الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ Dr. YAHIA FARES DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE

DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCEDES & ENVIRONNEMENT

MEMOIRE DE MASTER

En vue de l'obtention du Diplôme de

Master en Chimie

Option: Normes et contrôle de qualité

THEME

ETUDE DES EFFETS ANTIMICROBIENS DE KEFIR ET EVALUATION DE POTENTIEL PROBIOTIQUE DES LACTOBACILLES ISOLEES DE SES GRAINS

Encadré et dirigé par

Mr. ACHEK Rachid

Présenté par

Melle. HENTABLI Selma

Année universitaire 2015-2016

Remerciements

J'aimerais en premier lieu remercie mon dieu Allah qui m'a donné la volonté et le courage pour réaliser ce travail.

Je voudrai témoigner ma reconnaissance au Mr. ACHEK Rachid, pour avoir encadré ce travail. Je le remercie particulièrement pour sa rigueur scientifique, son exigence, sa disponibilité et ses encouragements, en nous faisant partager son expérience et ses connaissances scientifiques, durant la réalisation de ce mémoire, au sein du laboratoire de Microbiologie de l'Université de Médéa.

Cette aventure a été possible grâce à une personne que j'apprécie et que je respecte énormément : monsieur NABI Ibrahim. Je vous remercie chaleureusement pour votre confiance à mon égard, pour vos judicieux conseils ainsi que le temps et l'énergie que vous m'avez consacrés. Vous avez été un mentor extraordinaire.

Un remerciement particulier est adressé à Pr. OUMOUNA Mustapha Maître de Conférences à l'université de Médéa, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

Je tiens à remercier, Dr. REBOUH Samia, Maître de Conférences à l'université de Médéa, ait accepté de juger mon travail.

Je suis aussi très honoré que Mme HASSENI Mouna, Maitre assistante à l'université de Médéa, d'avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie vraiment Mlle METIDJI Fouzia pour ses judicieuses conseils, ses chaleureux encouragements et plus particulièrement pour sa patience durant la réalisation de ce travail.

.

Milles mercis aux :

Dr. RAHMANI Hamza pour son aide précieux et ses conseils.

Enseignants et membres du Laboratoire : Mme. Tifoura, Mr. Taihi et Mr. Bachene.

Mr. Skender, Mr. Nebat et Mr. Menacer pour leurs aides précieuses.

Dédicaces

*A ma **chère mère**, vous m'avez donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. Je tiens à vous dire merci, pour votre patience, vos encouragements et vos judicieux conseils.*

*A l'astre qui s'est éteint et qui continue toujours de m'éclaircir sur la voie, A **mon père** que je dédie cette réussite. Que Dieu, le tout-Puissant, l'accueil en son vaste paradis.*

Abstract

Kefir is a fermented drink prepared by the inoculation of kefir grains in milk or in sugar solutions. The aims of this study were to examine the microorganisms of kefir and its polysaccharide, determine its antimicrobial activity and evaluate the effects of kefir on an experimental infected wound. Initially, Lactic Acid Bacteria (LAB), strains isolated from the grains were purified and identified using API 50CHL test kits and evaluated as potential probiotics. Also, the antimicrobial activity of kefir cell-free supernatants fermented for 24h, 48h and 72h with different substrates and its polysaccharide were investigated against pathogenic microorganisms. Finally, 10 rabbits were used and divided into 2 groups, the experimental and the control group, a 1.5x1.5cm wound was inoculated with *staphylococcus aureus* on the dorsal back of each rabbit. After 24h post injury, only the experimental group was treated with kefir ointment. On days 4, 10, 14 and 21, rabbits were sacrificed and wound samples were collected for size measurements and histopathological studies. The results indicated that three lactobacillus strains were identified as *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis*, *lactobacillus paracasei* and *lactobacillus hilgardii* and were observed as potential probiotics. As for the antimicrobial activity, kefir supernatants and its polysaccharide showed some antimicrobial activity towards all microorganisms tested; the highest activity was against *staphylococcus aureus* with 53mm of inhibition zone, when 72h cell-free supernatant was used. Kefir significantly deceased the wound area to less than 0.31 cm^2 within 10 days, as the histological examination showed an acceleration in the inflammation phase and its rapid transition to the proliferative phase, during which enhanced wound contraction was observed.

Keywords: *kefir, lactobacillus, fermentation, probiotics, antimicrobial, wound healing.*

Résumé

Le kéfir est une boisson fermentée, préparé par l'inoculation de grains de kéfir dans le lait ou dans les solutions sucrées. Le but de cette étude était d'examiner les microorganismes de kéfir et son polysaccharide, déterminer son activité antimicrobienne et d'évaluer les effets du kéfir sur une plaie expérimentalement infectée. Initialement, les souches des bactéries lactiques isolées à partir des grains de kéfir ont été purifiée et identifiée par API 50 CHL, ces souches ont été évaluées comme probiotiques. En outre, l'activité antimicrobienne de surnageant acellulaires de kéfir fermenté pendant 24h, 48h et 72h avec des différents substrats et sa polysaccharide, ont été étudiés contre les microorganismes pathogènes. Enfin, 10 lapins ont été utilisés et regroupés en 2 groupes, le groupe expérimental et groupe de contrôle, une plaie de 1.5x1.5cm a été ensemencée par les *Staphylococcus aureus* sur la dorsale de chaque lapin. Après 24 h de la blessure, seulement le groupe expérimental a été traité avec la pommade de kéfir. Aux 4eme, 10eme, 14eme et au 21eme jour, les lapins ont été sacrifiés et les blessures ont été prélevées pour faire des études histopathologies. Les résultats indiquent que les trois souches de Lactobacillus identifiées comme *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis, Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus hilgardii* ont été observées comme potentiels de probiotiques. Concernant l'activité antimicrobienne, le surnageant de kéfir et sa polysaccharide ont montré une certaine activité antimicrobienne contre tous les microorganismes testés, la meilleure activité inhibitrice était contre *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 53mm lorsque le surnageant acellulaires de 72h a été utilisé. Les résultats ont montré que le kéfir a des propriétés cicatrisantes, car il a diminué la surface de la plaie à moins de 0,31 cm^2 dans seulement 10 jours, de plus l'examen histologique a montré une accélération dans la phase d'inflammation, une transition rapide à la phase prolifération, et une accélération de la guérison de la plaie.

Mots clés : *kéfir, lactobacillus, fermentation, probiotique, antimicrobien, cicatrisation.*

ملخص

الكفير هو مشروب مخمّر، يُحضّر بواسطة وضع حبوب الكفير في الحليب أو في محلول سكري. الهدف من هذه الدراسة هو دراسة مجموعة الكفير ومتعدد السكريات الموجود فيه، تحديد نشاطه المضاد للميكروبات ولتقييم آثار الكفير على الجرح المتعفن تجريبيا. في البداية، سلالات البكتيريا اللبنية المعزولة من حبوب الكفير تمّ تنقيتها وتحديدها من خلال الاختبارات API 50 CHL البيو كيميائية وتمّ تقييم هذه السلالات كمعينات حيوية. بالإضافة إلى ذلك، تم دراسة نشاط مضادات ميكروبات الطاف الخالية من الخلايا من الكفير المخمر مدة 24سا، 48سا و72سا مع مواد مخمرة مختلفة ومتعدد السكريات ضد الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض. وأخيرا، تم استخدام 10 أرانب وتنقسم إلى مجموعتين، المجموعة التجريبية والمجموعة الشاهد.تم وضع جرح 1.5*1.5 سم على الجزء الخلفي للظهر من كل أرنب وتم تلقيحه بالمكورات العنقودية. بعد 24 ساعة من الإصابة، المجموعة التجريبية فقط التي تم علاجها بمرهم الكفير. في اليوم 4، 10، 14، 21 بعد الإصابة تم تشريح الأرانب، وأخذت عينات من الجروح من أجل دراسات التشريح المرضي. النتائج أشارت إلى أن السلالات الثلاث للعصية اللبنية المعرفة ب *Lactobacillus paracasei Lactobacillus delbrueckii* و *Lactobacillus hilgardii* لوحظت كمعينات حيوية المحتملة. فيما يتعلق بنشاط مضادة الميكروبات، أظهر طاف من الكفير ومتعدد السكريات الموجود فيه بعض النشاط البكتيري ضد كل أنواع البكتيريا المختبرة، كان أفضل فاعلية ضد المكورات العنقودية الذهبية عندما استخدم طاف خالية من الخلايا 72سا حيث كان قرص التثبيط حوالي 53 ملم. أظهرت النتائج أن الكفير يملك خصائص التئام الجروح ويسارع في شفائها حيث اصبحت مساحة الجرح اقل من 0.31 سم^2 في 10 ايام فقط ، إضافة إلى أن الفحص النسيجي أظهر تسارع في مرحلة التهاب الجرح وانتقال سريع إلى المرحلة تجديد النسيج.

كلمات البحث : كفير. تخمر. البيكتيرية اللبنية. معين حيوي . ضد البكتيريا. التام الجروح

SOMMAIRE

1

SOMMAIRE vii
LISTE DES FIGURES xi
LISTE DES TABLEAUX xiii
LISTE DES ABREVIATIONS xiv
INTRODUCTION 2
1 Problématique 2
2 Les objectifs 3
3 Organisation de la thèse 3
RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE 6
1 Introduction 6
2 Généralités sur Kéfir 6
3 Grains de Kéfir 7
3.1 Structure des grains de kéfir 7
3.2 Microflore des grains de kéfir 8
3.2.1 Bactéries lactiques 10
3.2.2 Levures 10
3.3 Kefiran 12
3.4 Interactions entres les microorganismes de Kéfir 13
4 Contribution des différents groupes microbiens à la production des métabolites 14
4.1 Acidification du milieu par la production des acides organiques 14
4.2 Synthèse de composés aromatisants 14
4.3 Exopolysaccharides 15
5 Les propriétés fonctionnelles du Kéfir 16
5.1 Activité antimicrobienne de kéfir 17
5.2 Propriétés anti-cancérigènes et l'inhibition de la croissance tumorale 17
5.3 Améliorer la tolérance au lactose 18
5.4 Propriétés cicatrisantes 19

6 Les propriétés de kéfir comme un probiotique dans le tractus gastro-intestinal 19
7 Conclusion 21
PROCEDURE EXPERIMENTALE 23
1 Introduction 23
2 Matériels 23
2.1 Les équipements et les produits utilisés 23
2.2 Provenance des Grains de Kéfir 25
2.3 Souches indicatrices 25
3 Méthodes 26
3.1 Fermentation de Kéfir 26
3.1.1 Préparation des solutions acellulaires et la mesure de pH 26
3.2 Isolement, purification et identification des microorganismes 26
3.2.1 Isolement et culture des microorganismes 27
3.2.2 Purification des bactéries lactiques 27
3.2.3 Identification des isolates 27
3.3 Extraction de Kefiran 31
3.4 Propriétés probiotiques des bactéries lactiques isolées 31
3.4.1 Résistance à pH acide 31
3.4.2 La tolérance aux sels biliaires 32
3.5 L'activité antimicrobienne 32
3.6 Etude in vivo de l'activité antimicrobienne de Kéfir 33
3.6.1 Préparation de la pommade de Kéfir 33
3.6.2 Les animaux 33
3.6.3 Induction de plaie 34
3.6.4 Le protocole de traitement 35
3.6.5 évaluation d'état de cicatrisation 35
3.6.6 Etudes histologiques 35
RESULTATS ET DISCUSSION 39
1 Résultats de mesure de pH pendant la fermentation 39
2 Identification des isolates 41
2.1 Pré-identification des levures 41

2.2 Identification des bactéries lactiques 42
3 Résultat d'extraction de Kefiran 49
4 Les propriétés probiotiques des bactéries lactiques 50
4.1 Résultats de résistance au stress acide 50
4.2 Tolérance contre la bile 53
5 Activité antimicrobienne de kéfir et de kefiran 55
6 L'évaluation *in vivo* de l'application de kéfir sur les plaies infectées 60
6.1 Evaluation de l'état de la cicatrisation 61
6.2 L'étude Histologique 65
CHAPITRE 5 75
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 75
1 Conclusions 75
2 Perspectives 76
BIBELIOGRAPHIE 78
Annexe A 87
Annexe B 90
Annexe C 91
Annexe D 93

LISTE DES FIGURES

Figure 2. 1 Les grains de kéfir de lait et les grains de kéfir d'eau. (Botelho et al., 2014)**Error! Bookmark not defined.**
Figure 2. 2 observation des microorganismes dans les grains de kéfir par microscope électronique A, C, E: la portion périphérique du grain, B, D, F: la portion centrale du grain. Flèches - Micrographie A: cocci; Micrographie D: fibrillar material - kefiran polysac 9
Figure 2. 3 Structure de Kefiran (Sako et al., 1999)..... 12
Figure 2. 4 Structure de Kefiran (Sako et al., 1999)..... 13
Figure 2. 5 Schéma représente les propriétés fonctionnelles du kéfir. 16
Figure 2. 6 Diagramme représente les effets de probiotiques sur le métabolisme et la santé (Farnworth, 2006)..... 20
Figure 3. 1 les grains de kéfir utilisé. (a) grains kéfir de lait. (b) grains kéfir de l'eau……25
Figure 3. 2 (a) et (b) galerie API 50 CHL. (biomerieux-tutorial 2009)..... 30
Figure 3. 3 préparation de pommade de kéfir. 33
Figure 3. 4 les animaux utilisés dans cette étude. 34
Figure 3. 5 induction de plaie. (a) préparation de la zone, (b) and (c) incision de plaie. (d) mesure de la plaie(e) inoculation de S. aureus sur la plaie. 34
Figure 4. 1 changement de pH pendant les fermentations……40
Figure 4. 2 Observation macroscopique des levures sur gélose Sabouraud..... 41
Figure 4. 3 Observation microscopique des levures après la coloration de bleu méthylène... 42
Figure 4. 4 (a). Aspect des colonies des bactéries lactiques sur MRS solide. (b). Culture dans milieu MRS liquide. 42
Figure 4. 5 Observation microscopique des bactéries lactiques après la coloration de Gram. 43
Figure 4. 6 Production du gaz à partir du glucose. 43
Figure 4. 7 Résultat de la fermentation de lactose sur gélose BCP. 44
Figure 4. 8 Résultats du test de fermentation des hydrates de carbone sur galerie API 50 CHL (a). Résultats du Fermentation de Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis, (M1 and M3) (b) Résultats du Fermentation de lactobacillus paracasei (M2) (c) Résultats du Fermentation de lactobacillus hilgardii (W1, W2 and W3). 46
Figure 4. 9 Résultats du test de fermentation des hydrates de carbone sur galerie API 50 CHL (a). Résultats du Fermentation de Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis, (M1 and M3) (b) Résultats du Fermentation de lactobacillus paracasei (M2) (c) Résultats du Fermentation de lactobacillus hilgardii (W1, W2 and W3). 47
Figure 4. 10 (A.B) Résultat d'extraction de kéfiran à partir des grains de kéfir d'eau. (C.D) Résultat d'extraction de kéfiran à partir des grains de kéfir de lait. 49
Figure 4. 11 (A,C) la précipitation de kéfiran dans l'éthanol après 24h (B,D) kéfiran dissous dans l'eau distillée chaude. 49
Figure 4. 12 Tolérance des souches au pH 2.5 en fonction du temps. 51
Figure 4. 13 Taux de survie des souches Lactobacillus dans 0.3% bile et à pH 2.5. 52

Figure 4. 14 Tolérance des souches au 0.3% bile en fonction du temps. 54
Figure 4. 15 Activités antimicrobiennes de surnageants de Kéfir de lait inoculés dans le lait pendant 24, 48 et 72 heures. 57
Figure 4. 16 Activités antimicrobiennes de surnageants de Kefir d'eau inoculés dans le sucre brun pendant 24, 48 et 72 heures. L'activité antimicrobienne de l'amoxicilline (Ox1) sur les bactéries et clotrimazole (C) sur C. albicans. 57
Figure 4. 17 Activités antimicrobiennes de surnageants de Kefir d'eau inoculés dans mélasse pendant 24, 48 et 72 heures. 58
Figure 4. 18 Activités antimicrobiennes de Kefiran de lait, Kefiran de sucre et Amoxicillin (AMC) sur les bactéries. 58
Figure 4. 19 Résultats d'observation des plaies chez le groupe traité avec le kefir et le groupe non-traité. 63
Figure 4. 20 L'activité de guérison de kéfir sur les plaies infectées chez les lapins. Les données dans ce graphe représentent les animaux non traités (contrôle négatif) et les animaux traités par le kéfir. 64
Figure 4. 21 Le pourcentage de guérison de kéfir sur les plaies infectées chez les lapins. Les données dans ce graphe représentent les animaux non traités (contrôle négatif) et les animaux traités par le kéfir. 64
Figure 4. 22 Coupe histologique d'une partie de peau normale saine. E: Epiderme. GS: Gland sudoripare. TC: Tissu conjonctif. FP : Follicules pileux. F : Fibroblaste VC : Vaisseau capillaire. FM : Faisceau musculaire. 65
Figure 4. 24 Coupe histologique de plaie de groupe traité après 4 jours. Re : Re-épithélisation. RU : Revêtement ulcérée cutanée. CI : Cellules inflammatoires, H : Histiocytes. 66
Figure 4. 23 Coupe histologique de plaie de groupe non-traité après 4 jours. RU: Revêtement ulcérée. CI : Cellules inflammatoires 66
Figure 4. 25 Coupe histologique de plaie de groupe non-traité après 10 jours. F-inf : Foyer inflammatoire. CI : Cellules inflammatoires, P : Plasmocyte. 68
Figure 4. 26 Coupe histologique de plaie de groupe traité après 10 jours. Re : Re-épithilisation. F : Fibroblastes. CF : Collagène fibrillaire. VS : vaisseau sanguin. MF : Myofibroblaste. T : Tissu de granulation 68
Figure 4. 27 Coupe histologique de plaie de groupe non-traité après 14 jours. F-inf : Foyer inflammatoire. CI : Cellules inflammatoires, Fb : Fibrose 70
Figure 4. 28 Coupe histologique de plaie de groupe traité après 14 jours. K : kératinocytes. FP : Follicules pileux. F: Fibroblastes. TG : Tissue de granulation. Fé : Faisceaux élstiques. Fb : Fibrose 70
Figure 4. 29 Coupe histologique de plaie de groupe non-traité après 21 jours. F-inf : Foyer inflammatoire. CI : Cellules inflammatoire. BF : Bande fibreuse. CF : Collagène fibrillaire. 72
Figure 4. 30 Coupe histologique de plaie de groupe traité après 21 jours. E: Epiderme. FP : Follicules pileux. F: Fibroblastes. TC : Tissue conjonctif. Fb : Fibrose 72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2. 1 Microbiota de grains de kéfir. (Simova, 2002) 10

Tableau 3. 1 les produits utilisés. 24
Tableau 3. 2 Les souches microbiennes utilisées 25

Tableau 4. 1 Résultats des tests de l'identification du genre. 44
Tableau 4. 2 L'utilisation des hydrates de carbone par les souches dans une API 50 CHL. .. 45
Tableau 4. 3 les résultats d'activité antimicrobienne de kefiran et les surnageants de kéfir .. 56

LIST DES ABREVIATIONS

% : pour cent.
°C : degré Celsius.
ATCC: American Type Culture Collection
B.subtilis : *Bacillus subtilis*
C.albicans *: Candida albicans*
cm : centimètre.
DO: densité optique.
E.coli*: Escherichia coli*
Ec : Enzyme Commission numbers
g : gramme.
GRAS : Generally Recognized as Safe
h: heure
kg : kilogramme.
kDa: kilo Dalton
LAB :les bactéries lactiques
Lb. : *Lactobacillus*
mg : milligramme.
min : minute
ml : millilitre
mm : millimètre
MRS : milieu de Man, Rogosa and Sharpe (1960)
N : normalité
p : page
P.aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*
pH : potentiel d'hydrogène.
rpm : tours par minute
S. aureus *: Staphylococcus aureus*
Subsp : sous espèce
s : second.
t : temps
UFC : unité formant colonie

Chapitre 1

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1 Problématique

La résistance bactérienne aux agents antimicrobiens apparaît de nos jours comme une des préoccupations majeures de santé publique. Les bactéries pathogènes sont à l'origine de diverses pathologies et intoxication alimentaires. L'émergence et la dissémination de souches bactériennes résistantes résultent de l'usage anarchique et abusif des antibiotiques (Gan, 2002).

Les bactéries de Gram positives telles que *Staphylococcus aureus* sont les causes majeures des infections nosocomiales, elle présente de 10% d'infections grave. Cette bactérie est également responsable de syndrome de choc toxique, l'endocardite, d'ostéomyélite ou de l'intoxication alimentaire (Laughton, 2006). De plus, les bactéries de Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa* est couramment liés aux infections nasales et représente l'une des principales causes de mortalité due à brûler les infections des plaies (Stover, 2000). Malheureusement, ces bactéries et beaucoup d'autres micro-organismes ont développé une résistance aux divers antibiotiques utilisés ans le traitement des infections graves (Laughton, 2006). (Liu, 2011) a indiqué que 64% des infections nosocomiales étaient associés avec *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), et seulement 17 % des patients infectés par MRSA ont reçu un traitement efficace.

Cette situation a forcé les chercheurs à explorer des nouvelles substances antimicrobiennes provenant de diverse source comme des nouveaux agents antimicrobiens. Les récents rapports ont décrit le rôle des probiotiques dans la prévention et le traitement de nombreuses infections (Farnsworth, 2008) . Parmi les plus anciens probiotiques utilises pendant des siècles et des décennies et fait l'objet de plusieurs études de caractérisations et valorisations,

le kéfir. Le kéfir est une boisson probiotique provenaient des montagnes caucasiennes, composé d'un mélange de bactéries et de levures (Angulo, 1993). L'utilisation de kéfir dans le traitement et la prévention contre les maladies, en particulier contre les infections bactériennes, a donné de nombreux résultats positifs (Vescovo, 2006; Rodrigues, 2005; Santos, 2003; Silva, 2009)

2 Les objectifs

Ce travail consiste principalement à étudier l'activité antimicrobienne des surnageant de kéfir et sa polysaccharide vis-à-vis des souches pathogènes, le travail consiste à :

- L'isolement et détermination de la présence des levures et les bactéries lactiques dans les grains de kéfir.
- La purification et l'identification phénotypique des souches lactiques.
- L'extraction de kéfiran ; le polysaccharide de kéfir.
- L'étude des potentiels probiotiques des bactéries lactiques isolées du kéfir.
- L'étude l'activité antibactérienne des surnageants de kéfir et kéfiran vis-à-vis les souches pathogènes.
- Détermination et évaluation *in vivo* de l'activité antimicrobienne et cicatrisante de kéfir.

3 Organisation de la thèse

Notre manuscrit est structuré en cinq parties, le premier est consacré à une introduction générale. La seconde partie est une synthèse bibliographique présente un aperçu sur le kéfir, la diversité des micro-organismes dans ce produit fermenté, l'importance des métabolites produits par les micro-organismes dans les grains de kéfir, et finalement les propriétés probiotiques de kéfir et leurs effets sur la santé de l'être humain.

La troisième partie du manuscrit présente le matériel et les méthodes mis en œuvre dans le cadre de la réalisation de ce travail. Les résultats obtenus au cours de cette étude sont ensuite exposés dans la quatrième partie et sont discutés. Finalement, la dernière partie est une conclusion générale permet de récapituler les principaux résultats de ce travail avec une présentation des principales perspectives.

Chapitre 2

CHAPITRE 2

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

1 Introduction

Au cours des dernières années, les études se sont intéressées sur les produits contenant les microorganismes probiotiques et substances organiques fonctionnels. Ce contexte présent l'utilisation de kéfir, sa composition microbiologique, l'activité biologique de la microflore du kéfir, l'importance de kefiran et finalement il décrit les propriétés et avantages de kéfir sur la santé humaine.

2 Généralités sur Kéfir

Le kéfir est une culture naturelle mixte utilisé depuis des siècles dans l'Europe de l'Est exactement les montagnes du Caucase de la Russie, obtenue par la fermentation alcoolique et lactique (Assadi, 2000; Yaman, 2006). Le kéfir se distingue des autres boissons fermentées ceux que ce n'est pas le résultat de l'activité métabolique d'une seule espèce, mais il est fabriqué à partir de grains de kéfir, ces grains sont inoculés dans le lait ou 'autre solutions sucrées et la fermentation se fait dans une température ambiante pendant un ou deux jours. (Farnworth, 2006).

La préparation de ce boisson qui peut être faite avec du jus de fruits, de la mélasse, le sucre, et tout type de lait, tels que la vache, de chèvre, brebis, chameaux, buffles, lait de soja (Botelho, 2014), même du lait de noix de coco (Angulo, 1993). Donc, les deux boissons fermentées sont diffèrent les uns des autres (Garrote, 2001). Historiquement, le kéfir a été

consommé depuis des siècles. La manière avec laquelle les grains de kéfir ont été formés c'est commencée par la conservation du lait en sacs de peau. Ces derniers ont abouti à la production de premier grain de kéfir. Bien que le kéfir de lait partage certaines de ses propriétés organoleptiques avec le kéfir d'eau, il existe quelques différences importantes. Le kéfir d'eau n'est pas aussi crémeux que le lait le kéfir, il est effervescent, en raison de la teneur en dioxyde de carbone, et il est légèrement alcoolisées (Angulo, 1993; Farnworth, 2006).

Le mot kéfir vient d'une langue du Caucase, où on le boit depuis au moins la haute Antiquité. Selon une autre version, ce mot viendrait du turc « keif », signifiant « qui donne du plaisir » (Santos, 2003). Le kéfir est connu bien au-delà des frontières soviétiques, comme en témoigne la provenance des grains utilisés dans les études publiées. Ces grains ont en effet été collectés auprès de particuliers habitant des pays aussi divers que l'Afrique du Sud (Sarkar, 2008). Taiwan (Abraham, 1999), l'Argentine (Garrote, 2001), le Portugal (Cebra, 1999), l'Espagne (Angulo, 1993), la France (Stover, 2000) et la Belgique (Botelho, 2014).

3 Grains de Kéfir

3.1 Structure des grains de kéfir

Dans le lait, les grains sont décrits comme étant : blanchâtres et gonflante, ce sont des masses gélatineuses, (Kosikowski, 1997), irrégulières, de taille variable, homogène ou hétérogène (figure2.1). Les grains de Bottazzi Bianchi (1980) ont 2 à 3 mm de diamètre tandis que ceux de Abraham & De Antoni (1999) ont un diamètre compris entre 1 et 40 mm, sont lobées, insolubles dans l'eau et dans la plupart des solvants (Kosikowski, 1997; Angulo, 1993). Le kéfir dit sucrer, ou les grains de kéfir d'eau sont de 0,1 à 2 cm de petites masses (figure2.1), élastiques, translucides, transparent, en forme de glace composées de bactéries lactiques et de levures (Horisberger, 1969).

