

CARACTERISATION DE *BIFIDOBACTERIUM INFANTIS* DANS LE LAIT ADAPTE 1^{er} ÂGE (CELIA1®) ET DANS LE LAIT MATERNEL

MAMECHE-DOUMANDJI A. ^(1,2),
TERKMANI H. ⁽¹⁾ et BOUSBIA N. ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Université Saâd Dahleb, Faculté des sciences Agro-Vétérinaires,
DépT Agron., Route de Soumaâ, B.P. 270 – 9000, Blida (Algérie)

⁽²⁾ Auteur pour la correspondance, Fax: + 213 (0)25 41 82 60,
Tel: +213 (0)793 27 27 01, E-mail : corino147@yahoo.fr

RESUME

Une souche de *Bifidobacterium infantis* a été isolée à partir des selles d'un nourrisson âgé de deux mois allaité exclusivement au sein de l'hôpital de Ben Boulaid de Blida. Les milieux MRS et Columbia représentent de bons milieux de culture pour la croissance de cette souche. L'inoculum standard de cette dernière est de l'ordre de $5,5 \cdot 10^7$ UFC/mL. Deux types de lait ont fait l'objet de notre étude, le lait maternel et le lait adapté 1^{er} âge (Célia1®). Grâce à l'importance de *Bf. infantis* dans la prévention des diarrhées néonatales, cette espèce constitue une souche probiotique. Cette dernière a montré un effet bénéfique sur l'équilibre de la flore intestinale du nourrisson. Le lait maternel et le lait artificiel Célia1® 1^{er} âge ont permis une bonne croissance pour l'espèce *Bf. infantis*. Ceci peut être expliqué par la richesse du lait maternel en facteurs bifidigènes et la richesse du lait infantile en éléments nutritifs indispensables à la croissance de *Bf. infantis*. Une congélation à -20°C. a montré que *Bf. infantis* n'était pas dans un état physiologique optimal. D'où l'intérêt d'utilisation de techniques de conservation plus efficaces telle que la lyophilisation. *Bf. infantis* représente une sensibilité envers divers antibiotiques. Cette sensibilité est notée particulièrement envers l'amoxicilline et la céfalexine. Les diamètres de la zone d'inhibition sont respectivement de l'ordre de 24 et de 20 mm.

Mots clés : *Bifidobacterium infantis* – croissance – pH - lait artificiel –
lait maternel - conservation – antibiotiques - probiotique.

**CARACTERISATION OF BIFIDOBACTERIUM INFANTIS
IN MILK ADAPTS 1ST ÂGE (CELIA1®)
AND IN THE MOTHER'S MILK**

S U M M A R Y

A stock of *Bifidobacterium infantis* was insulated starting from the saddles from infant nursed exclusively with the two months old centre from the hospital from Ben Boulaid de Blida. The mediums MRS and Columbia represent good culture media for the growth of our stock of interest. The standard inoculum of this stock is about $5.5 \cdot 10^7$ UFC/mL. Two types of milk were the subject of our study: mother's milk and milk adapted 1st age (Célia1®). Due of the importance of *Bf. infantis* in the prevention of the diarrhoeas neonatal, this species constitutes a probiotic stock which showed a beneficial effect on balance of the intestinal flora of the infant. This stock showed a good growth in the mother's milk and artificial milk Célia1® 1st age. This can be explained by the richness of the mother's milk in factors bifidigenes and richness of infantile milk in essential nutritive elements with the growth of *Bf. infantis*. The effect of the conservation at -20°C. and of the duration of congelation showed that the stock *Bf. infantis* was not in an optimal physiological state. From where interest of the use of more effective techniques such as freeze-drying. The stock *Bf. infantis* represents sensitivity towards various antibiotics, more particularly towards Amoxicilline and the cefalexine. The diameters of the zone of inhibition are respectively about 24 and 20 mm.

Key words : *Bifidobacterium infantis* - growth - pH - artificial milk - mother's milk conservation – antibiotics - probiotic.

دراسة خصائص جرثومة *Bifidobacterium infantis* في الحليب الاصطناعي مخصص للعمر الأول (Célia1®) وحليب الأم.

المخلص

تم عزل جرثومة *Bifidobacterium infantis* من غائط أطفال رضع غنوا بحليب الأم فقط ويبلغون كلهم شهرين من العمر وهذا بمستشفى بن بولعيد – البلدية. كذلك تم استعمال وسط التكاثر MRS و Columbia الوسطين الأكثر ملائمة لنمو وتكاثر الجرثومة التي هي محل دراستنا.

قدرت الكمية المعيارية المستخدمة لدراسة هذه الجرثومة ب 5,5 . 10⁷ وحدة مستعمرة مشكلة /مل، ولإجراء الدراسة قمنا باستعمال صنفان من الحليب: حليب الأم وحليب اصطناعي مخصص للعمر الأول (Célia1®). ونظرا لأهمية جرثومة *Bf. infantis* للوقاية من الإسهال عند الرضع حديثي الولادة، فقد اعتبرت محفزة حيوية ذات تأثير إيجابي على توازن البكتريا المعوية عند الرضع.

أظهرت هذه الجرثومة معدلات نمو جيدة خلال تكاثرها في حليب الأم وفي الحليب الاصطناعي (Célia1®)، وهذا راجع أساسا إلى وجود محفزات لنموها في حليب الأم ولغني الحليب الاصطناعي بالمواد المغذية والضرورية لنمو الجرثومة.

إن لتأثير درجة الحرارة (-20°) و مدة تجميدها قد جعلت جرثومة *Bf. infantis* تنمو في ظروف فيزيولوجية غير ملائمة لذا ننصح باتخاذ إجراءات تخزينية أخرى مثل التجفيف بتبخير الماء ثم تجميده تحت درجات حرارة منخفضة وتحت الفراغ (دريغ- فريزر).

