

Survie des ferments du yaourt dans le tube digestif du lapin

Abdelkader DILMI-BOURAS^{a*}, Djamila SADOUN^b

^a Laboratoire de Microbiologie, Institut d'Agronomie, Université H.B. Chlef,
BP 151 Chlef, 02000, Algérie

^b Laboratoire de Microbiologie du lait, Institut des Sciences de la Nature,
Université de Bejaia, 06000, Algérie

(Reçu le 25 janvier 2001 ; accepté le 25 juin 2001)

Abstract – Survival of starters of yogurt in the digestive tract of rabbits. Yogurt presents a probiotic interest for the consumer. Most of its properties are linked to the ingestion of living lactic acid bacteria (starters), some of which can survive during the crossing of the digestive tract. Our study is based on this perspective. The results obtained show that *Streptococcus thermophilus* (*Sc. t.*) and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (*Lb. b.*) were relatively resistant to gastric acid, bile salts and intestinal flora. These starters were found at significant concentrations and at different levels of the digestive tract as the rabbits fed with a standard diet supplemented with yogurt (YB3). After stopping addition of the *Sc. t.* and *Lb. b.* yogurt to the diet of the rabbits, the number of *Sc. t.* and *Lb. b.* remained at an acceptable level for 24 h; the numbers were about 10^5 , 10^7 cells·mL⁻¹ and 10^7 cells·g⁻¹ wet faeces for the stomach, the duodenum and the large intestine, respectively.

***Sc. thermophilus* / *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* / gastric acid / bile salt / intestinal flora**

Résumé – Le yaourt présente un intérêt probiotique pour le consommateur. La plupart de ses propriétés sont liées à l'ingestion des ferments vivants, dont certains peuvent survivre lors de la traversée du tube digestif. C'est dans cette optique que notre étude a été réalisée. Les résultats obtenus montrent que *Streptococcus thermophilus* (*Sc. t.*) et *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (*Lb. b.*) sont relativement résistants à l'acidité gastrique, aux sels biliaires et à la flore intestinale. Ces ferments se retrouvent à des concentrations importantes, à différents niveaux du tube digestif, tant que les lapins consomment du yaourt. Après l'arrêt de l'ingestion du yaourt, la concentration de *Sc. t.* et de *Lb. b.* reste à un niveau acceptable, pendant 24 heures, avec une concentration voisine de 10^5 cellules·mL⁻¹ au niveau de l'estomac, 10^7 cellules·mL⁻¹ au niveau du duodénum et 10^7 cellules·g⁻¹ de fèces au niveau du gros intestin.

***Sc. thermophilus* / *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* / acide gastrique / sel biliaire / flore intestinale**

* Correspondance et tirés-à-part

Tél. : 027 72 18 28 ; Fax : 027 72 17 88 ; e-mail : dilmiba@yahoo.fr

1. INTRODUCTION

Notre alimentation n'est pas stérile et, en mangeant, nous ingérons un certain nombre de microorganismes. La quantité ingérée reste toutefois dérisoire par rapport au nombre de bactéries présentes dans le tube digestif. Généralement, la flore intestinale protège l'organisme des germes pathogènes qui peuvent provenir de l'alimentation. De même que les pH bas et la bile diminuent la survie de la majorité des bactéries [8]. Par définition, les ferments du yaourt sont des microorganismes étrangers aux sujets qui les ingèrent. Grâce à leur capacité physiologique d'adaptation, les bactéries lactiques peuvent coloniser des espaces très différents du point de vue biologique et physiologique [11]. Ces ferments ont une importance stratégique en industrie alimentaire et en nutrition humaine parce qu'ils jouent des rôles très importants sur la physiologie de l'hôte qui l'abrite. De même qu'ils jouent un rôle fondamental dans l'inhibition des flores nuisibles à la technologie ou dans celle des flores pathogènes [5]. Pour que les ferments du yaourt puissent avoir des rôles bénéfiques sur la santé humaine, il faut qu'ils gardent une certaine activité, voire une viabilité lors du transit intestinal. Ainsi, les ferments eux-mêmes doivent pouvoir passer sans dommage irréversible la barrière acide de l'estomac, puis l'effet inhibiteur éventuel des sels biliaires.