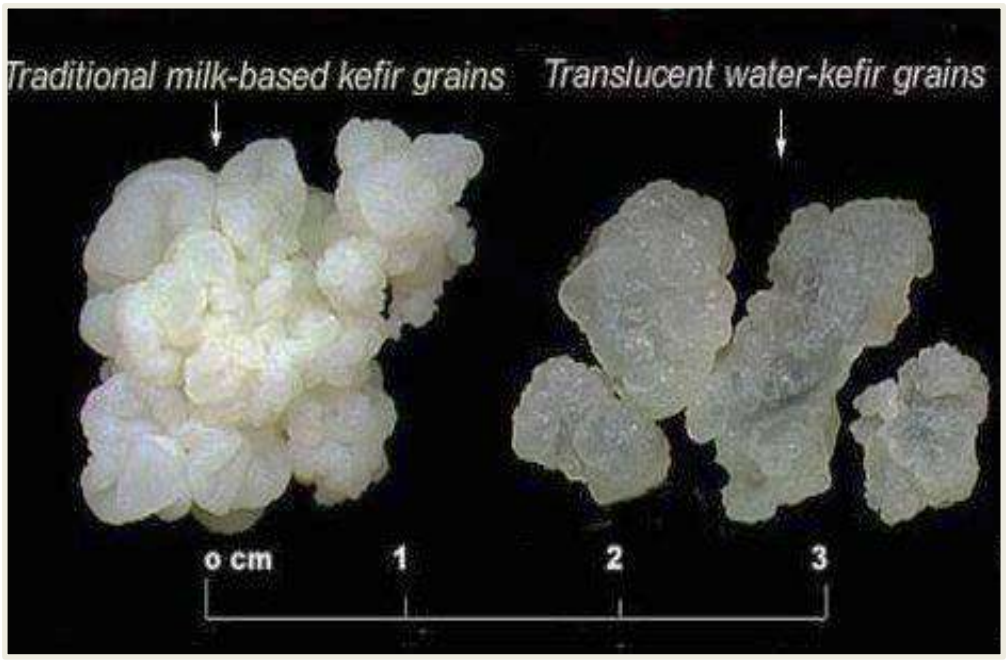


Figure 2. 1 Les grains de kéfir de lait et les grains de kéfir d'eau. (Botelho et al., 2014)

D'après (Farnworth, 2006; Garrote, 2001), la composition de grains dépend selon l'origine, mais ils sont principalement composées par (90%) d'eau, (3%) protéines, (0,3 %) lipides, (6 %) de glucides et (0.7%) cendres.

3.2 Microflore des grains de kéfir

Selon (Witthuhn, 2005), il y a une association symbiotique de micro-organismes dans les grains de kéfir, qui appartenant à un large spectre d'espèces et de genres, y compris les bactéries lactiques, les levures et les bactéries d'acide acétique. Les études publiées sur la composition microbienne de grains de kéfir mettent en lumière une microflore complexe,

souvent composée de plusieurs espèces de bactéries lactiques et de levures, parfois associées à d'autres micro-organismes.

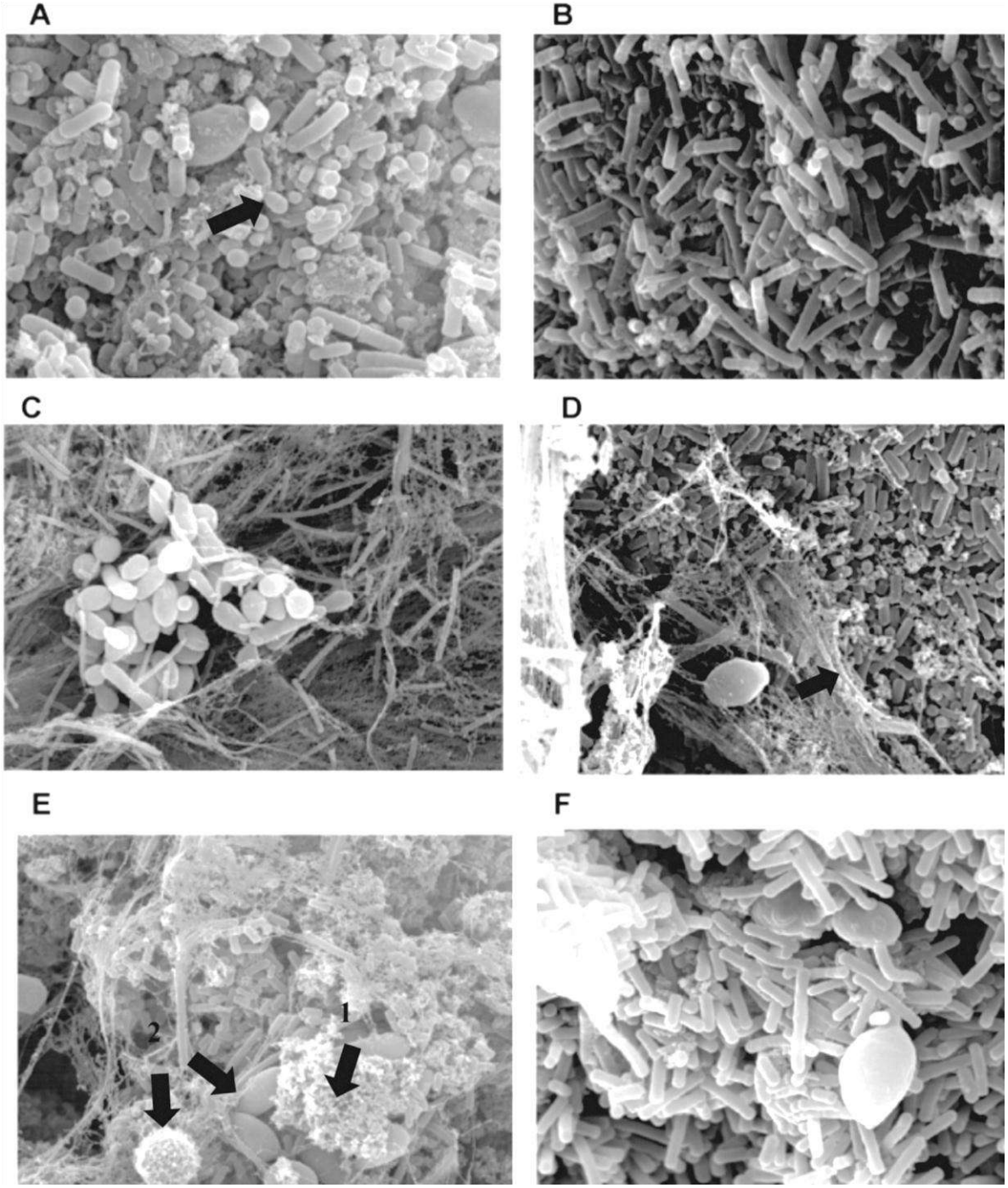


Figure 2. 2 observation des microorganismes dans les grains de kéfir par microscope électronique A, C, E: la portion périphérique du grain, B, D, F: la portion centrale du grain. Flèches - Micrographie A: cocci; Micrographie D: fibrillar material - kefiran polysaccharide

3.2.1 Bactéries lactiques

Parmi les bactéries lactiques, la majorité des espèces appartient au genre Lactobacillus. Elle inclut des espèces hétérofermentaires : *Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. gallinarum*, *Lb. gasseri*, *Lb. helveticus*, *Lb. kefiranofaciens* ; et des espèces homofermentaires: *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. fermentum*, *Lb. kefiri*, *Lb. paracasei*, *Lb. parakefiri*, *Lb. plantarum* et *Lb. rhamnosus.* Les autres bactéries lactiques, représentées dans une moindre diversité d'espèces que les lactobacilles, appartiennent aux genres homofermentaires Lactococcus *(L. lactis), Pediococcus* et Streptococcus *(St. thermophilus*) ainsi qu'aux genres hétérofermentaires Leuconostoc (*Ln. mesenteroides et Ln. lactis)* et Weissella (*W. viridescens*) (tableau2.1).

3.2.2 Levures

Les levures isolées à partir des grains comprennent de nombreuses espèces incapables de fermenter le lactose : *Candida friedrichii*, *Candida inconspicua*, *Candida maris*, *Candida tenuis*, *Kazachstania exigua*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Torasporula delbrueckii*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces* sp., et seulement deux espèces capables de fermenter le lactose : *Kluyveromyces lactis* et *Kluyveromyces marxianus* (tableau2.1)

Tableau 2. 1 Microbiota de grains de kéfir. (Simova, 2002)

	Microorganisme	Reference*
1	***Acetobacter fabarum***	Gao i sur. 2012
2	***Acetobacter lovaniensis***	Unsal, 2008
3	***Acetobacter syzygii***	Unsal, 2008
4	***Acinetobacter***	Gao i sur., 2013
5	***Bifidobacterium spp***	Leite i sur., 2012
6	***Candida inconspicua***	Simova i sur., 2002
7	***Dysgonomonas***	Gao i sur., 2013
8	***Enterococcus faecium***	Unsal, 2008
9	***Geotrichum candidum***	Timara, 2010
10	***Gluconobacter japonicus***	Miguel i sur., 2012
11	***Halococcus spp.***	Leite i sur., 2012
12	***Kazachstania aerobia***	Magalhães i sur., 2011
13	***Kazachstania exigua***	Zhou i sur., 2009

14	***Kazachstania unispora***	Zhou i sur., 2009
15	***Kluyveromyces lactis***	Zhou i sur., 2009
16	***Kluyveromyces marxianus***	Zhou i sur., 2009
17	***Kluyveromyces marxianus* var. *lactis***	Simova i sur., 2002
18	***Lachancea meyersii***	Magalhães i sur., 2011
19	***Lactobacillus amylovorus***	Leite i sur., 2012
20	***Lactobacillus brevis***	Simova i sur., 2002
21	***Lactobacillus buchneri***	Leite i sur., 2012
22	***Lactobacillus casei***	Zhou i sur., 2009
23	***Lactobacillus paracasei***	Magalhães i sur., 2011
24	***Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum***	Simova i sur., 2002
25	***Lactobacillus crispatus***	Leite i sur., 2012
26	***Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus***	Simova i sur., 2002
27	***Lactobacillus helveticus***	Unsal, 2008
28	***Lactobacillus kefiranofaciens***	Unsal, 2008
29	***Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens***	Leite i sur., 2012
30	***Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum***	Leite i sur., 2012
31	***Lactobacillus kefiri***	Unsal, 2008
32	***Lactobacillus parabuchneri***	Magalhães i sur., 2011
33	***Lactobacillus parakefiri***	Leite i sur., 2012
34	***Lactobacillus plantarum***	Gao i sur., 2012
35	***Lactobacillus satsumensis***	Miguel i sur., 2012
36	***Lactobacillus uvarum***	Miguel i sur., 2012
37	***Lactococcus lactis* subsp. *cremoris***	Zhou i sur., 2009
38	***Lactococcus lactis* subsp. *lactis***	Unsal, 2008
39	***Leuconostoc lactis***	Gao i sur., 2012
40	***Leuconostoc mesenteroides***	Unsal, 2008
41	***Pelomonas***	Gao i sur., 2013
42	***Pichia fermentans***	Wang i sur., 2008
43	***Pichia guilliermondii***	Gao i sur., 2012
44	***Pichia kudriavzevii***	Gao i sur., 2012
45	***Pseudomonas putida***	Zhou i sur., 2009
46	***Saccharomyces cerevisiae***	Zhou i sur., 2009

47	***Saccharomyces martiniae***	Zhou i sur., 2009
48	***Saccharomyces turicensis***	Wang i sur., 2008
49	***Saccharomyces unisporus***	Zhou i sur., 2009
50	***Shewanella***	Gao i sur., 2013
51	***Streptococcus thermophilus***	Simova i sur., 2002
52	***Weissella***	Gao i sur., 2013

Molska et al. (1980) relèvent de ces observations microscopiques une absence d'agencement structuré entre les bactéries et les levures. Tous s'accordent à dire que les bactéries et les levures sont inégalement réparties dans le grain. Toutefois, tandis que certains observent une plus grande concentration de levures à la surface du grain et une plus grande concentration de bactéries à l'intérieur du grain (Güzel-Seydim, 2000; Mukai, 1991), d'autres observent le contraire (Botelho, 2014; Ryan, 1996). Rea et al. (1996) confirment cette différence de répartition entre grains et précisent qu'elle existe aussi au sein d'un même grain : qu'elle soit effectuée à la surface ou au cœur du grain, la répartition de ces micro-organismes varie en fonction de la coupe examinée. Lorsqu'elles sont observables, les bactéries en forme de coque ont toutefois toujours été localisées à la surface du grain (Angulo, 1993; Güzel-Seydim, 2000).

3.3 Kefiran

La matrice des grains de kéfir contient un polysaccharide spécifique, jamais isolé d'un autre substrat, et nommé pour cette raison kéfirane. (Ruas-Madiedo, 2002) estiment que le kéfirane constitue près de la moitié de la substance cohésive des grains.

Le kéfirane est un polysaccharide soluble dans l'eau qui a la particularité de gélifier en présence d'alcool (Mukai, 1991). Les deux kefiran isolés des grains sont similaires (Aslim, 2005). Il se caractérise par une répartition binaire ou uniforme en chromatographie, correspondant à des composants de poids moléculaire d'environ 1.10^6 ou 4.10^6 daltons selon la source, Yokoi et al. (1990) ou Piermaria et al. (2008) respectivement. D'après Kooiman (1968), le kéfirane est composé de quantités équimolaires de D-glucose et de D-galactose agencés en un réseau d'unités de six sucres (figure2.3).

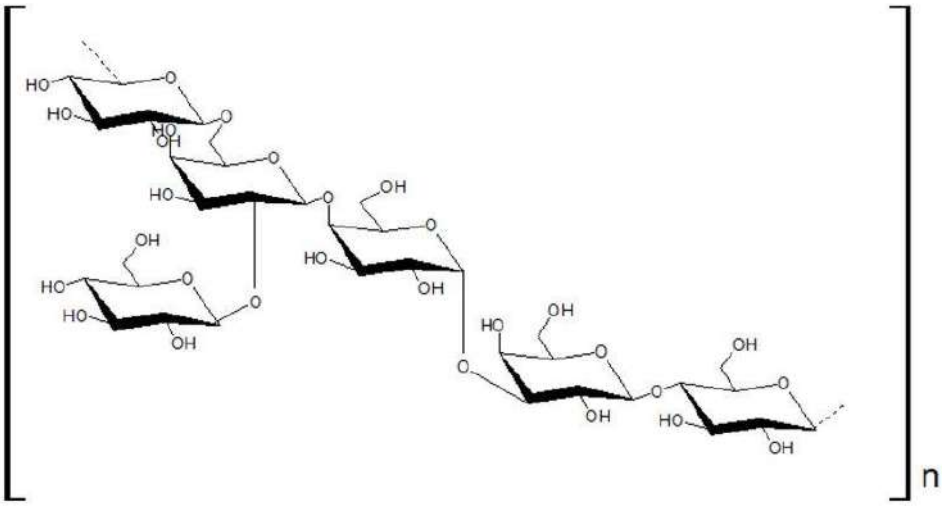


Figure 2. 4 Structure de Kefiran (Sako et al., 1999).

3.4 Interactions entres les microorganismes de Kéfir

Le kéfir représente une association typique de groupes microbiens ayant des demandes différentes pour les facteurs de croissance. Plusieurs relations particulières de dépendance ont été mises en évidence.

Les lactobacilles et les levures sont étroitement liés à bénéfices réciproques. Les levures produisent probablement des facteurs de croissance qui paraissent indispensables pour la synthèse d'un polysaccharide bactérien participant à la structure du grain. Ainsi, elles interviennent dans le processus de la formation d'un nouveau grain. Par exemple, *Lactobacillus brevis*, qui produit du polysaccharide en présence d'extrait de levure, ne se développe dans du lait non supplémenté qu'en présence de *Saccharomyces delbrueckii*, levure isolée du kéfir (Assadi, 2000).

(Angulo, 1993), rapporte que les relations établies entre les microorganismes du kéfir sont responsables de certaines propriétés d'intérêt industriel. Ces microorganismes ne répondent pas aux variations saisonnières de la qualité du lait (Abraham, 1999), ni à la présence d'antibiotiques et d'autres inhibiteurs (présents d'habitude en quantités détectables) et ils résistent aux bactériophages. Cependant, les deux derniers caractères ne sont pas cités par d'autres auteurs.

4 Contribution des différents groupes microbiens à la production des métabolites

4.1 Acidification du milieu par la production des acides organiques

L'activité des bactéries lactiques conduit principalement à l'acidification du milieu. Les bactéries lactiques se caractérisent en effet par la propriété de produire de l'acide organique à partir de sucre dans la solution sucré, et à partir de lactose disponible dans le lait (Angulo, 1993).

Les espèces homofermentaires ont un plus grand pouvoir acidifiant que les espèces hétérofermentaires. Elles fermentent les sucres presque exclusivement en acide lactique tandis que les espèces hétérofermentaires les fermentent en deux produits terminaux : l'acide lactique et l'acide acétique ou l'éthanol. Pour être complet, signalons que cette fermentation "hétérolactique" s'accompagne d'un dégagement de CO_2.

Dans le lait et à température ambiante, les lactocoques se développent rapidement et produisent rapidement de l'acide lactique. Ainsi, dans ces conditions, ils en produisent environ 8 $g.l^{-1}$ et abaissent le pH à environ 4,6 en 15 à 20 heures (Teuber, 1995). Leur croissance est ensuite inhibée par l'acidité ambiante.

Dans les mêmes conditions, *Lactobacillus casei*, un lactobacille homofermentaire dans les grains de kéfir d'eau, en produit 10 $g.l^{-1}$ seulement en 24 heures (Assadi. 2000). Toutefois, lors de la fermentation du kéfir de l'eau, son développement est stimulé par l'acidification résultant de l'activité des lactocoques. Les lactobacilles sont en effet acidophiles ; le pH auquel ils se développent le mieux se situe entre 4,0 et 4,5 (Rozier, 1985). Par ailleurs, leur croissance peut aussi être stimulée par la présence de levures (Gueguen & Schmidt, 1992).

4.2 Synthèse de composés aromatisants

Les bactéries lactiques produisent également des molécules participant à l'arôme du kéfir : acétaldéhyde, acétoïne, diacétyle et butanediol.

L'acétaldéhyde est un métabolite intermédiaire de la fermentation "hétérolactique" du sucre lactose. Il est normalement réduit en éthanol chez les bactéries lactiques mésophiles mais peut être excrété comme produit final par certaines bactéries thermophiles dépourvues d'alcooldéhydrogénase. C'est le cas pour *Streptococcus thermophilus* que l'on retrouve parfois dans les grains de kéfir d'eau.

L'acétoïne, le diacétyle et le butanediol sont parfois produits à la place de l'acide lactique dans le métabolisme des sucres mais leur principal précurseur est l'acide citrique.

De nombreuses bactéries lactiques sont capables de dégrader l'acide citrique du lait en acide acétique, en CO_2 et, pour certaines d'entre-elles, en acide formique ou en composés aromatisants : acétoïne, diacétyle et butanediol. La plupart des leuconostocs "laitiers" et un biovar de Lactococcus lactis fermentent l'acide citrique par cette dernière voie. Dans le kéfir, les composés aromatisants qui en sont issus sont attribués à l'activité des leuconostocs (Koroleva, *et al* 1988 ; Rea *et al* 1996).

4.3 Exopolysaccharides

Les agents texturants d'origine microbienne sont des polysaccharides de poids moléculaire élevé appelés exopolysaccharides en référence au fait qu'ils sont exocellulaires, c'est-à-dire sécrétés dans le milieu. La synthèse d'exopolysaccharide est un métabolisme répandu chez les bactéries et rare chez les levures(Assadi, 2000).

Les lactobacilles *Lactobacillus kefiranofacienssubsp. kefiranofaciens* et *Lb. brevis* sont à l'origine de la synthèse de kéfirane, l'exopolysaccharide typique du kéfir, ces deux lactobacillus sont trouvées dans les grains de kéfir de lait et les grains de kéfir d'eau (Aslim, 2005).

D'autres micro-organismes du kéfir sont toutefois susceptibles de produire des exopolysaccharides et de contribuer à sa texture. Les souches productrices d'exopolysaccharides concernent plusieurs espèces qui peuvent figurer parmi le consortium microbien de grains de kéfir : *Leuconostocmesenteroides, Streptococcus thermophilus, Lactococcuslactissubsp. cremoris, Lactobacillus acidophilus, Lb. delbrueckiisubsp. bulgaricus, Lb. helveticus, Lb. paracasei*et *Lb. rhamnosus*(Mukai, 1991).

Les bactéries lactiques mésophiles, comme la plupart de celles rencontrées dans le kéfir, produisent généralement un maximum d'exopolysaccharides en conditions sub-létales ; le taux de production d'exopolysaccharide est alors indépendant de la croissance bactérienne (Garrote, 2001). Les exopolysaccharides produits par les différents micro-organismes ont des pouvoirs texturant variables qui dépendent notamment de leur composition et de leur masse moléculaire (Laws& Marshall, 2001).

5 Les propriétés fonctionnelles du Kéfir

Les propriétés fonctionnelles du kéfir sont discutées en détail ci-dessous dans le schéma présent dans la figure2.4.

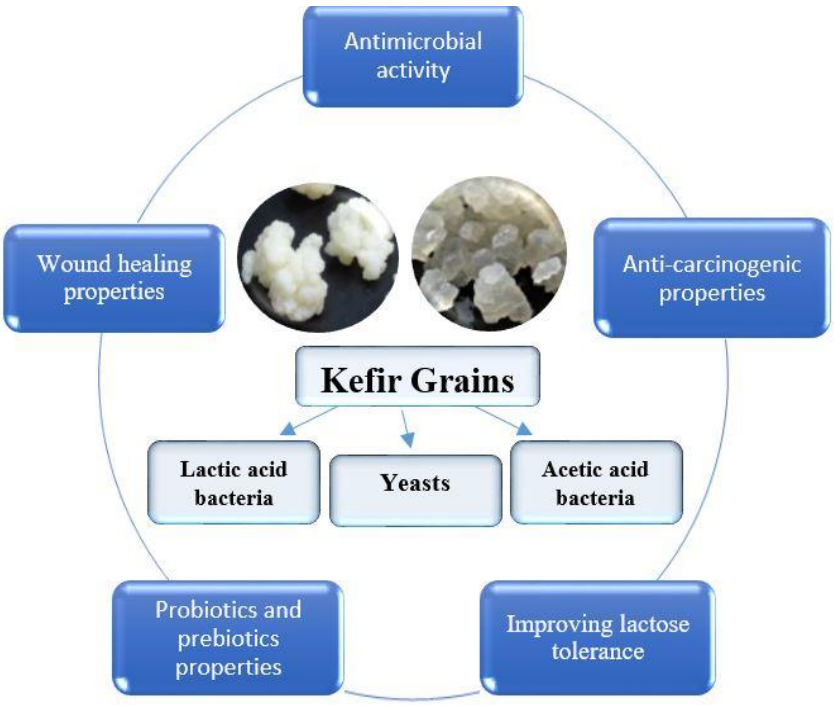


Figure 2. 5 Schéma représente les propriétés fonctionnelles du kéfir.

5.1 Activité antimicrobienne de kéfir

Kéfir a un effet antibactérien contre nombreux organismes pathogènes en raison de la formation d'acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, de l'acétaldéhyde, le dioxyde de carbone, et les bactériocines. Par exemple, 3,5 kDa bactériocine a été identifié à partir de *Lactobacillus plantarum ST8KF* dans le kéfir (Gan, 2002). En outre, le peroxyde d'hydrogène est un autre métabolite produit par certaines bactéries comme un composé antimicrobien. (Yuksekdag et al. 2004) a montré que tous les 21 isolats de bactéries d'acide lactique à partir de de kéfir produisent de peroxyde d'hydrogène. Toutes les souches de lactocoques avaient inhibé totalement la croissance de *S. aureus* donc c'est également la plus sensible, par contre les souches de *Escherichia coli et Pseudomonas aeruginosa* ont été moins sensibles.

En outre, Santos et al. (2003) a déclaré que la bactériocine nommé lacticin 3147, qui a été produit *par Lactococcus lactis 3147* isolé de grains de kéfir, avait une activité antimicrobienne contre *Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, S. enteritidis, S. flexneri,* et *Yersinia enterocolitica*. De plus, Ahmed et al. (2011) a signalé que la suspension de kéfir, kefiran, et ces grains ont montré une activité antibactérienne contre certaines espèces de bactéries unicellulaires et une nouvelle activité antifongique contre les champignons filamenteux

D'autre scientifiques tel (Rodrigues, 2005; Aslim, 2005) ont déclaré que le kéfir et ses exopolysaccharides, kefiran, avaient des activités antimicrobiennes et une activité antibiotique notable contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives ainsi que les levures comme *Candida albicans.* (Cebra, 1999) a également suggéré que le kéfir peut être un bon agent antimicrobien dans la technologie alimentaire pour la sécurité alimentaire.

5.2 Propriétés anti-cancérigènes et l'inhibition de la croissance tumorale

(Liu et al. 2006) a étudié les effets du kéfir, produit à partir de lait de soja et de vache avec les grains de kéfir, sur la croissance des tumeurs chez les souris. Les souris ont été soumises à une injection de cellules cancéreuses avant une semaine de début de l'expérience, La croissance de la tumeur (volume) a été estimée jusqu'à 30 jours. À la fois le kéfir du lait de soja (70,9 %) et le kéfir du lait de vache (64,8 %) a inhibé la croissance tumorale, en comparant avec des souris de groupe contrôle positif.

Le travail expérimental de (Elmer, 1996) ont montré que la consommation de kéfir peut protéger le corps contre un défi de cancer. Si le kéfir est consommé avant une exposition au cancer, l'incidence des animaux en voie de développement du cancer est réduite. Si l'utilisation est maintenue après l'exposition, le taux de croissance du cancer est réduit.

Plusieurs études ont aussi montré que les extraits de kéfir et isolats bactériens de kéfir ont le potentiel de réduire le risque ou le développement de croissances cancéreuses *in vitro* et *in vivo*, certains propriétés anti-tumorale associés avec l'exopolysaccharide kefiran, ce qui explique la raison global pour l'usage du kéfir dans de nombreux rapports de guérisons de maladies (Rattray, 2011).

5.3 Améliorer la tolérance au lactose

L'intolérance digestive de Lactose ou La mal-digestion de Lactose c'est l'incapacité à digérer le lactose qui est le glucide principal pratiquement dans tous les laits de mammifères. L'intolérance digestive de Lactose affecte 75 % des adultes dans le monde, le plus souvent cette maladie se produit à la suite d'une diminution programmée génétiquement dans l'activité intestinale de lactose après l'âge de 3 à 5 ans (Sahi, 1994; Swagerty, 2002).

Hertzler et Clancy (2003) ont démontré qu'une entreprise commerciale produit le kéfir à partir d'une culture contenant six bactéries (mais pas de L. acidophilus) et une seule levure, aussi a une efficacité tel que le yaourt en réduisant le lactose et améliorer l'activité intestinale de lactose chez les adultes. Il a été également indiqué que les produits à base de lait fermenté ont un temps de transit intestinal plus court que le lait, qui peut améliorer la digestion du lactose (Cebra, 1999).

En outre, David Rattray et Connell (2011) ont constaté que le kéfir avec ces populations microbiennes a un certain degré d'activité de beta-galactosidase, qui peut convertir le lactose en glucose et galactose, à la fin ces deux sucres peuvent être facilement digérés.

5.4 Propriétés cicatrisantes

Tandis que le kéfir est un mélange de probiotique, bactéries et de levures, (Witthuhn. 2005). Le kéfir peut aussi stimuler les réponses immunitaires innées contre les pathogènes (Lee, 2007; Diniz, 2003).

(Lee et al. 2007) a montré que les propriétés anti-inflammatoires de polysaccharides présentent dans l'extrait de kéfir peut avoir de l'influence dans le processus de guérison des plaies. Selon (Hassan et al. (2012), L'acide lactique, l'acide acétique, polysaccharides et d'autres produits chimiques présentent dans le kéfir sont des facteurs importants dans la cicatrisation des plaies.