بينت جرثومة *Bf. infantis* حساسية اتجاه عدة مضادات حيوية بالخصوص أموكسيسيلين وسفاليكسين، بحيث قدر قطر مناطق كبح النمو ب 24 مم و 20 مم على التوالي والترتيب.

الكلمات الجوهرية : *Bifidobacterium infantis* - نمو - قدرة الهيدروجين (pH) -

حليب اصطناعي- حليب الأم- حفظ- محفز حيوي - مضاد حيوي.

1. INTRODUCTION

Chez les humains, la microflore intestinale constitue un riche écosystème composé d'une vaste gamme de micro-organismes présentant une activité métabolique. Dans le tube digestif, la colonisation bactérienne touche particulièrement le gros intestin, qui produit habituellement jusqu'à 10^{12} bactéries /g de selles. La microflore intestinale est constituée généralement de *Bactéroïdes*, de bifidobactéries, de coliformes, d'entérobactéries, d'eubactéries et de streptocoques. Le rôle-clé de la microflore intestinale dans la santé physiologique de l'organisme-hôte est largement documenté. En conditions normales, le milieu microbien de l'intestin humain affiche une très grande stabilité. Cependant, plusieurs facteurs internes et externes, dont l'âge et le régime alimentaire de l'hôte, agissent sur la nature et la quantité des bactéries présentes (SALMINEN et ISOLAURI, 2006; FARNWORTH et al., 2007). À la naissance, le tube digestif des nouveaux-nés humains constitue un milieu stérile. Peu de temps après la naissance, les bactéries amorcent la colonisation du gros intestin. Tant que l'allaitement maternel est maintenu, les bifidobactéries prédominent dans les selles du nourrisson. Au sevrage, cependant, son taux chute concurrentement à l'augmentation du nombre de bactéries indésirables comme les coliformes, *Clostridia* et les streptocoques. Le taux de bifidobactéries continue de décroître avec l'âge, provoquant du coup une augmentation de la sensibilité aux infections (MOORE et HOLDEMAN, 1974; BJORKESTE, 2005; KLIJN et al., 2005; NAGHMOUCHI et al., 2006).

Les diarrhées sont une cause principale de mortalité chez les enfants dans les pays en voie de développement où selon les estimations de l'OMS, l'on recense chaque année 1,3 milliards d'épisodes et 3,2 millions de décès chez les enfants de moins de cinq ans. L'un des rôles fondamentaux de la flore microbienne intestinale est de protéger l'hôte contre l'invasion par des germes pathogènes. L'apport par l'aliment de bactéries vivantes réputées bénéfiques (probiotiques) peut permettre d'orienter favorablement ou de renforcer les propriétés de la flore intestinale. Les bactéries lactiques comptent parmi les meilleures candidates (AKAO et al., 1994; BERTAZZONI-MINELLI et al., 1995; KHEADR et al., 2004; COLLADO et al., 2005).

En Algérie, les préparations lactées aux bifidobactéries destinées aux nourrissons ne sont pas encore disponibles. La mise au point d'un lait fermenté aux bifidobactéries destiné aux jeunes nourrissons pallierait à cette carence. Ce lait fermenté serait proposé en particulier en cas de diarrhées

déjà établies (traitement thérapeutique), ou en prévention de celles-ci (traitement préventif) chez les nourrissons recevant un allaitement artificiel.

La première partie de notre étude concerne le contrôle de la pureté de la souche *Bifidobacterium infantis*. La deuxième étape concerne le suivi de la cinétique de la croissance et du pouvoir acidifiant de la souche d'intérêt dans le lait infantile 1^{er} âge (Célia1®) et dans le lait maternel. La dernière partie est orientée vers l'étude de la technique de la conservation de *Bf. infantis* à -20°C. ainsi que sa sensibilité aux antibiotiques.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. CONTROLE DE LA QUALITE BACTERIOLOGIQUE DU LAIT INFANTILE 1^{ER} AGE (CELIA1®) ET DU LAIT MATERNEL

Le lait maternel provient d'une mère bien portante, ayant accouché par voie naturelle, qui n'est pas sous traitement antibiotique. L'échantillon provient des premières sécrétions mammaires. Le lait infantile 1^{er} âge utilisé lors de cette présente étude est le lait Célia1®. Le choix de ce dernier a été justifié par son utilisation au niveau de la pouponnière de Hadjout.

La qualité bactériologique du lait adapté premier âge et du lait maternel est déterminée selon la méthode décrite par le journal officiel de la république algérienne (J.O.R.A., 1998). Cette analyse est réalisée immédiatement après ouverture de la boîte du lait infantile artificiel où 25 g de ce dernier sont additionnés à 225 mL de TSE. 25 ml de lait maternel sont aussi additionnés à 225 mL de TSE. Les milieux de culture ainsi que les conditions d'incubation sont mentionnés au niveau du tableau 1.

