement.....	82

6 DESCRIPTION DES COLONIES ET DES BACTERIES.....	84
6.1 Description des colonies.....	84
6.2 Description des bactéries.....	85
7 TECHNIQUES PERMETTANT DE MESURER L'ACTIVITE LACTASIQUE.....	87
7.1 Dosage du lactose et du galactose.....	87
7.1.1 Principe de la réaction.....	87
7.1.2 Principe du dosage.....	88
7.2 Dosage de l'acide lactique.....	88
7.2.1 Principe de la réaction.....	88
7.2.2 Principe du dosage.....	89
7.3 Dosage du glucose.....	90
8 ACTIVITE LACTASIQUE DE LA SOUCHE A à pH = 6,50..	91
8.1 Protocole opératoire.....	91
8.2 Résultats des dosages.....	92
9 ACTIVITE LACTASIQUE DES SOUCHES B et C à pH = 6,50.....	95
9.1 Protocole opératoire.....	95
9.2 Résultats des dosages de la souche B.....	95
9.3 Résultats des dosages de la souche C.....	100
10 ACTIVITE LACTASIQUE DE LA SOUCHE B EN FONCTION DU pH.....	105
10.1 Préparation de la gamme de pH.....	105
10.2 Protocole opératoire.....	105
10.3 Résultats des dosages.....	106

11 ACTIVITE LACTASIQUE DE LA SOUCHE D à pH = 6,50..	109
11.1 Protocole opératoire.....	109
11.2 Résultats des dosages.....	110
12 ACTIVITE LACTASIQUE DE LA SOUCHE D EN FONCTION DU pH.....	112
12.1 Protocole opératoire.....	112
12.2 Résultats des dosages.....	113
13 ACTIVITE LACTASIQUE DANS LE YAOURT ENSEMENCE PAR LA SOUCHE D.....	116
13.1 Protocole opératoire.....	116
13.2 Résultats des dosages.....	116
DISCUSSION CONCLUSION.....	119
BIBLIOGRAPHIE.....	126
Références bibliographiques.....	127
Annexes bibliographiques.....	135
TABLE DES MATIERES GENERALE.....	136
TABLE DES MATIERES DES FIGURES ET TABLEAUX.....	143
Figures.....	144
Tableaux.....	144
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	147

TABLE DES MATIERES
DES FIGURES ET TABLEAUX

T A B L E D E S M A T I E R E S
D E S F I G U R E S E T T A B L E A U X

- F I G U R E S -

	Page
Figure 1 : Dégradation des hexoses par la voie du fructose-6-phosphate phosphocetolase.....	43
Figure 2 : Courbes d'évolution de la concentration de lactose en % au cours du temps pour la souche A.....	94
Figure 3 : Courbes d'évolution de la concentration de lactose en % au cours du temps pour la souche B.....	99
Figure 4 : Courbes d'évolution de la concentration en glucose et galactose en g/l au cours du temps pour la souche B.....	100
Figure 5 : Courbes d'évolution de la concentration de lactose en % au cours du temps pour la souche C.....	103
Figure 6 : Courbes d'évolution de la concentration en glucose et galactose en g/l au cours du temps pour la souche C.....	104
Figure 7 : Histogramme représentant le taux de lactose dégradé en g/l après une heure d'incubation à 40°C et pH variable pour la souche B.....	106
Figure 8 : Activité lactasique en fonction du pH pour la souche B, après une heure d'incubation, en microkatal pour 100 ml de suspension bactérienne.....	108
Figure 9 : Histogramme représentant le taux de lactose dégradé en g/l après une heure d'incubation à 40°C et pH variable pour la souche D.....	114
Figure 10 : Activité lactasique en fonction du pH pour la souche D, après une heure d'incubation, en microkatal pour 100 ml de suspension bactérienne.....	114
Figure 11 : Courbes d'évolution de la concentration en lactose, galactose, glucose et acide lactique en g/l pour le yaourt.....	118