Cependant, les recherches réalisées jusqu'à présent suggèrent que les ferments lactiques vivants, que l'on peut qualifier de probiotiques pourraient durant leur temps de transit et étant donné leur nombre, exercer des actions dans l'intestin grêle [7, 9]. Dans une étude *in vitro*, Dilmi-Bouras [6] montre que *Sc. t.* et *Lb. b.* du yaourt YB3 ont une bonne résistance à l'acidité et aux sels biliaires.

Dans cette étude, nous allons suivre l'évolution de *Sc. t.* et *Lb. b.* du yaourt YB3 dans le tube digestif des lapins et déduire la

résistance de ses deux ferments vis-à-vis de l'acide gastrique, des sels biliaires et de la flore intestinale. Le choix est porté sur le modèle expérimental lapin, du fait qu'il a un transit intestinal très lent et il s'avère plus intéressant et approprié dans la suite de nos travaux traitant l'utilisation de *Sc. t.* et *Lb. b.* du yaourt YB3 dans l'élaboration des produits de « santé ».

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Souches de bactéries utilisées

Streptococcus thermophilus (*Sc. t.*) et *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (*Lb. b.*) sont utilisés pour la fabrication du yaourt à l'OROLAIT de Tiaret (source : Boll-France).

2.2. Milieux de cultures et conditions de croissance

Le milieu MRS-Agar (référence : 1.16660, Merck) est utilisé pour le dénombrement de *Lb. b.* dans le yaourt et dans les fèces, et le milieu M17-Agar (référence : 11640, Merck) est utilisé pour le dénombrement de *Sc. t.* Les milieux de cultures sont préparés avec de l'eau distillée à 121 °C pendant 15 min.

2.3. Yaourt utilisé

Le yaourt YB3 est préparé au laboratoire comme suit : 120 g de poudre de lait entier (LAHDA fabriquée pour EDIPAL, Pays Bas) est dissoute dans un litre d'eau distillée et stérile. À ce lait, 80 g de sucre et 3 % d'inoculum (ferments lactiques) sont additionnés. L'incubation est observée à 44 °C durant 3 h. La multiplication des ferments est stoppée par le froid à 4 °C.

2.4. Lapins

L'expérimentation est réalisée sur des lapins mâles de même espèce (*Oryctolagus cuniculus*) et de même âge (5 mois), pesant entre 1000 et 1050 g au début de l'expérimentation. Les animaux mis individuellement dans des cages métalliques, de 50 cm de côté, sont maintenus dans une animalerie bien aérée, à température constante : 21 ± 1 °C avec un éclairage de 12 h assuré de 8 heures à 20 heures. La nourriture et l'eau sont distribuées ad libitum et le nettoyage des cages est assuré tous les matins.

2.5. Régime des lapins

Nous disposons de 12 lapins qui sont d'abord nourris avec un régime standard (250 g par jour de laitue, carottes, pain et eau) durant une période d'adaptation de 7 jours. Ensuite et pendant les 4 jours suivants, le régime des lapins est supplémenté de 2×10 mL par jour de yaourt YB3 (9 heures et 17 heures). Cette supplémentation en yaourt YB3 est arrêtée à la fin du 4^e jour.

2.6. Prélèvement du jus gastrique

À l'aide d'une sonde que l'on introduit dans l'estomac à travers l'oesophage du lapin, on prélève 1 mL du jus gastrique, 1 h après ingestion du yaourt YB3. Après filtration du jus sur papier filtre stérile, une analyse microbiologique est effectuée pour déterminer le nombre de cellules de *Sc. t.* et *Lb. b.* Pour suivre l'évolution de *Sc. t.* et de *Lb. b.*, en fonction du pH de l'estomac, on prélève du jus gastrique à 0 h (témoin), 1 h et 3 h après ingestion du yaourt YB3.

2.7. Prélèvement du liquide duodéal

Les prélèvements du liquide duodéal ont été réalisés avant l'ingestion du yaourt YB3 (témoin), 2 h après ingestion et ensuite tous les jours pendant la période de

l'ingestion du yaourt par les lapins et après l'arrêt. Le liquide duodéal est prélevé rapidement après sacrifice des lapins. Après filtration du liquide duodéal du lapin sur papier filtre stérile, 1 mL est prélevé pour l'analyse microbiologique.

