

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie appliquée

THEME

Etude de l'effet d'un probiotique sur le microbiote intestinal

Présenté par :

^mlle Abbi Kenza Tinhinane

^mlle Abbi Sarah Inas

Devant le jury :

Président(e) : ^{Mr} Chaibi Rachid MCA

Rapporteur : ^{Mr} Chtatha mohamed MAA

Co-Rapporteur : ^{Mr} Benaceur Farouk MAA

Examineur(rice)s : ^{Mr} Krentar Kamel MAA

Soutenu publiquement le 20/06/2018.

Dédicace :

À NOS CHÈRES PARENTS. Aucune dédicace ne saurait exprimer notre respect, notre amour éternel et notre considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour nous instruction et notre bien-être.

Nous vous remercions pour tout le soutien et l'amour que vous nous portez depuis notre enfance et j'espère que votre bénédiction nous accompagne toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que nous ne vous en acquitterai jamais assez.

Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais nous ne vous déçoive.

À nos chères sœurs, pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

À nos chers frères, pour leur appui et leur encouragement,

À toute notre famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

Et à tous nos amis chaque personnes avec son nom.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour nous.

Kenza et Sarah ☺

Remerciement :

*Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et
miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce
Modeste travail.*

*En second lieu, nous tenons à remercier nos encadreur^s ^{Mr} Thtetha
Mohammed et ^{Mr} Bennacer Farouk, leur précieux conseil et leur aide
durant toute la période du travail.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour
l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre
travail Et de s'enrichir par leurs propositions.*

*À nos familles et nos amis qui par leurs prières et leurs
encouragements, on a pu surmonter tous les obstacles.*

*Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont
participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail*

Table des matières

Dédicace.....	I
Remerciement.....	II
Liste des tableaux.....	III
Liste des figures.....	III
Liste d'abréviation.....	IV
Résumé.....	VI
Introduction.....	01
Synthèse bibliographique	
I- Probiotiques.....	02
I-1-Historique et développement.....	02
I-2-Définition des probiotique.....	02
I-3-Principales souches bactériennes au potentiel probiotique.....	03
I-3-1-Bactéries lactiques.....	04
a- Le genre lactobacillus.....	05
b- Le genre streptococcus	05
I-3-2-Bifidobactérium	06
I-4- Mécanisme d'action des probiotiques.....	06
I-4-1-Maintien de l'équilibre de la barrière intestinale	06
I-4-2- Effet immunomodulateur.....	07
I-5-Caractéristiques souhaitables des probiotiques.....	09
I-6-Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine.....	10
I-7 Effets indésirables des probiotiques.....	10

I-7-1- Infection	11
I-7-2-Activités métaboliques nocives.....	12
I-7-3- Immunomodulation excessive.....	12
I-7-4-Transfères des gènes	13
II- Microbiote intestinal.....	14
II-1-Communauté bactérienne intestinale chez l’homme.....	14
II-1-1-Etablissement du microbiote chez l’homme.....	14
a-De la naissance à l’équilibre.....	14
b-Facteurs influencent sur l’installation du microbiote	15
b-1-Les facteurs génétiques	15
b-2-Les facteurs environnementaux	16
• Influence du mode d’accouchement.....	16
• Influence de la date du terme de la grossesse.....	16
• Influence de l’environnement.....	17
• Influence du mode d’alimentation.....	17
• Influence de l’antibiothérapie.....	18
II-2- La diversité du microbiote intestinale.....	18
II-2-1-Composition du microbiote intestinale.....	18
II-2-2-L’écosystème digestif	20
II-2-3- Présentation des micro-organismes de notre intestin.....	22
II-2-4-Facteurs du variation du microbiote intestinal	22
a- Facteurs intrinsèques	23
a-1- Variation du microbiote intestinal avec l’âge.....	23

a-2- Compétition entre les micro-organismes de la flore intestinale	24
b- Facteurs extrinsèques	24
b-1- L'alimentation	24
b-2- Les médicaments	26
b-3- Les probiotiques	26
b-4- Les prébiotiques	26
b-5- Les conditions d'hygiène	27
II-3-Fonctions du microbiote intestinal	27
II-3-1-Fonctions métaboliques et nutritionnelles	28
II-3-2-Fonction protectrice	29
II-3-3-Fonction immunologique	30

Partie expérimentale

I- Matériel et méthodes	
I-1- population étudiée.....	31
I-2- les conditions de l'étude.....	31
I-2-1- le régime alimentaire.....	31
I-2-2- la consommation du probiotique.....	31
I-3- méthodologie.....	31
I-3-1- l'évaluation de l'état de la digestion.....	32
I-3-2- l'étude de l'état des sels.....	32
I-3-3- l'examen microscopique.....	32
*I'évaluation des bactéries a Gram+ et des bactéries a Gram- chez les 4 sujets par la coloration de Gram.....	32
• Méthodologie.....	32
I-3-4-Culture	33
Méthodologie.....	33

	a- pour le milieu GN	33
	b- pour le milieu MRS	33
	c- pour le milieu Columbia au sang du mouton.....	34
	d- pour le milieu Columbia au sang cheval.....	34
II-	Résultats	36
III-	Discussion	43
	Conclusion.....	44
	Références bibliographiques	45
	Annexes.....	57

Liste d'abréviation

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNr : Acide DésoxyriboNucléique
ribosomal

AINS : Anti-Inflammatoires Non
Stéroïdiens

ARN : Acide RiboNucléique

ARNr : Acide RiboNucléique ribosomal

CMH : complexe majeur
d'histocompatibilité

DGGE: Denaturing Gradient Gel
Electrophoresis

ECP électrophorèse en champ pulsé

EIEC : *Escherichia coli enteroinvasif*

FISH: Fluorescent In Situ Hybridization

FOSHU: Foods for Specified Health Use

GRAS: Generally Recognized As Safe

IgA : immunoglobuline A

INF : interferon

LAB : Bactérie de l'Acide Lactique

LTA : les acides lipotéchoïques

LPS : lipopolysaccharides

MICI: Maladies Inflammatoires
Chroniques de l'Intestin

PAMPs : pathogen associated molecular
Patterns

PCR: Polymerase Chain Reaction

PG : les peptidoglycanes

pH : Potentielle d'Hydrogène

PLFR : le polymorphisme de longueur des
fragments de restriction

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

TLR : toll-like receptor

TNF : tumor necrosis factor

UFC: Unités Formant Colonies

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Micro-organismes considérés comme probiotiques	04
02	Résumé des régimes inducteurs de dysbiose, Tableau traduit de	24

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Les différents ligands des récepteurs Toll-like	08
02	Présentation des effets bénéfiques sur la santé humaine de la consommation des probiotiques	09
03	Répartition des différentes espèces bactériennes dans le tube digestif	19
04	évolution du microbiote intestinal avec l'âge	23
05	Les fonctions du microbiote intestinal	26

Résumé

RESUME

Résumé

Durant 4 mois d'études et analyses bactériologiques de coprocultures des sujets jeunes sous un régime de probiotique.

Ou cour de cette étude nous avons utilisé des milieux de cultures ; GN, MRS, Colombia au sang du mouton et Colombia au sang du cheval, pour le dénombrement des germes totaux, la flore lactique et pour l'isolement des *bactéroides* et les *firmicutes* ; plus des examens complémentaires microscopique des frottis coloré en Gram pour l'évaluation des bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻ plus des testes statistiques pour comparer entre les témoins et les sujets à étudier sous régime probiotique.

Les résultats de dénombrement sur milieu GN (A⁺ 11/53 A⁻ 02/05 B⁺ 18/25 B⁻ 02/00) ont montré qu'il y'a une différence de nombre des souches chez les consommateurs par rapport au témoins, sur milieu MRS (A⁺ 685/568 A⁻ 129/138 B⁺ 275/128 B⁻ 08/08) démontre que le nombre des bactéries lactiques s'augmente chez le consommateur après la consommation du probiotique ,sur Colombia au sang de mouton (A⁺ 08/04 A⁻ 18/08 B⁺ 19/23 B⁻ 26/23) démontre que ce probiotique a un effet inhibiteur sur les bactéries à Gram-, sur milieu Colombia au sang de cheval (A⁺ 15/11 A⁻ 59/47 B⁺ 25/14 B⁻ 105/52) démontre que le probiotique est un catalyseur des bactéries à Gram+, aussi l'examen microscopique des frottis à montrer que le nombre des bactéries à Gram+ s'augmente par rapport à les bactérie à Gram- chez les consommateur (l'augmentation des Gram+ commence à augmenter cher le B⁺ dès la 3^{eme} semaine et chez le A⁺ dès la 5^{eme} semaine, après le 2^{eme} mois chez A⁺ 70% des Gram+ et 30% des Gram- et chez le B⁺ 73% des Gram+ et 27% des Gram-).

Mots clés : microbiote, probiotique, régime.

Introduction

Introduction

Introduction

Dès la naissance, le corps humain est colonisé de l'extérieur (peau et muqueuses) mais aussi de l'intérieur (tube digestif) par un ensemble de bactéries. Au niveau du tractus intestinal, la communauté bactérienne est estimée à 10^{14} bactéries et est composée de plus de 1000 espèces différentes. Cette communauté appelée anciennement flore (ou microflore) intestinale est dorénavant nommé microbiote. L'ensemble des gènes portés par ce microbiote est appelé microbiome. On peut influencer la stabilité de ce microbiote par l'ingestion de certains microorganismes (probiotiques) où sont rendu un bénéfice sur la santé du consommateur.

Le terme « probiotique » signifie « pour la vie » et désigne des microorganismes vivants qui, ingérés en quantité appropriée, produisent un effet bénéfique pour la santé de l'hôte qui vont au-delà des fonctions nutritionnelles de base.

Les probiotiques sont souvent des bactéries lactiques (lactobacilles et bifidobactéries) ou des levures introduites dans l'alimentation sous forme de produits lactés fermentés ou de suppléments alimentaires. Ces micro-organismes renforcent la flore intestinale et vaginale. Leur présence permet notamment de lutter contre la prolifération des bactéries pathogènes.

Est-ce que ces probiotiques ont des effets bénéfiques sur la digestion ?

Est-ce que ces probiotiques induisant ils des changements sur la flore intestinal ?

