



Composés bioactifs

Etude des propriétés antimicrobiennes, antifongiques et cicatrisantes du Kéfir

Study of antimicrobial, antifungal and healing properties of Kefir

Nezha SEKKAL-TALEB^{1,2}, Fatima Zohra SENOUCI¹, Ghazelane MEDJAHDI¹

¹Département de Pharmacie, Faculté de Médecine Taleb Mourad. ²Civil Engineering and Environmental Laboratory, CEEL. Université Djillali Liabes, Sidi Bel Abbes, Algérie

Auteur correspondant: nezhataleb@yahoo.fr

Reçu le 14 octobre 2021, Révisé le 12 décembre 2021, Accepté le 30 décembre 2021

Résumé *Introduction.* Le Kéfir est une association symbiotique de microorganismes, préparé à partir de grains de Kéfir. **Objectif.** L'activité antibactérienne, antifongique et cicatrisante du Kéfir a été étudiée. **Matériel et méthodes.** L'étude des propriétés antibactériennes et antifongiques a été réalisée contre quelques espèces microbiennes pathogènes, telles que *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Enterobacterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* et *Candida albicans*, par la méthode de diffusion sur gélose par disques et par puits. Des expériences de cicatrisation ont été menées chez des rats Wistar adultes, avec des brûlures cutanées, à l'aide d'une application topique de deux gels de Kéfir de lait et de fruit et du Sulfadiazine d'argent. **Résultats.** Le Kéfiran, un exopolysaccharide du Kéfir, est doté d'une activité antibactérienne anti *Staphylococcus* et d'une activité antifongique anti Candidosique. Les gels de Kéfir ont une meilleure cicatrisation par rapport au Sulfadiazine d'argent, avec un effet protecteur sur la peau et le tissu conjonctif, après un traitement de 15 jours chez les rats. **Conclusion.** Le kéfir est un probiotique naturel, à multiples vertus. En effet, le Kéfiran est doté d'une activité anti *Staphylococcus* et d'une activité anti Candidosique. L'activité cicatrisante du gel de Kéfir est une approche thérapeutique efficace pour améliorer la guérison, après une brûlure grave par rapport à un traitement classique comme le Sulfadiazine d'argent.

Mots clés : Kéfiran, Probiotique, Activité antimicrobienne, Activité antifongique, Activité cicatrisante

Abstract Introduction. Kefir is a symbiotic association of microorganisms prepared from Kefir grains. **Objective.** The antibacterial, antifungal, and healing activity of Kefir was evaluated. **Material and methods.** Antibacterial and antifungal properties was carried out against some pathogenic microbial species, such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *enterobacterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Candida albicans*, by the agar disk diffusion method and by well. Healing experiments were carried out in adult Wistar rats, with skin burns, using a topical application of two milk, and fruit kefir gels, and silver sulfadiazine. **Results.** Kefiran, an exopolysaccharide of Kefir, had antibacterial anti *Staphylococcus* activity and anti-candidal antifungal activity. Kefir gels had better wound healing compared to silver Sulfadiazine, with a protective effect on skin, and connective tissue, after a 15-day treatment of rats. **Conclusion.** Kefir is a natural probiotic with multiple virtues. Indeed, Kefiran has an anti *staphylococcus* activity, and an anti candidiasis activity. Healing activity of Kefir gel is an effective therapeutic approach to improve healing, after a severe burn, compared to a conventional treatment with silver Sulfadiazine.

Keywords: Kefir, Kefiran, Probiotic, Antimicrobial activity, Antifungal activity, Healing activity

Introduction

Le Kéfir est une culture naturelle mixte, préparée à partir de grains de Kéfir qui sont une association symbiotique de micro-organismes appartenant à un large spectre d'espèces et de genres, y compris les bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), les levures (*Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia*) et les bactéries acétiques (*Acetobacter*) [1-2] (Fig. 1).