2.8. Prélèvement des fèces

Les fèces sont récupérées avant la prise du yaourt YB3 (témoin), 3 h après chaque prise et ensuite tous les jours pendant la période de l'ingestion du yaourt par les lapins et après l'arrêt. 1 g de fèces est dilué dans 9 mL d'eau physiologique (9 g de NaCl·L⁻¹). Après broyage et filtration sur papier filtre stérile, 1 mL de la solution est pris pour l'analyse microbiologique.

2.9. Analyses microbiologiques

Des numérations de *Sc. t.* et de *Lb. b.* ont été réalisées quotidiennement sur le yaourt YB3, sur le jus gastrique, sur le liquide duodéal et sur les fèces avant (témoin) et pendant la période d'utilisation du yaourt et après arrêt de ce dernier. Ces analyses ont pour but de déterminer le nombre de *Sc. t.* et de *Lb. b.* vivants et leur temps et niveau de survie dans l'estomac, le duodénum et dans le gros intestin. Après examen microscopique de la dilution au 1/100 du yaourt, du jus gastrique, du liquide duodéal ou des fèces, des dilutions décimales successives sont effectuées. Puis, 1 mL des dilutions est ensemencé en profondeur dans le milieu MRS-Agar pour la culture de *Lb. b.* et en surface sur le milieu M17-Agar pour la culture de *Sc. t.* Les cultures de *Lb. b.* et de *Sc. t.* sont incubées 48 h à 37 °C. Dans les courbes les valeurs du nombre de colonies formées sont données en log₁₀ (unités de colonies formées·mL⁻¹ ou cfu·mL⁻¹).

2.10. Analyse statistique

L'analyse statistique (analyse de la variance et de la probabilité) des résultats est

réalisée à l'aide de programmes « Anova ». Nous avons effectué, d'une part, une analyse de variance, pour montrer la signification de nos résultats et d'autre part, la comparaison des moyennes, par le test de Newman-Keuls et de la probabilité (P).

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Dénombrement des ferments du yaourt

Le nombre moyen de cellules de *Sc. t.* et de *Lb. b.* trouvé est respectivement $2,9 \times 10^9$ et $1,8 \times 10^9$ cellules·mL⁻¹ de yaourt YB3. Cette charge de cellules vivantes est indispensable pour que le yaourt soit utilisé à des fins probiotiques, car l'action d'une souche bactérienne n'est obtenue que si cette souche est présente dans le tube digestif à un niveau égal ou supérieur à 5×10^7 germes·g⁻¹ de fèces [9].

3.2. Évolution des ferments du yaourt dans l'estomac

L'acidité régnant dans l'estomac représente une barrière physiologique détruisant les bactéries et les enzymes naturellement présentes dans l'alimentation. Cependant, certains ferments lactiques résistent à cette barrière agressive. Avant l'administration du yaourt YB3 aux lapins (essai témoin), le dénombrement sur boîte de Petri n'a révélé la présence ni de *Sc. t.* ni de *Lb. b.* ni d'au-

cune autre colonie, car les bactéries de la flore intestinale sont des anaérobies strictes et l'expérimentation n'a pas été réalisée dans ces conditions. De plus, les milieux de cultures M17 et MRS sont plus spécifiques aux bactéries lactiques.

Les données du tableau I montrent que le pH au niveau de l'estomac augmente pour atteindre 3,6 une heure après l'administration du yaourt YB3 aux lapins et diminue à 2,8 trois heures après. Le nombre de ferments ne varie pas de manière significative grâce à l'effet tampon du pH du yaourt, initialement supérieur au pH du milieu gastrique. Notons, qu'aucune colonie différente de celles obtenues avec *Sc. t.* et *Lb. b.* n'est observée, car les conditions de culture sont plus défavorables aux bactéries, anaérobies strictes, de la flore intestinale.