Tableau 1 : Conditions de culture pour la recherche de microorganismes dans le lait artificiel 1er âge et le lait maternel

Microorganismes	Milieux de culture	Température et durée d'incubation
Germes aérobies mésophiles	gélose nutritive	37°C./ 72 heures
Coliformes	Bouillon lactosé au vert brillant (VBL)	37°C. / 48 heures
<i>Clostridium sulfito-réducteur</i>	Milieu viande foie + une ampoule d'Alun de fer + une ampoule de sulfite de sodium	80°C./ 10 minutes (au bain marie), puis un refroidissement avec de l'eau froide - choc thermique - 37°C./ 48 heures
Staphylocoques	-Enrichissement dans milieu Gioltti Cantonii + additif tellurite de Potassium	37°C./ 24 heures
	-Isolement sur gélose Chapman	37°C./ 48 heures
Levures et moisissures	Milieu à l'oxytétracycline glucose agar (OGA)	5 jours à l'air ambiant 20°C.
Salmonelles	-Pré-enrichissement dans le milieu tryptone sel eau (TSE)	37°C./ 24 heures
	-Isolement sur milieu gélose Hecktoën	37°C./ 48 heures

2. 2. CONTROLE DE LA PURETE DE LA SOUCHE

Bifidobacterium infantis

La souche bifide provient de selles fraîches d'un nourrisson sain âgé de 2 mois. L'échantillonnage est effectué au niveau de la pouponnière de l'hôpital Ben Boulaïd de Blida.

Les selles sont prélevées stérilement à partir de la couche jetable. L'isolement des bifidobactéries est réalisé en profondeur sur MRS cystéiné à 37°C. Après 48 h d'incubation, les colonies sont sélectionnées selon leur aspect morphologique ainsi que sur la base de leur mobilité, de leur forme, de leur état frais et de la coloration de Gram (TAMIME et al., 1995). Les colonies des bifidobactéries sont repiquées sur le bouillon MRS cystéiné, à pH 6,4 additionné de 15 µg/ mL d'acide nalidixique. Puis les tubes sont incubés en anaérobiose (en ajoutant une goutte d'huile de paraffine stérile à la surface du tube) pendant 24 h à 37°C. La pureté des souches est contrôlée par la coloration de Gram, test de la catalase, test physiologique et test biochimique de la galerie API 20A. Après quoi les souches seront repiquées sur MRS cystéiné à pH 6,4 (LARPENT, 1997; D'AIMMO et al., 2007).

2.3. CARACTERISATION DE *Bifidobacterium infantis*

DANS LE LAIT INDUSTRIEL ET LE LAIT MATERNEL

2.3.1. La reconstitution du lait adapté 1^{er} âge

La préparation du lait adapté premier âge a été faite par mesure d'une quantité adéquate de la poudre de lait. Celle-ci a été reconstituée dans de l'eau minérale à raison de 30 g de poudre dans 360 mL d'eau minérale (décrite sur l'emballage). Une fois la poudre bien dissoute dans l'eau, le lait est réparti dans des tubes à essais à raison de 9 mL par tube puis stérilisé à 110°C. pendant 10 minutes.

Le lait maternel n'a subi aucun traitement. Les deux types de laits sont conservés au congélateur à -20°C. jusqu'au moment de leur utilisation.

2.3.2. La mise au point du lait infantile (artificiel et maternel) fermenté au *Bifidobacterium infantis*

Le lait adapté et le lait maternel sontensemencés avec 1 mL d'une préculture de *Bifidobacterim infantis* âgée de 18h (soit $5,5 \cdot 10^7$ UFC/mL). Un suivi du pouvoir acidifiant et de la cinétique de la croissance de la

souche est réalisé toutes les deux heures pendant 8h et après 24h de fermentation dans les deux types de lait. Le dénombrement de la souche d'intérêt est réalisé sur gélose Columbia (Fig. 1).