Noter étude vise donc :

Evaluez l'effet du probiotique administré aux sujets jeunes sur:

- L'état de la digestion
- L'évolution du microbiote intestinal en bactéries à Gram⁺ et bactéries à Gram⁻

Dans une première partie les données récentes sur l'évolution de la composition du microbiote intestinal de la naissance jusqu'à l'âge adulte et ces principales fonctions, et les probiotiques et leurs intérêt, Puis dans une seconde partie, une étude sur l'effet de ce dernier sur la stabilité du microbiote, et dans une troisième partie les résultats de cette étude, et la discussion de ces résultats, et enfin la conclusion finale.

Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

I- les probiotiques :

I-1- Historique de développement

Le concept d'aliment fonctionnel est né dans l'Extrême-Orient au Japon dans les années 1980s. À cette époque, les pratiques ancestrales de gastronomie, l'accroissement des maladies liées à l'alimentation, et en particulier à la population vieillissante, conduit le gouvernement japonais à subsidier un programme de recherches visant à identifier les fonctions physiologiques des aliments (**Buttriss, 2000; Hasler, 1998**). Dès 1991, le législateur japonais autorise la distinction commerciale des aliments fonctionnels par le label « FOSHU » pour « Foods for Specified Health Use » et en détermine les conditions d'octroi (**Ninane and al., 2009**).

Importé en Europe dans les années 1990s, le concept d'aliment fonctionnel s'y est développé en prenant, dans l'esprit du public, une signification plus large. Pour le consommateur européen, les aliments fonctionnels représenteraient en effet simplement une alternative “ plus saine ” à l'alimentation classique (**Renard, 2000**). Parmi les ingrédients liés aux aliments fonctionnels, les probiotiques, qui trouvent leur origine dans les travaux de Metchnikoff, au début du 20ème siècle.

D'après la synthèse de ses travaux réalisée par **Tannock (2002)**, Metchnikoff avait pour théorie que les paysans bulgares, grands consommateurs de laits fermentés, vivaient très vieux et en bonne santé. Ainsi, Metchnikoff avait proposé l'ingestion de bactéries vivantes, particulièrement des bactéries lactiques, pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie. A peu près au même temps, un médecin français, Henry Tissier, a suggéré qu'il y avait une possibilité d'administrer de bifidobactéries isolées des selles d'enfants en bonne santé à des enfants malades.

Durant les années 1930s, Shirota réussit à isoler une bactérie ; *Lactobacillus casei shirota*, et ensuite l'intégrer dans une boisson lactée fermentée connue sous le nom « Yakult ». Depuis ce temps, de nombreux chercheurs ont isolé d'autres microorganismes qui ont des avantages associés à la santé de l'homme, et ils ont été commercialisés.

I-2- Définition des Probiotiques

Une des premières définitions des probiotiques comme « facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes » a été proposée par **Lilly and Stillwell en 1965**. Plus tard, Fuller propose une définition très proche du sens actuel : « supplément

alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale » (**Fuller, 1989**).

Récemment, les probiotiques se définissent comme « des cultures microbiennes vivantes survivant le transit gastro-intestinale, où elles colonisent le système » (**Saarela and al., 2000; Matilla-Sandholm and al., 2002;. Betoret and al., 2003**). D'autre part selon **Margoles and Garcia (2003)**, le terme probiotique se réfère à des « cultures de microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés à l'homme ou aux animaux (par le biais de cellules déshydratées ou des aliments fermentés), améliorent les propriétés de la microflore autochtone de l'hôte ».

Cependant, la définition la plus largement acceptée du terme est celle de la consultation mixte d'experts (**FAO/OMS, 2001**) qui redéfinit les probiotiques comme « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates (dans le cadre de l'alimentation), confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte ». Ce groupe a reconnu que les probiotiques doivent être capables d'exercer des prestations de santé sur l'hôte grâce à la croissance et/ou l'activité dans le corps humain (**Leahy and al., 2005**).

I-3- Principales souches bactériennes au potentiel probiotique

Les bactéries probiotiques sont principalement des bactéries lactiques et des bifidobactéries. En effet, ces bactéries sont des membres de la flore normale de l'intestin (**Dunne and al.,2001**), connues pour ne pas présenter de risques toxique ou infectieux (GRAS) et sont relativement faciles à inclure dans des produits laitiers (**Izquierdo, 2009**). La plupart des microorganismes employés comme probiotiques sont cités dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Micro-organismes considérés comme probiotiques. (Hozalpfel *and al.*, 1998).

Lactobacillus	Bifidobacterium	Autres bactéries lactiques	Autres micro-organismes
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i> ,	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus spp</i>
<i>L. amylovirus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli strain Nissle</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
<i>L. cellobius</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. curvatus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilis</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. farciminis</i> <i>L. fermentum</i>		<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. gallinarum</i>			
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

I-3-1- Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont Gram+, généralement immobiles, asporulées et ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio *and al.*, 1994). Douze genres bactériens figurent dans la catégorie des bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Alloicoccus*,

Carnobacterium, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. Elles ont des formes en bâtonnets ou en coques, elles ont également un métabolisme aérobie facultatif. Les bactéries lactiques ont en commun la capacité de fermenter les sucres en acide lactique (Sanders, 2001 ; Fooks and Gibson, 2002). Certaines sont dites « *homofermentaires* » car elles produisent majoritairement de l'acide lactique alors que d'autres sont dites « *hétérofermentaires* » et produisent de l'acide lactique en même temps que d'autres composés (acétate, éthanol et CO₂) (Sillanpaa, 2001 ; Fooks and Gibson, 2002 ; Klaenhammer and al., 2002).

Parmi les principales bactéries lactiques probiotiques utilisées on trouve :

a- Le genre *Lactobacillus*

Les lactobacilles sont les microorganismes probiotiques les plus en vue par leur association populaire avec les produits laitiers fermentés. Il s'agit en général de bâtonnets non flagellés, non sporulés, l'absence de catalase mais parfois une pseudo-catalase est détectée, Gram-positifs faisant partie des BAL. Elles sont importantes pour l'industrie alimentaire, notamment dans les fermentations laitières (Corrieu, 2008, Izquierdo, 2009). Elles sont anaérobies (mais aérotoles) et obtiennent leur énergie du métabolisme fermentatif, mais elles peuvent survivre en présence d'oxygène grâce à leur activité peroxydase capable d'inactiver le peroxyde d'hydrogène. Elles ont également la capacité de survivre à des pH bas dans les milieux qu'elles acidifient par la production d'acide lactique, produit final de la fermentation des carbohydrates.

Cette capacité à produire de l'acide lactique donne aux lactobacilles un avantage compétitif dans les environnements riches en nutriments, ce qui peut en partie expliquer leur potentiel probiotique. Une grande variété de lactobacilles sont utilisées comme probiotiques, parmi lesquelles *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*, sont les espèces les plus étudiées (Izquierdo, 2009).

b- Le genre *Streptococcus*

Les cellules de streptocoques sont des coques ou coccobacilles chimioorganotrophes (Corrieu and Luquet, 2008). Généralement groupées en paires et surtout en chaînes, de longueur variable.

L'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers), par son caractère non pathogène et ses propriétés probiotiques et technologiques (Guiraud *and* Rodec, 2004 ; Iyer, 2010).

I-3-2- Bifidobactérium

Les bifidobactéries sont des bâtonnets aux formes variées (bifide ou ramifié) dont la caractéristique principale est une forme en Y. Les bifidobactéries sont Gram+, immobiles, non sporulées, non productrices de gaz, anaérobies strictes (sauf quelques espèces pouvant tolérer l'oxygène), catalase (-) négatives (excepté *B.indicum* et *B.asteroides*) hétérofermentaires et saccharolytiques, ayant un pourcentage de bases G+C compris entre 55 et 67%, et dont la composition de leurs peptidoglycanes est très variable. La température de croissance des bifidobactéries varie respectivement de 36 à 38°C et de 41 à 43°C et à des valeurs de pH comprises entre 6,5 à 7. Les espèces les plus utilisées comme probiotiques sont *Bifidobacterium lactis* et *Bifidobacterium longum* (Dong *and al.*, 2000).

I-4- Mécanismes d'action des probiotiques

Les mécanismes d'action des probiotiques impliqués dans les effets bénéfiques exercés par ces bactéries sur l'hôte sont complexes, souvent multiples et dépendent de la souche bactérienne considérée. Les effets des probiotiques sont classiquement attribués à une modulation direct ou indirecte de la flore endogène ou du système immunitaire local (Rambaud, 1993). Ceci suggère qu'un contact direct de ces probiotiques avec les différents constituants de la barrière intestinale, tels que la microflore endogène, le mucus intestinal, les cellules épithéliales, les immunocytes, est nécessaire.

I-4-1- Maintien de l'équilibre de la barrière intestinale

Plusieurs souches probiotiques présentent *in vitro* et *in vivo* un effet favorable sur la fonction barrière de l'intestin augmentant ainsi la résistance transépithéliale et diminuant la perméabilité intestinale. Une réduction de l'augmentation de la perméabilité intestinale chez la rat a été observée après un traitement par *L. reuteri* et *L.plantarum* dans un modèle de colite expérimentale (Fabia *and al.*, 1993), ou encore par le cocktail VSL#3 dans le modèle de colite spontanée chez la souris déficiente en IL-10 (Madsen, 2001). De la même façon, *L. brevis* (Garcia-Lafuente *and al.*, 2001) et *L.rhamnosus* GG (Isolauri *and al.*, 1993) réduisent l'augmentation de la perméabilité induite par des germes bactériens ou des agents viraux.

L'effet des probiotiques sur la résistance transépithéliale est généralement accompagné par un maintien de l'intégrité fonctionnelle du cytosquelette des cellules épithéliales intestinales, régulée par les jonctions serrées. *L. acidophilus* et *S. streptococcus* vivants préviennent des modifications de la perméabilité induites par les souches *Escherichia coli* enteroinvasifs (EIEC) en évitant la déphosphorylation des protéines de jonctions et du cytosquelette (**Resta-Lenert and Barret, 2003**). La capacité de ces probiotiques à prévenir la redistribution de l'actine, de l'occludine et de la ZO-1, serait en partie liée à la modulation de la voie de signalisation intracellulaire incluant les MAP-kinases et les Rho-GTPases (**Trivedi and al., 2003**). La rupture du cytosquelette d'actine associée à l'adhésion de souches d'*E. coli* isolées de patients atteints de la maladie de Crohn est également prévenue par *L. GG* (**Khaled and al., 2003**). De même, *L. plantarum* exerce un effet bénéfique contre une souche d'*E. coli* EPEC altérant les protéines des jonctions serrées (**Wonodi and Panigrahi 2003**).