Par ailleurs, 1 h après l'administration du yaourt YB3 aux lapins, le nombre de cellules par millilitre de *Sc. t.* et de *Lb. b.* est très élevé et presque identique au nombre de cellules présentes initialement dans le yaourt ($5,2 \times 10^8$ pour *Sc. t.* et $4,3 \times 10^8$ pour *Lb. b.*). Cette concentration reste importante, supérieure à 10^8 cellules·mL⁻¹, pendant toute la période d'ingestion du yaourt YB3 par les lapins. 24 heures après l'arrêt de l'administration du yaourt, le nombre de *Sc. t.* et de *Lb. b.* diminue rapidement pour atteindre respectivement $3,38 \times 10^5$ et $2,9 \times 10^5$ cellules·mL⁻¹ et puis tend à s'annuler 96 h après l'arrêt (Fig. 1). La regression très significative ($P = 0,05$) du nombre de bactéries est due à l'acidité très

Tableau I. Évolution du pH de l'estomac et des ferments après ingestion du yaourt YB3.
Table I. Progress of pH stomach and the numbers of starters after digestion of yogurt YB3.

Temps (h)	pH	Nombre de bactéries·mL ⁻¹	
		<i>Strep. thermophilus</i>	<i>Lact. bulgaricus</i>
0	1,6	0	0
1	3,6	$5,2 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$
3	2,8	$2,9 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7$

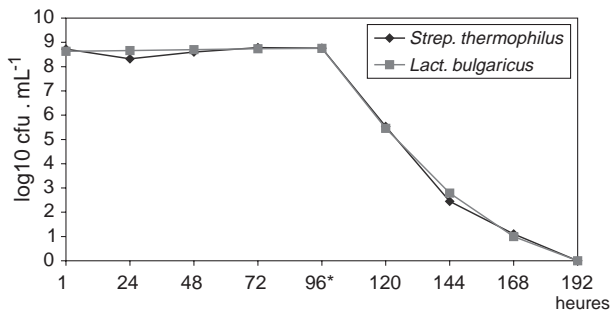


Figure 1. Évolution des ferments du yaourt dans l'estomac du lapin.

(* Arrêt de la supplémentation en yaourt).

Figure 1. Progress of starters of yogurt in the stomach of rabbits. (* Stop of addition of yogurt).

élevée de l'estomac, en absence de l'effet tampon du yaourt. Notons que les ferments du yaourt ont une faible capacité de résistance à l'acidité gastrique [1, 4, 5, 12]. De plus, Jin et al. [8] montrent que généralement les souches de Lactobacilles ont une faible résistance à pH 1,0 et 2,0 et une résistance modérée à pH 3,1.

3.3. Évolution des ferments du yaourt dans le duodénum

Le duodénum constitue, par la présence d'enzymes et de l'acide biliaire, la deuxième barrière physiologique du tube digestif. Avant l'administration du yaourt YB3 aux lapins (essai témoin), le dénombrement sur boîte de Petri n'a révélé la présence ni de *Sc. t.* ni de *Lb. b.* ni aucune autre colonie. 2 h après l'administration du yaourt aux lapins, les ferments se retrouvent vivants dans le duodénum à des

concentrations non négligeables, $6,45 \times 10^6$ cellules.mL⁻¹ pour *Sc. t.* et $1,65 \times 10^7$ cellules.mL⁻¹ pour *Lb. b.* (Fig. 2). Ces concentrations augmentent rapidement en fonction du temps et restent importantes (supérieures à 10^8 cellules.mL⁻¹ pour les deux ferments) pendant toute la période de l'ingestion du yaourt YB3. 24 h après arrêt de l'ingestion du yaourt, le nombre des ferments diminue pour atteindre $3,38 \times 10^6$ cellules.mL⁻¹ pour *Sc. t.* et $2,0 \times 10^5$ cellules.mL⁻¹ pour *Lb. b.* et atteint des niveaux inférieurs au seuil de détection 96 h après l'arrêt.