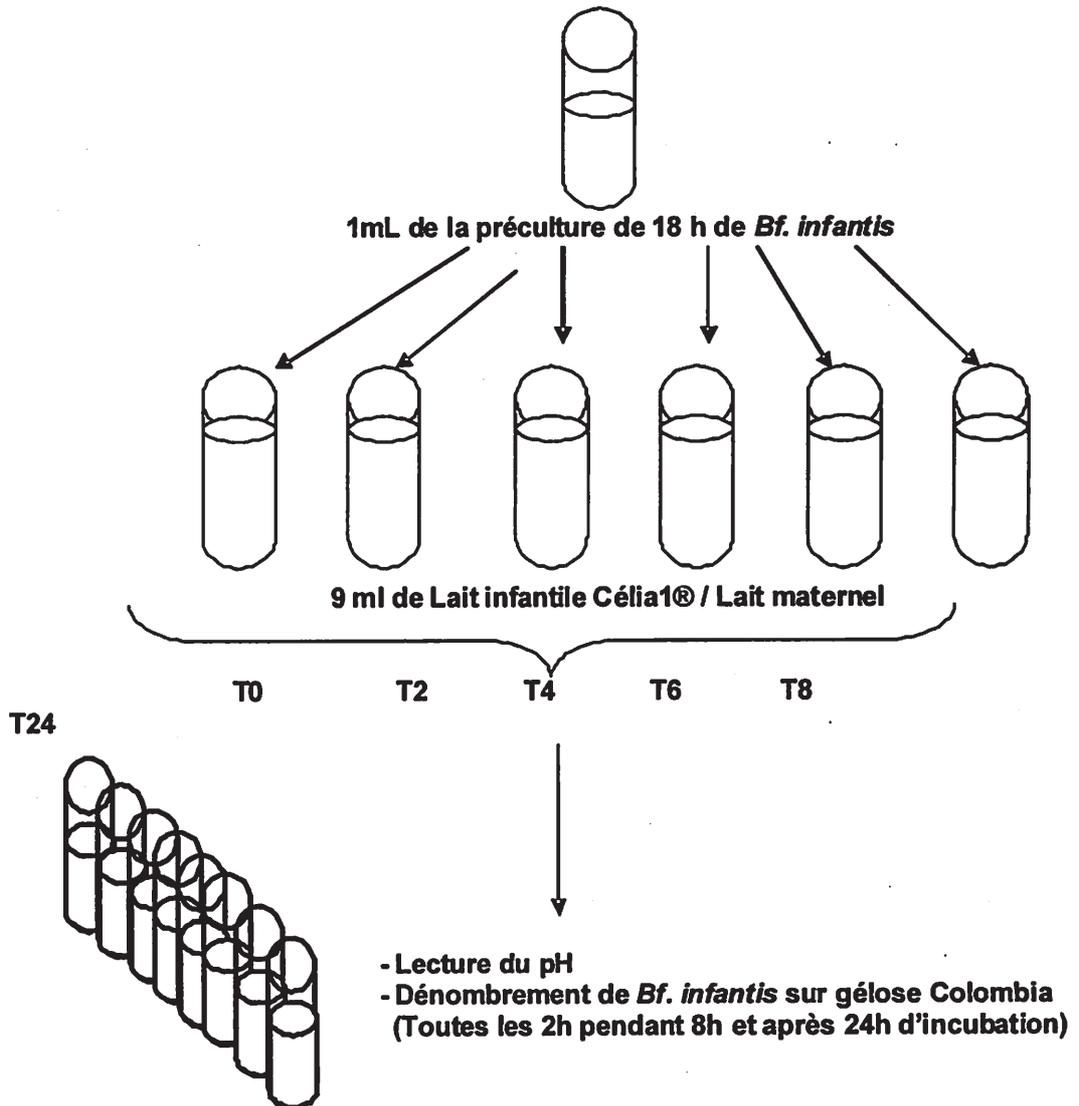


Figure 1 : Suivi du pouvoir acidifiant et de la croissance de *Bifidobacterium infantis* dans le lait artificiel et maternel

2.4. ETUDE DE LA SENSIBILITE DE *BIFIDOBACTERIM INFANTIS* AUX ANTIBIOTIQUES

Cette méthode a pour but de déterminer la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis de divers antibiotiques. Quatre antibiotiques ont fait l'objet de cette présente étude la pénicilline, l'amoxicilline, la céfalexine et la roxithromycine.

2.4.1. Méthode de diffusions des puits (antibiogramme standard)

La méthode de diffusion des puits ou antibiogrammes standards sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Des puits sont creusés sur gélose Colombia préalablementensemencée avec une préculture de *Bifidobacterim infantis*. Ces puits sont chargés avec 100 µL d'antibiotique à tester. Dès l'application des puits, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance de puit. Les boîtes de Pétri sont placées à 4°C. pendant 1h 30 min. Une fois la diffusion de l'antibiotique est terminée, ces boîtes sont mises à l'étuve à 37°C / 24h. Après incubation, les puits s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe.

2.4.2. Détermination des catégories sensible/ intermédiaire/résistant (S/I/R)

Les valeurs critiques définies pour les concentrations et les diamètres des zones d'inhibition, ainsi que les recommandations spécifiques, à certaines espèces ou à certains groupes d'antibiotiques sont publiées dans un communiqué annuel par le CA-SFM (comité de l'antibiogramme - société française de microbiologie) et BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) (OMS, 1979; ANDREWS, 2001).

Trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* : Sensible (S), Résistant (R) et Intermédiaire (I).

Aux regards des concentrations et des diamètres critiques (tableau 2, Fig. 2) sont considérées comme :

- **Sensible (S)**, la souche pour laquelle le diamètre de la zone d'inhibition de l'antibiotique testé est inférieur ou égale au diamètre

critique D. Ceci suggère que la concentration de l'antibiotique (C_a) est inférieure ou égale à la concentration critique basse (c).

- **Résistant (R)**, la souche pour laquelle le diamètre de la zone d'inhibition de l'antibiotique testé est supérieur au diamètre critique d. Ceci suggère que la concentration de l'antibiotique testé (C_a) est supérieure à la concentration critique haute (C).
- **Intermédiaire (I)**, la souche pour laquelle le diamètre de la zone d'inhibition de l'antibiotique testé est compris entre les deux diamètres critiques (d , D). La concentration de l'antibiotique testé (C_a) est comprise entre la concentration critique basse et la concentration critique haute.

Tableau 2 : Les différentes zones de sensibilité d'un micro-organisme en fonction de la concentration et du diamètre de la zone d'inhibition.

Catégories	C_a (mg/L)	Diamètre (mm)
Sensible	$C_a \leq c$	Diamètre $\leq d$
Résistant	$C_a > C$	Diamètre $\geq D$
Intermédiaire	$c \leq C_a \leq C$	$d \leq \text{Diamètre} \leq D$

C_a : Concentration de l'antibiotique, c : concentration critique basse, C : concentration critique haute, d , D : diamètre critique

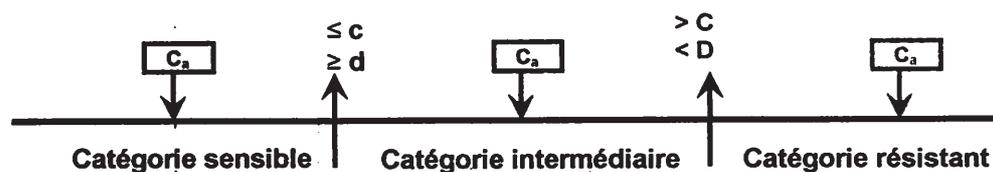


Figure 2 : Schéma illustrant les différentes catégories de sensibilité d'un micro-organisme vis-à-vis d'un antibiotique

2.5. ETUDE STATISTIQUE

Le test t de Student a été utilisé lors de cette présente étude afin de comparer l'évolution des deux paramètres technologique (pH et taux de croissance) dans les deux types de laitsensemencés avec *Bf. infantis*.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3. 1. CONTROLE DE LA QUALITE BACTERIOLOGIQUE

D'après nos résultats, le lait adapté premier âge (Célia 1®) est d'une bonne qualité hygiénique puisqu'il est exempt de bactéries pathogènes et d'autres bactéries indésirables.