Les effets des probiotiques sur l'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes Gram négatif, et sur la stabilisation de la barrière épithéliale sont également associés à une diminution de la translocation bactérienne. Ainsi chez l'animal, le traitement par certains probiotiques tels que *B. longum* (**Suzuki and al., 1997**) ou *S. bouillardii* (**Berg and al., 1993**) diminue la translocation bactérienne.

I-4-2- Effet immunomodulateur

La plupart des probiotiques stimulent généralement le système immunitaire de l'hôte de façon non spécifique, en stimulant l'activité phagocytaire et la production d'immunoglobulines A sécrétoires (IgA), néanmoins quelques études suggèrent une diminution de la réponse immunitaire de l'hôte (**Berg, 1998**). En effet, les bactéries présentes dans la lumière intestinale sont capables d'adhérer aux cellules épithéliales, de libérer des composés dans la lumière intestinale susceptibles d'être absorbés par l'épithélium intestinal et d'agir sur les cellules immunitaires (**Eckmann and al., 1995**).

De nombreuses études *in vitro* ont montré que les probiotiques stimulent la sécrétion de cytokines, en activant la réponse de type Th1, par les cellules immunitaires avec des effets dépendants des souches. Ainsi, *S. thermophilus* stimule la sécrétion de cytokines (TNF- α , IL-6), l'intensité de la réponse étant souche et dose-dépendantes (**Marin and al., 1998; Miettinen and al., 1996**). De la même façon, chez l'animal et chez l'homme, certaines études ont confirmé également la capacité de différentes souches de lactobacilles et de bifidobactéries à entraîner une réponse immunitaire et une activation de

mécanismes de défense non spécifiques. En effet, plusieurs lactobacilles (*L.acidophilus*, *L.casei*, *L.johnsonii*) aussi bien que des bifidobactéries (*B.bifidum*, *B.lactis*) sont capables d'augmenter la phagocytose (**Arunachalam and al., 2000; Perdigon and al., 1988**) et par conséquent l'élimination des micro-organismes pathogènes.

Une autre étude menée, chez l'homme, a montré que l'ingestion pendant 3 semaines de lait fermenté composé de *L.johnsonii* et de bifidobactéries entraîne une augmentation de la production d'IgA totales et spécifiques chez les sujets sains soumis à un stimulus infectieux avec *Salmonella thyphimurium* atténué (**Link-Amster and al., 1994**). De même, un traitement par *B. lactis* ou *L. rhamnosus* suivi d'un challenge avec une souche d'*E. coli* entérohémorragique se traduit chez la souris par une augmentation d'IgA (**Shu and Gill, 2001**).

L'immunité innée constitue la première ligne de défense immunologique non spécifique permettant l'élimination d'un grand nombre des micro-organismes pathogènes. Certains composés exo/endocellulaires des micro-organismes (pathogènes ou non) sont impliqués dans les effets immunomodulateurs et permettent à l'hôte de discriminer le soi du non-soi. Ces composés sont appelés PAMPs (pathogenassociated molecular patterns) (**Medzhitov and al., 1997**). Les PAMPs regroupent des composants de la paroi cellulaire bactérienne tels que les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycanes (PG), les acides lipotéchoïques (LTA) des parois bactériennes, l'ARN double brin de certains virus, ou encore les mannanes spécifiques des parois bactériennes. De manière générale, l'hôte distingue les signaux émis par les micro-organismes grâce à des récepteurs transmembranaires TLRs (Toll-like receptors) présents sur les cellules épithéliales intestinales et les cellules immunitaires (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques...) (**Beutler and al., 2003**).

Actuellement 10 récepteurs de type Toll ont été clonés chez l'homme (**Aderem and Ulevitch, 2000**) (Figure 01). Les TLRs induisent l'expression de gènes très variés, incluant des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, des chémokines, des facteurs anti-microbiens tels que la NO synthase inductible et les peptides antimicrobiens, des molécules de co-stimulatrices à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, des molécules du CMH et d'autres encore qui permettent d'armer les cellules de l'hôte contre les pathogènes envahisseurs.

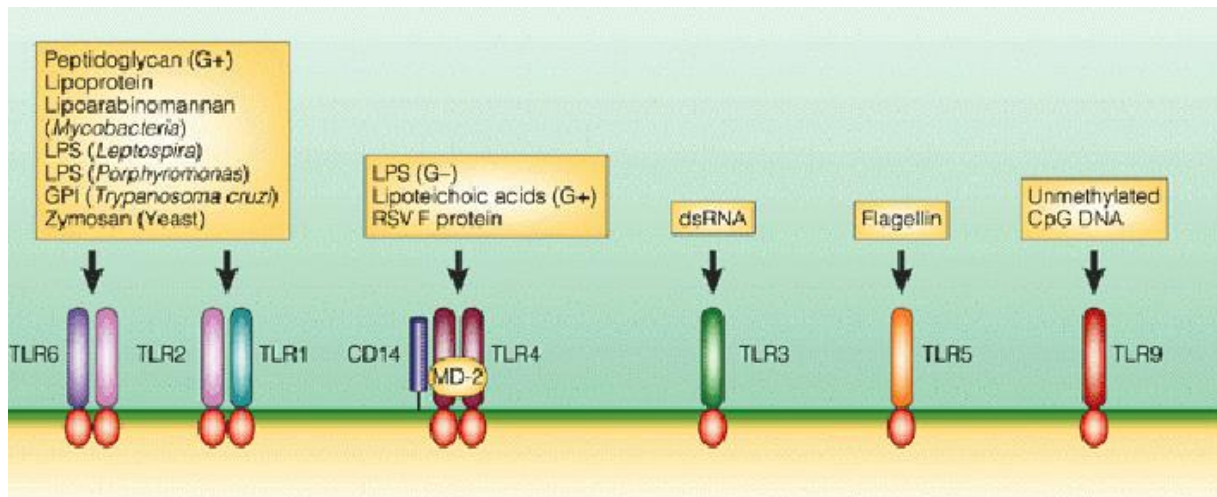


Figure 01 : Les différents ligands des récepteurs Toll-like (Medzhitov, 2001)

I-5- Caractéristiques souhaitables des probiotiques

De façon plus spécifique, pour qu'un microorganisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique, il doit présenter les caractéristiques suivantes :

1. Être un habitant naturel de l'intestin (origine humaine)
2. Être capable de coloniser le milieu intestinal, persister et se multiplier
3. Adhérer aux cellules intestinales et exclure ou réduire l'adhérence des pathogènes
4. Avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (acides, H₂O₂, bactériocines,...)
5. Non invasif, non carcinogène et non pathogène (GRAS)
6. Être capable de co-agréger pour former une flore normale équilibrée
7. Absence de toxicité
8. Possibilité de production en grande échelle
9. Possibilité de cryoprotection
10. Résistance à la bile et au mucus intestinal (l'acide).

Les microorganismes probiotiques doivent également être technologiquement adaptés à interagir dans les produits alimentaires, tels qu'ils conservent à la fois la viabilité et l'efficacité dans les produits alimentaires (sur une échelle commerciale) pendant et après la consommation. Les probiotiques doivent être capables de survivre aux applications industrielles (par exemple la transformation des produits laitiers) et aussi être en mesure de croître ou survivre à des niveaux élevés dans le produit à la fin de la durée de conservation (Farnworth, 2008).

I-6- Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine

Les probiotiques ont pour but d'aider la flore microbienne naturelle de l'intestin. D'innombrables avantages pour la santé sont fournis par l'ingestion des aliments contenant des cultures probiotiques (Figure 02) (Da Cruz *and al.*, 2010). Il est important de mentionner que les effets de la promotion de la santé dépendent de la souche présente dans la formulation du produit, et qu'il n'y a pas une souche probiotique en mesure de fournir tous les avantages (Shah, 2007).

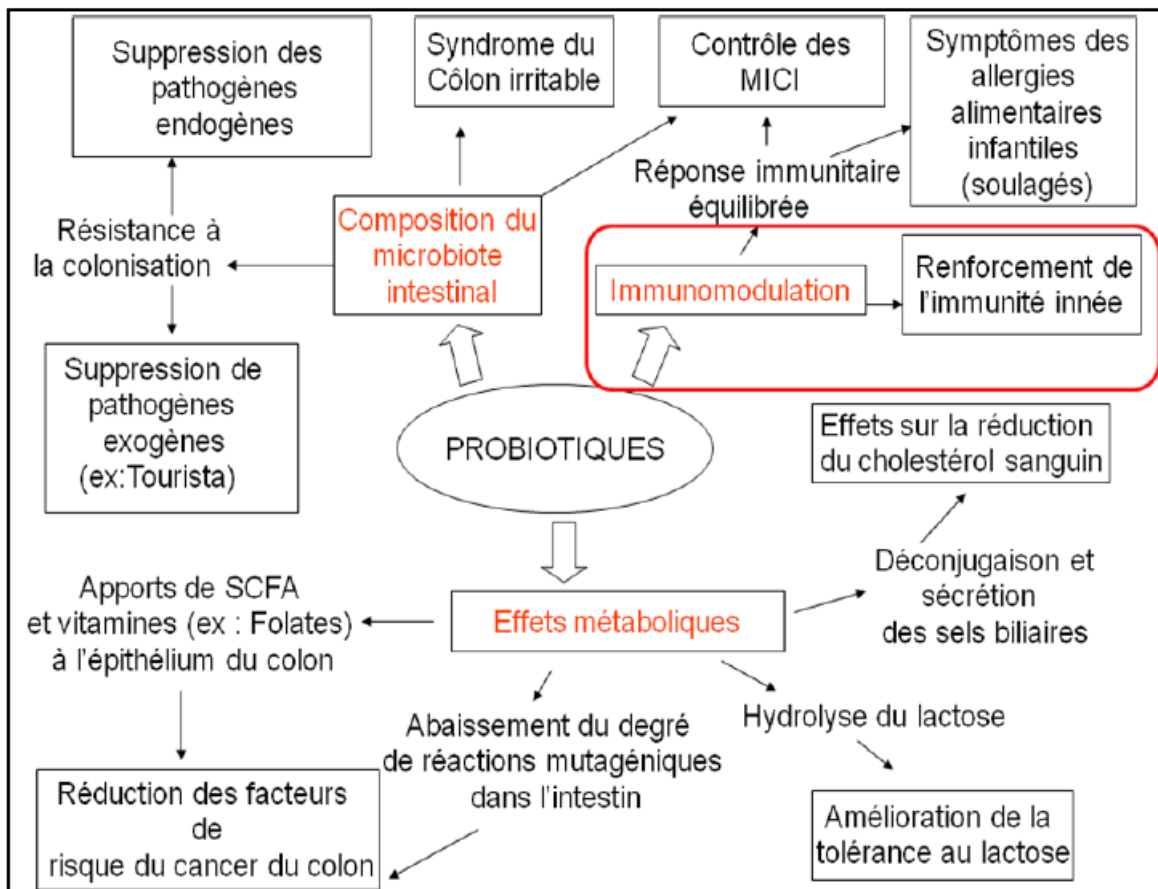


Figure 02 : Présentation des effets bénéfiques sur la santé humaine de la consommation des probiotiques (Saarela *and al.*, 2000).