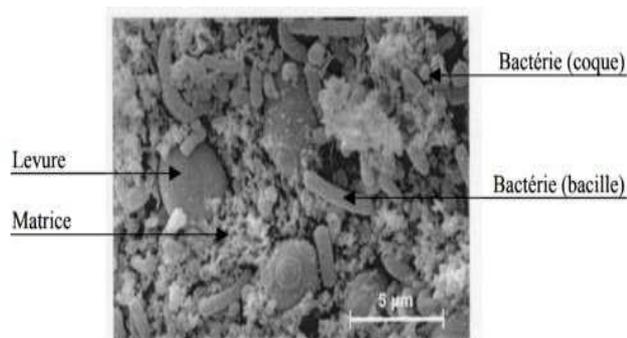


Fig.1. Illustration d'un grain de Kéfir

Grossissement x7000 [1]

Des études récentes sur le potentiel santé du Kéfir ont permis de montrer son intérêt comme immunomodulateur [3-6], anti-tumoral [7-8], antibactérien et antifongique [3]. De nombreux chercheurs ont ainsi pu évaluer de façon positive l'utilisation du kéfir dans l'ulcère duodénal et stomacal [9], les troubles biliaires et pancréatiques [10], les affections pulmonaires [11] et infectieuses [12], mais aussi comme

agent anti-inflammatoire [13] et adjuvant anticancéreux [8].

L'objectif de ce travail est l'étude de l'activité antibactérienne, antifongique et cicatrisante du Kéfir, après la préparation d'un gel de Kéfir de lait et de fruits.

Matériel et méthodes

Préparation des grains de kéfir

Les grains de kéfir ont été préparés (kéfirko : kit de préparation de Kéfir de lait et de fruit) [14]. Les grains de kéfir de lait ont été lavés soigneusement avec de l'eau distillée et inoculés dans 100mL de lactosérum déprotéiné pendant 24h, 48h et 96h à température ambiante. Les grains de Kéfir de fruit ont été inoculés dans 100mL d'eau minéralisée, plus une cuillère à soupe de sucre, une figue séchée et deux tranches d'orange, à température ambiante pendant 24h, 48h et 96h.

Culture des grains vivants

Les grains de Kéfir de fruits ont été mis dans 1 litre d'eau sucrée, puis deux tranches de citron ou d'orange et deux figues sèches ont été ajoutées au mélange qui a subi une fermentation pendant 24h à température ambiante.

Les grains de Kéfir du lait ont été mélangés dans 1 litre de lait de vache pasteurisé puis laissés fermenter pendant 24h à température ambiante puis filtrés. Le kéfir est récupéré et les grains sont rincés. Ces

derniers vont soit subir une nouvelle fermentation ou être mis au repos.

Préparation du lactosérum déprotéiné

Le lactosérum déprotéiné est préparé en ajustant le lait écrémé à pH 4,6 avec HCl 2 mol/L. La solution est chauffée pendant 30min à 100°C puis filtrée. Le surnageant résultant est ajusté à pH6,8 avec NaOH 2mol/L. Cette solution est chauffée pendant 30min à 100°C et filtrée encore une fois pour obtenir un lactosérum déprotéiné limpide et de couleur jaune pâle.

Extraction des exopolysaccharides (EPS) (Kéfir)

L'extraction des EPS a été réalisée selon la méthode de Van Geel-Schutten *et al.*, qui présente un meilleur rendement [15]. L'extraction se fait sur les trois types de Kéfir (kéfir de lait, kéfir de fruit, kéfir de fruit des grains qui ont subi la revivification) après 24, 48 et 96 heures. Après stockage à -20°C (pendant 24h) et centrifugation (5000tr/min, pendant 15min, à 4°C), les pellets EPS ont été remis en suspension dans de l'eau distillée chaude à 60°C et précipités à nouveau par l'addition de deux volumes d'éthanol froid.

Activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur gélose par disques et par puits

L'activité antimicrobienne du Kéfir a été testée par la méthode de diffusion sur gélose par des disques et des puits. Les souches utilisées étaient *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*.