Les résultats semblent très intéressants et hautement significatifs ($P < 0,05$), car les ferments ont pu survivre à des taux acceptables, au niveau du duodénum pendant toute la période de l'ingestion du yaourt et même quelques heures après l'arrêt de ce dernier, malgré la présence de concentrations relativement élevées en sels biliaires. Une étude

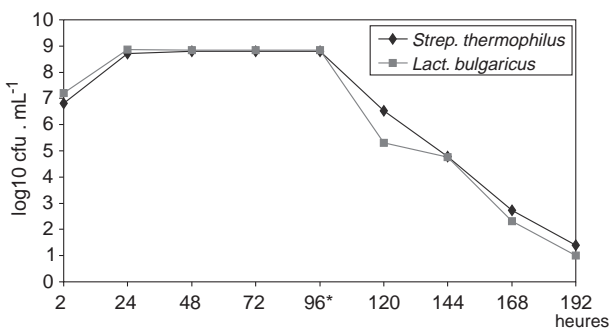


Figure 2. Évolution des ferments du yaourt dans le duodénum du lapin.

(* Arrêt de la supplémentation en yaourt).

Figure 2. Progress of starters of yogurt in the duodenum of rabbits.

(* Stop of addition of yogurt).

in vitro [6] montre que *Sc. t.* et *Lb. b.* résistent à des concentrations élevées en sels biliaires (0,3 %). De même, Bianchi-Salvadori et al. [3] ; Pochart et al. [10] ; Bouhnick et al. [4] trouvent qu'après ingestion du yaourt, les ferments vivants atteignent des concentrations duodénales supérieures à 10^5 cellules·mL⁻¹. Torre-Hernandez [11] montre que grâce à leur capacité physiologique d'adaptation, les bactéries lactiques peuvent coloniser des espaces très différents et exercer des effets bénéfiques, comme inhibiteurs de microorganismes nuisibles ou pathogènes ou encore des effets probiotiques. Cette différence dans les résultats est peut être due aux différentes souches de ferments utilisées, ou à la variation des concentrations de cellules vivantes prises dans le yaourt.

3.4. Évolution des ferments du yaourt dans le gros intestin

Naturellement, les ferments du yaourt sont absents dans le gros intestin où la flore intestinale est très abondante. Avant l'administration du yaourt YB3 aux lapins (essai témoin), le dénombrement sur boîte de Petri n'a révélé la présence ni de *Sc. t.* ni de *Lb. b.*, mais révèle la présence de quelques colonies différentes ne dépassant pas 10^2 cellules·g⁻¹ de fèces. Par contre, après ingestion du yaourt, les dénombrements sur boîte de Petri montrent une augmentation des bactéries lactiques. Par ailleurs, 3 h

après ingestion du yaourt YB3 par les lapins, le nombre de *Sc. t.* est de $5,75 \times 10^5$ cellules·g⁻¹ de fèces et celui de *Lb. b.* est de $1,44 \times 10^6$ cellules·g⁻¹ de fèces (Fig. 3). Ce nombre augmente progressivement, pour atteindre $9,02 \times 10^7$ cellules·g⁻¹ de fèces pour *Sc. t.* et $3,89 \times 10^8$ cellules·g⁻¹ de fèces pour *Lb. b.*, au bout de 72 h. La concentration des deux ferments reste importante et relativement stable tant que les lapins consomment du yaourt YB3. Par contre, le nombre de *Sc. t.* et de *Lb. b.* diminue d'une manière significative ($P < 0,05$) pour atteindre près de 10^5 cellules·g⁻¹ de fèces, 48 h après arrêt de la consommation du yaourt YB3 et tend à disparaître 96 h après. D'autres études confirment l'implantation des deux ferments dans l'intestin, mais avec une élimination fécale plus rapide de *Lb. b.* [2, 9].

Nous avons remarqué, que d'une manière générale *Sc. t.* et *Lb. b.* sont capables de survivre et de proliférer, pendant plusieurs heures (estomac et duodénum) et même pendant quelques jours (gros intestin) dans le tube digestif du lapin.