En 2005, Kamila et al a dirigé une étude sur les rats, ces derniers ont été traités par le kéfir. Les résultats ont montré des propriétés cicatrisantes comparés à ceux qui ont été traités par l'émulsion de clostébol-néomycine. Pareillement en 2005, Rodrigues et son équipe ont démontré que les rats traités par 70 % de gel de kéfir ont montré une réduction plus rapide de la plaie comparativement à ceux-ci de l'émulsion clostébol-néomycine. Une étude par Hassan et al. (2012) a également montré que le kéfir avait les propriétés à la cicatrisation de blessures thermiques.

6 Les propriétés de kéfir comme un probiotique dans le tractus gastro-intestinal

Le terme probiotique a été introduit par Lilly et Stillwell (1965) pour décrire les substances produites par un micro-organisme qui stimulaient le développement d'autres microorganismes. En 1974, Parker élargit la notion de probiotiques aux microorganismes qui contribuent au maintien de l'équilibre de la flore intestinale, englobant ainsi les microorganismes et les métabolites microbiens produits. Finalement, d'après (FAO/WHO, 2001), les probiotiques sont définit comme "des microorganismes vivants qui, administrés en quantités adéquates, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte".

Le kéfir est un système microbien complexe considéré comme un produit probiotique. Les micro-organismes présentent dans ce système, leurs métabolites formé pendant la fermentation et les produits de dégradation de la matrice alimentaire peuvent être responsable sur les effets bénéfiques de kéfir (Figure2.5) (Lopitz-Otsoa, *et al* 2003; Otles *et al* 2006)

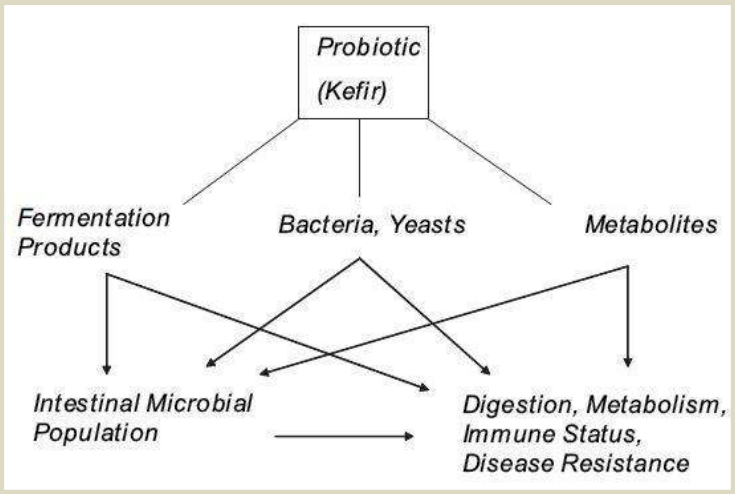


Figure 2. 6 Diagramme représente les effets de probiotiques sur le métabolisme et la santé (Farnworth, 2006).

Un des critères des bactéries probiotiques est qu'ils devraient être capables de supporter les conditions difficiles du tractus gastro-intestinal, y compris les conditions extrêmes de pH présentent dans l'estomac et l'action des sels biliaires et les enzymes digestives (Leite, 2013). Il est également estimé que l'un des moyens dont les bactéries probiotiques pourraient protéger les intestins c'est par adhésion aux cellules épithéliales intestinales. (Assadi, 2000; Farnworth, 2006).

En 2003, Santos et son équipe ont signalé que plusieurs souches de *Lactobacillus spp*, ont été isolées de kéfir, qu'ont une bonne adhésion sur les cellules Caco-2-cells. Ces souches étaient résistantes à des valeurs faibles de pH et des acides biliaires et avaient une activité antimicrobienne contre des bactéries pathogènes.

En outre, les prebiotiques sont considérées comme non digestible mais fermentescible (Norsker, 2011). Ces composés sont reconnus pour fournir des améliorations de l'état nutritionnel, en plus des avantages pour la santé comme la protection contre la cancérogenèse, mutagenèse, prévention contre les blessures causées par les radicaux libres, le contrôle de la

flore intestinale et le tractus gastro-résistance. Le kéfir est capable de produire dc peptide prébiotiques, lactacin, bactériocines, et kefiran (Schneedorf, 2004).

7 Conclusion

Les études scientifiques indiquent que le kéfir est un complexe probiotique, qui se construit d'une combinaison de bactéries et de levures. Ce chapitre mettent en évidence l'intérêt de kéfir et ses propriétés fonctionnelles comme antimicrobien, anti-cancérigène, probiotiques et il aide également à l'amélioration de la tolérance au lactose chez les humains. Ce produit fermenté semble avoir un grand potentiel et cela qui a amené les chercheurs à effectuer d'autres études sur le kéfir afin d'analyser les propriétés fonctionnelles et thérapeutique de ce produit fermenté.

Chapitre 3

CHAPITRE 3

PROCEDURE EXPERIMENTALE

1 Introduction

L'objectif de notre travail consiste à identifier la composition des grains de kéfir par mise en évidence la présence des levures et des bactéries lactiques et l'extraction de kéfiran. Par la suite, seulement les souches de lactobacilles ont été purifiées et identifiées par des tests physiologiques et biochimiques pour étudier des aptitudes probiotiques de souches sélectionnées. D'ailleurs, la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des solutions acellulaires de kéfir et kéfiran contre les microorganismes pathogènes. Enfin, c'est sur cette base de données, que nous essayerons d'étudier au laboratoire, l'activité antimicrobienne de kéfir *in vivo*.

2 Matériels

2.1 Les équipements et les produits utilisés

Cette étude est effectué au niveau de laboratoire de hall technologie de l'université de Médéa (lycée annexe) ; et pour réaliser cette expérience on a besoin des matérielles qui t'exprimé comme suit :

- Stromacher paddle Blender 400 circulator utilisé pour broyage et l'homogénéisation des échantillons de kéfir.

- Spectrophotomètre UV/visible type mini 1240 SHIMADZU utilisé pour la préparation des suspensions bactériennes selon les standards de McFarland.
- Mesure de la potentiel hydrogène fait par pH mètre de type ultra basic.
- Plaque chauffante avec Agitation de type Stuart UC 152 utilisé pour la préparation des solutions et les milieux de culture.
- La récupération de kefiran et des bouillions de kéfir acellulaires se fait par utilisation de la Centrifugeuse de type Hettich EBA21.
- Filtres seringue stériles à porosité de 0.45 µm utilisé pour la récupération des bouillions de kéfir acellulaires.
- Pour l'utilisation microbiologique on a utilisé Vortex de type VELP.
- Autoclave pour la stérilisation des solutions et les milieux de cultures.
- Toutes les pesées sont effectuée à l'aide d'un Balance à précision de type Denver avec l'incertitude de d=0,1 mg.
- Etuve de type Memmert utilisé pour l'incubation des microorganismes.
- Les données sont traitées à l'aide de l'Excel et logiciel Origine.

Les produits utilisés au cours de toutes les expériences sont consignés dans le tableau 3.1 ci-dessous :

Tableau 3. 1 les produits utilisés.

Produits		
Lait UHT	lugol	Eosine
Sucre brun	Formol	Bleu de méthylène
mélasse	Eau oxygénée	Violet de Gentiane
Eau physiologique 0.85%	Xylène	La fuscine
Huile d'immersion	Toluène	Lidocaine 2%
Huile de paraffine	Résine de montage	Acide acétique 1N
Ethanol	Hématoxyline	Sels biliaires

2.2 Provenance des Grains de Kéfir

Les échantillons des grains de kéfir proviennent des régions de wilaya d'Alger et Médéa (Algérie). Ils ont été prélevés dans des conditions d'asepsie dans des flacons stériles de 250 ml et conservés à 4 °C au niveau de laboratoire (Figure3.1).



(a) (b)

Figure 3. 1 les grains de kéfir utilisé. (a) grains kéfir de lait. (b) grains kéfir de l'eau.

2.3 Souches indicatrices

Les souches microbiennes utilisées dans cette étude sont été obtenues auprès de l'hôpital de Médéa, laboratoire de biologie et microbiologie –Université Yahia Fares, et les laboratoires des analyses microbiologiques SAIDAL Médéa – Algérie. Les 5 souches microbiennes sont, *Staphylococcus aureus*ATCC29213 Gram positif, *Bacillus subtilis*ATCC6631 Gram positif, *Escherichia coli* ATCC11150 Gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 Gram négatif, et *Candida albicans* ATCC10231. Tous ces microorganismes sont pathogènes avec des potentialités différentes selon le type d'infections provoquées ce qui a motivé leur choix. Les milieux de culture des souches et les températures d'incubation sont présents dans tableau3.2.

Tableau 3. 2 Les souches microbiennes utilisées

microorganismes	milieux de culture	températures d'incubation
Staphylococcus aureus	Gélose Chapman	37 ºC
Pseudomonas aeruginosa	Gélose Nutritif	37 ºC
Bacillus subtilis	Tryptone Soy Agar	37 ºC
Escherichia coli	Hektoen Enteric *Agar*	37 ºC
Candida albicans	Sabouraud Agar	30 ºC

3 Méthodes

3.1 Fermentation de Kéfir

Les grains de kéfir ont été lavés avec l'eau distillée avant le processus de fermentation. Les grains de kéfir de lait ont été inoculés dans 200ml de lait de vache UHT entier, tandis que les grains d'eau ont été inoculés dans 200 ml de différentes solutions de sucre, 10g/l de sucre brun et 10g/l de mélasse. Le processus de fermentation à 30ºC pendant 24h (Okda *et al.* 2013; Carasei *et al.* 2014).

Après chaque processus de fermentation, les grains ont été séparés de la solution fermentée par filtration l'aide d'une grille en plastique. Les grains ont été lavés et propagés à nouveau pour la prochaine fermentation. Cette procédure a été répétée pendant 2 à 3 semaines avant que les expériences commencent.

3.1.1 Préparation des solutions acellulaires et la mesure de pH

Les trois solutions fermentées (de kéfir de lait, kéfir d'eau avec sucre brun et kéfir d'eau avec mélasse) obtenus après filtration des grains. La fermentation faite dans trois périodes d'incubation, 24h, 48h et 72 heures et le pH est mesuré à travers toutes les périodes (Okda et al. 2013). À la fin de la période de fermentation et après centrifugation à 5000 tpm pendant 20 mn, les surnageants acellulaires contenant des métabolites de la culture de kéfir obtenus et filtré à travers des filtres de seringue stérile à 0,45 um porosité (Okda et al. 2013).

3.2 Isolement, purification et identification des microorganismes

10 g des grains de kéfir sont pesés dans un sac stérile et 90 mL d'eau physiologie (0.85% NaCl) sont ajoutés stérilement et en suite l'ensemble est broyé au stomacher pour 20 min. A l'aide d'une pipette stérile 1 ml de l'homogénat est prélevé et introduit dans un tube à essai contenant 9ml d'eau physiologique stérile, ainsi s'obtient la dilution 10^{-2}. Les dilutions 10^{-3} jusqu'à 10^{-6} sont obtenues de la même manière (Kivanç *et al.* 2015).

3.2.1 Isolement et culture des microorganismes

- **Isolement et culture des levures**

A partir des dilutions décimales 10^{-3} à 10^{-6} prélevé 1ml et le déposé aseptiquement dans une boite de pétri contenant de la gélose Sabouraud. Étaler à l'aide d'un râteau stérile. Puis incuber à 30ºC pendant 3 à 5 jours.

- **Isolement et culture des bactéries lactiques**

Un volume d'1ml est prélevé à partir des dilutions de 10^{-3} à 10^{-6}, et déposé dans une boite de Pétri stérile et vide, puis la gélose MRS (pH 5,4) est coulée, fondue et refroidie à 45ºC. Les boites sont incubées en anaérobiose à 30ºC pendant 24 à 48 heures.

3.2.2 Purification des bactéries lactiques

Les souches lactiques ont subis des séries de purification (isolement et repiquage sur milieu MRS pH 5,4 (Guiraud et Rosec, 2004), et à chaque fois on observe l'aspect macroscopique, la coloration de Gram et la présence de la catalase. Les souches considérées comme pures et qui possèdent les caractéristiques du genre *Lactobacillus* (petites colonies blanchâtres, à Gram positif et catalase négative) sont conservées à courte durée. La conservation des souches était réalisée par la méthode de conservation à courte durée.

- **Conservation courte durée**

Les souches sont ensemencées sur gélose MRS incliné en tube. Après incubation à 30 °C pendant 18 heures, les tubes sont conservés à + 4°C. Les repiquages se font toutes trois ou quatre semaines (Badis *et al.* 2004).

3.2.3 Identification des isolates

3.2.3.1 Pré-identification des levures

- **Caractérisation macroscopique**

Une observation macroscopique permet de décrire l'aspect des levures obtenues sur milieu solide de Sabouraud (taille, pigmentation, aspect) (Prescott *et al.* 2003).

- **Caractérisation microscopique**

L'observation microscopique au grossissement (G x 1000) et la coloration avec bleu de méthylène permet de classer les levures, leur morphologie cellulaire et leur mode d'association (Prescott *et al.* 2003).

3.2.3.2 Identification des bactéries lactiques

L'identification des souches lactiques passe par deux étapes, la première c'est l'identification du genre et une deuxième de l'espèce. Les souches sont classées selon les recommandations de Carr *et al* (2002), Axelsson (2004) et Hammes et Hertel (2006).

- **Caractérisation macroscopique**

Une observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies, obtenues sur milieu solide (taille, pigmentation, aspect). L'aspect de la croissance sur milieu liquide a été aussi pris en considération (Prescott *et al.* 2003).

- **Caractérisation microscopique**

L'observation microscopique au grossissement (G x 1000) permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire, leur mode d'association (Prescott *et al.* 2003).

- **Test de Catalase**

Le test catalase sert à démontrer si la bactérie possède le catalase servant à décomposer le peroxyde d'hydrogène. L'activité catalytique consiste à prélever une colonie sur gélose MRS et dissociée dans une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2). L'apparition de bulles d'air révèlent le dégagement d'oxygène, la souche est dite catalase positif (Guiraud, 2004).

- **Croissance à differences temperatures**

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles (Guiraud, 2004).L'aptitude à la culture est testée à 15 °C et

45°C pour lactobacilles et sur milieu MRS liquide .La croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble.

- **Fermentation de Glucose**

Ce test permet de classer les bactéries en hétérofermentaires ou homofermentaire. On ensemence abondamment un tube de 10 ml de bouillon MRS par la souche étudiée, dans le milieu on introduit une cloche de Durham, le CO_2 dégagé par les bactéries hétérofermentaire s'accumule dans la cloche après l'incubation 30 °C et 37 °C pendant 24 à 48h (Badis *et al*. 2004).

- **Fermentation de Lactose**

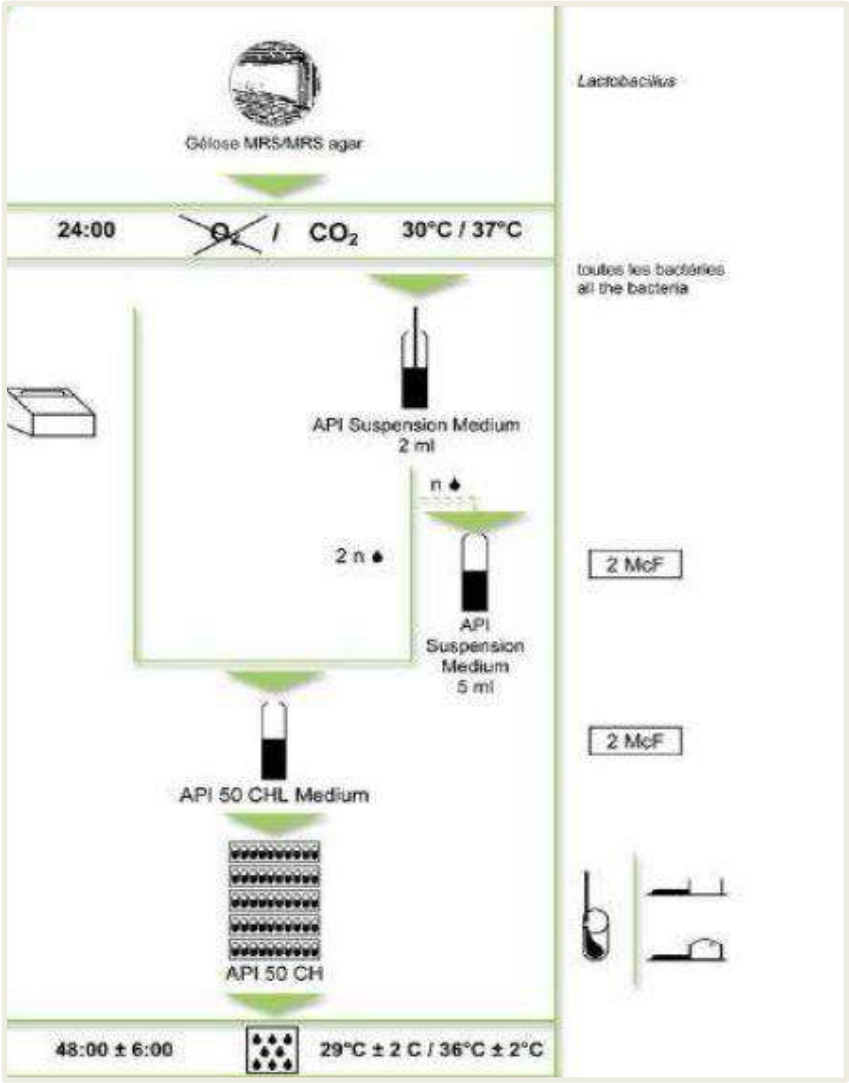
Ce test permet d'apprécier la capacité des souches à fermenter lactose. Pour ce faire, le milieu BCP a été ensemencé par les cultures bactériennes. Après 24h d'incubation, le développement de la culture et le virage de l'indicateur coloré traduit la fermentation du sucre testé (Badis *et al*. 2004).

- **API 50 CHL**

Pour la détermination de l'espèce, l'étude du profile de la fermentation des hydrates de carbone sur une galerie API 50 CH a été réalisée. La galerie API 50 CH (biomerieux) est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques). L'inoculum est préparé dans le 50 CHL medium, puis répartit à l'aide d'une micropipette stérile dans les 50 tubes de la galerie.



(a)



(b)

Figure 3. 2 (a) et (b) galerie API 50 CHL. (biomerieux-tutorial 2009)

Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans le tube, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH. Le premier tube, sans principe actif, sert de témoin. La lecture des résultats se fait après 24 et 48 heures d'incubation (Recommandations biomérieux : www.biomerieux.com).

3.3 Extraction de Kefiran

10g des grains de kéfir ont été pesé et traitée dans 100 ml d'eau bouillante (dans un rapport de 1:10) pendant 30 min sous agitation discontinue. Après centrifugation à 6000 tpm pendant 20 min et élimination de culot, le polysaccharide dans le surnageant a été précipité par addition de deux volumes d'éthanol froid. Le mélange a été placé à 4 ºC pendant 24h. Après l'élimination du surnageant (éthanol), l'eau distillée chaude a été ajoutée et le précipité qui est kefiran a finalement été dissous dans de l'eau chaude. Cette procédure de précipitation selon Rimada et Abraham (2006) a été répétée trois fois (au lieu de deux fois) pour augmenter la pureté de produit.

3.4 Propriétés probiotiques des bactéries lactiques isolées

Cette partie est consacrée à l'étude des aptitudes probiotiques des *Lactobacillus* isolées et tester leurs survie dans les conditions gastro-intestinal.

3.4.1 Résistance à pH acide

L'aptitude des souches à résister à l'acidité gastrique, a été déterminée selon la technique décrite par Çakır (2003). Avant réaliser ce test, chaque souche a été préparé par culture dans bouillon MRS. Le culot bactérien des cultures jeunes a été préparé après centrifugation à 5000 rpm/ 10 min, puis les cellules ont été suspendues dans 10ml du bouillon MRS ajusté à pH 2 avec l'acide acétique 1N. Le nombre de cellules viables ont été déterminés à temps zéro heure (T0h). Les tubes ont été par la suite incubés pendant 3h à 37°C. La résistance des souches à ce facteur hostile est estimée par dénombrement des cellules par la technique des dilutions, après les 3h d'incubation (T3h). Le taux de survie est calculé par l'équation suivante.

$$Taux\ de\ survie\ (\%) = \frac{Log\ CFU/ml\ \ (3h)}{Log\ CFU/ml\ \ (0h)}\ x\ \ 100$$

3.4.2 La tolérance aux sels biliaires

La concentration de bile intestinale est de 0,3% (p/v) et le temps de séjour des aliments dans l'intestin grêle est approximativement de 4 h (Prasad *et al.* 1998). L'expérience a été appliquée à cette concentration de la bile pour 4 h. Les souches sont ensemencées dans 10ml un bouillon MRS enrichis à 0,3% (v/v) de sels biliaires et incubées à 37°C. Au cours de l'incubation de 4h, La croissance a été vérifiée par un dénombrement sur MRS solide toutes les heures. Le taux de survie est calculé par l'équation suivante.

$$Taux\ de\ survie\ (\%) = \frac{Log\ CFU/ml\ \ (4h)}{Log\ CFU/ml\ \ (0h)}\ x\ \ 100$$

3.5 L'activité antimicrobienne

L''activité antimicrobienne des solutions acellulaires de kefir avec différentes périodes de fermentation (24h, 48h et 72h) et kefiran a été évaluée sur quatre souches bactériennes (*Escherichia coli ATCC11150, Staphylococcus aureus ATCC29213 ,Bacillus subtilisATCC6631* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027) et une souche fongique (*Candida albicans* ATCC10231) en utilisant la méthode de diffusion de disque qu'a été standardisée par le Comité National des Normes pour Laboratoires Cliniques (NCCLS) (Kiehlbauch *et al.* 2000).

L'activité antimicrobienne a été réalisée en utilisant la méthode de diffusion de disque sur les milieux gélose de Muller Hinton (MH) pour les souches bactériennes et Sabouraud (SB) pour la souche fongique Ainsi, les milieux (MH) et (SB) sont uniformément ensemencés à l'aide d'un écouvillon stérile par une suspension en saline (NaCl 0,9%) de la souche à étudier, préalablement ajustée à l'aide de l'étalon 0,5 McFarland a une turbidité environ de 10^8 bactéries/ ml et 10^4 levures/ml (Rodrigues et al. 2005).

Les disques en papier absorbant (5 mm de diamètre) ont été séparément imprégnés avec les bouillions de kefir (24h,48h et 72h) et kefiran et déposés sur les milieux de (MH) et (SB). disque d'antibiotique de référence approprié a été appliqué sur les boites (Oxacillin (Ox1) 30µg, Amoxicillin (AMC) 25µg pour les souches bactériennes et clotrimazole (C) pour la

levure); ces disques ont servi comme contrôle positif efficace contre les espèces microbiennes. (Rodrigues et al. 2005).

Après 24 h d'incubation à 37°C pour les bactéries et à 48h d'incubation à 30°C pour les levures. L'activité antimicrobienne a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de croissance en millimètres (y compris le diamètre du disque de 5 mm). Les manipulations sont répétées 3 fois pour chaque test.

3.6 Etude in vivo de l'activité antimicrobienne de Kéfir

3.6.1 Préparation de la pommade de Kéfir

Le lait de kéfir est choisi pour cette étude. La pommade a été préparée en mélangeant des quantités égales de grains et solution fermentée de kéfir durent 48-72h. La pommade est conservée à +4ºC jusqu'à l'utilisation (figure3.3).



Figure 3. 3 préparation de pommade de kéfir.

3.6.2 Les animaux

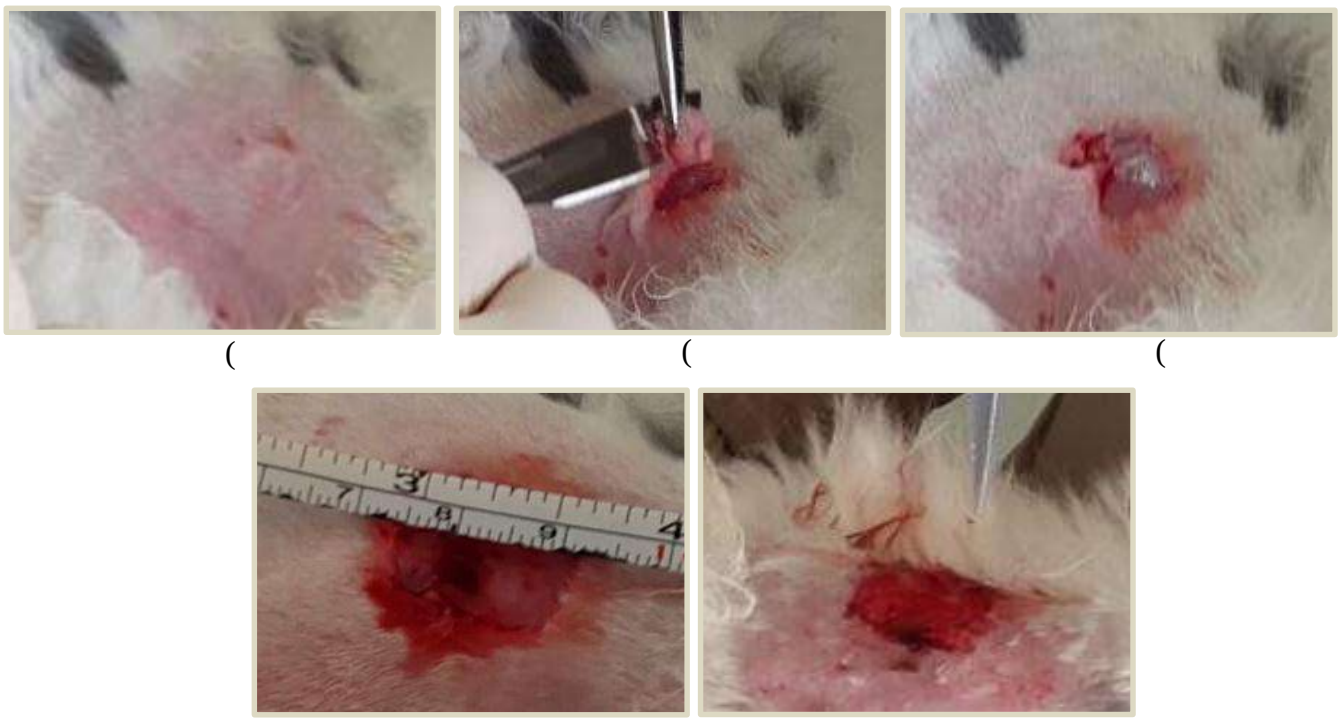
Dix lapins de races hybrides ont 2-3 mois pesant environ 1,5 kg ont été impliqués dans cette étude (figure3.4) Ces derniers ont été placés dans des cages individuelles, dans des conditions contrôlées de la lumière et de la température pour deux semaines avant cette étude. Ils ont été répartis au hasard en deux groupes de cinq animaux à chaque groupe et maintenu sur le même régime de lapin standard.



Figure 3. 4 les animaux utilisés dans cette étude.

3.6.3 Induction de plaie

La taille de zone est de 8x8cm sur la face arrière de dorsale était raser et préparé pour la chirurgie aseptique. La zone est anesthésiée localement avec 1 ml de lidocaïne 2% et la peau de cette dernière était nettoyée avec l'alcool 70% et séchée à l'air. L'épaisseur de blessure était d'environ 1.5x1.5 cm au niveau du tissu adipeux sous-cutané à l'aide d'une lame chirurgicale. La blessure a été inoculée avec 0.1 ml de 1.5x 10^8 CFU/ml *Staphylococcus aureus* (*ATCC29213*) (Rodrigues et al. 2005).



(((

(d) (e)

Figure 3. 5 induction de plaie. (a) préparation de la zone, (b) and (c) incision de plaie. (d) mesure de la plaie(e) inoculation de S. aureus sur la plaie.