Méthode de diffusion sur gélose : La gélose de Mueller-Hinton a été utilisée, elle est le seul milieu de culture solide pour l'étude de sensibilité, validé par le NCCLS (Comité National des Normes pour Laboratoires Cliniques). Le standard de turbidité Mc Farland, notamment utilisé lors de la préparation des inoculums bactériens pour les tests de sensibilités aux agents antimicrobiens a été préparé. Après la procédure d'inoculation, des dilutions décimales de Kéfir ont été préparées: 1mL de la dilution mère de 10g/L a été prélevée aseptiquement à l'aide d'une micropipette et introduit dans un tube à essai contenant 9mL d'eau physiologique stérile. Une dilution de 1g/L a été obtenue et la même procédure a été répétée, en prélevant 1mL à partir de la dilution 1g/L et en introduisant aseptiquement dans un tube à essai contenant 1mL du diluant et ainsi de suite jusqu'à 10⁻²g/L. Cette procédure a été terminée

par les dépôts des disques imprégnés d'antibiotiques et de Kéfir (Technique de Kirby-Bauer). Les antibiotiques utilisés étaient la Gentamicine 10ug, l'Amoxicilline 25ug, l'Imipénème 10ug, la Triméthoprim-sulfaméthoxazole 25ug, la Céfotaxime 10ug.

Méthode des puits : L'activité antimicrobienne du Kéfir a été retestée en augmentant la dose à 45g/L pour la solution mère contre les souches bactériennes suivantes *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi*. Pour le *Candida albicans*, la méthode la plus adaptée était celle des puits sur un milieu sabouraud chloramphénicol, les boîtes devant être incubées à 25°C pendant 24 heures. Puis, les boîtes de pétri ont été incubées à 35°C pendant 16 à 18 heures. Après une nuit d'incubation, le diamètre de chaque zone d'inhibition (diamètre du disque compris) était mesuré en mm et noté, le diamètre de la zone sera mesuré dans les marges de développement important.

Formulation des gels

Dans un mortier, la carboxyméthylcellulose (CMC) a été dispersée dans la glycérine préalablement pesée dans un bécher en verre et immédiatement après, du propylène glycol a été versé sur la dispersion de CMC en triturant très rapidement afin d'éviter la formation de grumeaux, puis la préparation a été versée dans un bécher et complétée au poids avec le Kéfir. La préparation obtenue a été triturée dans le bécher à l'aide d'un agitateur de façon à incorporer le Kéfir. Cette préparation épaissira dans les heures qui suivent et le gel sera formé.

Propriétés de cicatrisation: Etude *in vivo*

Douze rats Wistar mâles, âgés de 6 mois, pesant 200±30g ont été placés dans des cages individuelles, selon des conditions strictes (lumière 07:00 -19:00 h, température 23±1°C et humidité 60%), pendant une semaine. Ils sont divisés en quatre groupes de trois rats chacun : Groupe A Témoin négatif (ne reçoit aucun traitement), Groupe B témoin positif (traité par le sulfadiazine d'argent), Groupe C traité par le gel de Kéfir de lait et Groupe D traité par le gel de Kéfir de fruit.

Cette étude a été approuvée par le Comité Institutionnel sur la Recherche Animale de l'Université de Sidi Bel Abbès. Les directives générales sur l'utilisation des animaux dans la recherche scientifique du Conseil des Communautés européennes (1987) ont été suivies [16].

Les rats ont été anesthésiés (100mg de Lidocaïne/kg de poids corporel), puis des brûlures de 2^{ème} degré ont été induites sur la zone dorsale rasée à l'aide d'une plaque de 2,25cm² chauffée à une température de 70°C pendant 15 secondes. Une dose de 1mL de Paracétamol 1% a été injectée afin d'atténuer la douleur.