4. CONCLUSION

L'administration de 2×10 mL par jour de yaourt YB3 aux lapins conduit à une présence à des concentrations élevées de *Sc. t.* et de *Lb. b.* dans l'estomac, dans le duodénum et dans le gros intestin. Le pH tampon

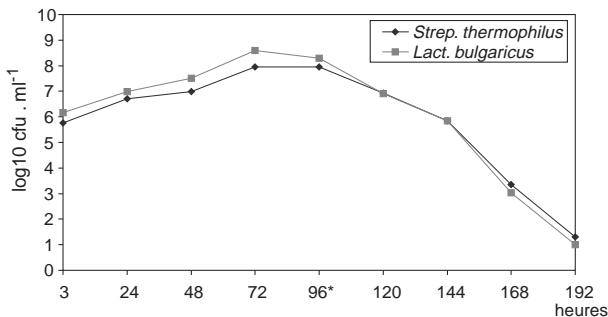


Figure 3. Évolution des ferments du yaourt dans le gros intestin du lapin. (* Arrêt de la supplémentation en yaourt).

Figure 3. Progress of starters of yogurt in the large intestine of rabbits. (* Stop of addition of yogurt).

du yaourt a sûrement permis aux deux ferments de résister à l'acidité du suc gastrique, aux sels biliaires et à la flore intestinale, pendant toute la période de l'ingestion du yaourt (96 h) et avec un nombre appréciable de cellules bactériennes. Le nombre de *Sc. t.* et de *Lb. b.* reste important tant que les lapins consomment du yaourt. 24 h après arrêt de la consommation du yaourt YB3 par les lapins, les concentrations de *Sc. t.* et de *Lb. b.* restent à des niveaux acceptables au niveau des différentes parties du tube digestif. Les ferments utilisés, étrangers au sujet qui les ingère, résistent au moins partiellement aux agressions du tube digestif et le parcourent vivants sans s'implanter durablement. Ces résultats peuvent être intéressants dans le cas où ces ferments sont utilisés à des fins thérapeutiques ou métaboliques (réduction du cholestérol excessif dans le sang, l'hydrolyse du lactose, dans les infections intestinales...).

RÉFÉRENCES

- [1] Aktypis A., Kalantzopoulos G., Huis In't Veld V.H.J., Ten Brink B., Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin product by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040, J. Appl. Microbiol. 84 (1998) 568–576.
- [2] Besnier M.O., Bourlioux P., Fourniat J., Ducluzeau R., Aumaitre A., Influence de l'ingestion du yaourt sur l'activité lactasique intestinale chez les souris axéniques ou holoxéniques, Ann. Microbiol. 134 (1983) 219–230.
- [3] Bianchi-Salvadori B., Camaschella P., Bazzigaluppi E., Distribution and adherence of *L. bulgaricus* in the gastroenteric tract of germ free animals, Milchwissenschaft 39(1984)387–391.
- [4] Bouhnick Y., Marteau P., Rambaud J.C., Utilisation des probiotiques chez l'homme, Ann. Gastroentérol. Hépatol. 29 (1993) 241–249.
- [5] Desmazeaud M., Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité, Cah. Agric. 5 (1996) 331–334.
- [6] Dilmi-Bouras A., Assimilation du cholestérol par les bactéries lactiques, Thèse de magistère, INA El Harrach, Alger, (1991) 143 p.
- [7] Ducluzeau R., Écologie microbienne du tube digestif et flores de barrière, Lett. Sci. IFN 20 (1993) 1–8.
- [8] Jin L.Z., Ho Y.W., Abdullah N., Jallaludin S., Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine, Lett. Appl. Microbiol. 27 (1998) 183–185.
- [9] Moreau M.C., Nuyts V., Raibaud P., Effet de l'ingestion d'un lait fermenté sur la stimulation de l'immunité chez la souris axénique, Cah. Nutr. Diét. 29 (1994) 341–347.
- [10] Pochart P., Dewit O., Desjeux P., Viable started culture β -galactosidase activity and lactose in duodenum after yoghourt ingestion in lactose deficient humans, Ann. J. Clin. Nutr. 49 (1989) 828–831.
- [11] Torre Hernandez P., Caractéristiques microbiologiques du lait de brebis et chèvre : bactéries lactiques et microorganismes nuisibles, Cours International CIHEAM 10-19 Avril (2000) Surgères.
- [12] Vermier R.O., Barthelemy F., Rahe I., La fabrication du yaourt, Service de presse syndifrais (1993) 13 p.