3.6.4 Le protocole de traitement

Après 24 heures de l'induction de la plaie infectée, les lapins ont été regroupés en deux groupes, le premier groupe a servi comme groupe contrôle négatif, alors que le deuxième groupe était l'expérimental (Atalan *et al* 2003). Le protocole de traitement était comme la suit :

⇒ Groupe 1: le groupe de contrôle négatif, les blessures infectées reçu aucun médicament.

⇒ Groupe 2 : le groupe expérimental, la pommade de kéfir est étalé de manière uniforme aux blessures infectées une fois par jour jusqu'à la fin de l'expérience.

3.6.5 évaluation d'état de cicatrisation

L'état de guérison de la blessure est déterminé comme suivant: les observations macroscopiques. Les blessures infectées ont été évalués pour voir la présence de tissu de granulation, la taille de la blessure, l'état de l'infection et le temps de guérison complète. Par la suite, les jours 4, 10, 14 et 21 après l'incision, la plaie est mesurée à l'aide d'une règle à mesure. La zone de la plaie est calculée à partir de ces mesures en fonction du temps qui s'était passé pendant le traitement.

Le degré de contraction est déterminé à partir de la différence entre les zones des blessures initiales et finales. Ensuite, Les valeurs moyennes ont été calculées. Les résultats sont exprimés en cm^2. Le pourcentage de fermeture de plaie est calculé comme suit :

$$\text{percentage de fermeture de plaie (\%)} = \frac{\text{(Zone initiale de plaie – Zone actuelle de plaie)}}{\text{Zone initiale de plaie}}\ x100$$

3.6.6 Etudes histologiques

Cette étude a pour but de la vérification de l'existence des modifications de la structure histologique de peau au niveau lésion cutanée, pour le groupe expérimentale et groupe de contrôle négatif. La peau des lapins utilisés a soumis à différentes étapes de technique d'étude des tissus

Les lapins ont été sacrifiés à 4, 10, 14 et 21 jours, à chaque fois on a pris une partie d'une peau normale et d'une peau qui a subi une inflammation ensuite elles ont fixés dans le formol à 10% pendant 48h, après on a les mettre dans des cassettes en plastique. La déshydratation se fait par passage dans trois bains l'alcool de concentration croissante après l'alcool est éliminé par deux bains de xylène, 45 min dans chaqu'un, puis la paraffine liquide à 56 °C a imprégné les tissus. L'étape finale de l'inclusion consiste à réorienter le fragment de la peau dans le sens de la coupe dans un moule de paraffine. Le bloc solide de paraffine contenant le fragment est coupé par un microtome, les coupes de 3à 5 microns d'épaisseur sont étalées sur des lames. Après déparaffiner des lames par deux bains successifs de toluène, chaque bain dure 10 min, Puis réhydratation. Les coupes qui ont été colorées à l'hématoxyline-éosine (H&E) (l'hématoxyline colore le noyau en violet et l'éosine colore le cytoplasme en rose), puis déshydratées et protégées par des lamelles collées, elles sont prêtes à être analyser au microscope optique. Tableau 3.3 resume les techniques de coupes histologiques

Tableau 3.3 les techniques de coupes histologiques

Etape	Produits	Nombre de bains	Temps	Température
Fixation	Formol 10%	/	21 jours	Ambiante
Déshydratation	Alcool à degré croissant 70° 95° 100°	 2 Bains 2 Bains 3 Bains	 10min/bain 10min/bain 15min/bain	Ambiante
Imprégnation	Butanol Paraffine+butanol (1V/1V) Paraffine pure	3 Bains 1 Bains 2 Bains	8h/bain 2h 2h/bain	Ambiante Etuve à 60°C Etuve à 60°C
Confection des blocs	Paraffine pure	/	/	Ambiante
Coupe et étalement (avec de l'eau gélatinée à 0.4%)				

Déparaffinage	Xylène	2 Bains	2min/bain	ambiante
Réhydratation	Alcool décroissant : 100° 95° 70° Eau distillée	1 Bain 1 Bain 1 Bain 1 Bain	2min 2 min 2min 2min	Ambiante
coloration	Hémalun-Eosine	/	/	Ambiante
Déshydratation	Alcool croissant 70° 95° 100° Xylène	1 Bain 1 Bain 1 Bain 2Bains	Quelques sec/bain	Ambiante
Montage entre lame/lamelle à l'aide de l'Eukitt				

Chapitre 4

CHAPITRE 4

RESULTATS ET DISCUSSION

1 Résultats de mesure de pH pendant la fermentation

Les trois surnageants de deux consortiums de kéfir ont été analysés, les grains de kéfir de lait ont été inoculés dans le lait et les grains de kéfir d'eau ont été propagés dans le sucre brun et la mélasse séparément. Les procédés de fermentation ont été surveillés. Le pH a été mesuré, ce paramètre a permis de déterminer indirectement l'activité biologique des grains.

Au cours de la fermentation, le pH de kéfir a rapidement diminué dans les 48 h d'environ 6,7 à 3.5. Les deux consortiums de kéfir ont montré des tendances similaires de pH, seulement dans les premières 20 h, pH de kéfir d'eau soit propager dans le sucre brun ou dans la mélasse, a été diminué plus rapidement que le pH du kéfir de lait. Après 48-72h de fermentation, où les boissons sont habituellement consommées, les surnageants ont montré des valeurs de pH final entre 3,7 et 3,5 (figure 4.1).

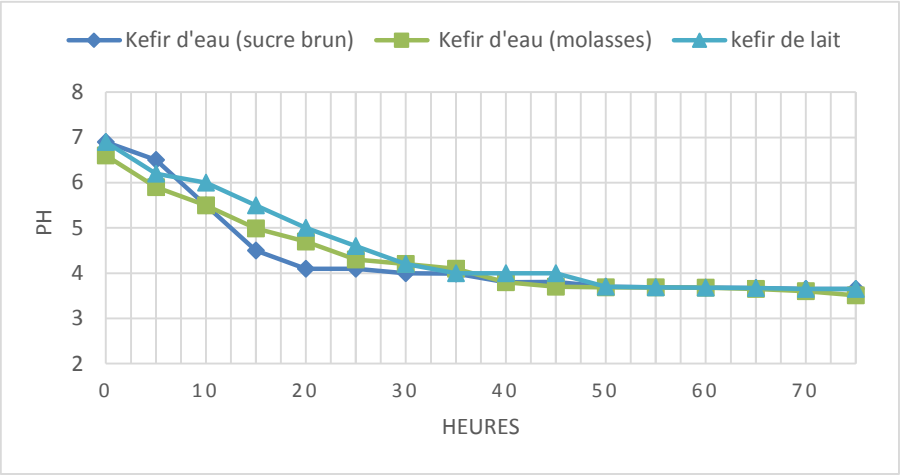


Figure 4. 1 changement de pH pendant les fermentations.

La comparaison entre deux consortiums de kéfir (grains kéfir de lait et grains kéfir d'eau) avec différents substrats, dans des conditions de fermentation similaires montrée des tendances pH similaires. Le pH de tous les surnageants de kéfir a diminué dans les 48 heures de 6,8 à 3,5 en raison de la production d'acides organiques. Des résultats similaires obtenus par Demirhan *et al.* (2011) et Zajsek *et al.* (2010) lorsque la valeur du pH de kéfir mis en incubation pendant 24 heures a atteint 3,49.

Ce paramètre physico-chimique est étudié avant par Rice B (2008) et Sadykov (2012) pour des longues périodes de fermentation pour la détermination de la production d'acides organiques. Au cours de la fermentation du kéfir de lait, lactose est converti au glucose et galactose par β-galactosidases, alors que la fermentation de glucose est plus rapide que celle de galactose (Carrau, 2008). Cette fermentation aboutit à la production de l'acide lactique et d'acide acétique, ainsi que de petites quantités d'éthanol, ce qui conduit à la diminution du pH. Par contre, la microflore de kéfir d'eau durant la fermentation en appliquant des solutions de sucre différentes, elle a produit l'acide lactique, l'acide acétique, des quantités différentes de l'éthanol, le succinate, le mannitol, et de nombreux composés volatils, sont assemblés ce qui explique les valeurs élevées d'acidification de milieu (Allison. 1978).

2 Identification des isolates

Dans notre présente étude, l'analyse microbiologique des grains testés a permis l'isolement des levures à partir du milieu Sabouraud et les bactéries lactiques ont été isolées à partir du milieu MRS. Les bactéries lactiques ont été exclusivement identifiées selon les caractéristiques physiologiques et biochimiques. Les tests préliminaires ont démontré que ces souches sont des bacilli à Gram positive et catalase négative, ces critères étant caractéristiques des bactéries lactiques. 6 souches ont été isolées et purifiées. Les isolats ont été nommés en fonction de leur origine. Par exemple; trois isolats de grains de kéfir du lait ont été nommés comme M (n) et trois isolats provenant de grains de kéfir d'eau ont été nommés en tant que W (n).

2.1 Pré-identification des levures

L'examen macroscopique des levures cultivées en aérobiose à 30°C sur gélose Sabouraud, montre qu'il s'agit des colonies crémeuses, lisses, rondes et bombées avec une odeur de levure (figure4.2).

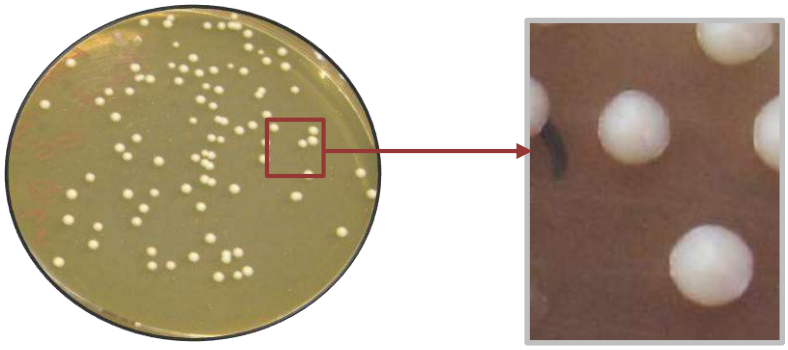


Figure 4. 2 Observation macroscopique des levures sur gélose Sabouraud

La coloration de bleu méthylène montre que les levures ont une forme sphérique avec des extrémités arrondies. Ces cellules étaient isolées, ou regroupées en paire ou en chainette (figure.4.3).

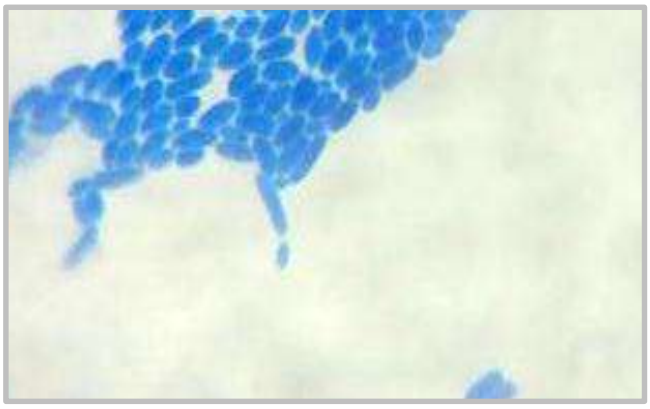
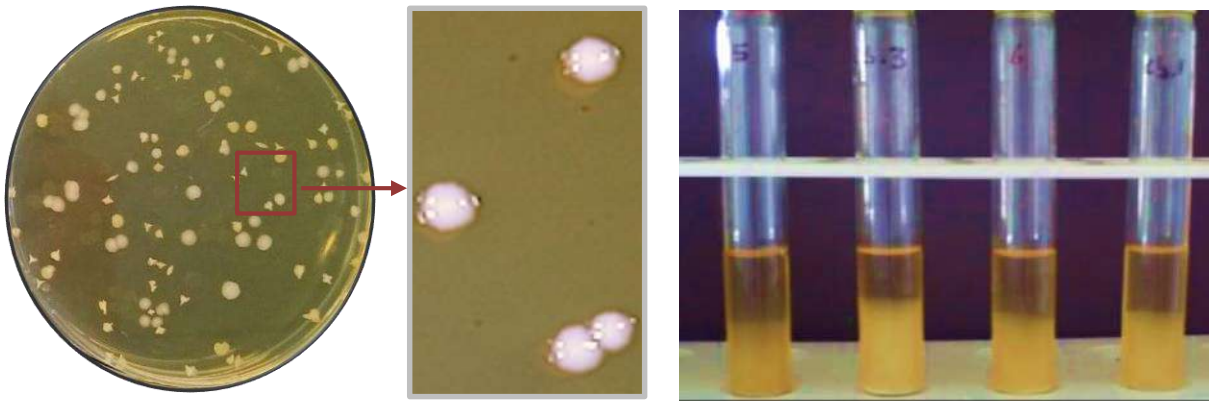


Figure 4. 3 Observation microscopique des levures après la coloration de bleu méthylène.

2.2 Identification des bactéries lactiques

Après les séries de purification sur milieu solide et liquide (MRS pH 5,4), les colonies des souches présentent les caractéristiques suivantes : petites, blanchâtres, lisses, de surface convexe (Figure.4.4.a). La croissance en milieu liquide est caractérisée par l'apparition du trouble bas du tube (Figure4.4.b).



(a) (b)

Figure 4. 4 (a). Aspect des colonies des bactéries lactiques sur MRS solide. (b). Culture dans milieu MRS liquide.

Vue au microscope optique après coloration de Gram, les souches sont Gram positive, et de forme bâtonnet, disposées en chainettes plus ou moins longues (de 0.5 à 8 µm) (figure4.5).

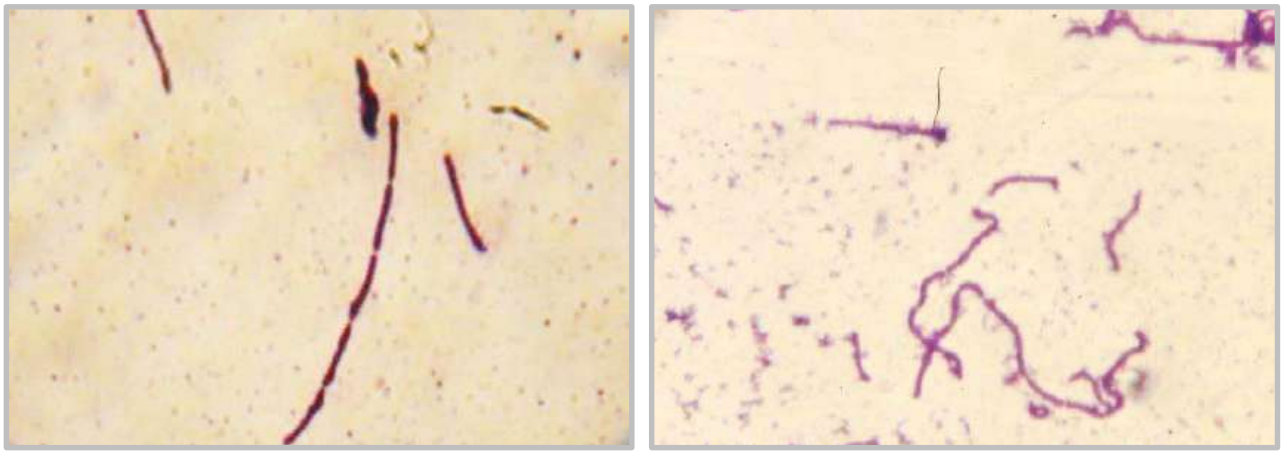


Figure 4. 5 Observation microscopique des bactéries lactiques après la coloration de Gram.

Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats montrent que les six souches isolées sont Catalase négatives.

La production du gaz (CO2) à partir du glucose, présente deux aspects : les souches M1, M3, W1, W2 et W3 étaient hétérofermentaires, et la souche M2 homofermentaire (figure4.6).

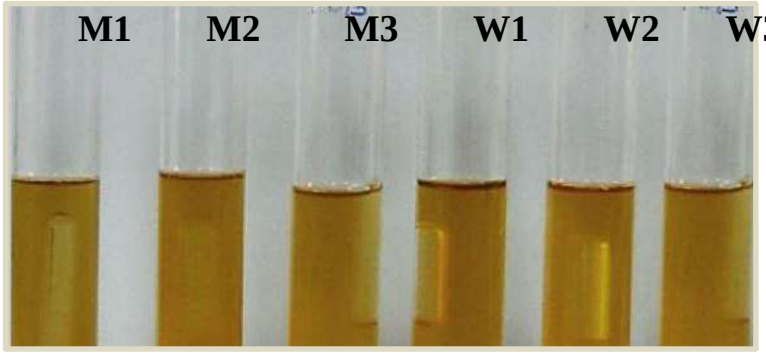


Figure 4. 6 Production du gaz à partir du glucose.

Les six souches poussent bien à 15 et 45°C après 24h, et fermentent le lactose sur milieu BCP. Figure4.7 montre que les colonies deviennent jaunes après la réduction de pH.

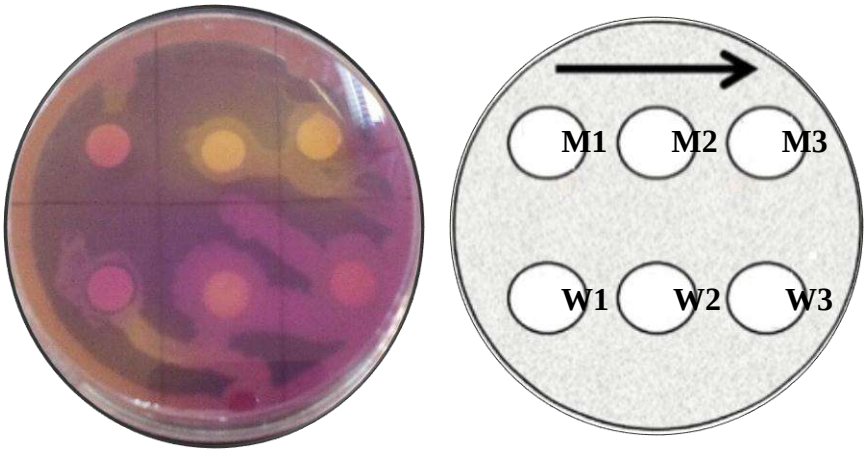


Figure 4. 7 Résultat de la fermentation de lactose sur gélose BCP.

A partir des résultats ci-dessus, et en suivant les recommandations de Carr *et al* (2002), Axelsson (2004) et Hammes et Hertel (2006), on peut conclure que les six souches appartiennent au genre *Lactobacillus*.

Le Tableau4.1, montre les résultats qui ont permis l'identification du genre.

Tableau 4. 1 Résultats des tests de l'identification du genre**.**

	Souches					
Caractères	M1	M2	M3	W1	W2	W3
Forme	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet
Gram	+	+	+	+	+	+
catalase	-	-	-	-	-	-
Croissance A 15/45	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Glucose fermentation	Hetero-fermentaire	Homo-fermentaire	Hetero-fermentaire	Hetero-fermentaire	Hetero-fermentaire	Hetero-fermentaire
Lactose fermentation	+	+	+	+	+	+
conclusion	**Lactobacillus**	**Lactobacillus**	**Lactobacillus**	**Lactobacillus**	**Lactobacillus**	**Lactobacillus**

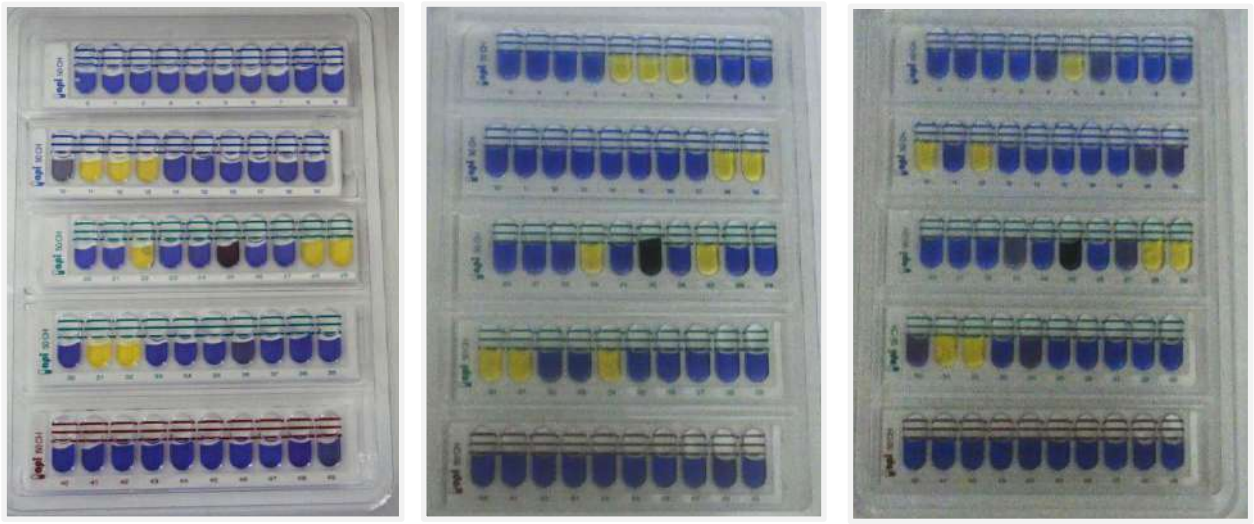
Les résultats de la fermentation des hydrates de carbone sur la galerie API 50CH, ont permet l'identification des espèces, le tableau4.2 et les figures 4.8 et 4.9, montre les résultats du profile de fermentation des hydrates de carbones. D'après ces résultats, et suivant les recommandations de Carr et *al* (2002), Axelsson (2004) et Hammes et Hertel (2006). On peut conclure que :

- ✓ Les souches M1 et M3 appartiennent à l'espèce *lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis*. ces résultats sont confirmés à partir de la base des données de Biomérieux, à qui le pourcentage de similitude était de 98.8%.
- ✓ La souche M2 appartient à l'espèce *Lactobacillus paracasei* avec un 95.8% pourcentage de similitude
- ✓ les souches W1, W2 et W3 appartiennent à l'espèce *lactobacillus hilgardii* avec un pourcentage de similitude de 97,7%.

Tableau 4. 2 L'utilisation des hydrates de carbone par les souches dans une API 50 CHL**.**

Hydrates De Carbone	Souches					
	M1	**M2**	**M3**	**W4**	**W5**	**W6**
Témoin	-	-	-	-	-	-
Glycérol	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-
D- Arabinose	-	-	-	-	-	-
L- Arabinose	-	+	-	-	-	-
D- Ribose	-	+	-	+	+	+
D- Xylose	-	+	-	-	-	-
L- Xylose	-	-	-	-	-	-
D- Adonitol	-	-	-	-	-	-
MDX	-	-	-	-	-	-
D- Galactose	-	-	-	+	+	+
D- Glucose	+	-	+	-	-	-
D- Fructose	+	-	+	+	+	+
D- Mannose	+	-	+	-	-	-
L- Sorbose	-	-	-	-	-	-
L- Rhamnose	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-
D- Mannitol	-	+	-	-	-	-
D- Sorbitol	-	+	-	-	-	-
MDM	-	-	-	-	-	-
MDG	-	-	-	-	-	-

NAG	+	-	+	-	-	-
Amydaline	-	+	-	-	-	-
Arbutine	-	-	-	-	-	-
ESC	+	+	+	+	+	+
Salicine	-	-	-	-	-	-
D- Celiobiose	-	+	-	-	-	-
D- Maltose	+	-	+	+	+	+
D- Lactose [1]	+	-	+	+	+	+
D- Melibiose	-	+	-	-	-	-
D-Saccharose	+	+	+	+	+	+
D- Trehalose	+	-	+	+	+	+
Inuline	-	-	-	-	-	-
D- Mélézitose	-	+	-	-	-	-
D- Raffinose	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-
Glycogène	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	-	-	-	-	-	-
D-Turanose	-	-	-	-	-	-
D- Lyxose	-	-	-	-	-	-
D- Tagatose	-	-	-	-	-	-
D- Fucose	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-
D- Arabitol	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-
GNT	-	-	-	-	-	-
2KG	-	-	-	-	-	-
5KG	-	-	-	-	-	-
Identifiées comme	*Lactobacillus delbrueckii*	*Lactobacillus paracasei*	*Lactobacillus delbureckii*	*Lactobacillus hilgardii*	*Lactobacillus hilgardii*	*Lactobacillus hilgardii*

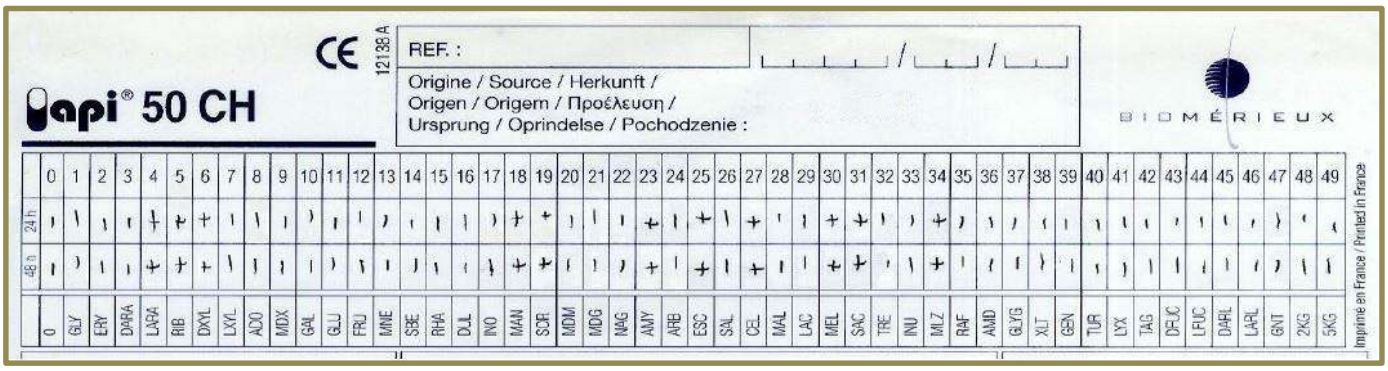


(a) (b) (c)

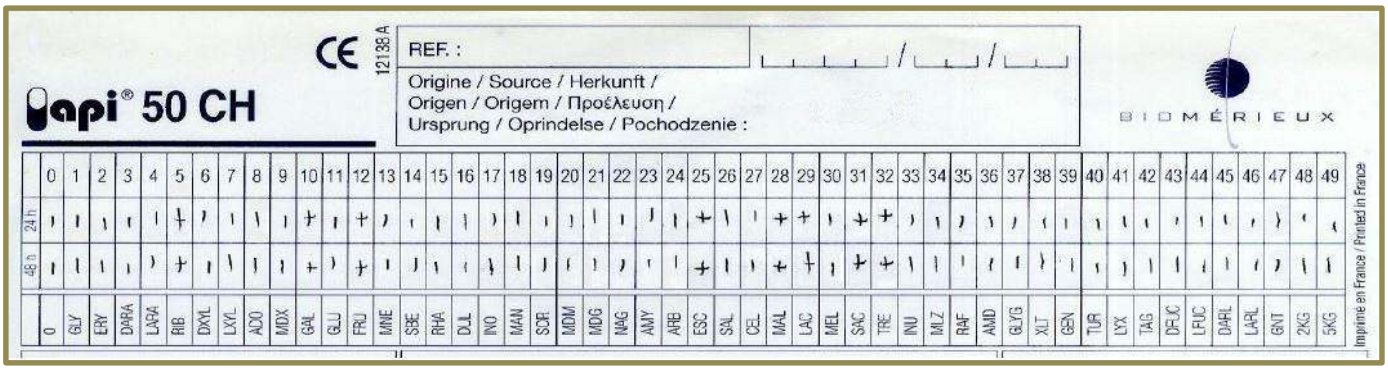
Figure 4. 8 Résultats du test de fermentation des hydrates de carbone sur galerie API 50 CHL (a). Résultats du Fermentation de *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, (M1 and M3) (b) Résultats du Fermentation de *lactobacillus paracasei* (M2) (c) Résultats du Fermentation de *lactobacillus hilgardii* (W1, W2 and W3).