D'après les résultats obtenus le lait maternel est de bonne qualité microbiologique, les levures sont en nombre réduit et inférieur au normes admises (1000 germes/ mL). Les deux laits peuvent donc servir à l'élaboration de lait fermenté.

3.2. CONTROLE DE LA PURETE DE *Bifidobacterium infantis*

Les colonies du genre *Bifidobacterium* cultivé sur MRS cystéiné apparaissent sous une forme ronde et lenticulaire. L'aspect microscopique révèle la présence de cellules en forme de bâtonnets bifurqués. Les résultats des tests effectués sont les suivants: Gram +, catalase -. Les résultats de la galerie API 20 A ont indiqué qu'il s'agirait bien de l'espèce *Bifidobacterium infantis*.

3.3. CARACTERISATION DE *Bifidobacterium Infantis* DANS LE LAIT INDUSTRIEL ET LE LAIT MATERNEL

3.3.1. Suivi du pouvoir acidifiant de *Bifidobacterium infantis* au cours de la fermentation

Bf. infantis est caractérisé par son haut pouvoir acidifiant. La diminution du pH est due à la production mixte d'acide acétique et d'acide lactique (voie hétérofermentaire, *bifid shunt*).

En effet, Les bifidobactéries produisent de l'acide acétique et de l'acide lactique dans un ratio molaire théorique de 3 : 2 en métabolisant une grande variété d'hexoses par le cycle du fructose-6-phosphate.

Toutes les deux heures on note une diminution de pH atteignant une valeur de 4,85 pour le lait adapté et 4,95 pour le lait maternel. L'évolution du pouvoir acidifiant dans les deux types de lait sont représentés au niveau de la figure 3.

D'après les résultats du test t de Student, deux conclusions sont notées :

- **Conclusion statistique:** l'hypothèse nulle H_0 ($\mu_a - \mu_b = 0$) peut être rejetée pour $t = 5,31$, avec un seuil de confiance de 0,005. En conclusion la moyenne de l'évolution du pH dans le lait artificiel (LA) est significativement différente de celle du pH dans le lait maternel (LM), au seuil de confiance de 0,005 (5 chances sur milles de se tromper en rejetant l'hypothèse nulle).

- **Conclusion expérimentale:** le calcul du test t de Student pour un test bilatéral permet de rejeter l'hypothèse nulle H_0 au seuil de confiance de 0,005. En conclusion y a une différence significative entre les deux séries de mesure du pH, au seuil de confiance 0,005.

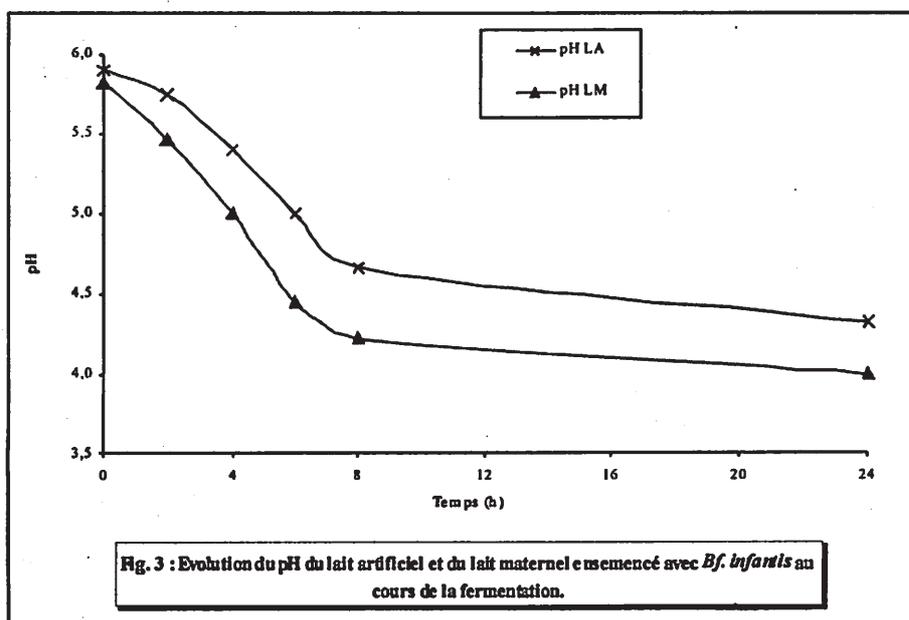


Figure 3 : Evolution du pH du lait artificiel et du lait maternel ensemencé avec *Bf. Infantis* au cours de la fermentation

3.3.2. Suivi de la cinétique de la croissance de *Bifidobacterium infantis* dans les deux types de laits

D'après nos résultats, le nombre de *Bifidobacterium infantis* atteint après 4 h d'incubation un nombre de $3 \cdot 10^8$ UFC/mL lorsque cette espèce est cultivée dans le lait maternel, alors que le même nombre n'est atteint qu'après 6 h d'incubation lorsque *Bf. infantis* se retrouve dans le lait adapté 1^{er} âge (Fig. 4).

Après 24 h d'incubation, le nombre de cellules atteintes est de l'ordre de $2,50 \cdot 10^8$ UFC/ml pour le lait adapté et $1,39 \cdot 10^8$ UFC/mL pour le lait maternel. Cette diminution peut être expliquée par la diminution du pH à un seuil défavorable à la croissance de *Bf. infantis* ou autres. Cette acidité est expliquée par l'activité hétéro-fermentaire de *Bf. infantis*. La fructose-6-phosphate phosphocetolase (F6PPK) assure la dégradation des hexoses par la voie du fructose -6- phosphate. Cette voie est appelée « *Bifid-shunt* », par l'appauvrissement du milieu en éléments nutritifs et par l'âge de la bactérie. L'activité acidifiante de *Bf. infantis* est plus importante dans le lait maternel que dans le lait artificiel. Ceci peut être expliqué par la richesse du lait de femme par les facteurs bifidigènes. Ces derniers représentent des facteurs de croissance indispensables au développement de la flore bifide.