Résultats

Activité antimicrobienne et antifongique

Les résultats sur l'activité antibactérienne du kéfir sont illustrés dans les figures ci-dessous et montrent l'activité des différentes dilutions de Kéfiran (0,01 - 0,1 - 1 - 10g/L.) contre *Staphylococcus aureus* (Fig.2) et contre *Klebsiella* (Fig. 5).

La comparaison de l'action du kéfiran avec celle des antibiotiques est aussi illustrée dans la Fig. 3 contre *Staphylococcus aureus* et dans la Fig. 5 contre *Klebsiella pneumoniae*.



Fig. 2. Activité des différentes dilutions de kéfiran contre *Staphylococcus aureus*

Dilutions à 0,01 - 0,1 - 1 - 10 g/L.



Fig. 3. Comparaison de l'action du kéfiran avec celle des antibiotiques contre *Staphylococcus aureus*

Gentamicine 10ug; Amoxicilline 25ug; Imipénème 10ug; Triméthoprime-sulfaméthoxazole 25ug; Céfotaxime 10ug.



Fig. 4. Activité de différentes dilutions du Kéfiran contre *Klebsiella*

Dilutions 0,01 - 0,1 - 1 - 10g/L.

Les résultats sur l'activité antimicrobienne par la méthode des puits sont aussi illustrés dans les Fig. 6 et Fig. 7.



Fig. 5. Comparaison de l'action du kéfiran avec celle des antibiotiques contre *Klebsiella pneumoniae*

Gentamicine 10ug; Amoxicilline 25ug; Imipénème 10ug; Triméthoprime-sulfaméthoxazole 25ug; Céfotaxime 10ug.

L'absence d'inhibition de *E. faecalis*, *S. paratyphi*, *P. aeruginosa* par le Kéfiran est constatée à différentes concentrations (0.045 - 0.45 - 4.5 - 45 g/L) (Fig. 6), et une inhibition du *Candida albicans* par le Kéfiran est notée (Fig. 7).

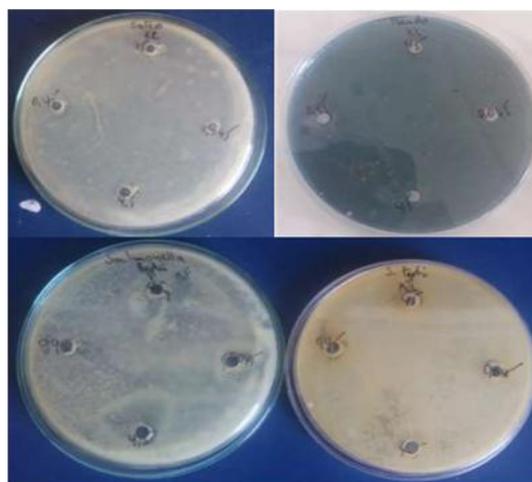


Fig. 6. Absence d'inhibition de *E. faecalis*, *S. paratyphi*, *P. aeruginosa* par le Kéfiran à différentes concentrations par la méthode des puits

Concentrations 0.045 - 0.45 - 4.5 - 45 g/L.



Fig. 7. Inhibition du *Candida albicans* par le Kéfiran

Activité cicatrisante

Un hydrogel formulé à partir d'un ferment de kéfir de 96h est testé chez les rats afin de prouver son efficacité comme gel cicatrisant. Un suivi du poids et de la température des rats est effectué dans le but d'écartier tout trouble de santé.

L'évolution progressive des poids des rats était positive et leur température corporelle était

comprise dans les valeurs normales (entre 36 et 37,5°C), sauf après brûlure, où l'élévation de la température était due à l'infection des brûlures sur la surface corporelle totale des rats. En général, les rats étaient en bonne santé. Les résultats des tests de cicatrisations sur les rats sont présentés dans les **Fig. 8-9**. Une importante cicatrisation est constatée chez les groupes traités par les gels de Kéfir par rapport au groupe traité par le Sulfadiazine d'argent.