(a)



(b)



(c)

Figure 4. 9 Résultats du test de fermentation des hydrates de carbone sur galerie API 50 CHL (a). Résultats du Fermentation de *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis,* (M1 and M3) (b) Résultats du Fermentation de *lactobacillus paracasei* (M2) (c) Résultats du Fermentation de *lactobacillus hilgardii* (W1, W2 and W3).

La composition microbiologique des grains de kéfir est vraiment complexe qu'est construit à partir lactobacilles, streptocoques lactiques, levures et de bactéries acétiques. Le kéfir se différé par rapport aux autres boissons fermentées par ses grains qui ont une structure spécifique et s'agissent comme un organisme vital (Angulo *et al*. 2004). Parmi les objectives de cette étude, est de connaitre et d'examiner la microflore de grains de kéfir. D'après les résultats obtenus, les bactéries lactiques et les levures ont été présentées dans les grains de kéfir d'eau, ainsi que dans les grains de kéfir de lait. Les levures existant en grains de kéfir ont été isolées sur gélose Sabouraud et pré-identifiées morphologiquement. Alors que parmi les bactéries lactiques, seulement les souches de Lactobacillus ont été isolés et identifiés à l'aide de tests biochimiques précis, L'isolement et identification initiale était fondée sur les apparences morphologiques et le test de catalase. Après avoir procédé à des essais préliminaires afin de déterminer le genre, une totale de 6 isolats ont été choisis pour la poursuite de l'identification. Trois différentes souches de *Lactobacillus* étaient identifiées comme *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis, Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus hilgardii* avec haute simultanéité d'identification par l'API 50 CHL.

L'existence des souches de Lactobacillus identifiées dans cette étude est connue par ça existence dans les grains (Duitschaever. 1987). D'après Abraham, A. G, (1999) environ 130 des 339 isolats ont été identifiés comme *Lactobacillus delbrueckii* (Abraham, 1999). Parmi les espèces de *Lactobacillus* prédominantes dans les deux grains de kéfir il y a : *Lactobacillus lactis, Lactobacillus kefiri* et *Lactobacillus kefiranofaciens* (garrot. *et al.* 2000). Ces différences peuvent avoir une relation avec les changements géographiques, le type de lait, les variétés de sucre, saison de production et de climat. Il est noté que boisson fermentée traditionnelle dans des régions froides favorise la croissance de bactéries mésophiles tels que *Lactococcus* et *Leuconostoc spp.*, alors que, dans les régions chaudes, bactéries thermophiles sont les plus dominantes comme *Lactobacillus* et *Streptococcus* (Carrau, *et al*. 2008).

D'autres études mentionnent que il y a différentes espèces de levure prédominante dans les Produits de kéfir (Angulo. 2004; garrot, GL., et al. 1999; Maeda et al. 2004).Ils ont prouvé la présence de *Hanseniaospora valbyensis* et *Lachancea fermentati* comme des espèces dominantes associées dans les grains de kéfir, mais également *Sccharomyces cervisiae* été fréquemment isolés.

Duitschaever (1987) a signalé que *Kluyveromyces lactis ; kluyveromyces marxiamus* constituent une partie importante des levures dans les produits de kéfir, et le rôle essentiel de *Candida kefyr* et *Sccharomyces cervisiae* apparut dans le développement du goût pendant la fermentation de kéfir. La symbiose entre les bactéries lactiques avec les levures a des effets bénéfiques sur la croissance des bactéries lactiques. Ces derniers produisent des acides organiques et d'autres composés aromatiques (Alvarez-Martin *et al.* 2008). En outre, Alvarez-Martin *et al.* (2008) a signalé que la croissance des levures peut être essentielle pour le développement de la texture et l'arôme grâce à leurs activités protéolytiques et lipolytiques.

3 Résultat d'extraction de Kefiran

Figure4.10 indique les étapes d'extraction de Kéfiran par centrifugation et extraction éthanolique à partir des grains de kéfir de lait et les grains de kéfir d'eau. Après centrifugation, l'éthanol a été ajouté qui conduit à la précipitation du polysaccharide. L'observation a indiqué que la séparation a présenté le résultat désiré puisque le polysaccharide a été graduellement précipité. Figure4.11 montre la formation du culot de kefiran après 24h à 4 °C dans l'éthanol. Après élimination de l'éthanol, le kefiran finalement été dissous dans l'eau distillée chaude.

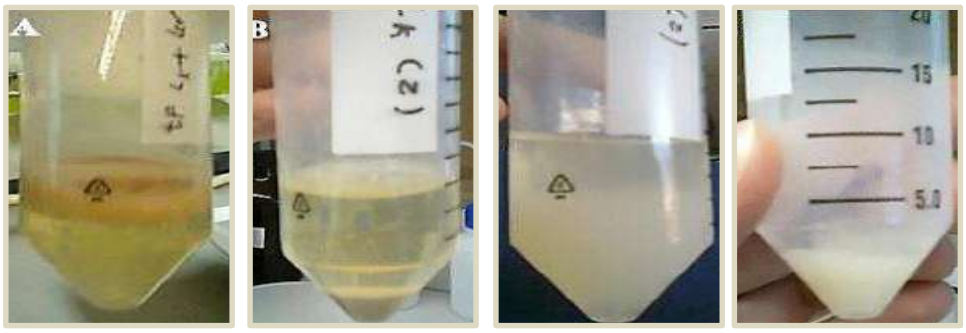


Figure 4. 10 (A.B) Résultat d'extraction de kéfiran à partir des grains de kéfir d'eau. (C.D) Résultat d'extraction de kéfiran à partir des grains de kéfir de lait.

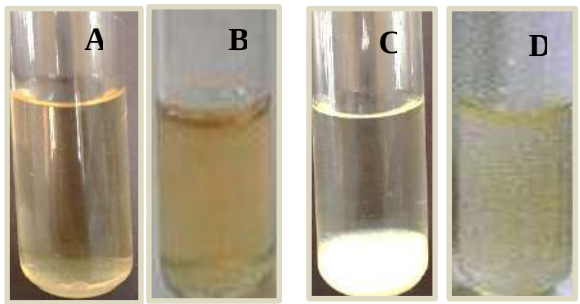


Figure 4. 11 (A,C) la précipitation de kéfiran dans l'éthanol après 24h (B,D) kéfiran dissous dans l'eau distillée chaude.

Kefiran est un polysaccharide soluble dans l'eau, qui peut être isolé à partir de la boimasse des grains de kéfir. D'après le résultat, kefiran secrété par les bactéries dans les grains de kefir de lait, est blanc, claire gel avec une texture visqueux. Tandis que le kéfiran de grains d'eau est jaune, pâle et secrété en petite quantité.

Kefiran est un produit microbien exopolysaccharide (EPS) a la particularité de gélifier en présence d'alcool (Mukai *et al.* 1991), obtenu à partir de la flore des grains de kéfir. Les bactéries qui synthétisent kefiran ont été identifiés comme *Lactobacillus kefiranofaciens* et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Maeda *et al.* 2004). Les grains de kéfir de lait sont composés d'un consortium symbiotique de bactéries et de levures, contrairement, aux grains de kéfir d'eau contiennent moins de diversité microbienne qu'explique la différence de quantité de production de kefiran (Rimada *et al.* 2006).

Bien que cette étude était particulièrement intéressé par l'extraction et les propriétés antimicrobiennes de kefiran, de nombreuses recherches ont montré que le kefiran est composé de quantités équimolaires de D-glucose et de D-galactose agencés en un réseau d'unités de six sucres et qu'il présentait certaines qualités médicinales (Kooiman *et al.* 1968 : Maeda *et al.* 2004; Rodrigues *et al.*2005). D'autres ont étudié les caractéristiques physico-chimiques et rhéologiques de kefiran (Piermaria et al, 2008; Rimada et al. 2006), qui porte une perspective pour l'utiliser comme agent épaississant ou gélifiant dans les aliments.

4 Les propriétés probiotiques des bactéries lactiques

4.1 Résultats de résistance au stress acide

L'étude de la survie des bactéries lactiques dans le tractus gastro-intestinal est importante pour une meilleure connaissance du devenir des bactéries lactiques ingérées avec l'aliment et une meilleure compréhension de l'action des probiotiques chez l'homme et l'animal.

La résistance aux faibles valeurs du pH est l'un des critères de sélection des souches probiotiques (Quwehand, et al. 1999, Çakır 2003). Car avant d'atteindre le tractus intestinal, les bactéries probiotiques doivent d'abord survivre au transit dans l'estomac ou le pH peut être aussi bas que 1.5 à 2 (Dunno et al, 2001). La résistance à pH 2.5 souvent utilisée dans des essais in vitro pour déterminer la résistance au pH de l'estomac. La survive des trois souches Lactobacillus dans une condition acide (pH 2.5) sont illustrés dans les figures 4.12 et 4.13. Dans notre expérience, la totalité des souches ont résisté à un pH 2.5, mais on remarque que la croissance n'a pas été détectée pour les souches testées. Le dénombrement des cellules viables (Log UFC/ml) a montré une importante diminution pour la souche *lactobacillus paracasei* et seulement deux souches *(lactobacillus delbrueckii subsp lactis et Lactobacillus hilgardii*) ont résisté durant tout le temps d'incubation qui est de trois heures.

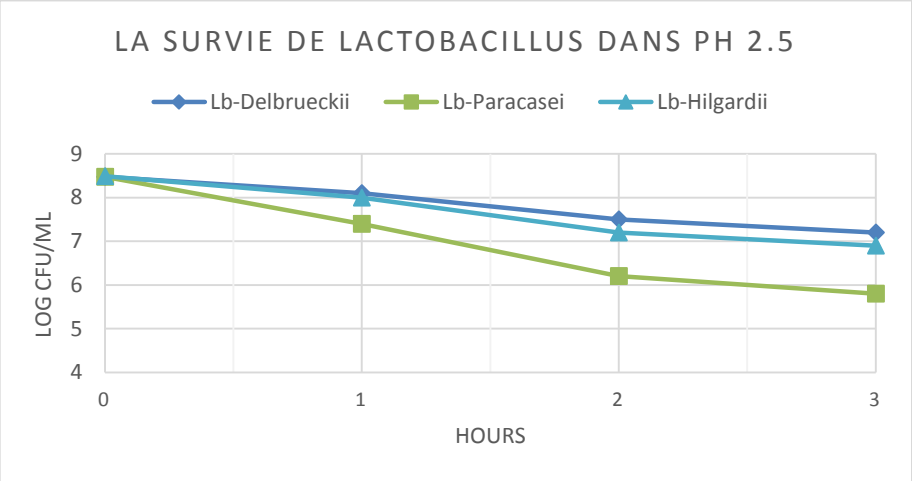


Figure 4. 12 Tolérance des souches au pH 2.5 en fonction du temps.

D'une façon générale, il est bien établi que malgré qu'il y ait eu une perte de la croissance de l'ensemble des bactéries lactiques à pH acide, le nombre des cellules viable reste plus au moins

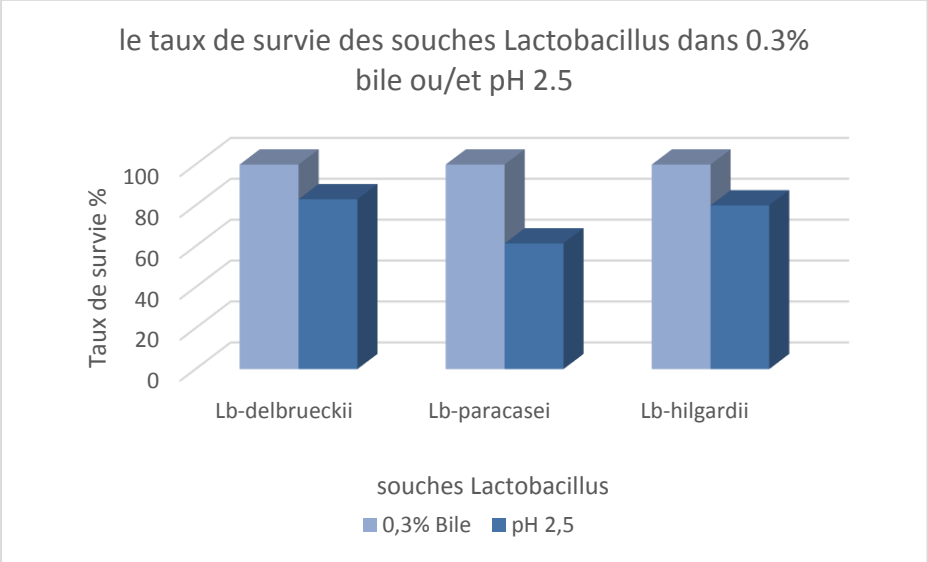


Figure 4. 13 Taux de survie des souches Lactobacillus dans 0.3% bile et à pH 2.5**.**

important avec un taux de survie supérieur à 70%. Donc elles peuvent résistent ultérieurement aux conditions d'acidité de l'estomac.

Urdaneta *et al.* (2007) ont testé 29 souches de *Lactobacillus* d'origine de kéfir de lait pour leur potentiel probiotique. La résistance de ces bactéries à un pH entre 1 et 3 a révélé que toutes les souches sont résistantes à pH 3 pendant 3h, et la plupart ont perdu leur viabilité en 1h dans un pH 1. Par contre, dans les travaux de Conway *et al.* (1987) et Lindwall et Fonden (1984), les résultats ont montré que *Lb. bulgaricus* et *S. thermophilus* ont une résistance très faible à l'acidité et sont détruits très rapidement à pH 1, et après environ 1 h à pH 3 (Lindwall et Fonden, 1984 ; Conway *et al.* 1987). *In vitro*, Lc. lactis ne survit pas à une acidification brutale du milieu. Par contre, cette survie peut être augmentée par une phase d'adaptation à des pH intermédiaires (Conway *et al.* 1987).

Chez les bactéries, cette résistance au stress acide est attribuée à un ensemble de protéines. Trois protéines, GroES, GroEL et DnaK, sont fortement induites en condition d'adaptation au stress. Ces trois protéines appartiennent à la famille des protéines induites en réponse à des conditions de stress variées, notamment le stress acide, et cela a été décrit chez des bactéries à Gram positif comme *Lactococcus lactis* (Hartke *et al.* 1994 ; Kilstrup *et al.* 1997) et *Lactobacillus casei* (Hartke et al. 1994). Une autre molécule qui a un rôle essentiel pour la résistance des bactéries lactiques au stress acide est l'une des sous-unités de l'ATPase

F0F1 qui est surexprimée lors de l'adaptation à l'acidité. Ce complexe protéique expulse les protons hors de la cellule en hydrolysant l'ATP (O'Sullivan, 1999).

4.2 Tolérance contre la bile

Le taux de sécrétion et la concentration de la bile dans les différentes régions de l'intestin varie principalement en fonction du type d'aliment consommé et il ne sera pas possible de prédire la concentration de bile dans l'intestin à un moment donné. Davenport (1968) rapporte que les concentrations biliaires dans l'intestin, sont entre 0,5 à 2,0% pendant la première heure de la digestion. Les niveaux peuvent diminuer pendant la deuxième heure. Les concentrations biliaires allant de 0.1% à 1,5% ont été utilisées dans plusieurs milieux microbiologiques pour l'isolement sélectif des bactéries résistantes aux sels biliaires.

Les résultats représentés dans la figure 4.13 et 4.14 montrent la résistance aux sels biliaires des trois *Lactobacillus* isolées, toutes les souches ont pu tolérer et croître dans ces conditions. Tandis que les souches ont montré une croissance modérée au cours des 4 heures d'incubation. Les trois isolats avait initialement un dénombrement des bactéries viables autour de 8,47 log UFC/ml, notamment, *L.hilgardii* avaient le plus grand nombre viable de 10,2 log UFC/ml après 4 h de croissance alors que le reste était compte varie entre 9,23 et 9,60 log UFC/ml. Puisque les isolats non seulement survécu à la concentration de 0,3% la bile mais ils ont aussi été capables de croître, leur taux de survie ont été considérés comme 100 % (figure 4.13).

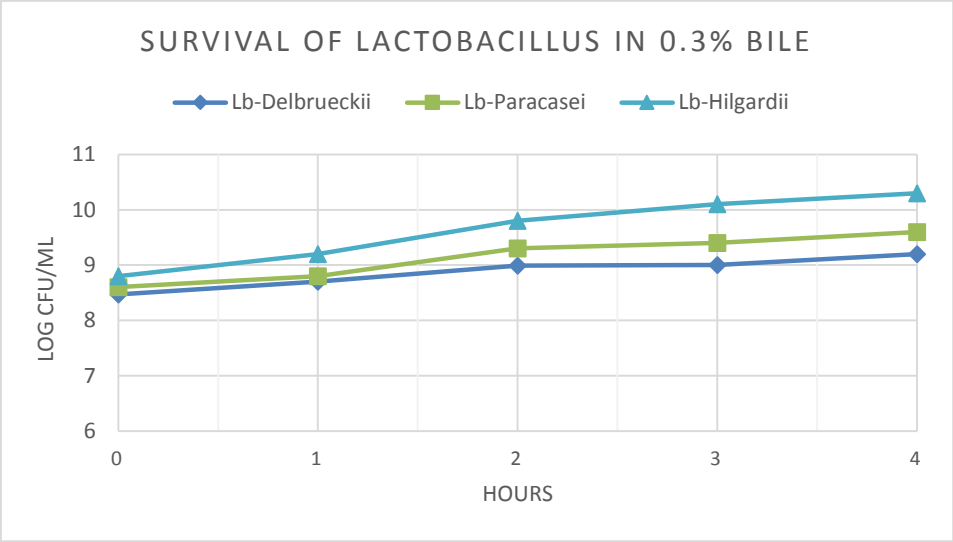


Figure 4. 14 Tolérance des souches au 0.3% bile en fonction du temps.

Cette capacité des lactobacilles à croître dans 0,3% de sels biliaires est due à une activité exo-hydrolasique, qui leur permet de résister à l'action détergente des sels biliaires en les transformant en dérivés inoffensifs (Chen *et al*. 2012). La «Bile Salt Hydrolase» (BSH, EC 3.5.1.24), aussi appelée cholylglycine hydrolase, est responsable de la déconjugaison des sels biliaires. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des sels biliaires conjugués avec la glycine ou la taurine en résidus d'acides aminés et en sels biliaires libres Chen *et al*. 2012).

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Burns et al. (2008) qui ont montré que la plupart des souches *lactobacillus delbrueckii* sont résistantes aux sels biliaires. De même, Zago et al. (2011) qui ont révélé une moyenne de survie de 70% chez des lactobacilles isolés à partir de kéfir de lait et du fromage. Kimoto-Nira et al. (2009) ont rapporté que les facteurs influençant la résistance des lactocoques à la bile sont associés à la composition du milieu de croissance. Ils ont prouvé que la résistance à la bile de quelques souches de Lactococcus a été changée quand le sucre dans le milieu est changé du glucose en lactose. En d'autres termes, l'exclusion de la bile par les bactéries exige de l'énergie. Les hydrates de carbone qui sont facilement ou rapidement métabolisés pour apporter cette énergie, augmentent la résistance aux sels biliaires. D'autre part, et comme la bile est un détergent, la résistance aux sels biliaires semble être associée à la stabilité de la membrane cellulaire.

5 Activité antimicrobienne de kéfir et de kefiran

Les bactéries probiotiques ont un caractère souhaitable qui apparut dans l'inhibition de la croissance des pathogènes. Cette particularité pourrait également être un avantage technologique dans l'industrie alimentaire puisque ces bactéries probiotiques pourraient être utilisées comme des starters cultures fonctionnels. L'activité antimicrobienne de kefiran et les surnagents de kéfir pourraient être déterminés à l'aide de méthode de diffusion du disque après fermentation à 30°C pour différentes durées d'incubation, 24, 48 et 72h.En outre, les effets des substrats tels que le lait, le sucre brun et mélasses sur les propriétés antimicrobiennes ont été confirmés.

Le tableau 4.3 et la figure 4.15 à figure 4.18 indiqués le profil d'inhibition et cela dépend de la souche, on constate que les bactéries Gram positif ont montré une plus grande sensibilité pour les surnageants de kéfir et kefiran que les bactéries à Gram négatif. L'activité inhibitrice de kefiran contre *S. aureus* et *B. subtilis* a été montré que ces souches étaient les plus sensibles avec le diamètre des zones de 30 et 40 mm avec kefiran du lait ; et 23 et 35mm de diamètre avec kefiran de l'eau, respectivement. Par contre les souches, *P. aeruginosa, E. coli* et *C. albicans* ont été moins sensibles et plus résistants.

La plus grande quantité de micro-organismes pathogènes est inhibée, quand le surnageant de kéfir de lait de 72h est utilisé, avec des halo zones d'inhibition pour les *S aureus, B subtilis, P aeruginosa, C.albicans* et *E. coli*, étaient de 53, 30, 19, 18 et 18 mm, respectivement. Comme c'été mentionné dans Tableau 4.3, l'Amoxicilline-acide clavulanique et Oxacilline avaient des zones d'inhibitions inférieurs sur *S. aureus* à celles-ci causés par le surnageant de kéfir de lait de 72h.

Les grains de kéfir de l'eau inoculés dans le sucre brun avaient montré des effets antimicrobiens sur la majorité des pathogènes, néanmoins ces effets diminuent lorsque la mélasse a été utilisée comme substrat.

Par la suite, le temps d'incubation avait un effet important sur l'activité antimicrobienne de kéfir. D'après ces études les meilleurs effets antimicrobiens sont obtenus à 30 °C pendant 72h comme temps d'incubation avec des zones d'inhibition supérieurs à 10 mm contre toutes les souches d'indicateurs.

Tableau 4. 3 les résultats d'activité antimicrobienne de kefiran et les surnageants de kéfir

		Zone d'inhibition (diamètre par mm)				
		S.aureus	P.aeruginosa	E.coli	B.subtilis	C.albicans
Kefir du lait	24h	15	10	-	12	-
	48h	31	18	15	23	-
	72h	53	19	18	30	18
Kefir de l'eau (sucre brun)	24h	12	-	-	8	-
	48h	25	7	7	18	8
	72h	30	10	7	25	11
Kefir de l'eau (mélasse)	24h	5	-	-	7	-
	48h	13	7	-	15	-
	72h	16	7	-	20	-
Kefiran	lait	30	-	-	40	-
	eau	23	-	-	35	-
Antibiotiques	Ox1	25	-	-	19	-
	AMC	43	-	-	33	-
	C	-	-	-	-	15

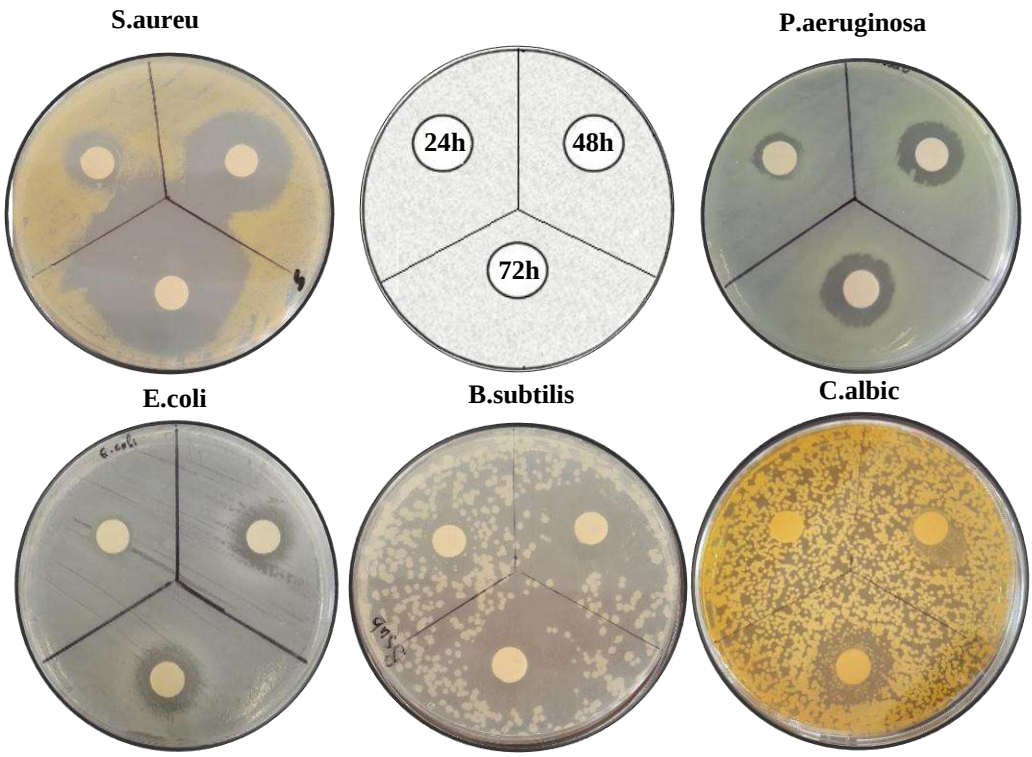


Figure 4. 15 Activités antimicrobiennes de surnageants de Kéfir de lait inoculés dans le lait pendant 24, 48 et 72 heures.

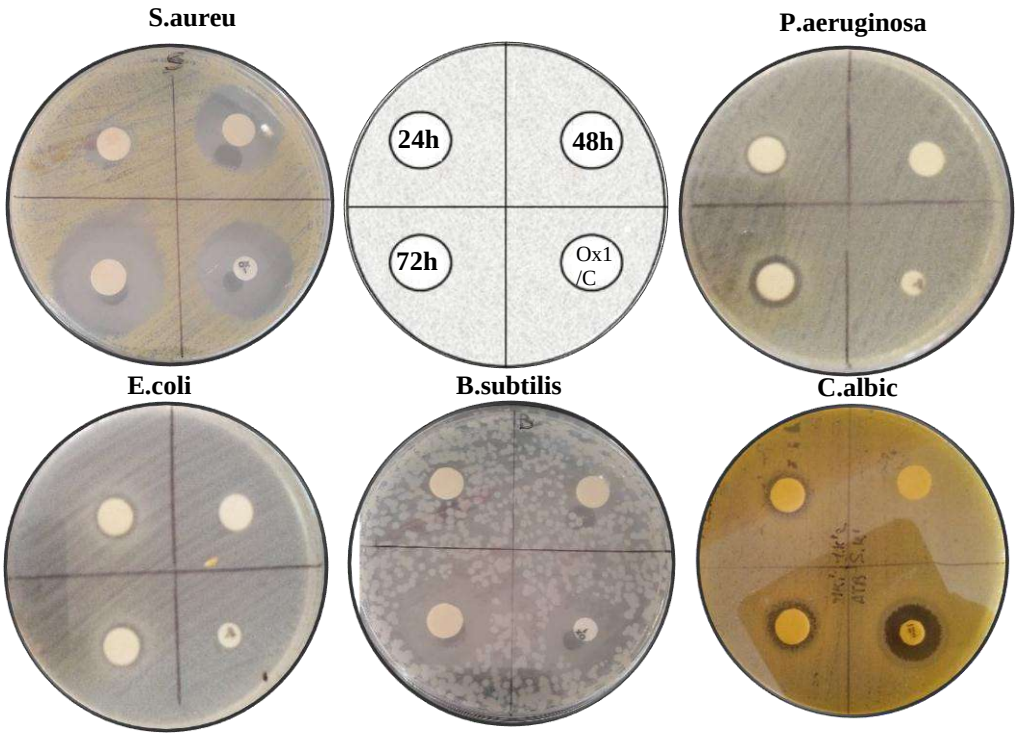


Figure 4. 16 Activités antimicrobiennes de surnageants de Kefir d'eau inoculés dans le sucre brun pendant 24, 48 et 72 heures. L'activité antimicrobienne de l'amoxicilline (Ox1) sur les bactéries et clotrimazole (C) sur C. albicans.