D'après les résultats du test t de Student, deux conclusions sont notées:

- **Conclusion statistique:** l'hypothèse nulle H_0 ($m_a - m_b = 0$) peut être rejetée pour $t = 0,97$, avec un seuil de confiance de 0,2. En conclusion l'évolution du logarithme du nombre de *Bf. infantis* dans le lait artificiel (LA) est significativement différent de celle du nombre trouvé dans le lait maternel (LM), au seuil de confiance de 0,2 (2 chances sur 10 de se tromper en rejetant l'hypothèse nulle).

- **Conclusion expérimentale:** le calcul du test t de Student pour un test bilatéral permet de rejeter l'hypothèse nulle H_0 au seuil de confiance de 0,2. En conclusion y a une différence significative entre les deux séries de mesure du Nombre de cellules, au seuil de confiance 0,2.

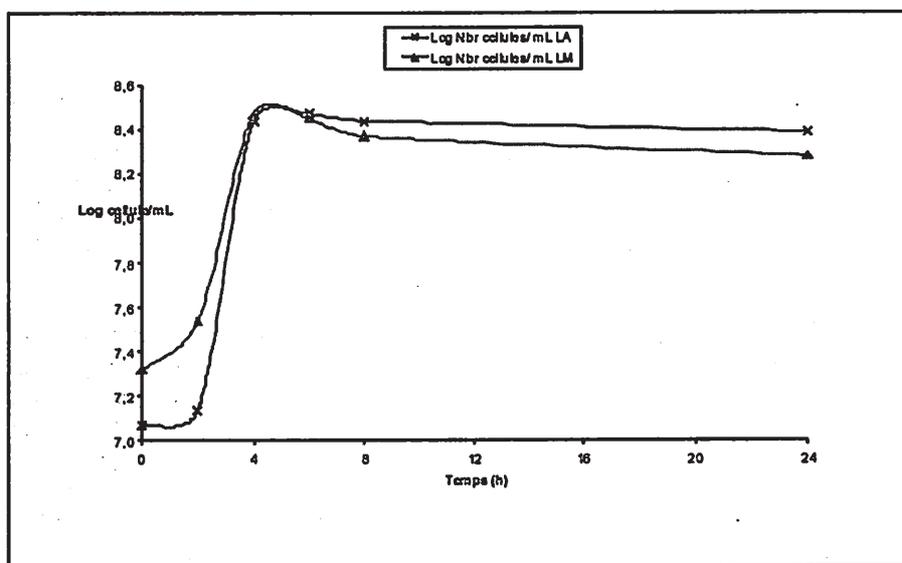


Figure 4 : Cinétique de la croissance de *Bf. infantis* dans le lait maternel et artificiel au cours de la fermentation

3.4. RESISTANCE DE *BIFIDOBACTERIUM INFANTIS* AUX ANTIBIOTIQUES

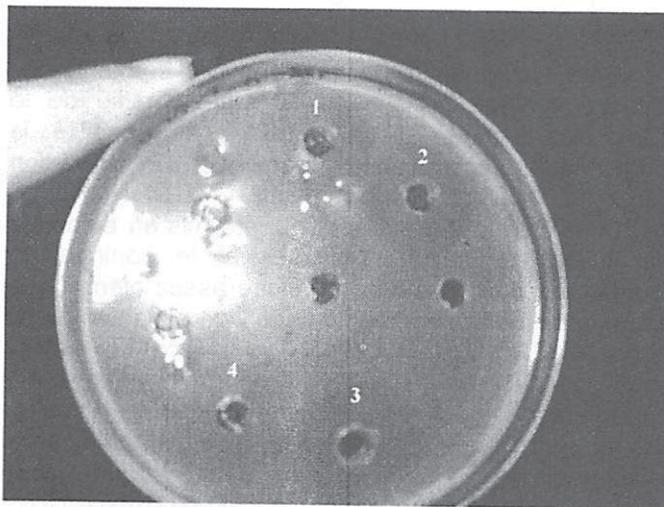
Les résultats de la sensibilité de *Bf. infantis* vis-à-vis des 4 antibiotiques (pénicilline, amoxicilline, céfalexine et roxytrthromycine) sont représentés au niveau du tableau 3 et la figure 5. La souche *Bf. infantis* représente une sensibilité envers divers antibiotiques, plus particulièrement envers l'amoxicilline et la céfalexine, le diamètre de la zone d'inhibition est respectivement de l'ordre de 24 et 20 mm.

D'après nos résultats un traitement usuel par l'amoxicilline chez l'enfant, induit des modifications quantitatives et qualitatives des populations du genre *Bifidobacterium* présentes dans sa microflore fécale. On estime qu'à deux ans, un enfant acquiert une microflore résidente "mature" constituée de nombreuses espèces bactériennes qui vont s'établir et peuvent évoluer au cours du temps. Cette flore comprend notamment des populations bactériennes appartenant au genre *Bifidobacterium*, populations considérées comme bénéfiques pour la santé de l'hôte. L'amoxicilline qui est un antibiotique très fréquemment prescrit chez l'enfant, est active *in vitro* sur la plupart des souches de bifidobactéries (MOUBARECK *et al.*, 2005).

Cependant, peu d'études décrivent les effets de l'amoxicilline sur la flore totale de l'enfant (WALIGORA-DUPRIET *et al.*, 2007).