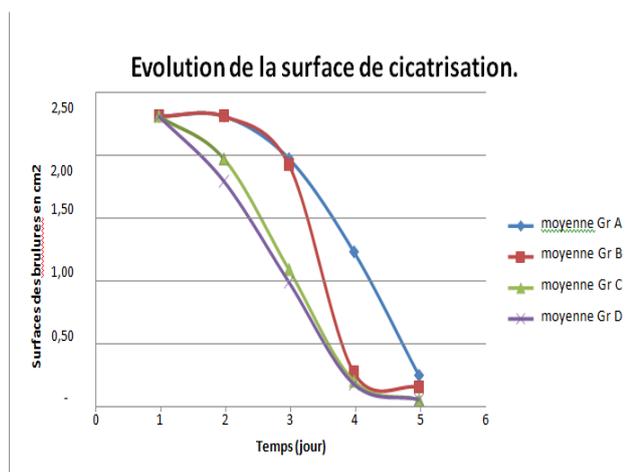


Fig. 8. Evolution de la surface de cicatrisation

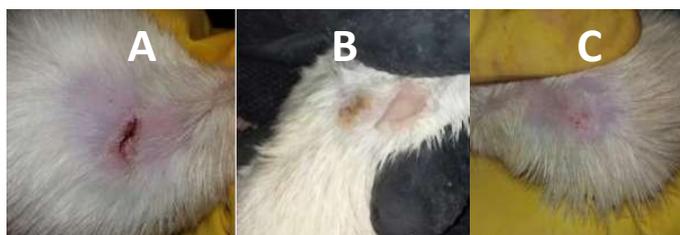


Fig. 9. Cicatrisation des brûlures après 15 jours de traitement

A: rat témoin négatif ; B: rat témoin positif traité par le Sulfadiazine argentique ; C: rat traité par le gel de Kéfir.

Discussion

Le but de cette étude était de déterminer les propriétés antibactériennes, antifongiques et cicatrisantes du Kéfir, par des méthodes *in vitro* et *in vivo*, après la préparation d'un gel de Kéfir de lait et de fruits.

Les stades très avancés de la fermentation ont permis une bonne récupération du Kéfir, la matrice des grains de Kéfir étant dotée de plusieurs avantages sur la santé. Parmi ces bienfaits, l'activité antibactérienne du kéfir a montré une absence d'activité pour les trois extractums de kéfir contre les espèces *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. para*

typhi. En revanche, les *Staphylococcus aureus* ont présenté une sensibilité envers les différents extractums (**Fig. 2-5**).

En ce qui concerne les résultats sur l'activité antimicrobienne par la méthode des puits, l'absence des halos d'inhibition a été constatée envers les souches citées auparavant, malgré l'augmentation de quantités de Kéfir, ce qui prouve que le kéfir n'as pas d'activité antimicrobienne contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi*, *Enterococcus faecalis* et *E. coli* (**Fig.6**). Ces résultats ne confirment pas ceux rapportés dans la littérature [17]. Le kéfir possède également une activité antifongique contre le *Candida albicans* (**Fig. 7**).

Les résultats des tests de cicatrisations chez les groupes traités par les gels de Kéfir montrent une cicatrisation plus importante comparé au groupe traité par le Sulfadiazine d'argent (**Fig. 8-9**), suggérant ainsi que les gels de kéfir sont plus efficaces que le traitement classique des brûlures par le Sulfadiazine d'argent.

A la lumière de nos résultats, et compte tenu de ceux de la littérature, on peut constater que le kéfir est doté d'une action diverse, d'un point de vue nutritif [5-7], mais aussi, d'un point de vue thérapeutique, notamment, son action intéressante contre les cancers [8-9] et ses propriétés antimicrobiennes et antifongiques [17].