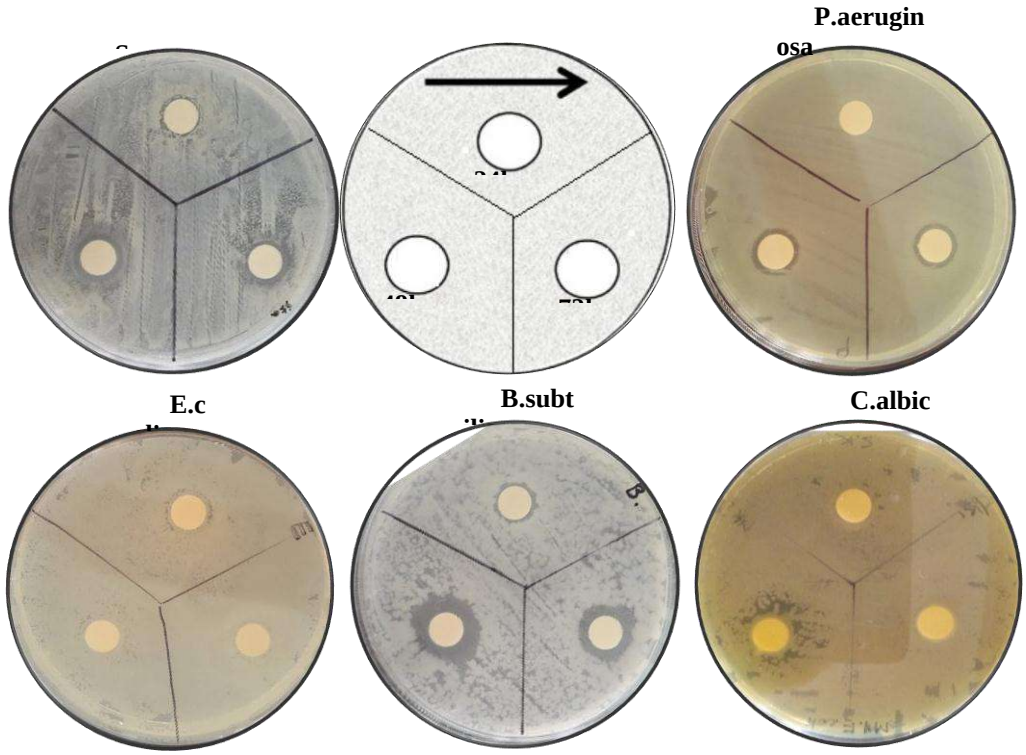


Figure 4. 17 Activités antimicrobiennes de surnageants de Kefir d'eau inoculés dans mélasse pendant 24, 48 et 72 heures.

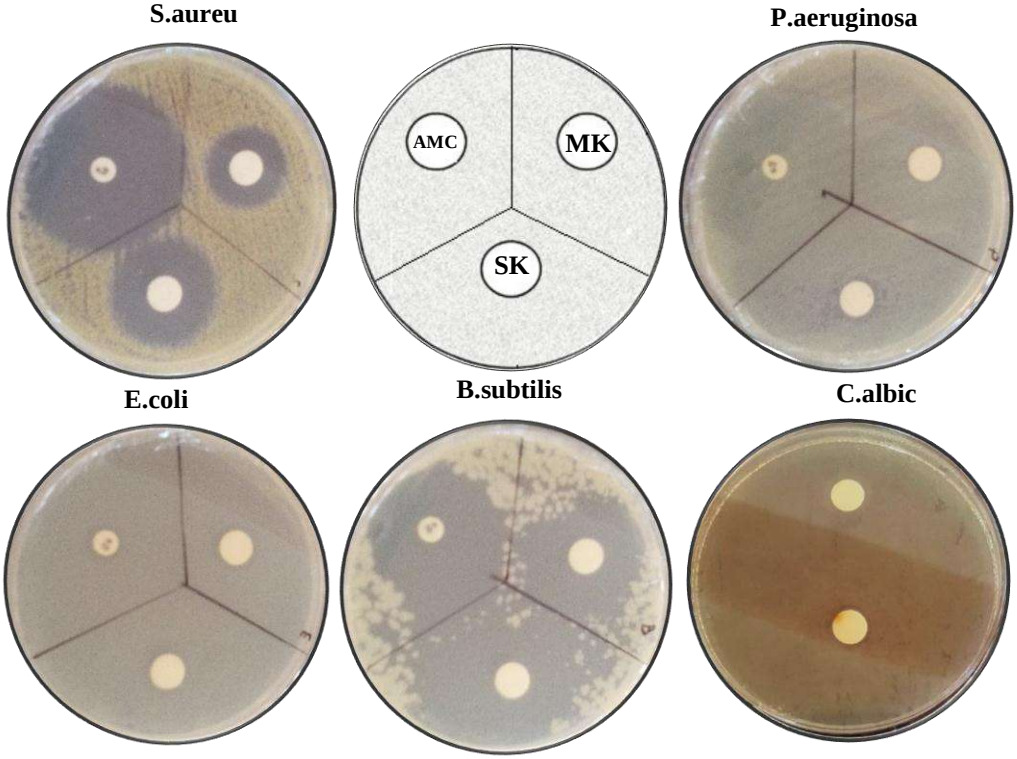


Figure 4. 18 Activités antimicrobiennes de Kefiran de lait, Kefiran de sucre et Amoxicillin (AMC) sur les bactéries.

Ces résultats sont compatibles à celle-ci rapportées par Rodrigues *et al.* (2005), qui a étudié l'activité antibactérienne contre les microorganismes pathogènes. Le meilleur effet antimicrobien de kéfir était contre *Staph. aureus*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* et *Streptococcus salivarius* avec des zones d'inhibitions supérieures à 25 mm. Kamila *et al.* (2005) a trouvé d'autres résultats semblables contre les bactéries Gram positives bacillus et Gram positif coccus.

En outre, les conditions de fermentation de kéfir sont très importantes concernant l'activité antibactérienne produite par grains de kéfir. Ces résultats sont assimilables à celles établis par Sirirat et al., (2010), qui a étudié l'activité antibactérienne de kéfir de lait de vache et de riz à 24-30 °C pendant 24 et 48 h d'incubation contre certains pathogènes. Leurs résultats montrent que *E. coli* était la plus sensibles parmi les autres micro-organismes. *Staphylococcus aureus* était sensibles uniquement pour 48h avec une zone réduite et ne dépasse pas 10 mm diamètre. De plus, l'effet d'inhibition de tous les deux kéfirs a été noté contre *B. subtilis* par des petites zones après 24 h de fermentation.

(Bensmira et Jiang.2011) ont révélé que les métabolites produites et l'évolution du pH sont affectés par le temps de fermentation du kéfir. Contrairement aux résultats actuels, (Ulusoy et al. 2007) noté qu'aucune différence significative a obtenu entre les diamètres des zones antimicrobiens de 24 et 48 heures comme temps de fermentation du kéfir. Le meilleur effet antimicrobien de 24 et 48 heures de kéfir a été observé contre *Staphylococcus aureus* avec des zones de diamètre de 21,4 et 21,1 mm respectivement.

Selon Ryan *et al.* (1996) ; Santos *et al.* (2003) et Raja *et al.* (2009) L'activité antibactérienne de kéfir contre les agents pathogènes peuvent être attribuée à la production d'acides organiques comme lactiques et acétiques par la culture de kéfir, ainsi qui va causer la réduction du pH, la production de composés antimicrobiens tels que la bactériocine, exo-polysaccharides, le peroxyde d'hydrogène, l'alcool et le CO_2. A ce stade de l'étude, les fermentés bouillons contenant du sucre brun et la mélasse avaient les valeurs de pH les plus faibles, toutefois, halo zone d'inhibition pour ces bouillons étaient significativement inférieur à l'zones d'inhibition causée par le kéfir du lait. Probablement, la diminution de pH due à la production d'acides organiques, alors que le pH n'était pas le seul facteur responsable de l'inhibition des pathogènes donc ils ont suggéré que il y a une production des bactériocines (Zacconi et al.1995 et garrot *et al.* 2000). Santos *et al.* (2003) et Raja *et al.* (2009) ont décrit un grand nombre des mécanismes associés à l'inhibition des bactéries pour *Lactobacillus* isolées de kéfir, et les effets

de molécules d'antimicrobiens est habituellement dépendantes sur les souches à tester, ce qui conformer avec nos résultats.

De plus, de nombreuses recherches ont admis que le pouvoir inhibiteur d'acides organiques produites par grains de kéfir (Jeantet *et al.* (2007) ; Hirshfield *et al*. 2003). Il est généralement convenu que la capacité d'acides faibles pour inhiber la croissance microbienne est liée à leur perméabilité ces résultats ont été constaté par (Hirshfield *et al*.2003). Les acides faibles tels que l'acide acétique qui est perméable lipidique (bien que la lipophilie varié entre un acide faible et d'autre) peut donc diffuser librement dans le cytoplasme de cellules microbiennes. Vu que la plupart des microorganismes maintenir un gradient de pH à travers leurs membranes cytoplasmiques, avec pH d'intérieur est plus alcaline que l'extérieur, le résultat est de l'accumulation de nombreux d'acides faibles dans le cytoplasme conduisent finalement à la mort cellulaire. Cependant, il a été constaté que plusieurs souches de bactéries lactiques produites d'autres substances antibactériennes différentes d'acides organiques. Ces composés étaient surtout actifs contre quelques bactéries Gram positives et Gram négatives. Néanmoins, leurs activités ne sont pas encore exprimé (santos *et al*. 2003).

6 L'évaluation *in vivo* de l'application de kéfir sur les plaies infectées

Les résultats cliniques publiés depuis une quinzaine d'années soulignent les multiples effets bénéfiques des probiotiques Ils semblent avoir des effets préventifs et curatifs, notamment dans les cas de maladies inflammatoires du tube digestif et d'amélioration de fonctions intestinales grâce à un certain nombre de mécanismes (Rolfe *et al.* 2000; Sanders *et al.* 1999), y compris l'augmentation de la fonction de barrière épithéliale (Ewaschuk *et al*.2008) et empêcher colonisation de pathogènes (Isolauri.2001; Lai. 2010). D'autres travaux étudient aussi l'utilisation de probiotique et son rôle dans l'amélioration de la barrière de la peau pour stimuler la santé de la peau et augmenter la résistance aux infections cutanées (Sultana, *et al* 2013).

Depuis l'activité antimicrobienne de kéfir et sa polysaccharide ont été confirmé dans cette étude, l'objectif de cette expérience est de déterminer et d'étudier l'effet de l'application locale cutané de kéfir sur les cicatrisations chez les lapins. De plus, Nous avons confirmé les

effets antimicrobiens de kéfir sur *Staphylococcus aureus*. La sélection de grains de kéfir du lait était fondée sur les résultats d'une épreuve de dépistage antibactérien où le kéfir du lait et son kefiran ont extrêmement prouvé une efficacité contre *S. aureus.*

6.1 Evaluation de l'état de la cicatrisation

La cicatrisation des plaies a été comparée entre les lapins non traités comme groupe de témoin négatif et les lapins traités par le kéfir comme groupe expérimental durant le processus de réparation. Évaluation macroscopique de la blessure a révélé que l'application cutanée de pommade de kéfir a diminué significativement la taille de la blessure en la comparé à celle de groupe non traité.

Dans le groupe traité, les blessures infectées étaient recouvertes d'un revêtement ulcéré au quatrième jour après l'incision et ce revêtement presque a disparu au dixième jour, révélant une fine peau résiduelle (Figure4.19.a). Par le 21eme jour après l'incision, les plaies sont complètement guéries chez tous les lapins traités par le kéfir et cela par la fermeture de l'incision macroscopique et la restauration de la couche épithéliale.

En revanche, les lésions chez les animaux non traité de groupe négatif étaient plus grandes et plus œdémateuses que celles-ci chez les animaux traités, il a été remarqué que, le revêtement ulcéré est toujours présent avec une ré-épithélialisation imparfaite jusqu'à 21eme jours (Figure4.19.b). En outre, 2 sur 5 des lapins non traités ont montré des symptômes d'infection à staphylocoques avec des signes d'une inflammation aiguë, développement de pus et l'œdème même des septicémies.

D'autre part, selon les résultats de mesure des plaies, les tailles des plaies de groupe de contrôle négatif sont significativement plus grandes que celles de groupe expérimental pendant toute la durée de l'expérience. (Figure4.20) et (la Figure 4.21) montre les patterns de guérison des deux groupes. Commençant par les plaies infectées chez les animaux traités, la pommade de kéfir confirmée une cicatrisation très significative en comparant à celles d'animaux non traitées. Alors que la zone de plaie traité par la pommade a réduit jusqu'à 0,81 cm^2de leur taille initiale (2,25 cm^2) pendant 7 jours avec un pourcentage de contraction de 64 %. La taille de plaie non traité était encore autour de 1,55 cm^2 avec seulement 32 % de guérison. La diminution

de la taille de blessure était plus rapide dans le groupe traité par le kéfir, ce groupe atteignait presque 100 % de guérison seulement en 14 jours.

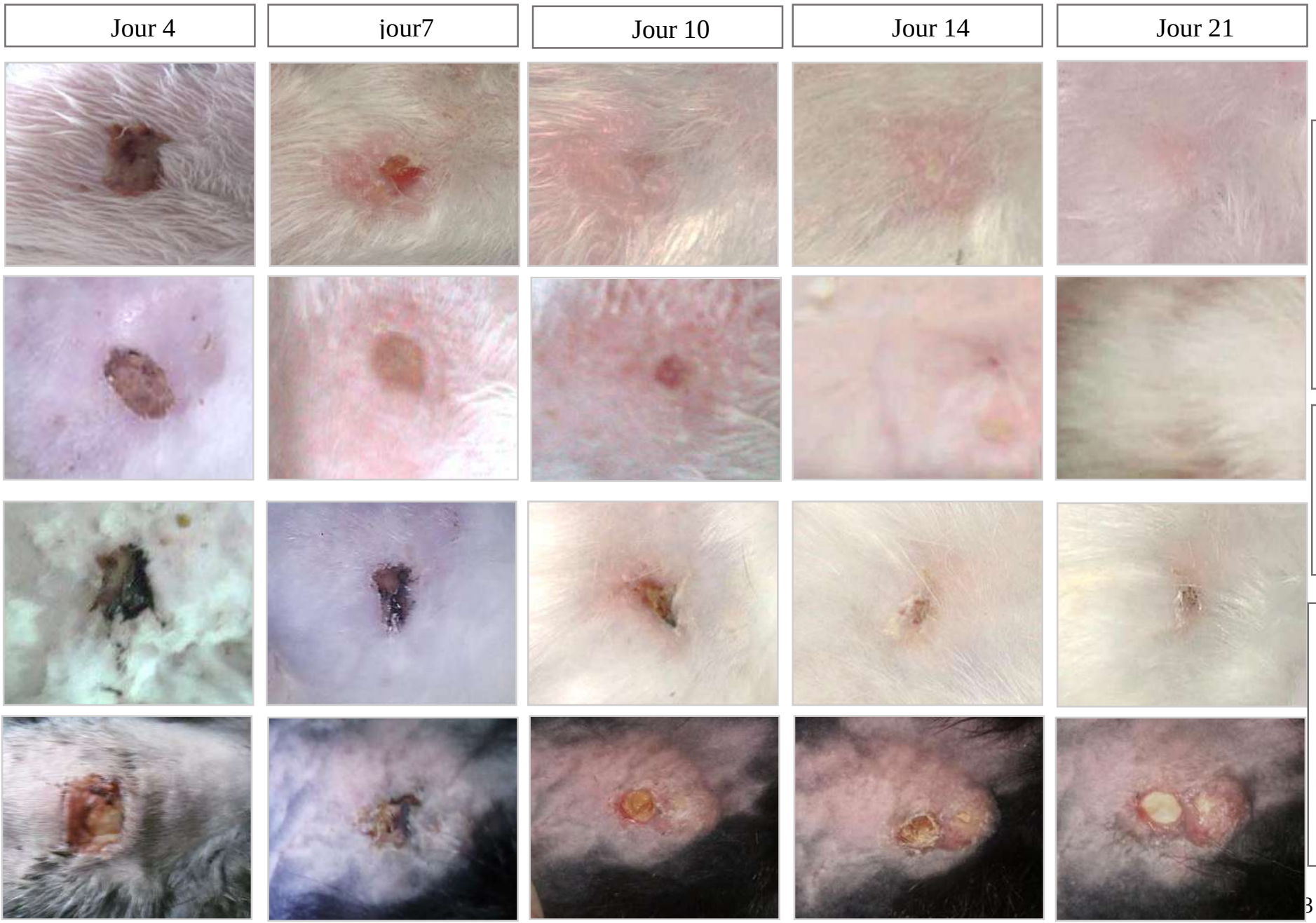


Figure 4. 19 Résultats d'observation des plaies chez le groupe traité avec le kefir et le groupe non-traité.

Figure4.

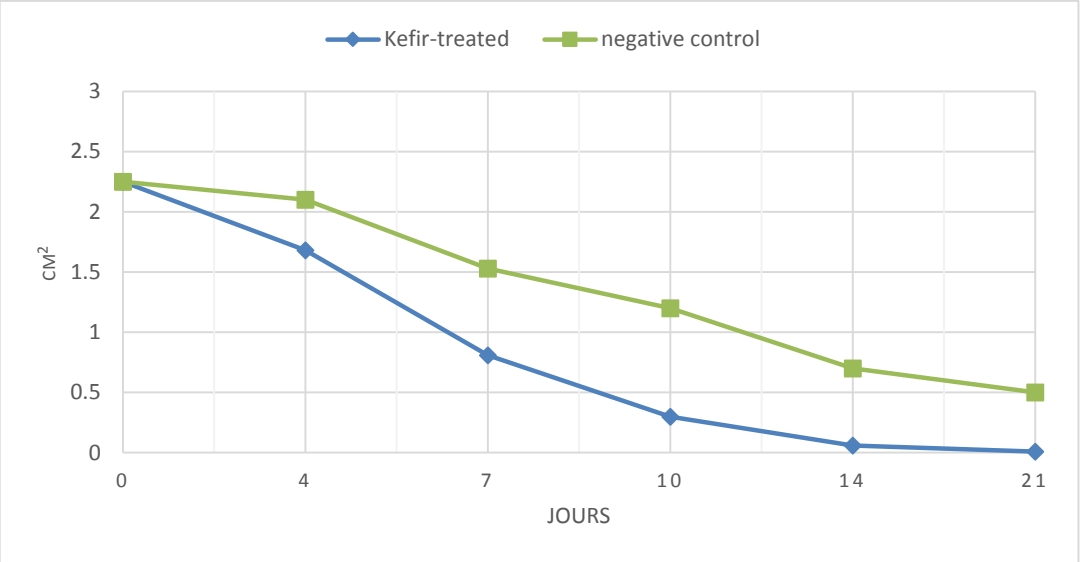


Figure 4. 20 L'activité de guérison de kéfir sur les plaies infectées chez les lapins. Les données dans ce graphe représentent les animaux non traités (contrôle négatif) et les animaux traités par le kéfir.

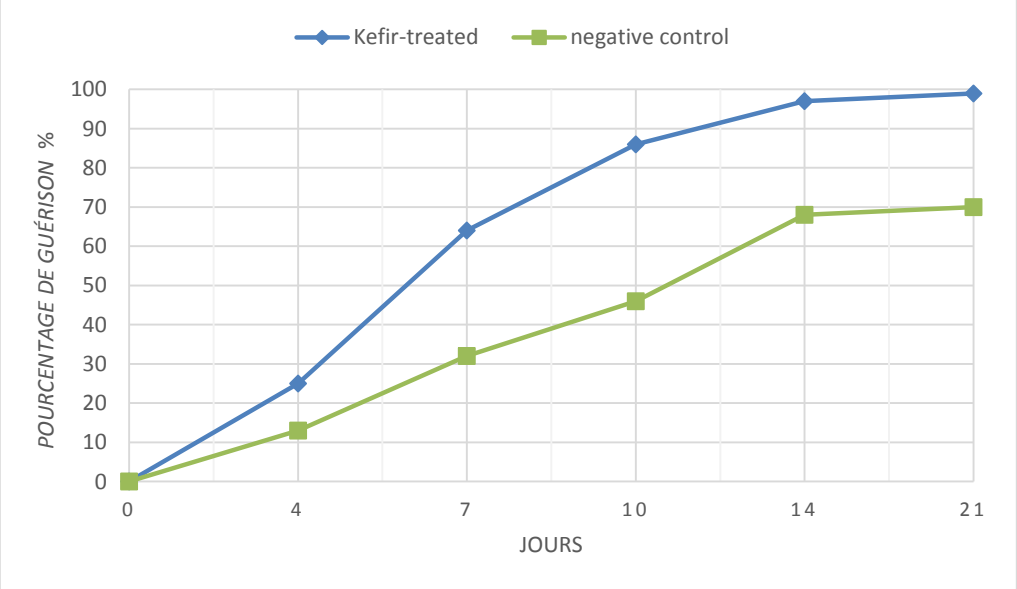


Figure 4. 21 Le pourcentage de guérison de kéfir sur les plaies infectées chez les lapins. Les données dans ce graphe représentent les animaux non traités (contrôle négatif) et les animaux traités par le kéfir.

6.2 L'étude Histologique

L'analyse microscopique des coupes histologiques donne les résultats suivants:

La peau saine garde la même structure histologique dans les 4eme, 10eme, 14eme et 21eme jours. Elle est composée d'un revêtement cutané (épiderme), qui est un épithélium stratifié malpighien kératinisé, surmontant un derme composé de follicules pileux, des annexes sudoripares au sein d'un tissu conjonctif vascularisé comportant des cellules allongées (fibroblastes) avec un cytoplasme mal délimité éosinophile et un noyau fusiforme (à des extrémités effilés), ondulés parfois. On a noté l'absence d'infiltrat inflammatoire. Le derme surmonte un hypoderme, qui est un tissu conjonctivo-graisseu.

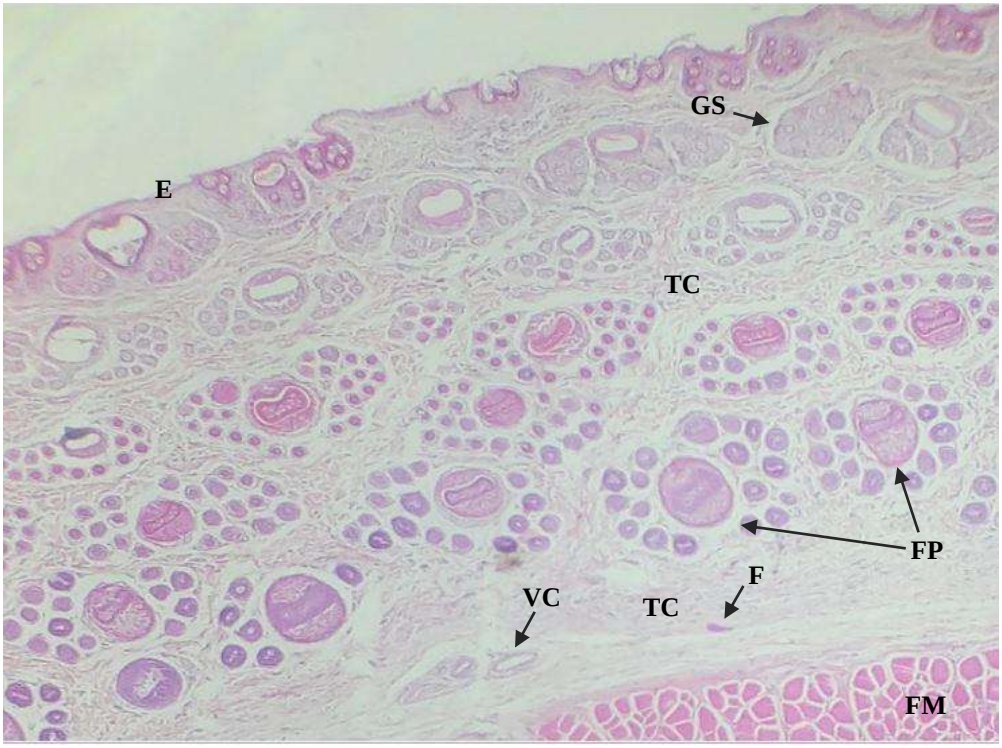


Figure 4. 22 Coupe histologique d'une partie de peau normale saine. E: Epiderme. GS: Gland sudoripare. TC: Tissu conjonctif. FP : Follicules pileux. F : Fibroblaste VC : Vaisseau capillaire. FM : Faisceau musculaire.

- **Après 4 jours**

Les coupes histologiques de la plaie de groupe non-traité a montré, un revêtement cutané ulcéré en surface, siège d'une perte de substance comblé par un tissu fibrino-leucocytaire. Le derme, siège d'un infiltrat inflammatoire diffus composé de lymphocytes et polynucléaires

neutrophiles. Les cellules fibroblastiques sont d'abondance et de morphologie normale avec une congestion vasculaire à ce niveau.

Dans le groupe traité par la pommade de kéfir, on a remarqué en surface, la présence d'un revêtement cutané ulcéré avec la présence d'un dépôt bleuâtre correspond aux actinomycoses surmontant un derme siège d'infiltrat inflammatoire et contient des histiocytes (cellulesphagocytaires ont des noyaux claires avec un cytoplasme granuleux).