I-7- effets indésirables des probiotiques :

Un point important concerne l'aspect sécuritaire de l'utilisation des probiotiques. Peu d'études focalisent sur ce point, cependant l'utilisation très large de nombreuses souches probiotiques depuis plusieurs décennies est une preuve indirecte de l'innocuité de ces souches. En outre, la majorité des souches probiotiques appartiennent aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* qui sont classés dans la catégorie des organismes dénués

de pathogénicité (statut GRAS, pour generally regarded as safe). Cependant, quatre types d'effets indésirables potentiels méritent d'être envisagés : infections, activités métaboliques délétères, immunomodulation excessive et transfert de gènes (FAO/WHO, 2002).

I-7-1- Infections

Les probiotiques ne sont pas sélectionnés parmi des agents pathogènes. Par conséquent, le risque d'infections est quasiment nul. Cependant, le risque de leur passage dans le sang par translocation existe.

On définit la translocation bactérienne par le passage de microorganismes du tractus gastro-intestinal aux sites « extra-intestinaux » comme les ganglions lymphatiques mésentériques, le foie, la rate ou le système sanguin. Normalement, les bactéries indigènes sont continuellement en translocation, mais rapidement détruites par les organes lymphoïdes.

Mais, chez les patients atteints de traumatismes graves ou immunodéficients, la translocation est une des causes principales des infections systémiques. Trois mécanismes sont incriminés :

- L'augmentation de la perméabilité intestinale, ou la création de nombreuses lésions sur la muqueuse intestinale,
- L'augmentation de la croissance bactérienne,
- L'immunodéficiência. (EFSA, 2012)

Saccharomyces boulardii est responsable de fongémies chez des patients hospitalisés par passage dans le sang via un cathéter. Il est bien important de mentionner que ce n'est pas l'ingestion qui est à l'origine de la fongémie mais bien la contamination du site d'injection, et par conséquent le passage systémique de la levure, qui est responsable de l'infection.

La contamination de l'air, de l'environnement, du personnel soignant constituent de véritable facteur de risque. Il est donc recommandé aux patients hospitalisés consommant des probiotiques de les ingérer hors de leur chambre et, si le personnel soignant doit aider à l'ingestion, de mettre des gants pour la prise de probiotique et de changer les gants si un geste médical doit être effectué pour éviter tout risque de passage systémique.

Concernant les infections à *Lactobacillus rhamnosus*, il est fort probable qu'elles aient été la conséquence d'une translocation. Une femme de 74 ans, ayant un diabète non insulino-dépendant et consommant régulièrement le probiotique *Lactobacillus rhamnosus*

GG, a souffert d'un abcès du foie à lactobacilles impossible à distinguer de la souche du probiotique. (**Kunz and al, 2004**)

Par ailleurs, une équipe de chercheurs ont étudié la prévalence des bactériémies dans le sud de la Finlande et ils comparent les cultures sanguines isolées et les souches probiotiques laitières. Dans la première étude, 8 cultures sur 3317 contiennent des lactobacilles mais, dans les 8 cultures, aucune ne présente des souches probiotiques d'origine laitière. Dans la seconde étude, 12 cultures sur 5912 possèdent des lactobacilles, mais aucune d'elles ne met en évidence la présence de lactobacilles commercialisés. (**Marteau, 2004**)

L'OMS et la FAO indiquent que, historiquement, les lactobacilles et les bifidobactéries utilisés dans les compléments alimentaires présentent une bonne tolérance. En effet, ces deux types de flores sont présents naturellement dans la flore commensale, et aucune infection aux bifidobactéries n'a été rapporté (**Jenke and al, 2012**).

Les données sont encore insuffisantes sur les risques d'infections des probiotiques en cas de déficit immunitaire. Au contraire, *Saccharomyces boulardii* a démontré un effet protecteur contre des pathogènes intestinaux chez des souris immunodéprimés (**Zanello and al, 2008**).

I-7-2- Activités métaboliques nocives

Bien que les probiotiques induisent des réactions métaboliques positives dans le tractus digestif, ils peuvent promouvoir des réactions métaboliques délétères chez l'hôte.

Pendant la colonisation bactérienne de l'intestin grêle, les microorganismes présents en surnombre peuvent induire des diarrhées et des lésions intestinales via les voies de déconjugaison et de deshydroxylation des sels biliaires. Il a été montré que les patients porteurs d'une iléostomie consommant des probiotiques augmentaient la transformation des acides biliaires primaires conjugués en acides biliaires secondaires libres.

Pour éviter ces réactions exagérées de déconjugaison, et de deshydroxylation, il est primordial de réaliser de bons tests *in vitro* (**Marteau, Shanahan, 2003**).

I-7-3- Immunomodulation excessive

L'administration parentérale de composants de parois bactériennes tels que les peptidoglycanes peut induire de la fièvre, des arthrites et des maladies auto-immunes. Ces effets secondaires sont médiés par les cytokines et il est désormais bien établi que la sécrétion de cytokines est induite par de nombreux probiotiques.

D'après les connaissances actuelles, un seul effet immunologique indésirable a été observé chez l'Homme, sous la forme d'une observation anecdotique et non détaillée d'hépatite auto-immune qui aurait été aggravée par l'ingestion de très fortes quantités de yaourt (Marteau, Seksik, 2005; Kuitunen, 2013).

I-7-4- Transfert de gènes

Certains gènes microbiens, particulièrement des gènes de résistance aux antibiotiques codés par des plasmides, peuvent être transférés entre microorganismes. La probabilité de transfert de gènes dépend de la nature du matériel génétique à transférer (plasmides, transposons...), de la nature des souches donneuses et receveuses, de leurs concentrations respectives et de la pression de sélection dans le milieu (tout particulièrement la présence d'antibiotiques) favorisant la pousse des transconjugants. Il est difficile de mesurer *in vitro* ou *in vivo* le risque de transfert de gènes, et encore plus difficile de choisir quel niveau de probabilité est acceptable.

La résistance des probiotiques aux antibiotiques n'est pas en elle-même un risque, sauf si elle rend le probiotique intraitable en cas d'infection systémique par celui-ci ou si elle peut être transmise à des pathogènes chez lesquels la résistance thérapeutique pourrait avoir des conséquences cliniques néfastes (Aireset *and al*, 2007; Van Reenen, Dicks, 2011).

II- Le microbiote intestinal

Le microbiote, anciennement appelé flore digestive, est une notion récente dont le domaine d'étude s'est développé en France dans les années 1970-1980. Les principaux investigateurs de ce courant se nomment Edmont Sacquet, Pierre Raibaud, et Robert Ducluzeau, Cyril Tancrede et Antoine Andremont (**Corthier, 2007**).

Le microbiote représente l'ensemble des micro-organismes qui colonisent notre tube digestif. La grande majorité de microorganismes réside dans notre intestin et prend le nom de microbiote intestinal. Il est constitué principalement de bactéries, mais aussi minoritairement d'archées, de levures et de virus. Les micro-organismes sont dix fois plus nombreux que nos cellules (10^{14} bactéries contre 10^{13} cellules). Véritable forme de commensalisme, les bactéries présentes dans notre tractus digestif perdurent par la consommation de produits alimentaires ou issus de la desquamation de nos tissus et par cela même, nous permettent d'exercer les mécanismes physiologiques nécessaires pour assurer notre bonne santé. C'est pourquoi le microbiote est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière (**Louis and Marteau, 2010; Marteau, 2013**).

II-1- Communautés bactériennes intestinales chez l'homme

II-1-1- Etablissement du microbiote chez l'Homme

Le microbiote intestinal étant responsable sur de nombreux aspects de la santé humaine, il est important de comprendre comment la composition de cette flore écologique s'établit.

a- De la naissance à l'équilibre

A la naissance, le tractus intestinal est stérile. Rapidement (quelques heures), les bactéries commencent à apparaître dans les selles. La colonisation bactérienne, pendant les premiers jours de vie de l'enfant, dépend principalement de la flore de la mère (vaginale et fécale) et de l'environnement. Cependant, la flore fécale maternelle apparaît être le déterminant essentiel des premières bactéries s'implantant chez l'enfant, les nouveau-nés étant colonisés plutôt par des entérobactéries et des bifidobactéries que par des lactobacilles (**Campeotto and al, 2007**).