Tableau 3 : Résultats de la sensibilité de *Bf. infantis* à l'égard des 4 antibiotiques

Antibiotique	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Interprétation
La pénicilline	18	Intermédiaire
L'amoxicilline	24	sensible
La céfalexine	20	sensible
La roxithromycine	18	Intermédiaire



- 1: La pénicilline
- 2: La roxithromycine
- 3: La céfalexine
- 4: L'amoxicilline

Figure 4 : La sensibilité de *Bf. infantis* aux antibiotiques

Selon RASIC et SAD (1990), deux facteurs sont très importants lors de l'isolement et la numération des bifidobactéries. Le premier de ces facteurs est l'obtention des conditions anaérobies et le second est un milieu de culture adéquat. Les conditions anaérobies sont facilement obtenues depuis l'apparition des hottes anaérobies qui ont des atmosphères modifiées composées de 10% de CO₂ et de 90% de N₂ (SHAH, 1997). De plus, les milieux de culture contiennent généralement des suppléments tels que la cystéine, la cystine, des sels minéraux, l'acide ascorbique et le sulfite de sodium qui réduisent le potentiel redox (SHAH, 1997). Les milieux de cultures MRS et Colombia ont permis une bonne croissance de notre souche d'intérêt. Des études cliniques ont démontré que des infections gastro-intestinales peuvent être contrecarrées avec succès par l'utilisation de probiotiques (MERCENIER et al., 2003, TURCHET et al., 2003; PLUMMER et al., 2004; TURSI et al., 2006).

WANG et al., (2004) ont rapporté que la consommation régulière de yogourt additionné de *Lactobacillus acidophilus* La5 ou de *Bifidobacterium lactis* Bb12 induit une suppression effective de l'infection due à *H. pylori*. Par contre ROSENFELDT et al., (2002) ont mentionné que des souches de *L. rhamnosus* et *L. reuteri* ont permis de traiter des gastro-entérites à *Rotavirus* chez des enfants hospitalisés.

Récemment, il a été clairement démontré que les probiotiques influencent directement sur certains aspects de la fonctionnalité de la muqueuse intestinale tels que l'expression de gènes, la perméabilité, le niveau de stress oxydatif, les défenses anti-oxydantes et l'inflammation (GARCIA-LAFUENTE et al., 2001; HOOPER et GORDON, 2001; STAPPENBECK et al., 2002). Si aucun lien direct n'a été mis en évidence entre une espèce particulière de micro-organismes et le contrôle de certaines de ces fonctionnalités, on connaît en revanche assez bien le rôle joué par certains des métabolites sur la muqueuse, l'exemple le mieux étudié étant celui du butyrate (MARIADASON et al., 1997; VENKATRAMAN et al., 2000). Par conséquent, toute modification de l'écosystème est susceptible d'induire des altérations au niveau de la muqueuse de l'intestin. C'est ainsi que chez les rongeurs, il a été montré que des perturbations de la flore induites par exemple par l'administration d'antibiotiques sont susceptibles d'altérer la maturation de la muqueuse intestinale (KINOSHITA et al., 2007).

4. CONCLUSION

Bifidobacterium infantis est une souche qui a été isolée à partir des selles d'un nourrisson allaité exclusivement au sein. Les milieux MRS et Columbia représentent de bons milieux de culture pour la croissance de notre souche d'intérêt. L'inoculum standard de cette souche est de l'ordre de $5,5 \cdot 10^7$ UFC/mL. Deux types de lait ont fait l'objet d notre étude: le lait maternel et le lait adapté 1^{er} âge (Célia1®). Une optimisation de la croissance et du pouvoir acidifiant de la souche ont été obtenus dans les deux types de laits. Ceci peut être expliqué par les facteurs bifidigènes contenus dans le lait maternel et la richesse du lait infantile en éléments nutritifs indispensables à la croissance de *Bf. infantis*. Après 4 heures de fermentation le nombre de *Bf. infantis* dans le lait adapté est de l'ordre de $2,78 \cdot 10^7$ UFC/mL, alors qu'il est meilleur dans le lait maternel soit $3 \cdot 10^8$ UFC/mL.

L'effet de la durée de la congélation à -20°C . a montré que la souche *Bf. infantis* n'était pas dans un état physiologique optimal, d'où l'intérêt de préconiser l'utilisation de techniques plus efficaces telle que la lyophilisation. La souche *Bf. infantis* représente une sensibilité envers divers antibiotiques, plus particulièrement envers l'amoxicilline et la céfalexine. Les diamètres de la zone d'inhibition sont respectivement de l'ordre de 24 et 20mm.