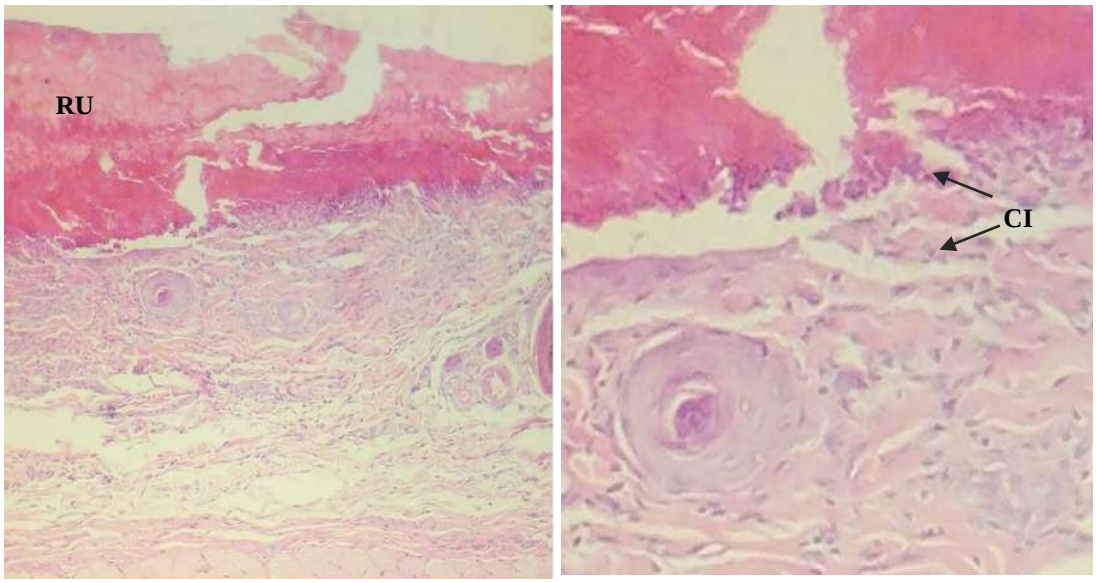


Figure 4. 24 Coupe histologique de plaie de groupe non-traité après 4 jours. RU: Revêtement ulcérée. CI : Cellules inflammatoires

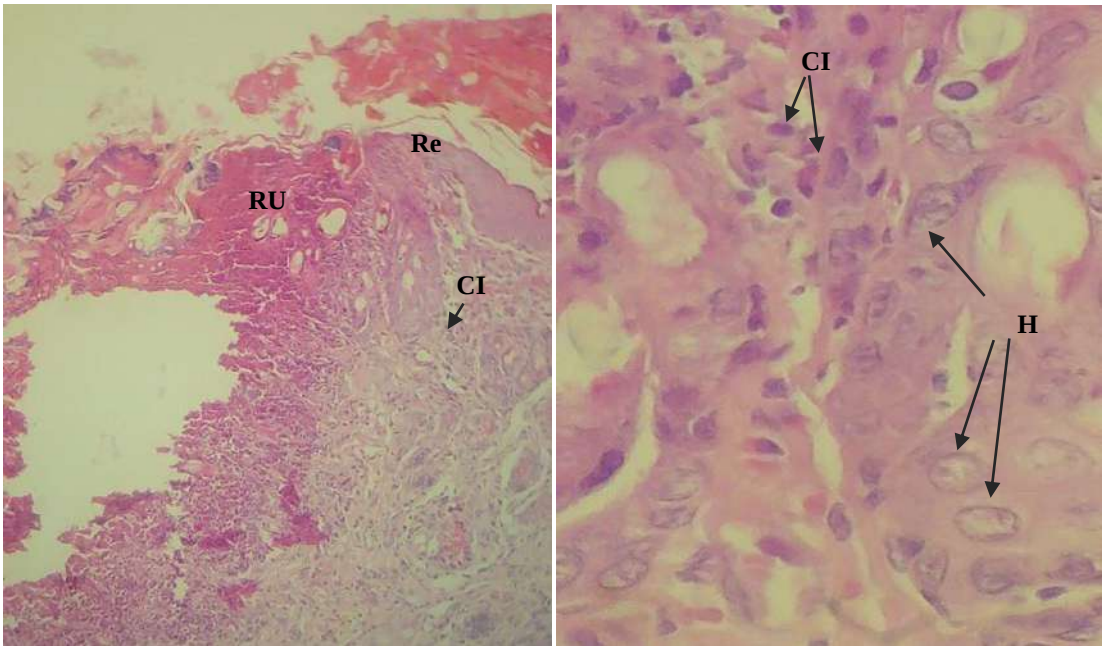


Figure 4. 23 Coupe histologique de plaie de groupe traité après 4 jours. Re : Re-épithélisation. RU : Revêtement ulcérée cutanée. CI : Cellules inflammatoires, H : Histiocytes.

- **Après 10 jours**

L'analyse microscopique des coupes histologiques de groupe non-traité a montré un derme, siège d'un infiltrat inflammatoire occupe un foyer étendu 4 mm^2, très dense et composé de lymphocytes, plasmocytes et de polynucléaires

Dans l'observation des coupes histologiques de groupe traité, on a trouvé un Epithélium stratifié malpighien kératinisé surmontant un derme, siège d'une fibrose cicatricielle modéré, résultant d'un processus émanant des myofibroblastes et des fibroblastes entre lesquels une substance collagénique modéré, avec un infiltrat inflammatoire discret de type lympho-plasmocytaire. Les vaisseaux capillaires sont discrètement congestifs, les follicules pileux et les annexes sudoripares sont absents sur ce derme fibreux.

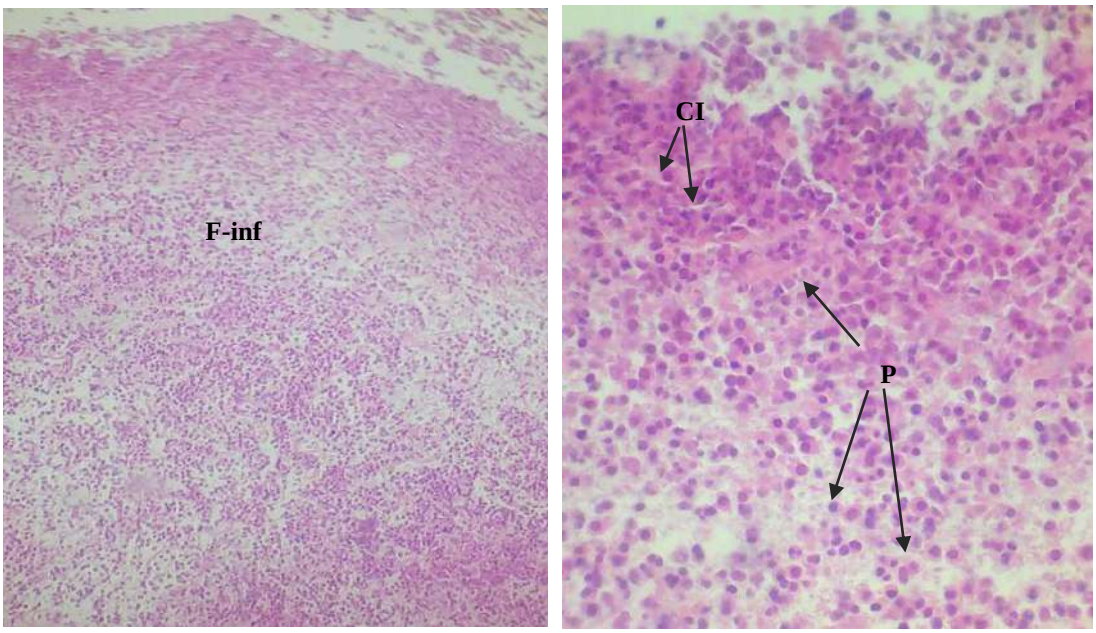


Figure 4. 25 Coupe histologique de plaie de groupe non-traité après 10 jours. F-inf : Foyer inflammatoire. CI : Cellules inflammatoires, P : Plasmocyte.

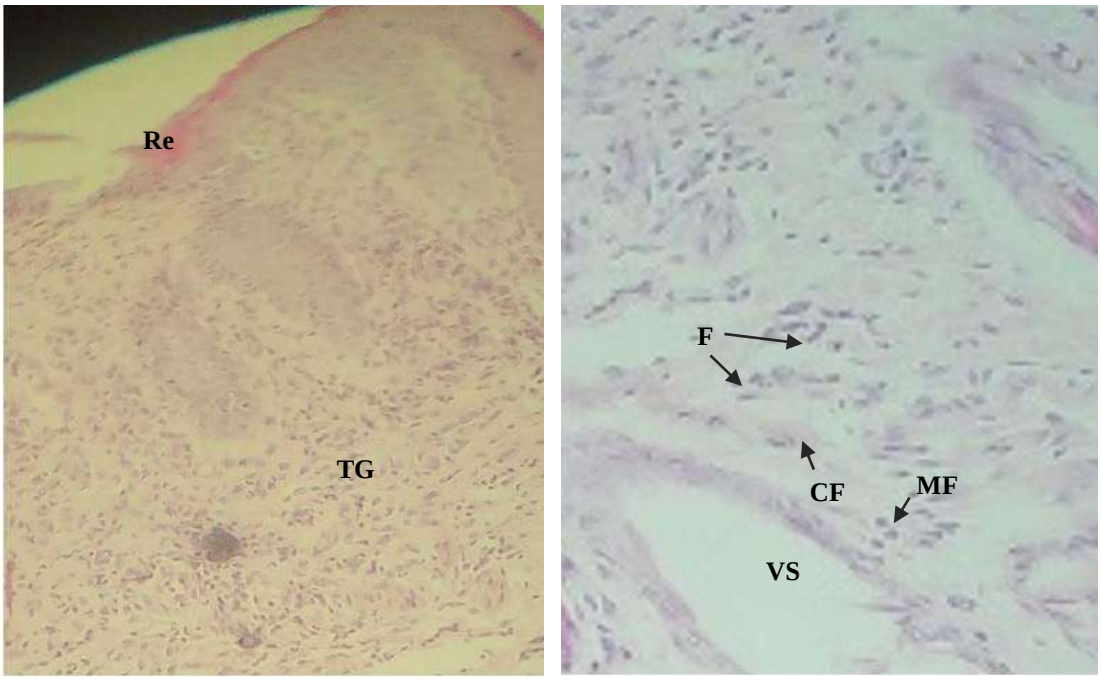


Figure 4. 26 Coupe histologique de plaie de groupe traité après 10 jours. Re : Re-épithilisation. F : Fibroblastes. CF : Collagène fibrillaire. VS : vaisseau sanguin. MF : Myofibroblaste. T : Tissu de granulation

- **Après 14 jours**

Dans Les coupes histologiques de groupe non-traité, on a observé un épithélium stratifié malpighien kératinisé, surmontant un derme superficiel (papillaire), dont l'infiltrat inflammatoire est discret de type lympho-plasmocytaire et des faisceaux de collagène de morphologie et d'abondance normale. Le derme moyen est le siège d'un foyer inflammatoire étendu (Abcès en voie de collection), composé de cellules lympho-plasmocytaires, entourées d'une fibrose formée de plusieurs fibroblastes et de capillaires congestifs.

Dans l'analyse microscopique des coupes histologiques de groupe non traité, on a remarqué la présence d'un revêtement cutané composé d'un épithélium stratifié malpighien kératinisé surmontant un derme, siège d'un foyer cicatriciel fibreux avec un discret infiltrat inflammatoire lympho-plasmocytaire. On a remarqué que la fibrose est tantôt disposée en faisceaux composés de cellules fibroblastiques, tantôt composée de faisceaux élastiques ondulés. Ils ont été observés quelques follicules pileux au sein de ce derme, les vaisseaux capillaires sont rares avec absence de polynucléaires neutrophiles

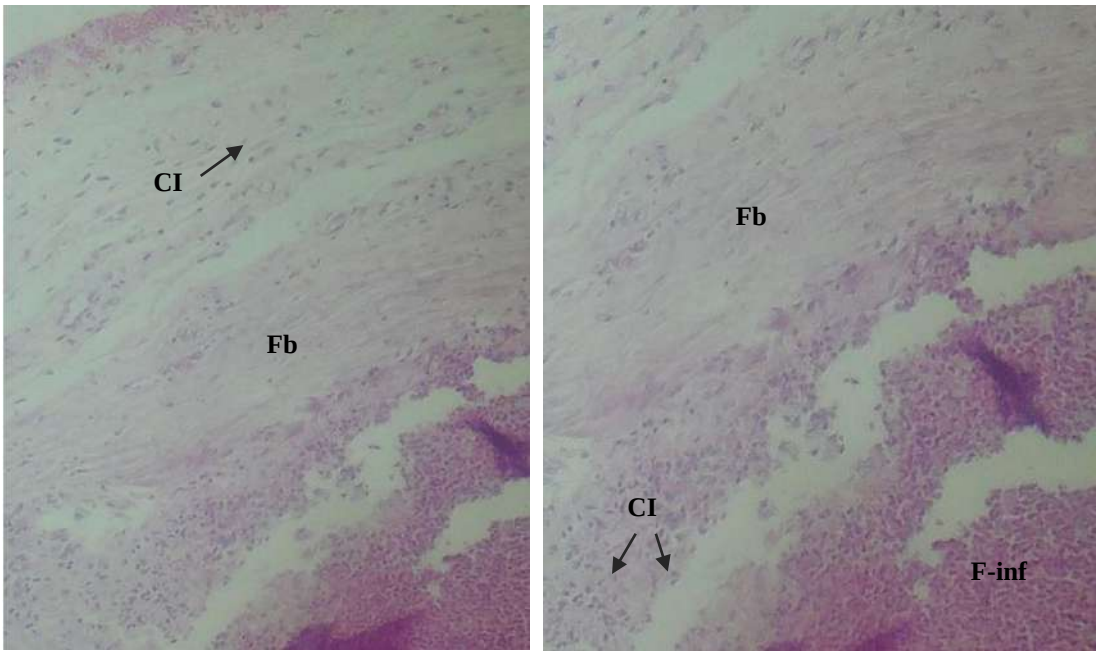


Figure 4. 27 Coupe histologique de plaie de groupe non-traité après 14 jours. F-inf : Foyer inflammatoire. CI : Cellules inflammatoires, Fb : Fibrose

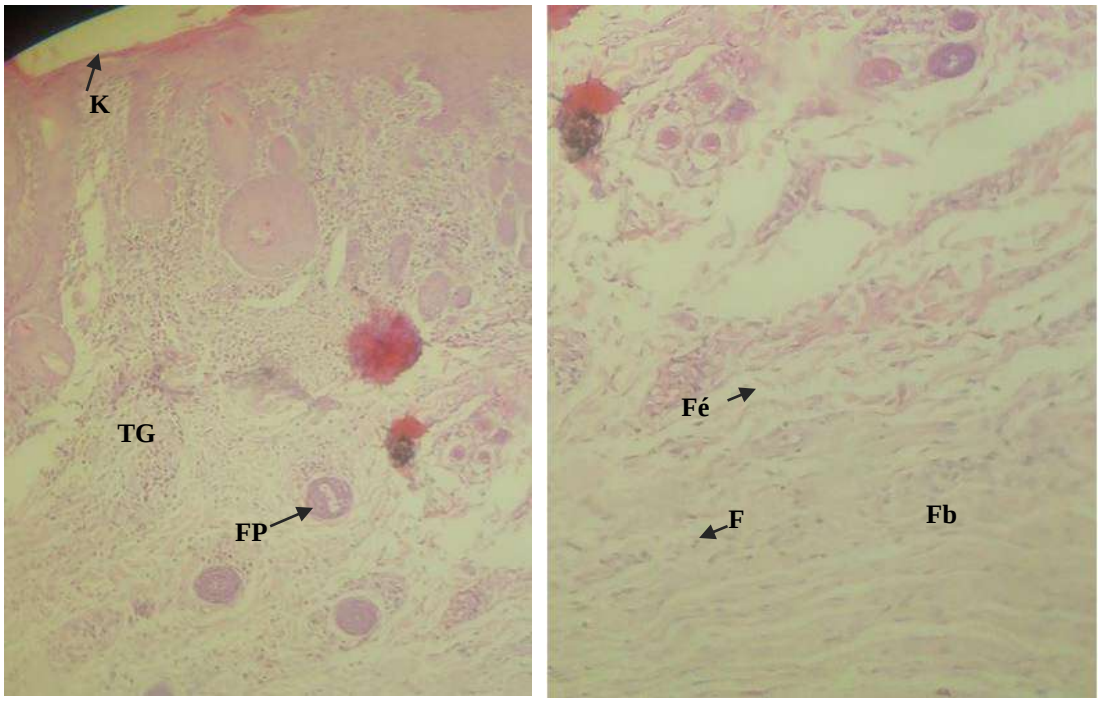


Figure 4. 28 Coupe histologique de plaie de groupe traité après 14 jours. K : kératinocytes. FP : Follicules pileux. F: Fibroblastes. TG : Tissue de granulation. Fé : Faisceaux élstiques. Fb : Fibrose

- **Après 21 jours**

Les coupes histologiques de groupe control négatif a montré un épiderme composé d'un épithélium stratifié malpighien kératinisé, surmontant un derme superficiel comporte une légère fibrose sans évidence de cellules inflammatoires. Le derme moyen est le siège d'un foyer bien délimité, composé de lympho-plasmocytes (formation d'un abcès), entouré par une bande fine fibreuse composée de cellules fibroblastiques régulières.

Dans les coupes histologiques de groupe traité avec le kéfir, on a observé un revêtement cutané composé d'un épithélium stratifié malpighien kératinisé surmontant un derme conjonctivo-fibreux régulier comportant des annexes pileux et on a remarqué absence d'inflammation sur les différentes couches du derme.

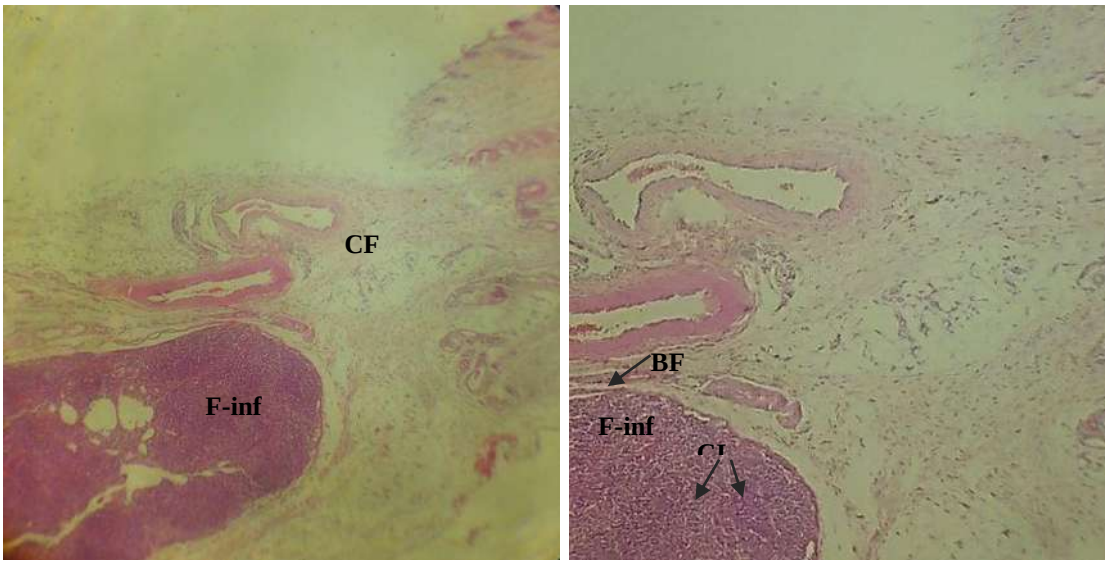


Figure 4. 29 Coupe histologique de plaie de groupe non-traité après 21 jours. F-inf : Foyer inflammatoire. CI : Cellules inflammatoire. BF : Bande fibreuse. CF : Collagène fibrillaire.

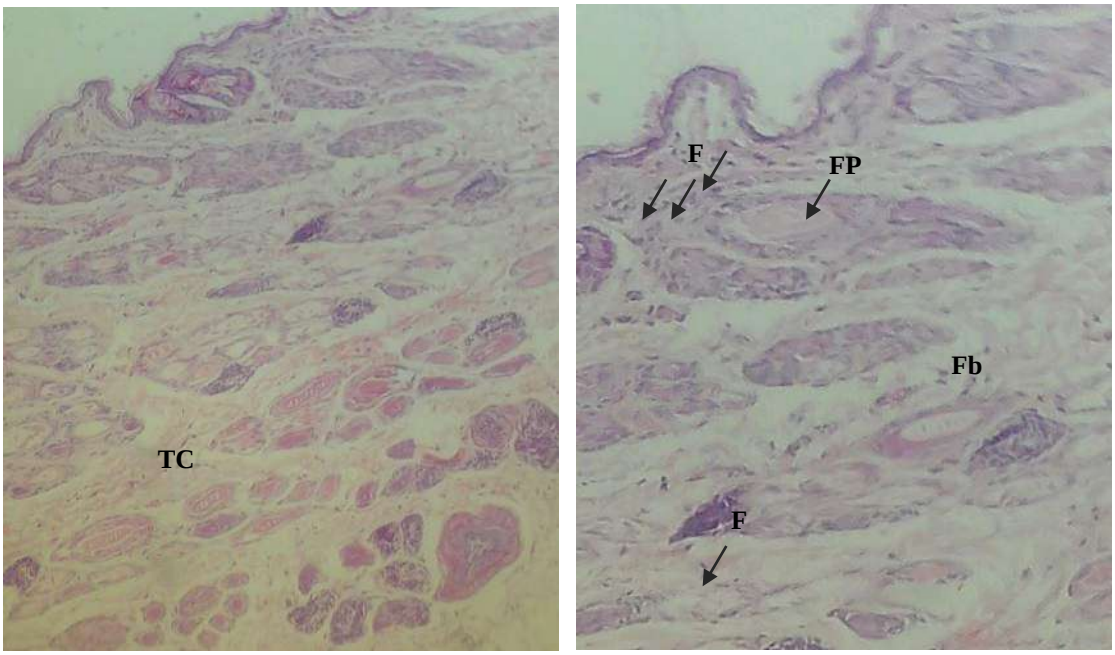


Figure 4. 30 Coupe histologique de plaie de groupe traité après 21 jours. E: Epiderme. FP : Follicules pileux. F: Fibroblastes. TC : Tissue conjonctif. Fb : Fibrose

Les infections à *Staphylococcus aureus* sont souvent difficiles à éradiqué puisque elles développent une résistance aux antibiotiques (Gan, 2002) Par conséquent, cet organisme est l'une des complications plus graves observés dans des plaies chirurgicales (Hassan. 2012). Les probiotiques ont été principalement utilisés pour traiter les troubles gastro-intestinaux (Witthuhn *et al.* 2005). Cependant, leur capacité de sécréter les acides, les bactériocines et autres produits qui peuvent neutraliser l'infection causée par les agents pathogènes, et le fait que les probiotiques peuvent améliorer les réponses inflammatoires et immunitaires chez l'hôte affirment qu'ils peuvent être utilisé comme un traitement pour les infections cliniques dans d'autres parties du corps (Assadi, 2000; Farnworth, 2006). L'une des principales résultats de cette étude, envisager l'application de la pommade du kéfir sur les plaies infectées chez les lapins.

La cicatrisation cutanée est un phénomène complexe implique 3 phases, La première phase, appelée phase inflammatoire, sert à stopper le saignement et à nettoyer la plaie des bactéries et des résidus de peau, Puis la phase de réparation comprend la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, la multiplication des fibroblastes pour combler la plaie, et la construction de nouveau épiderme à partir des bords de la blessure. Enfin, les tissus sous-cutanés sont remodelés pour augmenter la densité et la résistance de la peau.

Comme il a été observé dans le groupe de contrôle, le taux de contraction de la plaie était faible, le processus d'inflammation a été plus intense et a pris beaucoup de temps et à la fin la formation d'un abcès sous-cutané. Cette étude a montré que l'application cutanée de kéfir a entraîné une amélioration dans le taux de contraction de plaie. Ces résultats indiquent clairement l'effet du kéfir pour accélérer la cicatrisation des blessures.

En examens histologiques, les cellules inflammatoires diminué après le 4éme jour dans les blessures du groupe traité par le kéfir, en raison de propriétés antimicrobiennes de kéfir. Depuis le kéfir stimulé et accéléré l'activité de cellules inflammatoires, ces dernières ont interagi avec les fibroblastes, augmenter la déposition du collagène, et accélérer la ré-épithélisation qui a finalement conduit à une cicatrisation plus rapide.

Selon (Atalan *et al.* 2003 ; Kamila *et al.* 2005 Rahimzadeh *et al.* 2014 : Rodrigues *et al.* 2004) nombreuses études ont présenté l'application cutanée de kéfir sur les plaies infectées et les plaies causées par des brûlures. (Kamila et al. 2005) a mené une étude sur les rats, ces derniers ont été traités par une suspension de kéfir préparé à partir des grains sèches. Les

résultats ont montré des propriétés cicatrisantes comparés à ceux qui ont été traités par l'émulsion de clostébol-néomycine. De même, Rodrigues *et al.* (2004) a également montré que le kéfir avait les propriétés à la cicatrisation de blessures thermiques. Pourtant, les mécanismes de la cicatrisation et les effets antimicrobiens restent obscurs. Cependant, plusieurs études ont démontré que les Lactobacillus ont la capacité pour inhiber certains agents pathogènes de se lier aux cellules épithéliales (Gan et al 2002). Alors que d'autres études de (Santos et al 2003: Heydri et al. 2011 ; Halper J*et al* 2003) ont attribué ses activités antimicrobiennes et cicatrisantes à la présence d'un mélange d'acides organiques tels que l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide hyaluronique et autres acides.

Weindl et al (2004) et Gariboldi et al. (2008) ont rapporté que les effets positifs de l'acide hyaluronique sur les blessures sont dues à ses effets anti-inflammatoires. Il a été prouvé que l'acide hyaluronique peut améliorer l'hydratation de la peau et sa élasticité, aussi aide à la cicatrisation des plaies et de réguler la quantité de production de cytokines pro-inflammatoires (taylor et al 2004). D'autres chercheures ont étudié les activités antimicrobiennes de l'acide acétique et l'acide lactique (Nagoba et al. 2008 ; Heseini et al 2012) et (Smith et al. 1996) ont évalué et déterminé les effets de l'acide lactique sur le remodelage des cellules épidermiques et les cellules et tissus cutanée, modulation angiogenèse, la sécrétion de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire et la sécrétion de cytokines.

CHAPITRE 5

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

1 Conclusions

Les principaux objectifs de cette étude étaient d'établir l'activité antimicrobienne de kéfir et sa polysaccharide, d'évaluer les propriétés des bactéries lactiques isolées de kéfir comme probiotiques, et l'utilisation du kéfir contre les infections cutanées.

La présence et la distribution des micro-organismes en grains de kéfir a été étudiés dans cette étude. Les résultats de l'examen microbiologique du kéfir ont confirmé la présence de levures et bactéries lactiques dans les grains de kéfir d'eau ainsi que dans les grains de kéfir du lait. En outre, les bactéries lactiques spécifiquement les Lactobacillus, ont été identifiés phénotypiquement et la présence de trois espèces, *Lactobacillus delbrueckii subs Lactis*, *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus hilgardii a* été déterminée.

Concernant l'exo-polysaccharide, Kefiran pouvait être récupéré et extraite du deux grains de kéfir par extraction éthanolique, l'exo-polysaccharide va être précipité lorsque l'éthanol est ajouté puis dissous dans l'eau chaud et stérile. Ce résultat démontre la capacité des micro-organismes de kéfir à produire le polysaccharide.

D'autres résultats de cette étude ont montrés que les isolats des bactéries lactiques de kéfir ont des potentiels de probiotiques. Comme ces isolats étaient tolérés à un faible niveau de pH 2,5, et de bile jusqu'à 0,3 %, ce qui a confirmé leur capacité de survivre dans les conditions

acides de l'estomac. Cela démontre que les bactéries lactiques isolées de kéfir sont capables de survivre au niveau de l'appareil digestif et la coloniser.

L'un des principaux critères de probiotiques est l'inhibition d'autres bactéries pathogènes, les surnageants de kéfir et le kefiran ont apparu comme des inhibiteurs pour nombreux microorganismes pathogènes tels que *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, E.coli, Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*. Les tests antimicrobiens sur différents organismes ont prouvé que les bactéries Gram positives étaient plus sensibles au kéfir et kefiran par rapport à celles de Gram négatifs. En plus, il a été déterminé que l'activité antimicrobienne était affectée par la période de fermentation et les substrats utilisés au cours de la fermentation.

Bien que le traitement des plaies a été amélioré pendant les dernières décennies, les cas chroniques, surtout celles associées aux infections bactériennes, sont encore difficiles à traiter. Par conséquent, il existe un grand désir d'améliorer les méthodes de traitement. Cette étude déterminée l'effet de pommade de kéfir sur les plaies infectées chez les lapins. L'évaluation macroscopique et les examens histologiques ont confirmé que il y a un effet de la pommade sur la contraction de plaie, comme il y avait une diminution significative de l'inflammation et l'accélération de la cicatrisation chez les animaux traités par le kéfir en comparé à ceux non traités.