Malgré les différences observées entre les études, liées aussi bien aux techniques bactériologiques mises en œuvre qu'aux variations interindividuelles ou géographiques, un schéma général d'implantation se dégage. L'environnement intestinal des nouveau-nés montrant un potentiel oxydatif supérieur au pouvoir réducteur, le tractus intestinal est colonisé en premier par une flore aérobie composée d'entérobactéries (principalement

Escherichia coli), d'entérocoques et de staphylocoques. Au fur et à mesure, la consommation de l'oxygène par ces bactéries qui atteignent 10⁹ à 10¹⁰ ufc (unités formant colonie)/g change l'environnement du tractus intestinal en un milieu réducteur permettant la croissance de bactéries anaérobies strictes (*Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*) (Bezirtzoglou, 1997). Le nouveau-né est ensuite continuellement exposé à de nouvelles bactéries provenant de l'environnement, de la nourriture et des bactéries cutanées de l'adulte. Vers l'âge d'un mois, la flore intestinale présente une majorité de bifidobactéries chez tous les enfants, ainsi que la présence d'*E.coli* et *B. fragilis*, la présence de lactobacilles et de *C. difficile* est moins constante. Une flore complexe et stable, proche de celle de l'adulte, semble obtenue entre l'âge de 2 à 4 ans (Campeotto *and al*, 2007).

b- Facteurs influençant sur l'installation du microbiote

Les éléments pouvant influencer la cinétique d'installation et la composition de ce microbiote sont nombreux. Ces facteurs peuvent être classés en 2 types, les facteurs génétiques et les facteurs environnementaux.

b-1- Les facteurs génétiques :

La première publication qui a démontré l'influence de la génétique sur le microbiote intestinal a été publiée par **Toivanen *and al*, 2000**. Cette étude a extrapolé la composition de la flore en déterminant par chromatographie en phase gazeuse le profil en acide gras dans les selles de souris congéniques élevées dans des conditions identiques et présentant ou non un même complexe majeur d'histo-compatibilité (CMH). Les résultats obtenus ont indiqué que le CMH avait clairement une contribution sur la composition de la communauté microbienne, cependant, l'auteur ajoute que d'autres gènes seraient susceptibles de modifier le microbiote (**Toivanen *and al*, 2000**). Plus récemment, une expérimentation sur des prélèvements caecaux sur souris consanguines a montré que les microbiotes intestinaux étaient plus semblables entre ces animaux qu'entre ceux des animaux non consanguins. Cette étude réalisée en obtenant les profils caecaux par DGGE démontre le lien entre les gènes et le microbiote. Par contre, deux populations de souris consanguines mais élevées chez deux vendeurs différents, ne présentaient pas la même flore, ce qui prouve que les facteurs environnementaux ont aussi un rôle important dans la composition du microbiote (**Hufeldt *and al*, 2010**). Une étude à grande échelle (n=645) sur des selles de souris analysées par pyroséquençage a permis de confirmer ces résultats. En effet, il a pu être défini un noyau du microbiote composé de 64 groupes taxonomiques différents qui varie quantitativement à travers la plupart des animaux dans la population.

Puis, ce noyau a été comparé avec 530 SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Il en est ressorti que 18 locus de caractères quantitatifs montrés un lien significatif avec l'abondance de certains taxons bactériens (**Benson and al, 2010**).

Il est donc certain que la génétique quantitative apparaît comme une approche fortement prometteuse qui peut être utilisée pour mieux comprendre l'influence génétique hôte sur le microbiote et découvrir des gènes hôtes supplémentaires contrôlant la diversité microbienne dans le tractus intestinal.

b-2- Les facteurs environnementaux :

Une étude hollandaise a analysé par PCR en temps réel 1032 selles d'enfants âgés de plus de 3 semaines et de moins de 6 semaines ce qui permis d'estimer la flore suivant des facteurs précis (mode d'accouchement, régime alimentaire de la mère et de l'enfant, antibiothérapie (**Penders and al, 2006**).

- **Influence du mode d'accouchement :**

Une étude du département de biologie de Puerto Rico a montré que de la composition du méconium prélevé dans les premières 24 heures était déjà très différent entre un nouveau-né accouché par césarienne ou par voie basse. Les enfants nés par voie basse présentaient une flore proche de la flore vaginale de leurs mères (*Lactobacillus*, *Prevotella*) alors que les enfants nés par césarienne présentaient une communauté bactérienne proche de celle de la peau (*Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium*) (**Domingoz-Bello and al, 2010**).

Chez le nouveau-né âgé d'un mois, la différence de composition est toujours importante, l'accouchement par césarienne est associé à une plus faible colonisation par des bifidobactéries et *Bacteroides fragilis* et à une plus forte colonisation par des *Clostridium difficile* (**Penders and al, 2006 ; Biasucci and al, 2010**).

- **Influence de la date du terme de la grossesse :**

Chez les nouveau-nés prématurés, deux observations ont pu être mises en évidence. D'une part, un retard de colonisation important par rapport aux enfants arrivés à terme ainsi qu'un nombre réduit d'espèces bactériennes (**Magne and al, 2005 ; Westerbeek and al, 2006**). Si la flore aérobie colonise assez rapidement le prématuré, la flore anaérobie (*Bifidobacterium* et *Bacteroides*) est retardée. Ce retard d'implantation peut s'expliquer par le fait que les enfants plus fréquemment nés par césarienne, sont rapidement séparés de leurs mères et placés dans un environnement de soins intensifs très aseptisé et fréquemment soumis à une antibioprofylaxie à large spectre. D'autre part, il a été observé

une colonisation considérablement plus importante en fréquence mais aussi en quantité de *Clostridium difficile* (**Penders and al, 2006**).

Enfin, une étude sur l'entérocolite nécrosante, pathologie survenant chez 5-10% des prématurés de moins de 1,5 kilogramme, montre une association entre la présence dans les selles de certaines entérobactéries (*Klebsiella*, *Citrobacter* et *Tatumella*) et l'entérocolite. Cette étude a été réalisée dans la phase précoce de l'entérocolite nécrosante (marqueurs inflammatoires encore négatifs et clinique asymptomatique), ce qui pourrait être une voie pour prévenir cette pathologie (**Carlisle and al, 2011**).

- **Influence de l'environnement :**

L'environnement joue un rôle important dans la colonisation intestinale. Certaines études ont mis en évidence une colonisation par les bifidobactéries plus fréquentes et à un niveau plus important chez les enfants nés dans les pays en voie de développement (**Campeotto and al, 2007**). Ces différences au niveau du microbiote sont vraisemblablement liées aux conditions plus strictes d'hygiène dans les pays industrialisés.

- **Influence du mode d'alimentation :**

La flore qui s'implante chez le nouveau-né allaité est moins diversifiée que celle d'un nouveau-né nourri au lait artificiel. La différence la plus notable est la colonisation dominante avec le genre *Bifidobacterium* chez le nouveau-né allaité. Parallèlement, l'implantation des entérobactéries, mais surtout des *Clostridium* et des *Bacteroides* est retardée et/ou se fait à un niveau moins élevé. En revanche, dès la fin de l'allaitement, ou l'instauration d'une alimentation mixte, la flore prend rapidement un profil de flore de nouveau-né nourris au lait artificiel. De nombreux travaux ont recherché les composants du lait responsables de cette colonisation dominante du genre *Bifidobacterium*, mais ce n'est que tardivement que l'on s'est intéressé aux oligosaccharides (3^{ème} constituants quantitativement du lait maternel). En raison de leur structure, ils ne sont pas hydrolysés et donc non assimilés et peuvent jouer leurs rôles de facteurs bifidogènes (**Coppa and al, 2004**).

Enfin et étrangement, *Clostridium difficile* colonise plus fréquemment et en plus grand nombre les enfants nourris par du lait maternel (**Penders and al, 2006**), mais ce portage dans la petite enfance reste dans la majorité des cas asymptomatique.

- **Influence de l'antibiothérapie :**

L'administration orale d'antibiotiques (principalement l'amoxicilline) mais aussi d'antifongiques (le miconazole) à l'enfant pendant le premier mois de vie a montré une diminution du nombre de *Bifidobacterium* et de *Bacteroides fragilis* (**Penders and al, 2006**).

De plus, l'antibiothérapie chez la femme *per partum* (surtout pour la prévention du risque d'infection néonatale par le Streptocoque du groupe B) a montré une augmentation des infections néo natales par des bactéries résistantes à l'antibiotique (**Stoll and al, 2002**).

II-2- Diversité du microbiote intestinal

II-2-1- la composition du microbiote intestinale

L'analyse du microbiote intestinal est actuellement en plein essor. Celle qui reposait sur des données de microscopie avant 1995, bénéficie des progrès de la science en termes de biologie moléculaire.

En effet, les premières techniques d'analyse du microbiote résultaient de données de microscopie et de cultures axéniques. Ces techniques ont pu mettre en évidence les bactéries dominantes du microbiote intestinal (4 *phyla* contre 30 existants) mais ont trouvé leurs limites dans la diversité des bactéries détectées conséquence en partie d'une mise en culture difficile des bactéries anaérobies.

Aujourd'hui, les études de métagénomiques ont permis l'identification d'un grand nombre de micro-organismes de notre tractus intestinal (**De Preter and Verbeke, 2013; Lagier and al, 2012**).

Les différentes approches dites « omiques » sont utilisées pour identifier de nouveaux marqueurs spécifiques. Génomique, transcriptomique et protéomique délivrent des informations intéressantes en matière de génotype mais des données limitées sur le phénotype. L'une des plus utilisée dans l'identification des bactéries du microbiote est l'étude de l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) et l'ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). Ces structures sont étudiées car elles présentent de nombreux avantages : l'ARNr 16S est présent dans toutes les bactéries et sa fonction ne varie pas. L'ADNr 16S se compose d'une région constante qui définit le *phylum* et d'une région variable qui caractérise le genre et l'espèce de la bactérie considérée.

La méthode qualitative classique utilisée pour étudier ces régions est la PCR. En plus d'identifier les souches bactériennes, elle permet d'analyser leurs liens phylogéniques. D'autres techniques assez courantes peuvent également être sollicitées : l'électrophorèse en

champ pulsé (ECP), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PLFR) et le typage bactérien (ou « ribotyping »).

Le PLFR a recourt à l'amplification d'une région particulière d'ADNr 16S. Le fragment obtenu est ensuite digéré par des enzymes de restriction sélectionnées en fonction du genre bactérien étudié. Le profil PLFR est ensuite défini après migration des différents fragments de restrictions sur gel d'agarose. De la même manière, l'ECP implique l'amplification et la digestion de longs fragments d'ADN (50 à 1000 kb) sur un gel d'agarose soumis à un champ électrique pulsé. Elle permet d'établir le génome complet de la bactérie à identifier. Le ribotyping est une empreinte bactérienne qui a recours à la digestion de l'ADN bactérien entier par des enzymes de restrictions. Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse et transférés sur une membrane de nitrocellulose sur laquelle seront hybridées des sondes correspondant à différentes régions du génome bactérien (ARNr 16S, 5S, et 23S).

Les méthodes quantitatives permettent d'évaluer la proportion de chaque population bactérienne dans l'intestin. Elles regroupent 3 grandes techniques : l'hybridation « dot blot », l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) et la PCR en temps réel.