- T A B L E A U X -

	Page
Tableau I : Culture et morphologie de Bifidobacterium bifidus dans différents milieux.....	29
Tableau II : Teneur en polysaccharides de la paroi cellulaire des Bifidobacterium.....	35
Tableau III : Comparaison de la composition de la flore bifidobactérienne des enfants nourris au sein et de ceux nourris au lait artificiel.....	59
Tableau IV : Taux de lactose au cours du temps dans les sachets de « Lyobifidus ».....	93
Tableau V : Activité lactasique des sachets de bifidus lyophilisés au cours du temps.....	93
Tableau VI : Variation du pH et de la concentration en galactose, en g pour 1 g de poudre lyophilisée au cours du temps.....	94
Tableau VII : Evolution du nombre de bactéries par ml au cours du temps dans les différents lots de suspension bactérienne dans la souche B, conservés par congélation à -20° C.....	96
Tableau VIII : Taux de lactose en g/l au cours du temps à J, J+8 et J+15 pour la souche B...	97
Tableau IX : Variation du pH et de la concentration en lactose, galactose et glucose en g/l dans les lots n° 1 et n° 2 au cours du temps, pour la souche B.....	98
Tableau X : Activité lactasique de la souche B à pH = 6,50 en microkatal pour 100 ml de suspension bactérienne.....	98
Tableau XI : Evolution du nombre de bactéries par ml au cours du temps dans les différents lots de suspension bactérienne dans la souche C, conservés par congélation à -20° C.....	100
Tableau XII : Taux de lactose en g/l au cours du temps à J et J+8 pour la souche C.....	101

	Page
Tableau XIII : Variation du pH et de la concentration en lactose, galactose et glucose en g/l dans les lots n° 1 et n° 2 au cours du temps, pour la souche C.....	102
Tableau XIV : Activité lactasique de la souche C à pH = 6,50 en microkatal pour 100 ml de suspension bactérienne.....	103
Tableau XV : Activité lactasique en fonction du pH pour la souche B au bout d'une heure, en microkatal pour 100 ml de suspension...	107
Tableau XVI : Variation du pH et de la concentration en lactose, galactose et acide lactique en g/l au cours du temps pour la souche D.	111
Tableau XVII : Activité lactasique de la souche D à pH = 6,50 en microkatal pour 100 ml de suspension bactérienne.....	111
Tableau XVIII : Variation du pH dans la souche D au cours du temps.....	113
Tableau XIX : Activité lactasique au cours du temps en fonction du pH, pour la souche D, en microkatal pour 100 ml de suspension bactérienne.....	115
Tableau XX : Variation du pH et de la concentration en lactose, galactose et acide lactique en g/l au cours du temps pour le yaourt...	117
Tableau XXI : Activité lactasique du yaourt à pH = 6,50 en microkatal pour 100 g de produits laitiers.....	117

TABLE DES ILLUSTRATIONS

T A B L E D E S I L L U S T R A T I O N S

- Bactéries de la souche B.....	85
- Bactéries de la souche C.....	86
- Bactéries de la souche D.....	86

PASSERAT Brigitte -- Activité lactasique des Bifidobacterium. Leur intérêt nutritionnel dans le cadre de l'hypolactasie de l'adulte.

148F; 21 Tabl.; 11 Fig.; 3 Ill.; (Thèse : Pharm ; Limoges ; 1991).

RESUME :

Dans la première partie bibliographique, nous parlons des caractères physiologiques et morphologiques des Bifidobacterium. Les bifidobactéries sont des bactéries Gram-positif que l'on trouve dans les selles de l'homme et de nombreux animaux. Elles jouent un rôle très important sur le bien-être et la santé de l'homme, et leur présence dans les selles des nouveaux-nés est un signe de bonne santé.

Les résultats rapportés dans la seconde partie expérimentale portent sur la lactase des Bifidobacterium.

Dans une première étape nous avons isolé les Bifidobacterium à partir des laits fermentés afin d'obtenir des souches pures de bifidobactéries. Il nous a fallu trouver un milieu de culture adéquat, qui non seulement permettait la culture des Bifidobacterium mais aussi inhibait la culture des autres bactéries contenues dans les laits fermentés.

Dans une seconde étape nous avons testé l'activité lactasique des Bifidobactérium en mettant en contact des suspensions bactériennes de Bifidobacterium et des solutions de lactose.

Nos dosages ont montré que les Bifidobacterium possèdent une activité lactasique. Cette activité est maximale à pH acide. La dégradation du lactose par les bactéries est suivie de l'apparition dans le milieu réactionnel de glucose, de galactose et d'acide lactique. On observe aussi une acidification du milieu.

MOTS CLES :

- Bifidobacterium
 - Lactase
 - Hypolactasie
 - Lactose
-

JURY : Président : Monsieur NICOLAS, Professeur
Juges : Madame DESMAISONS, Maître de Conférences
Madame BRUTUS, Pharmacien