2 Perspectives

Grâce à cette thèse est possible de reconnaître que beaucoup de travail reste encore à faire et plusieurs parties ont besoin d'être étudié.

Les grains de kéfir du Lait et l'eau sont une association de différentes bactéries lactiques, bactéries acétiques et levures. Ces grains sont différentes structurellement, chimiquement et microbiologiquement. Donc il nécessite d'autres études pour déterminer ces différences et d'étudier les interactions et la coexistence entre ces micro-organismes.

Les grains de kéfir sont un mélange complexe de micro-organismes. La croissance des microorganismes est influencée par de nombreux paramètres tels que la température, le pH, les substrats et la durée de l'incubation, qui a fini par influencer sur leur variété, de la viabilité et

de leurs métabolites. Il serait intéressant d'analyser les effets de différents paramètres physiologiques sur la croissance du micro-organisme de kéfir et leurs métabolites,

Les principaux critères de bactéries lactiques comme souches probiotiques ont été déterminés et les isolats sélectionnés ont été identifiés. Par conséquent, il exige d'autres futures études qui devraient être effectuées pour utiliser ces isolats de manière fiable. Il peut être utile pour tester les caractéristiques suivantes telles que l'adhérence à la surface des muqueuses, des études cliniques pour la santé humaine et leurs propriétés technologiques (la stabilité des souches, la viabilité dans les produits, résistance aux bactériophages).

En se basant sur cette étude, et pour bien comprendre l'activité antimicrobienne de kéfir, il est recommandé de déterminer les acides organiques, les bactériocines et les exopolysaccharides comme le kefiran, produisent par les microorganismes du kéfir. Il serait nécessaire de déterminer les mécanismes de l'activité antibactérienne contre les bactéries pathogènes et les champignons. De plus, la purification des métabolites, les bactériocines et les exopolysaccharides est nécessaire pour déterminer et évaluer leur activité comme bio-préservatives.

Cette étude notée le potentiel d'une application cutanée de kéfir *in vivo* sur les plaies infectées chez les lapins. Bien que cette étude est l'une des nombreuses études qui ont suggéré l'application cutanée des probiotiques, mais cette dernière exige d'autres recherches pour confirmer l'effet de kéfir sur le mécanisme de cicatrisation.

BIBELIOGRAPHIE

Abraham, A. G. (1999). Characterization of kefir grains grown in cows' milk and in soya milk. . *Journal of Dairy Research*, 66(02), 327-333.

Alvarez-Martin, P., Florez, A. B., Hernández-Barranco, A., & Mayo, B. (2008). Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. *Food Control*, *19*(1), 62-70.

Allison, M. J. (1978). Production of branched-chain volatile fatty acids by certain anaerobic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(5).

Angulo, L. L. (1993). Microflora present in kefir grains of the Galician region (North-West of Spain). *Journal of Dairy Research,*, 60(02), 263-267.

Aslim, B. Y. (2005). Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. . *LWT-Food Science and Technology*, 38(6), 691-694.

Assadi, M. M. (2000). Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. . *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(6), 541-543.

Atalan, G., Demirkan, I., Yaman, H., & Cina, M. (2003). Effect of topical kefir application on open wound healing on in vivo study. *Kafkas Univ Vet Fak Dderg*, *9*(1), 43-7.

Axelsson. L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. *In* Lactic acid bacteria, *Microbiological and Functional Aspect.* Third Edition. Marcel Dekker.

Baba, H. M. (2010). Oral intake of Lactobacillus helveticus-fermented milk whey decreased transepidermal water loss and prevented the onset of sodium dodecylsulfate-induced dermatitis in mice. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74(1), 18-23.

Badis. A, Laouabdia-Sellami. N, Guetarni. D, Kihal. M et Ouzrout. R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées a partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "Arabia et Kabyle". Sciences & Technologie C – N°23, Pp. 30-37.

Bensmira, M., & Jiang, B. (2012). Rheological characteristics and nutritional aspects of novel peanut based kefir beverages and whole milk kefir. *International Food Research Journal*, *19*(2), 647-650.

Botelho, P. S. (2014). Characterisation of a new exopolysaccharide obtained from of fermented kefir grains in soymilk. . *Carbohydrate polymers* , 107, 1-6.

Carr. F. J, Chill. D, et Maida. N. (2002).The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. Critical Reviews in Microbiology, 28(4):281–370.

Carrau, F. M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P. a, & Dellacassa, E. (2008). Production of fermentation aroma compounds by Saccharomyces cerevisiae wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS yeast research, 8(7),* 1196–1207.

Caspi, R. F. (2008). The MetaCyc Database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. Nucleic acids research, . *Nucleic acids research*, 36(suppl 1), D623-D631.

Cebra, J. J. (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. *The American journal of clinical nutrition*, 69(5), 1046s-1051s.

Cheirsilp, B. &. (2011). Use of whey lactose from dairy industry for economical kefiran production by Lactobacillus kefiranofaciens in mixed cultures with yeasts. *New biotechnology*, 28(6), 574-580.

Chen, Y. P., Hsiao, P. J., Hong, W. S., Dai, T. Y., & Chen, M. J. (2012).Lactobacillus kefiranofaciens M1 isolated from milk kefir grains ameliorates experimental colitis in vitro and in vivo. *Journal of dairy science*, *95*(1), 63-74

Conway, P. L., Gorbach, S. L., & Goldin, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of dairy science*, *70*(1), 1-12.

Çakır, İ. (2010). Antibacterial and antifungal activities of some lactic acid bacteria isolated from naturally fermented herbs. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, *8*(2), 223-226.

De LeBlanc, A. D. (2007). Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer model. *Journal of dairy science*, 90(4), 1920-1928.

Demirhan, E., Apar, D. K., Payer, G., & OeZBEK, B. E. L. M. A. (2011). A modelling study on kefir grain biomass growth: Influence of various minerals. *International journal of dairy technology*, 64(3), 402-407.

Diniz, R. O. (2003). Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix. *Pharmacological research*, 47(1), 49-55.

Duitschaever, C. L., Kemp, N., & Emmons, D. (1987). Pure culture formulation and procedure for the production of kefir. *Milchwissenschaft*, *42*(2), 80-82.

Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., Feeney, M., ... & Kiely, B. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (pp. 279-292). Springer Netherlands.

Ewaschuk, J. B., Diaz, H., Meddings, L., Diederichs, B., Dmytrash, A., Backer, J., ... & Madsen, K. L. (2008). Secreted bioactive factors from Bifidobacterium infantis enhance epithelial cell barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *295*(5), G1025-G1034.

Elmer, G. W. (1996). Biotherapeutic agents: a neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *Jama*, 275(11), 870-876.

Farnsworth. (2008). *The evidence to support health claims.* J Nutr 138:1250S.

Farnworth, E. R. (2006). *Kefir-a complex probiotic.* Food Science and Technology Bulletin: Fu, 2(1).

FAO/OMS. (2001). « Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes. Cordoba, Argentine .

FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.

G, R. (2008). *Probiotics and prebiotics: progress and challenges.* Int Dairy J 18:969–975.

Gan, B. S. (2002). Lactobacillus fermentum RC-14 inhibits Staphylococcus aureus infection of surgical implants in rats. . *Journal of infectious Diseases*, 185(9), 1369-1372.

Garrote, G. L. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. . *Journal of dairy research*, 68(04), 639-652.

Güzel-Seydim, Z. B. (2000). Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. *Journal of Food composition and Analysis*, 13(1), 35-43.

Guiraud. J-P et Rosec J-P. (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR.

Gariboldi, S., Palazzo, M., Zanobbio, L., Selleri, S., Sommariva, M., Sfondrini, L., ... & Rumio, C. (2008). Low molecular weight hyaluronic acid increases the self-defense of skin epithelium by induction of β-defensin 2 via TLR2 and TLR4. *The Journal of Immunology*, *181*(3), 2103-2110

Halper, J., Leshin, L. S., Lewis, S. J., & Li, W. I. (2003). Wound healing and angiogenic properties of supernatants from Lactobacillus cultures. *Experimental Biology and Medicine*, *228*(11), 1329-1337

Hammes. W.P, et Vogel. R.F. (1995). The genus *Lactobacillus*. In The Genera of Lactic Acid Bacteria; Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H., Eds.; Chapman & Hall: London, 19–54.

Hertzler, S. R. (2003). Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*, 103(5), 582-587.

Hartke, A., Bouche, S., Gansel, X., Boutibonnes, P., & Auffray, Y. (1994).Starvation-induced stress resistance in Lactococcus lactis subsp. lactis IL1403. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(9), 3474-3478

Hirshfield, I. N., Terzulli, S., & O'Byrne, C. (2003). Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria. *Science progress*, *86*(4), 245-269.

Horisberger, M. (1969). Structure of the dextran of the tibi grain. . *Carbohydrate Research*, 10(3), 379-385.

Huseini, H. F., Rahimzadeh, G., Fazeli, M. R., Mehrazma, M., & Salehi, M. (2012). Evaluation of wound healing activities of kefir products. *Burns*, *38*(5), 719-723.

Isolauri. E, Salminen. S, et Ouwehand, A. C. (2004). Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. Best Pract Res Clin Gastroenterol 18, 299-313.

Irigoyen, A. A. (2005). Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. . *Food Chemistry*, 90(4), 613-620.

Jiménez-Díaz, R. R.-S.-B. (1993). Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by Lactobacillus plantarum LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology,* , 59(5), 1416-1424.

Jeantet, R., Croguennec, T., Schuck, P., Brulé, G., Hernandez Ledesma, B. A. G., Lourdes, R. S., ... & de las Cortes, M. (2007). *Ciencia de los alimentos: bioquímica, microbiología, procesos, productos* (No. 664). e-libro, Corp..

Kimoto-Nira, H., Kobayashi, M., Nomura, M., Sasaki, K., & Suzuki, C. (2009). Bile resistance in Lactococcus lactis strains varies with cellular fatty acid composition: analysis by using different growth media. *International journal of food microbiology*, *131*(2), 183-188.

Kilstrup, M., Jacobsen, S., Hammer, K., & Vogensen, F. K. (1997). Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in Lactococcus lactis. *Applied and environmental microbiology*, *63*(5), 1826-1837.

Kandler. O. (1984). Current taxonomy of lactobacilli. Dev. Ind. Microbiol. 1984, 25, 109– 123.

Kabak, B. &. (2011). An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. *Critical reviews in food science and nutrition, ,* 51(3), 248-260.

Karska-Wysocki, B. B. (2010). Antibacterial activity of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). . *Microbiological research*, 165(8), 674-686.

Kosikowski, F. V. (1997). *Cheese and fermented foods.*

Kooiman, P. (1968). The chemical structure of kefiran, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. *Carbohydrate Research*, *7*(2), 200-211.

Laughton, J. M. (2006). Inhibition of expression of a staphylococcal superantigen-like protein by a soluble factor from Lactobacillus reuteri. *Microbiology.*, 152(4), 1155-1167.

Lebeer, S. V. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 728-764.

Lee, M. Y. (2007). Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. . *Immunobiology,*, 212(8), 647-654.

Leite, A. M. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. . *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 3.

Lindwall, S., & Fonden, R. (1984). Passage and survival of Lactobacillus acidophilus in the human gastrointestinal tract. *Bulletin-Federation Internationale de Laiterie (Belgium)*.

Liu, C. B. (2011). Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. *Clinical infectious diseases, ,* 52(3), e18-e55.

Liu, J. R. (2006). Liu, J. R., Wang, S. Y., Chen, M. J., Chen, H. L., Yueh, P. Y., & Lin, C. W. (2006). Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soyamilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. *British journal of nutrition* , 95(05), 939-946.

Lopitz-Otsoa, F. R. (2006). Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. . *Rev Iberoam Micol,*, 23(2), 67-74.

Lues, M. T. (2011). Organic Acids and Food Preservation. . *CRC PressTaylor & Francis Group*, 21-44.

Maragkoudakis, E., Realdi, G., & Dore, M. P. (2005). Fungal infections of the gastrointestinal tract. *Recenti progressi in medicina*, *96*(6), 311.

Mukai, T. T. (1991). Some taxonomical characteristics of encapsulated Lactobacillus sp. KPB-167B isolated from kefir grains and characterization of its extracellular polysaccharide. *International journal of food microbiology*, 13(4), 257-264.

Mullin, W. J. (1997). Determination of organic acids and sugars in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography. . *Food research international*, 30(2), 147-151.

Norsker, N. H. (2011). Microalgal production—a close look at the economics. . *Biotechnology advances*, 29(1), 24-27.

Nagoba, B. S., Gandhi, R. C., Wadher, B. J., Potekar, R. M., & Kolhe, S. M. (2008). Microbiological, histopathological and clinical changes in chronic infected wounds after citric acid treatment. *Journal of medical microbiology*, *57*(5), 681-682.

Okda, A. Y, Yahia H A. (2013). Antibacterial activity of kefir cuttural metabolites against some food-borne pathogens and their survival in kefir-tallaga chesse. *Journal of applied sciences research. 9(6).* 4114-4124.

Otles, S. &. (2003). Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. . *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(2), 54-59.

Pogačić, T. Š. (2013). Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo,*, 63(1), 3-14.

Piermaria, J. A., Mariano, L., & Abraham, A. G. (2008). Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*, *22*(8), 1520-1527.

Prado-Acosta, M. R. (2010). Synergistic effects of the Lactobacillus acidophilus surface layer and nisin on bacterial growth. . *Applied and environmental microbiology*, 76(3), 974-977.

Prescott. L. M, Harley. J. P, Klein. D. A, Bacq-Calberg C-M, Dusart. J. (2003).Microbiologie. Deboeck.

Rahimzadeh¹, G., Dolatabad, S. S., & Rostami, F. F. (2014). Comparison of two types of gels in improving burn wound. *A. General Policy*, 28

Raja, A., Gajalakshmi, P., Raja, M. M. M., & Imran, M. M. (2009). Effect of Lactobacillus lactis cremoris isolated from kefir against food spoilage bacteria. *Am. J. Food Technol*, *4*, 201-209.

Rattray, F. P. (2011). Fermented milks kefir. *Encyclopedia of dairy sciences*, 2, 518-524.

Reid. (2008). *Probiotics and prebiotics: progress and challenges.* Int Dairy J 18:969–975.

Rice, K. C., & Bayles, K. W. (2008). Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiology and Molecular Biology reviews*, *72*(1), 85–109, table of contents.

Rimada, P. S., & Abraham, A. G. (2006). Kefiran improves rheological properties of glucono-δ-lactone induced skim milk gels. *International Dairy Journal*, *16*(1), 33-39.

Rodrigues, K. L. (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *International journal of antimicrobial agents,*, 25(5), 404-408.

Rolfe, R. D. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of nutrition*, *130*(2), 396S-402S.

Ruas-Madiedo, P. H. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. . *International Dairy Journal*, 12(2), 163-171.

Ryan, M. P. (1996). An application in cheddar cheese manufacture for a strain of Lactococcus lactis producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 612-619.

Sanders, M. E. (1999). Probiotics. *Food technology*, *53*(11), 67-77.

Sahi, T. (1994). Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. . *Scandinavian Journal of Gastroenterology* , 29(sup202), 7-20.

Sako, T. M. (1999). Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. . *International Dairy Journal* , 9(1), 69-80.

Santos, A. S. (2003). The antimicrobial properties of different strains of Lactobacillus spp. isolated from kefir. . *Systematic and Applied Microbiology*, 26(3), 434-437.

Sarkar, S. &. (2008). Dynamics of open innovation in the food industry. . *Trends in Food Science & Technology*, 19(11), 574-580.

Schneedorf, J. M. (2004). Kefir, a probiotic produced by encapsulated microorganism and inflammation. Carvalho JCT.(ed.). . *Antiinfammatory phytotherapics (Portuguese)* , 443-467.

Silva, K. R. (2009). Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. . *Applied biochemistry and biotechnology, ,* 152(2), 316-325.

Simova, E. B. (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. . *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 1-6.

Sirirat, D., & Jelena, P. (2010). Bacterial inhibition and antioxidant activity of kefir produced from Thai jasmine rice milk. *Biotechnology*, *9*(3), 332-337.

Smith, W. P. (1996). Epidermal and dermal effects of topical lactic acid. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *35*(3), 388-391.

Stover, C. K. (2000). Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature, ,* 406(6799), 959-964.

Sultana, R., McBain, A. J., & O'Neill, C. A. (2013). Strain-dependent augmentation of tight-junction barrier function in human primary epidermal keratinocytes by Lactobacillus and Bifidobacterium lysates. *Applied and environmental microbiology*, *79*(16), 4887-4894.

Swagerty, D. L. (2002). Lactose intolerance. . *American family physician*, 65(9), 1845-1860.

Ulusoy, B. H., Çolak, H., Hampikyan, H., & Erkan, M. E. (2007). An in vitro study on the antibacterial effect of kefir against some food-borne pathogens. *Turk Mikrobiyol Cem Derg*, *37*(2), 103-107.

Urdaneta, Elena, et al. "Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats." *Nutrition research* 27.10 (2007): 653-658

Vanderhoof, J. A. (1999). Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. . *The Journal of pediatrics*, 135(5), 564-568.

Vescovo, M. S. (2006). Inhibition of Listeria innocua growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon. *Food microbiology* , 23(7), 689-693.

Wang, S. Y. (2012). Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. . *Food microbiology, ,* 32(2), 274-285.

Welman, A. D. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. . *Trends in biotechnology*, 21(6), 269-274.

Witthuhn, R. C. (2005). Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*, 15(4), 383-389.

Weindl, G., Schaller, M., Schäfer-Korting, M., & Korting, H. C. (2004). Hyaluronic acid in the treatment and prevention of skin diseases: molecular biological,

pharmaceutical and clinical aspects. *Skin Pharmacology and Physiology*, *17*(5), 207-213.

Yaman, H. U. (2006). The effect of a fermented probiotic, the kefir, on intestinal flora of poultry domesticated geese (Anser anser). . *Revue de médecine vétérinaire*, 157(7), 379-386.

Yüksekdağ, Z. N. (2004). Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefirs with natural probiotic. . *LWT-Food Science and Technology*, , 37(6), 663-667.

Yokoi, H., Watanabe, T., Fujii, Y., Mukai, T., Toba, T., & Adachi, S. (1991). Some taxonomical characteristics of encapsulated Lactobacillus sp. KPB-167B isolated from kefir grains and characterization of its extracellular polysaccharide. *International journal of food microbiology*, *13*(4), 257-264.

Yavuzdurmaz, H. (2007). Isolation, characterization, determination of probiotic properties of lactic acid bacteria from human milk.

Zacconi, C., Dallavalle, P., Vescovo, M., Parisi, M. G., & Scolari, G. (1995). Microbiological and chemical characterisation of'sugar grains'. *Annali di microbiologia ed enzimologia*, *45*, 27-36

Zhou, J. L. (2009). Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. . *Food microbiology*, 26(8), 770-775.

Zajšek, K., & Goršek, A. (2010). Modelling of batch kefir fermentation kinetics for ethanol production by mixed natural microflora. *Food and Bioproducts Processing*, 88(1), 55-60.

Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suàrez, V., Vinderola, G., ... & Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of Lactobacillus plantarum strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, *28*(5), 1033-1040.

Annexe A

Milieux de culture utilisés

Milieu MRS (De Man, Rogosa and Sharpe, 1960)

Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	10 g
Peptone	10 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de sodium	2 g
Glucose	20 g
KH_2PO_4	2 g
$MgSO_4$	0,25 g
MnSO4	0,05 g
Eau distillée	1000 ml

PH = 6,2

Autoclavage : 121°C pendant 15 minutes.

Gélose de SABOURAUD

Peptone pepsique de viande	10,0g
Glucose massé	20,0 g
Chloramphénicol	0,5 g
Agar agar bactériologique	15,0 g
Eau distillée	1 000 ml

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 5,7 ± 0,2.

Milieu Chapman

Peptone	10g
Extrait de viande	1g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol	10g
Rouge de phénol	0.025g
Agar	15g

pH 7.4 et Autoclavage 121°C, 15 minutes.

Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)

Infusion de viande de bœuf	3000 cm3
Peptone de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar-agar	17 g

pH=7.4

Autoclavage 121°C, 15 minutes.

Gélose Hektoen

Protéose peptone	12g
Extrait de levure	3g
Lactose	12g
Saccharose	12g
Salicine	2g
Citrate de fer III et d'ammonium	1.5g
Sels biliaires	9g
Chlorure de sodium	5g
Thiosulfate de sodium	5g
Fuschine acide	0.1g
Bleu de bromothymol	0.065g
Agar	14g
Eau distillée	1000mL

pH = 7,6 NE PAS AUTOCLAVER.

Gélose nutritive

Extrait de viande	5 g
Peptone	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g

pH = 7.4

Autoclavage 121°C, 15 minutes.

Gélose Tryptone-Soja

Tryptone	15 g
Peptone papaïnique de soja	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar bactériologique	15 g

pH final : 7,3 ± 0,2

Eau physiologique

Chlorure de sodium		8,5 g
Peptone		0,5 g
Eau distillée	1000mL	

pH=7

Autoclavage 121°C, 15 minutes.

Annexe B

Les techniques utilisées

Coloration de Gram :

La coloration de Gram est la méthode de coloration la plus utilisée en bactériologie médicale ; elle permet de colorer les bactéries et de les distinguer à l'examen direct par leur aptitude à fixer le violet de gentiane (Gram +) ou la fuschine (Gram -).

Cette coloration de Gram se réalise en 7 étapes :

- Etaler et sécher puis fixer le frottis à examiner
- plonger la lame dans le violet de gentiane (ou cristal violet) phéniqué et le laisser agir pendant 1 à 2 minutes puis Laver à l'eau distillée
- plonger la lame dans une solution de Lugol et le laisser agir 40 secondes puis rincer à l'eau déminéralisée.
- Verser goutte à goutte l'Alcool sur la lame inclinée. Laisser agir pendant 30 secondes puis Rincer à l'eau déminéralisée.
- plonger la lame dans la fuchsine pendant 1 minute puis rincer à l'eau déminéralisée.
- Sécher la lame en la tamponnant avec du papier Joseph puis mettre une goutte d'huile à immersion.
- Examiner sous un microscope électronique avec grossissement x100.

Coloration au Bleu De Méthylène

La coloration au bleu de méthylène (BM) est une coloration très simple qui permet d'observer les bactéries, les champignons, Elle permet de renseigner sur : la forme des bactéries, la taille, le mode de regroupement. Cette technique se réaliser par les étapes suivantes :

-Réaliser un frottis et le fixer.
- Recouvrir la lame de bleu de méthylène phéniqué, 1 à 2 minutes.
- Rincer abondamment à l'eau du robinet jusqu'à élimination des colorants en excès.
- Sécher la lame entre 2 feuilles de papier Joseph.
- Observer à l'objectif x100 à l'immersion dans l'huile et à pleine lumière.

Annexe C

Tableau des techniques histologiques

Etape	Produits	Nombre de bains	Temps	Température
Fixation	Formol 10%	/	21 jours	Ambiante
Déshydratation	Alcool à degré croissant 70° 95° 100°	 2 Bains 2 Bains 3 Bains	 10min/bain 10min/bain 15min/bain	Ambiante
Imprégnation	Butanol Paraffine+butanol (1V/1V) Paraffine pure	3 Bains 1 Bains 2 Bains	8h/bain 2h 2h/bain	Ambiante Etuve à 60°C Etuve à 60°C
Confection des blocs	Paraffine pure	/	/	Ambiante
Coupe et étalement (avec de l'eau gélatinée à 0.4%)				
Déparaffinage	Xylène	2 Bains	2min/bain	ambiante
Réhydratation	Alcool décroissant : 100° 95° 70° Eau distillée	 1 Bain 1 Bain 1 Bain 1 Bain	 2min 2 min 2min 2min	Ambiante
coloration	Hémalun-Eosine	/	/	Ambiante
Déshydratation	Alcool croissant 70° 95° 100° Xylène	 1 Bain 1 Bain 1 Bain 2Bains	 Quelques sec/bain	Ambiante
Montage entre lame/lamelle à l'aide de l'Eukitt				

Coloration de Hemalun Eosine

I. PRINCIPE :

Coloration des noyaux par une laque aluminique l'hemalun, et des fonds par un seul colorant acide : l'éosine.

II. REACTIFS :

- Hématoxyline de Harris :
- Eosine à 1.5 % E.D

III. MODE OPERATOIRE :

1. Déparaffiner :

- 5min xylène
- 7 min xylène

2. Hydrater :

- A 100° → 60 seconds à agitations.
- A 90° → 60 seconds à agitations.
- A 70° → 60 seconds à agitations.
- Eau Distillée 3 min

3. Coloration :

- L'hématine 30 seconds
- Laver pendant 3 minutes à l'eau courante (plusieurs bains)
- Colorer 4 min à l'eosine
- Rinçage à Eau distillée

4. Déshydrater :

- A 70° → 30 seconds à agitations.
- A 90° → 30 seconds à agitations.
- A 100° → 02 minutes à agitations.

5. Eclaircir :

- 5 min xylène
- 5 min xyléne

6. Monter : résine (Eukitt)

IV. RESULTATS :

NOYAU : Violet

FOND : Rose

Annexe D

Tableau 1 illustre les changements de pH pendant les fermentations.

Temps	Kéfir d'eau (sucre brun)	Kéfir d'eau (molasses)	Kéfir de lait
0	6.9	6.6	6.9
5	6.5	5.9	6.2
8	5.5	5.5	6
17	4.5	4.99	5.5
20	4.1	4.7	5
24	4.1	4.3	4.6
27	4	4.2	4.2
46	3.99	4.1	4
48	3.8	3.8	4
49	3.81	3.7	4
50	3.7	3.69	3.7
55	3.69	3.69	3.69
70	3.68	3.68	3.68
71	3.67	3.65	3.67
72	3.65	3.6	3.65
75	3.65	3.51	3.65

Tableau 2 de résultats des tests de tolérance des souches au pH 2.5 en fonction du temps (log UFC/mL).

Temps / souche	0	1	2	3
Lb-Delbrueckii	8.47	8.1	7.5	7.2
Lb-Paracasei	8.47	7.4	6.2	5.8
Lb-Hilgardii	8.49	8	7.2	6.9

Tableau 3 de résultats des tests de tolérance des souches au 0.3% bile en fonction du temps (log UFC/mL)

Temps / Souche	0	1	2	3	4
Lb-Delbrueckii	8.47	8.7	8.99	9	9.2
Lb-Paracasei	8.6	8.8	9.3	9.4	9.6
Lb-Hilgardii	8.8	9.2	9.8	10.1	10.3

Tableau 4 de résultats des tests de tolérance des souches au 0.3% bile en fonction du temps (UFC/mL)

Temps / souche	0	1	2	3	4
Lb-Delbrueckii	$2.95x10^8$	$5.01x10^8$	$9.77x10^8$	10^9	$1.58x10^9$
Lb-Paracasei	$3.98x10^8$	$6.30x10^8$	$1.99x10^9$	$2.51x10^9$	$3.98x10^9$
Lb-Hilgardii	$6.30x10^8$	$1.58x10^9$	$6.30x10^9$	$1.25x10^{10}$	$1.99x10^{10}$

Tableau 5 de résultats des tests de tolérance des souches au pH 2.5 en fonction du temps (UFC/mL).

Temps / souche	0	1	2	3
Lb-Delbrueckii	$2.95x10^8$	$1.25x10^8$	$3.16x10^7$	$1.58x10^7$
Lb-Paracasei	$2.95x10^8$	$2.51x10^7$	$1.58x10^6$	$6.30x10^5$
Lb-Hilgardii	$3.09x10^8$	$1x10^8$	$1.5x10^7$	$7.94x10^6$