L'hybridation dot blot est une technique semi-quantitative. Les ADN et ARN bactériens sont dénaturés et transférés sur une membrane chargée positivement. C'est à ce niveau qu'ils seront hybridés à des sondes radioactives spécifiques de région de l'ARNr 16S.

La PCR en temps réel quantifie les fragments d'ADN d'intérêt à partir de l'intensité de fluorescence obtenue au cours de l'amplification, ceci grâce à la présence d'agents intercalant de l'ADN marqués. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de fragments d'ADN étudiés. La technique FISH permet de quantifier les populations bactériennes sur des coupes de tissus ou des échantillons de selles. En effet, elle nécessite l'utilisation de sondes fluorescentes qui vont s'hybrider directement dans l'échantillon. L'intensité du signal est ensuite quantifiée par microscopie ou cytométrie en flux. Elle nous renseigne donc à la fois sur la proportion de bactéries mais également sur sa distribution au sein de l'échantillon considéré (**Cinquin, 2005**).

Cependant les données de protéomiques et de métagénomiques ne fournissent pas de renseignements sur le lien entre le microbiote intestinal et le métabolisme de l'hôte utiles à l'étude de situations physiologiques ou physiopathologiques. C'est pourquoi l'approche métabolomique est aujourd'hui envisagée. Elle intègre des informations intéressantes sur l'état de la cellule cible (modifications géniques, post-transcriptionnelles,

signalétiques...) qui vont refléter son phénotype physiologique ou pathologique. Le microbiote exerce une fonction métabolique importante dans l'intestin. La métabolomique étudie donc le profil métabolique des microorganismes en évaluant les métabolites qu'ils produisent. Cependant, les changements de concentrations des métabolites obtenus sont soumis à des variations relatives à des agents extérieurs tels que l'alimentation ou encore les médicaments. Ceci étant considéré, l'étude du profil métabolique du microbiote intestinal reste un élément de choix pour apprécier l'interaction nutriments, métabolisme intestinal et composition du microbiote dans des conditions physiologique et pathologique telles que les MICI (De Preter and Verbeke, 2013).

II-2-2- L'écosystème digestif

Le tractus digestif présente des environnements différents de la bouche à l'anus. C'est pourquoi les micro-organismes qui le colonisent vont varier en fonction du pH, du potentiel d'oxydoréduction, des substrats et des sites d'adhésion qui caractérisent l'organe cible ou la niche écologique. Les micro-organismes se concentrent majoritairement dans la région intestinale : côlon et iléon (Marteau, 2013) (Figure 03).

La bouche renferme 700 espèces de micro-organismes réparties dans 9 *phyla* bactériens et un *phylum* archéen. Elles colonisent les dents, les gencives, la langue et la muqueuse buccale. Les organismes majoritaires appartiennent aux genres *Streptococcus* et aux espèces *Actinomyces spp.* La surface d'attachement de ces bactéries est un élément clé de cette colonisation. Par exemple, les dents supportent des agrégats de bactéries organisés en biofilm générant la plaque dentaire favorable au développement des caries.

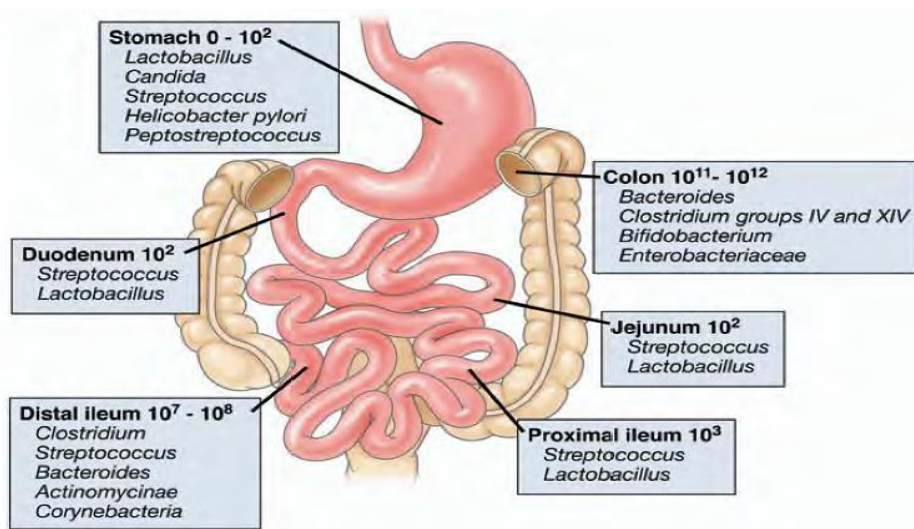


Figure 03 : Répartition des différentes espèces bactériennes dans le tube digestif (Sartor, 2008)

L'oesophage a une composition microbienne proche de celle de la bouche et compte une diversité de 6 *phyla* de 95 espèces. L'estomac présente un pH peu propice à l'implantation de micro-organismes, c'est donc une première barrière qui prévient l'entrée de micro-organismes exogènes. Les micro-organismes qui l'occupent se situent principalement dans le mucus stomacal et développent des adhésions. L'un des plus connus est *Helicobacter pylori*. L'intestin grêle est une zone plus favorable à la colonisation. La présence de mucus permet l'implantation de nombreux micro-organismes luminaux et pathogènes. Néanmoins le temps de séjour court des composés luminaux limite leur croissance à cet endroit. C'est dans le côlon que la multiplication des micro-organismes devient optimale : le temps de transit lent, l'abondance de facteurs alimentaires (polysaccharides) et de mucus en sont responsables. C'est une zone qui favorise également la diversité microbienne avec l'identification de plus de 800 espèces, chiffre encore largement sous-estimé (**Dethlefsen and al, 2006; Tlaskalova-Hogenova and al, 2004**).

D'autre part, on peut parler de plusieurs types de microbiotes intestinaux : le microbiote fécale, le microbiote luminal et le microbiote associé à la muqueuse intestinale. Le premier est étudié grâce au recueil de matières fécales, le dernier par des biopsies réalisées au décours d'une coloscopie de contrôle (**Louis and Marteau, 2010**).

De manière générale, les micro-organismes s'adaptent aux conditions du tractus digestif par divers moyens de sélection dont la mise en place de structures protectrices : les biofilms.

Les biofilms sont des matrices de protection qui renferment une ou plusieurs populations bactériennes adhérant les unes aux autres ou à un support. Ces structures sont présentes dans l'ensemble du tube digestif. Elles sont notamment mises en place pour pallier le transit rapide dans le grêle. Les genres *Bacteroides* et *Fusobacterium* créent des biofilms associés au mucus. *Fusobacterium* permet la co-agrégation de plusieurs colonisateurs (*Helicobacter pylori*, certaines bactéries buccales) au sein des biofilms en générant des relais. Le biofilm a un rôle protecteur vis-à-vis des pathogènes mais va également permettre une meilleure adhérence aux parois. L'hôte favorise la création des biofilms élaborés par la flore commensale par la sécrétion d'IgA (**Bollinger and al., 2007; Probert and Gibson, 2002**).

II-2-3- Présentation des micro-organismes de notre intestin

De manière générale, le microbiote intestinal se compose de nombreux micro-organismes aux diverses origines : bactéries, archées, levures et virus (**Lagier and al, 2012**).

Sa composition bactérienne est la plus étudiée. L'analyse en biologie moléculaire de l'ARN 16S bactérien a identifié 4 *phyla* majoritaires dans le tractus intestinal : *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Actinobacteria*, et *Proteobacteria*. 95% des bactéries de notre tractus digestifs sont anaérobies et près de 80% sont Gram +.

Elles appartiennent majoritairement au *phylum Firmicutes* (64%) apparenté aux genres *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus* et *Lactobacillus*. Le *phylum Bacteroides* représente 23% de la population bactérienne de l'intestin et se compose des genres *Bacteroides*, *Prevotella* et *Porphyromonas*. Les *Protéobacteria* sont minoritaires par rapport aux autres genres (8%) et sont représentées par les genres *Escherichia*, *Desulfovibrio* et *Helicobacter*. Enfin, les *Actinobacteria* (5%) regroupent les bifidobactéries (**Lagier and al, 2012; Sartor, 2008**).

En outre, il existe des micro-organismes de passage dans notre tractus digestif. Ce sont le plus souvent des levures ou des bactéries lactiques mais aussi certains pathogènes (**Marteau, 2013**).

Les organismes eucaryotes tels que les levures et les champignons peuplent donc aussi notre tractus digestif. Les plus communes sont les levures issues des espèces *Candida* et *Saccharomyces* détectées par des techniques de culture et de microscopie. Néanmoins la diversité de ces organismes est encore très sous-estimée (**Lagier and al, 2012**).

Les archées sont présentes chez 4% des individus. En effet, l'analyse de leur ADNr 16S a permis d'identifier au sein de nos fèces la présence de *Méthanobrevibacter smithii* et *Méthanobrevibacter stadtmanae* (**Dridi and al, 2011**).

Enfin, les virus de notre tractus digestifs sont pour l'essentiel des phages (ADN) et des virus végétaux (ARN) (**Lagier and al, 2012**).

II-2-4- Facteurs de variation du microbiote intestinal

La diversité des espèces dominant notre tractus digestif est stable dans le temps à l'exception des *lactobacilles* qui sont souvent transitoires car apportés par notre alimentation. On parle ainsi de normobiose. Les modifications du microbiote intestinal ou dysbiose sont généralement la conséquence d'une colonisation par des micro-organismes exogènes ou de la modification des niches écologiques (temps de transit, alimentation,

pH). Cependant, il est difficile d'induire un changement durable du microbiote intestinal (Dore and Corthier, 2010).

a- Facteurs intrinsèques

a-1- Variation du microbiote intestinal avec l'âge

Les changements de régime alimentaire, l'évolution du système immunitaire au cours de la vie sont des facteurs qui vont participer aux modifications du microbiote intestinal. En effet, le microbiote de la personne âgée sera différent de celui de l'enfant. Premièrement, le genre *Bacteroides* augmente avec l'âge et sa diversité se réduit fortement chez la personne âgée. Cette élévation est responsable d'une chute du nombre et de la diversité des espèces du genre *Bifidobacterium* dont *Bifidobacterium adolencensis*, *Bifidobacterium angulatum* et *Bifidobacterium longum* à ces âges. Par ailleurs, les populations du genre *Eubacterium* augmentent au fil des années. *Eubacterium* a été mis en cause dans l'apparition de l'arthrite du sujet âgé. L'émergence de souches à *Clostridium* au cours du temps et leurs diversifications est également observée. De nombreuses espèces ont été isolées des fèces des personnes âgées dont des pathogènes (*Clostridium difficile*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium malenominatum*) (Woodmansey, 2007).