Conclusion

Le Kéfir final, après fermentation des grains de kéfir, contient différents ingrédients bioactifs. Le pouvoir antimicrobien, testé *in vitro* par la méthode de diffusion sur gélose, par disques et par puits, ne révèle des zones d'inhibition bien distinctes qu'envers les *Staphylococcus aureus* et le *Candida albicans*. Il peut être conclu que le Kéfir est doté d'une activité antibactérienne anti *Staphylococcus* et d'une activité antifongique anticandidosique. L'activité cicatrisante du gel de Kéfir est une approche thérapeutique efficace pour améliorer la guérison après une brûlure grave par rapport à un traitement classique qui est le Sulfadiazine d'argent. Ces résultats sont prometteurs dans la recherche de nouveaux traitements naturels.

Remerciements

Nos remerciements s'adressent à la Direction Générale de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique (DGRSDT), MESRS, Algérie.

Conflit d'intérêts

Aucun conflit d'intérêts à déclarer.

Références

1. Guzel Seydim Z., Wyffels JT., Seydim AC., Greene AK. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation. *Int J Dairy Technol* 2005;58(1): 25-9.
2. Sekkal-Taleb N. Chemical and microbiological composition of Kefir and its natural benefits. *Med J Biosci* 2016;1(4):174-83.
3. Saloff-Coste CJ. Le kéfir. Danone world newsletter (FRA), 1996;11:2-6 <https://jurnal.polbangtanma lang.ac.id>
4. Nor Farahin A., Muganti RK., Swee Keong Y., Janna Ong A., Melati K., Abdul Rahman O. et al. Kefir and Its Biological Activities. *Foods* 2021; 10(6):1210-36.
5. Rosa DD., Dias MMS., Grześkowiak LM., Reis SA., Conceição LL., Peluzio MDCG. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr Res Rev* 2017;30(1):92-6
6. Thoreux K., Schmucker DL. Kefir Milk Enhances Intestinal Immunity in Young but Not Old Rats. *J Nutr* 2001;131(3):807-12.
7. Kubo M., Odani T., Nakamura S., Tokumaru S., Mastuda H. Pharmacological study on kefir—a fermented milk product in Caucasus. On antitumor activity (1). *Yakugaku Zasshi* 1992;112 (7):489-95.
8. Kubow S., Chan L., Chen C., Foutouhinia M. Kefir extract as anti-cancer agent. Brevet. WO0195917.2001.<https://patentimages.storage.googleapis.com/34/47/94/5bb6ceb06939b5/US20040033282A1.pdf>
9. Batinkov EL. Use of milk and kefir in peptic ulcer of the stomach and duodenum. *Vopr Pitan* 1971; 30(4):89-91.
10. Bukhgalter FL. Use of kefir in complex treatment of children with biliary tract diseases associated with diseases of the pancreas. *Pediatr Akus Ginekol* 1974;6:15-7.
11. Ormisson A., Soo T. Effect of lactic-acid milk and kefir on the indicators of acid-base equilibrium of arterial blood in healthy young children and patients with acute pneumonia and acute bronchitis. *Pediatr* 1976; 10:37-8.
12. Evenshtein EM. Use of kefir for stimulation of gastric secretion and acid-formation in patients with pulmonary tuberculosis. *Probl Tuberk* 1978; 2:82-4.
13. Diniz R., Garla L., Schneedorf J., Carvalho J. Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, asymbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into apolysaccharide matrix. *Pharmacol Res* 2003;47(1):49-52.
14. Amazon A. Le kit kéfirko. 2020. <https://www.amazon.ca/KEFIRKO-Homemade-water->
15. Geel-Schutten GV., Flesch F., Ten Brink B., Smith M., Dijkhuizen L. Screening and characterization of Lactobacillus strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 1998;50(6):697-703.
16. Council of European Communities. Council instructions about the protection of living animals used in scientific investigation. Official J. L358 of 18-12-1986; Corrigendum Official J. L117 of 05-05-1987.
17. Rodrigues KL., Gaudino Caputo LR., Tavares Carvalho JC., Evangelista J., Schneedorf JM. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int J Antimicrobial Agents* 2005; 25(5):404-8.