En perspectives, il est intéressant d'étudier l'effet de la lyophilisation sur la viabilité des souches probiotiques, la mise au point d'un lait infantile 1^{er} âge fermenté avec la souche *Bf. infantis* en association avec d'autres espèces de bactéries lactiques et la production de bactériocine et de biomasse issue de *Bf. infantis* en bioréacteur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AKAO T., CHE Q. M., KOBASHI K., YANG L., HOTTARI M. H., NAMBA T., 1994.- Isolation of a human intestinal anaerobic *Bifidobacterium* sp strain SEN, capable of hydrolysing sennosides to sennidins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3: 1041 – 1043.
- ANDREWS J. M., 2001.- The development of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) standardized method of disc diffusion testing. *J. Antimicrob. Chemotherapy*, 48: 29 – 42.
- BERTAZZONI-MINELLI E., BENINI A., VICENTINI L., 1995.- Intestinal microflora in premenstrual syndrome and effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* administration. *Microecol. Ther.*, 25: 223 – 230.
- BJORKESTE B., 2005.- Genetic and environmental risk factors for the development of food allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 5, 3: 249 - 253.
- COLLADO M. C., GONZÁLEZ R., HERNÁNDEZ M., FERRÚS M.A., SANZ Y., 2005.- Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 25, 5: 385 - 391.
- D'AIMMO M. R., MODESTO M., BIAVATI B., 2007.- Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp isolated from dairy and pharmaceutical products. *Inter. J. Food Microbiol.*, 115: 35 - 42.
- FARNWORTH E. R., MAINVILLE I., DESJARDINS M. P., GARDNER N., FLISS I., CHAMPAGNE C., 2007.- Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *Inter. J. Food Microbiol.*, 116: 174 - 181.
- GARCÍA-LAFUENTE A., ANTOLÍN M., GUARNER F., CRESPO E., MALAGELADA J. R., 2001.- Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. *Gut*, 48: 503 - 507.
- HOOPER L. V., GORDON J. I., 2001.- Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292, 5519: 1115 – 1118.
- KHEADR E., BERNOUSSI N., LACROIX C. FLISS I., 2004.- Comparison of the sensivity of commercial strains and infant isolated of *Bifidobacteria* to antibiotics and bacteriocins. *Int. Dairy J.*, 14: 1041 - 1053.

- KINOSHITA H., UCHIDA H., KAWAI Y., KITAZAWA H., MIURA H., SHIIBA K., HORII A., SAITO T., 2007.-** Quantitative evaluation of adhesion of lactobacilli isolated from human intestinal tissues to human colonic mucin using surface plasmon resonance (BIACORE assay). *J. Appl. Microbiol.*, 102: 116 – 123.
- KLJN A., MERCENIER A., ARIGONI F., 2005.-** Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29: 491 p.
- LARPENT J. P., 1997.-** *Technique de laboratoires, microbiologie alimentaire*, Ed. 2 techniques et documentations Lavoisier, Paris: 1073 p.
- MARIADASON J. M., BARKLA D. H., GIBSON P. R., 1997.-** Effect of short-chain fatty acids on paracellular permeability in Caco-2 intestinal epithelium model. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, 272: 705 - 712.
- MERCENIER A., PAVAN S., POT B., 2003.-** Probiotics as Biotherapeutic Agents: Present Knowledge and Future Prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 2: 175 - 191
- MOORE W. E. C., HOLDEMAN L. V., 1974.-** Human Fecal Flora: The Normal Flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Microbiol.*, 27, 5: 961 - 979.
- MOUBARECK C., GAVINI F., VANGIEN L., BUTEL M. J., DOUCET-POPULAIRE F., 2005.-** Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 55, 1: 38 - 44.
- NAGHMOUCHI K., DRIDER D., KHEADR E., LACROIX C., PRÉVOST H., FLISS I., 2006.-** Multiple characterizations of *Listeria monocytogenes* sensitive and insensitive variants to divergicin M35, a new pediocin-like bacteriocin. *J. Appl. Microbiol.*, 100: 29 – 39.
- OMS 1979.-** Comité d'experts sur la standardisation biologique. 13^{ème} Rapport. Sem. Rapp. Techn., 638: 61 - 65.
- PLUMMER S., WEAVER M.A., HARRIS J. C., DEE P., HUNTER J., 2004.-** *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea. *Int. Microbiol.*, 7, 1: 59 - 62.
- RASIC J. L., SAD N., 1990.-** Culture media for detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milks products. *Bull. IDF International Daky Federation*, 252: 24 - 34.

- ROSENFELDT V., MICHAELSEN K. F., JAKOBSEN M., LARSEN C. N., MOLLER P. L., PEDERSEN P., TVEDE M., WEYREHTER H., VALERIUS N. H., PAERREGAARD A., 2002.- Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in young children hospitalized with acute diarrhoea. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 21, 5: 411 - 416.
- SALMINEN S AND ISOLAURI E., 2006.- Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. *J. Pediatrics*, 149: 115 - 120.
- SHAH N. P., 1997.- Isolation and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products: A review. *Milchwissenschaft.*; 52, 2, 72 - 76.
- STAPPENBECK T. S., HOOPER L. V., GORDON J. I., 2002.- Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *PNAS*, 99: 15451 – 15455.
- TAMIME A. Y., MARSHALL V. M., ROBINSON R. K., 1995.- Microbiological and technological aspect of milks fermented by bifidobacteria. *J. Dairy Reseach*, 62, 1: 151 - 187.
- TURCHET P., LAURENZANO M., AUBOIRON S., ANTOINE J. M., 2003.- Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot study. *J. Nutr. Health Aging.*, 7, 2: 75 - 77.
- TURSI A., BRANDIMARTE G., GIORGETTI G. M. AND ELISEI W., 2006.- Mesalazine and/or *Lactobacillus casei* in Preventing Recurrence of Symptomatic Uncomplicated Diverticular Disease of the Colon: A Prospective, Randomized, Open-label Study. *J. Clinical Gastroenterol.*, 40, 4: 312 - 316.
- VENKATRAMAN A., RAMAKRISHNA B. S., PULIMOOD A. B., 2000.- Increased permeability in dextran sulphate colitis in rats: time course of development and effect of butyrate. *Scand. J. Gastroenterol.*, 35, 10: 1053 - 1059.
- WALIGORA-DUPRIET A. J., CAMPEOTTO F., NICOLIS I., BONET A., SOULAINES P., DUPONT C., BUTEL M. J., 2007.- Effect of oligo-fructose supplementation on gut microflora and well-being in young children attending a day care centre. *Intern. J. Food Microbiol.*, 113: 108 – 113.
- WANG Y. C., YU R. C., CHOU C. C., 2004.- Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soy-milk after drying, subsequent rehydration and storage. *Int. J. Food Microbiol.* 93: 209 –217.