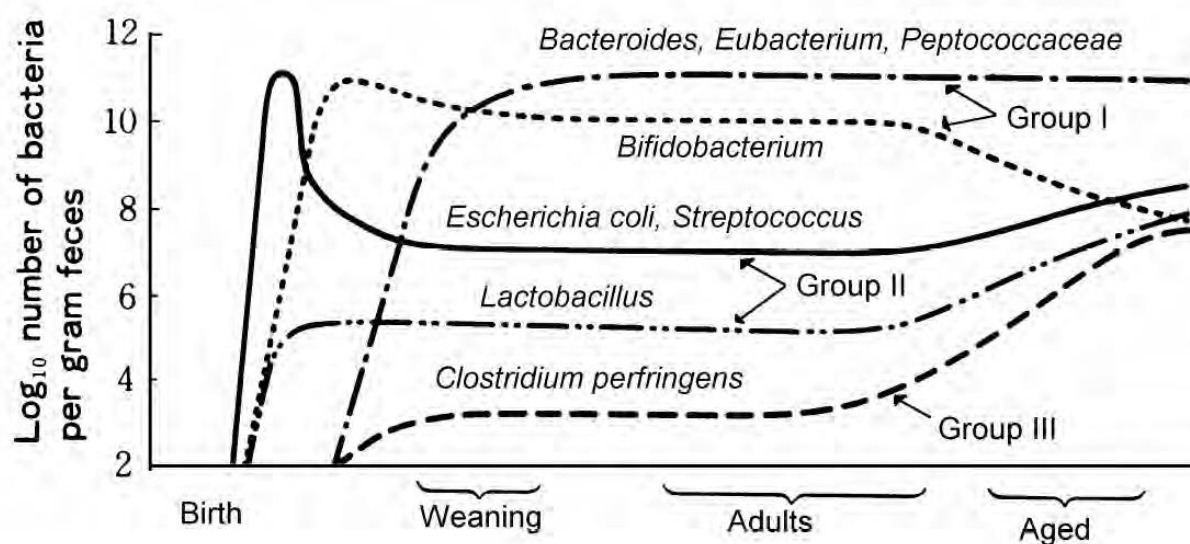


Figure 04 : évolution du microbiote intestinal avec l'âge (Mitsuoka, 1992)

a-2- compétition entre les microorganismes de la flore intestinale

Les relations entre les organismes du microbiote relèvent de véritables mécanismes de compétitions. En effet, les micro-organismes mettent en œuvre des processus afin de coloniser le milieu en inhibant la propagation de leurs voisins par :

1. émission de toxines (*Williopsis spp*, *Clostridium tetani*)
2. production de peptides antimicrobiens (bacteriocine par *Lactobacillus Bulgarius*, Colicine par *Escherichia Coli*)
3. métabolismes des nutriments (variation de pH, émission de produits toxiques : acide lactique produit par *Lactobacillus rhamnus* délétère pour *Salmonella*)
4. répression des adhérences (*Lactobacillus delbrueckii* empêche l'adhésion d'*Escherichia coli*). D'autres s'associent dans des structures de résistances telles que les biofilms. Cet ensemble d'interrelations entre les microorganismes participe donc à l'évolution de la composition du microbiote intestinal (**Abedi and al., 2013; Bevins and Salzman, 2011; Guyard and al., 2000; Stephani and al., 2011**).

b- Facteurs extrinsèques

Les modifications du microbiote sont le plus souvent imputables à des facteurs exogènes tels que : l'alimentation, la promiscuité et les conditions d'hygiène, les médicaments, les probiotiques, ou encore les pathologies.

b-1- L'alimentation

L'alimentation est un facteur de variation du microbiote. D'une part, elle influence sur la maturation du microbiote du nourrisson par sa diversification (introduction des légumes, de la viande).

D'autre part, des études comparatives entre des populations asiatiques et occidentales ont montré des divergences de microbiotes. En effet, des japonais soumis 10 mois à un régime occidental subissent une augmentation des *fusobactéries* au sein de leur microbiote intestinal.

Des aliments peuvent également orienter l'émergence de certains germes à condition qu'ils soient ingérés sur le long terme (**Dethlefsen and al., 2006; Finegold and Sutter, 1978**).

Les modifications du microbiote induites par les régimes alimentaires sont résumées dans le tableau 02.

Chapitre II : le microbiote intestinal

Tableau 02 : Résumé des régimes inducteurs de dysbiose, Tableau traduit de (Brown and al., 2012)

Régime	Bactéries altérées	Effets sur les bactéries
Riche en graisse	<i>Bifidobacteria</i>	↓
Riche en graisse et sucres	<i>Clostridium innocuum</i> <i>Catenibacterium mitsuokai</i> <i>Enterococcus spp</i> <i>Bacteroides</i>	} ↑ ↓
Pauvre en carbohydrates	<i>Bacteroides</i>	↑
Hypocalorique	<i>Clostridium coccoïdes</i> <i>Lactobacillus spp</i> <i>Bifidobacteria spp</i>	↓ (croissance limitée)
Carbohydrates complexes	<i>Mycobacterium avium</i>	} ↓
	<i>Subspecies paratuberculosis</i>	
	<i>Enterobacteriaceae</i>	
	<i>Bifidobacterium longum</i>	} ↑
	<i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	
Sucre raffinés	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium difficile</i>	↑
	Vegetarian	<i>Escherichia coli</i>
Riche en omega 6	<i>Bacteroides</i>	↓
	<i>Firmicutes</i>	} ↑
	<i>Actinobacteria</i>	
	<i>Proteobacteria (δ-proteobacteria)</i>	
Graisse saturés (graisse du lait animal)	<i>δ-proteobacteria</i>	↑

La consommation de fibres semble augmenter le taux de *bifidobactéries* lorsque ces populations sont faiblement représentées dans le tractus digestif. La mise en place d'un régime végétarien fait varier la composition du microbiote car il est riche en fibres. En conséquence, la concentration en AGCC est diminuée et il en résulte une diminution du pH intestinal. Les modifications des conditions de la niche écologique donnent lieu à une variation de la composition de la flore. Elles défavorisent l'implantation d'*Escherichia coli* et des *Enterobacteriaceae* pathogènes. Un régime occidental riche en graisses et en sucre conduit à une recrudescence de la colonisation intestinale par les *Firmicutes* au détriment des *Bacteroides*. L'augmentation de la consommation de sucres raffinés favorise la croissance de *Clostridium difficile*. Un régime enrichi en acides gras saturés conduit à l'augmentation des *δ-Proteobacteria* et riche en oméga 6 facilite la recrudescence des *Firmicutes*, *Actinobacteria* et *Proteobactéria* (Brown and al., 2012).

b-2- Les médicaments

Les antibiotiques influencent sur la composition du microbiote intestinal. Ils éliminent les souches qui leur sont sensibles et ont parfois pour conséquence la recrudescence de souches pathogènes minoritaires de notre flore. Ainsi certains de leurs effets indésirables sont infectieux : développement de candidoses digestives sous céphalosporines, colite pseudomembraneuse liée à *Clostridium difficile* sous amoxicilline (DOROSZ, 2012; Robinson and Young, 2010).

D'autres médicaments modulent la composition du microbiote intestinal. Ils agissent sur ce dernier par des modifications des conditions de la niche écologique telles que la variation du pH (inhibiteurs de la pompe à proton, anti-histaminiques H₂), l'altération du mucus (AINS), ou encore des modifications de la motilité intestinale (opioïdes, laxatifs) (Simren and al., 2013).

b-3- Les probiotiques

Les probiotiques sont des facteurs qui vont influencer la composition de la flore bactérienne. en délivrant des microorganismes bénéfiques à l'homéostasie des fonctions intestinales (*Lactobacilles*, *bifidobacteries*, *Saccharomyces boulardii*), (Marteau, 2013; Scaldaferrri and al., 2013).

b-4- Les prébiotiques

Le terme de prébiotique a été récemment introduit par Gibson et Roberfroid en 1995 (Gibson, 1995). Il désigne un ingrédient alimentaire non digestible par l'hôte mais stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité de certaines bactéries du côlon comme par exemple les bifidobactéries.

Pour qu'un ingrédient alimentaire soit classé comme prébiotique, il doit :

1. ni être hydrolysé, ni être absorbé dans la partie haute du tube digestif
2. être un substrat sélectif d'une ou plusieurs bactéries bénéfiques, commensales du côlon, dont la croissance est alors stimulée et/ou le métabolisme activé
3. en conséquence, induire une composition plus saine de la flore colique

Les prébiotiques peuvent être des sucres non digestibles, des peptides ou des protéines et même des lipides qui, en raison de leur structure ne sont pas absorbés dans l'intestin grêle.

Actuellement, le plus important des polysaccharides naturels, autre que l'amidon, est l'inuline, qui se trouve dans les racines de chicorée, les artichauts, les asperges, les

topinambours, les oignons, l'ail, le poireau, la banane...C'est un fruto-saccharide naturel. La liaison β 1-2 qui unit les radicaux fructosyl entre eux n'est pas hydrolysable par les enzymes digestives de l'homme. Elle l'est, au contraire, par l'enzyme β fructosidase des bifidobactéries (**Dacosta, 2001**).

b-5- Les conditions d'hygiène

Les conditions d'hygiène influencent la composition du microbiote intestinal. C'est en effet le cas, lorsque l'on compare le microbiote d'un Africain des zones rurales où les conditions d'hygiènes sont basses à un Européen citadin. En effet, la première population présente un microbiote intestinal plus riche en *Bacteroides* que la seconde. Les *Firmicutes* sont, par opposition, plus représentés lorsque le sujet est exposé à un environnement plus hygiénique (**Simren and al., 2013**).

Des conditions d'hygiène diminuées prédisposent, d'autant plus dans l'enfance à la recrudescence d'infections et notamment de gastroentérites. Ces pathologies induisent des dysbioses avec une augmentation des bactéries aérobies et une diminution des anaérobies strictes (**Joly and al., 2007**).

Cet ensemble de facteurs extrinsèques ne modifient pas de manière irréversible la composition du microbiote intestinal. C'est un organe très stable qui participe à de nombreuses fonctions de la physiologie humaine.

II-3- fonctions du microbiote intestinal

Les bactéries du microbiote sont impliquées dans diverses fonctions bénéfiques à l'hôte, comme la prévention des infections causées par les pathogènes, la digestion et la mise à disposition de nutriments ainsi que la maturation du système immunitaire associé aux muqueuses (**Figure 03**).

Ce microbiote impliqué dans des fonctions nutritive, métabolique, protectrice et immunologique agit sur la physiologie intestinale mais aussi sur la physiologie systémique de l'hôte (**Fanaro and al. 2003**). Les fonctions métabolique et protectrice seront présentées de façon succincte et la fonction immunologique sera décrite de façon plus détaillée.

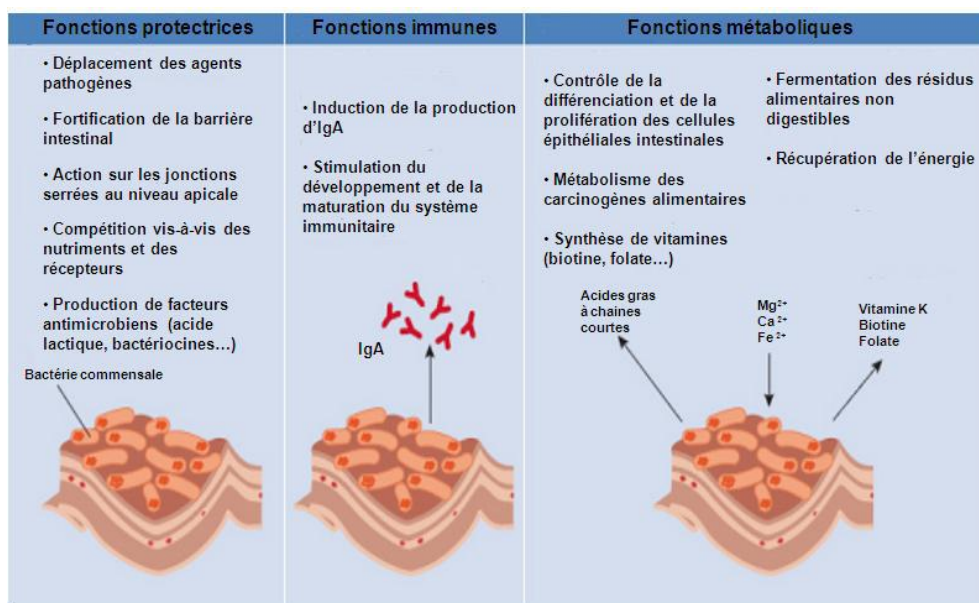


Figure 05: Les fonctions du microbiote intestinal. (O'Hara and Shanahan 2006)

II-3-1- Fonctions métaboliques et nutritionnelles

Les bactéries du microbiote intestinal peuvent participer au métabolisme de l'hôte en consommant des éléments non digérés par l'hôte comme les carbohydrates (pectine, cellulose...), fournissant ainsi des nutriments à l'hôte ou à d'autres bactéries du microbiote.

L'activité métabolique la plus intense se retrouve au niveau du colon qui contient le plus grand nombre de bactéries. Le microbiote intestinal participe au métabolisme des sucres, des lipides et des protéines. De plus, il est impliqué dans le maintien de l'homéostasie des gaz au niveau de l'intestin. Les principaux métabolites fournis par le métabolisme bactérien (butyrate, acétate et propionate) sont ensuite pris en charge par les cellules de l'hôte. Ces acides gras à chaînes courtes jouent un rôle important dans la physiologie de l'intestin, en contrôlant la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales au niveau du colon

(Srikanth and McCormick 2008), notamment le butyrate qui est consommé en grande partie par les colonocytes. Ce microbiote apporte également des acides aminés indispensables à l'hôte et des vitamines comme la vitamine K et des vitamines du type B (folate, biotine, riboflavine...) (Hill 1997). Les bactéries de ce microbiote participent également à la détoxification de l'organisme et au métabolisme des xénobiotiques.

II-3-2- Fonction protectrice

Les bactéries du microbiote intestinal s'opposent à la colonisation du tractus gastrointestinal par des bactéries de l'environnement externe pouvant être potentiellement pathogènes. De plus, elles permettent également de contrôler le développement excessif de bactéries pathogènes faiblement représentées au sein du microbiote intestinal. Cette fonction protectrice des bactéries commensales du microbiote intestinal est essentiellement due à la compétition pour les nutriments mais aussi à l'exclusion compétitive pour l'occupation des sites d'adhérence épithéliaux (**Srikanth and McCormick 2008**). La protection de l'intégrité de l'hôte comprend également la production de composés antimicrobiens par les bactéries du microbiote intestinal comme les bactériocines capables de détruire des bactéries pathogènes.

De plus, la présence du microbiote intestinal régule la composition du mucus qui recouvre et protège la muqueuse intestinale. Ce mucus contient principalement des mucines qui servent de barrière physique entre l'épithélium intestinal et les bactéries (**Swidsinski and al. 2007**) mais aussi des agents antibactériens (lysosymes, IgAs et défensines) produits par les cellules épithéliales. Il existe différents types de cellules épithéliales. La muqueuse intestinale comporte des invaginations, appelées cryptes de Lieberkühn, où sont situées les cellules souches dont la différenciation et la prolifération sont à l'origine du renouvellement de l'épithélium intestinal. Les cellules de Paneth situées au fond des cryptes, produisent des lysosymes et des défensines. De ce fait, elles participent activement à l'immunité innée. Les cellules calciformes produisent le mucus, les cellules entéro-endocrines produisent des hormones (catécholamines) et les entérocytes absorbants ont pour fonction d'absorber les nutriments. Le microbiote intestinal peut moduler la teneur en mucines du mucus en stimulant la différenciation des cellules calciformes. Il peut également influencer le niveau de production et de sécrétion des mucines (**Deplancke and Gaskins 2001**). Le microbiote intestinal peut donc réguler l'expression des gènes des cellules intestinales de l'hôte.

Les effets induits regroupent l'augmentation de la prolifération des cellules intestinales, de l'absorption et du métabolisme des nutriments, de l'assimilation de certains ions (fer, magnésium et calcium) et l'amélioration de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal (**Hooper and al. 2001, Rawls, Samuel and Gordon 2004**) également assuré par la présence de jonctions serrées. En effet, l'absence de microbiote est

associée à une diminution du renouvellement cellulaire, de la vascularisation au niveau de l'épithélium intestinal et de l'activité des enzymes digestives.

Cette absence a également un effet majeur sur le système immunitaire puisqu'un défaut de cellules immunitaires est également observé (**Macdonald and Monteleone 2005**).

II-3-3- Fonction immunologique

Le développement de l'immunité du nouveau-né est stimulé par la colonisation bactérienne du tractus gastro-intestinal qui est dépourvu de germe *in-utero*. Cette colonisation intervient dans le développement de l'immunité innée et adaptative.

Des résultats suggèrent que cette relation entre le microbiote intestinal et le système immunitaire est spécifique à l'hôte et aussi à l'espèce. Une étude récente montre en effet que l'influence du microbiote intestinal sur la maturation du système immunitaire de l'hôte est dépendante de la spécificité hôte-microbiote. Dans cette étude, des souris axéniques (sans microbiote) ont été colonisées par un microbiote de souris, de rat ou d'humain. L'analyse des du système immunitaire a révélé que les souris colonisées par les microbiotes provenant de rat et d'humain présentent certaines caractéristiques des souris axéniques c'est à dire que leur système immunitaire semble être peu développé. De plus les souris axéniques colonisées par un microbiote de souris sont mieux protégées contre les infections comparées aux souris colonisées avec un microbiote humain (**Chung and al. 2012**).

Partie expérimentale

Partie expérimentale

I- Matériel et méthodes :

La méthodologie appliquée à cette étude a été réalisé à l'université d'Amar Thlidji Laghouat. Nous avons appliqué un régime alimentaire sur les sujets étudiés et des examens microscopiques sur leurs flores intestinales, dans cette partie les techniques et matériel utilisées par l'examen coprologique sont exposées.

I-1- Population étudiée :

Tableau n°03 : répartition des sujets examinés en fonction de l'âge et le sexe.

Etat	Groupe	Groupe 01		Groupe 02		
		Age	Sexe	Age	Sexe	
Consommateur	A ⁺	23	♀	B ⁺	25	♀
Témoin	A ⁻	23	♀	B ⁻	25	♀

Notre étude repose sur un échantillon de 4 sujets, 2 consommateurs (consomme le probiotique) et 2 témoins, avec les mêmes conditions et le même régime, alimentaire mais sans probiotique.

I-2- Les conditions de l'étude :

I-2-1- Le régime alimentaire : *le 1^{er} consommateur A⁺ et le 1^{er} témoin A⁻ sa sera le même.

*le 2^{ème} consommateur B⁺ et le 2^{ème} témoin B⁻ sa sera le même.

I-2-2- La consommation du probiotique : * les sujets A⁺ et B⁺ consomment le probiotique (yogourt) 3fois/jour.

I-3- Méthodologie :

Nous avons fait des tests coprologique et des études sur les selles des sujets étudiés.

I-3-1-L'évaluation de l'état de la digestion :

- Normal ou pas (est ce que y a des symptômes liée à une male digestion).
- Présence d'une constipation ou d'une diarrhée.

I-3-2-L'étude de l'état des selles :

- La couleur (marron, jaune, noir...).
- L'aspect (pâteuse, solide, ...).
- La présence des muqueuses ou non.

I-3-3- L'examen microscopique :

***L'évaluation des bactéries à Gram+ et les bactéries à Gram- chez les4 sujets (A+, A-, B+ et B-) par la coloration de Gram :**

- Nous avent fait cet examens 2 fois par semaine, 3 observations pour chaque échantillon dès le début du régime (la 1^{er} semaine de consommation du probiotique).

Méthodologie :

Déposer une goutte d'eau physiologique sur une lame et ajouter l'échantillon sur la goutte, frotter la et laisser sécher à l'air.

Après la sécheresse du frotti déposer quelques gouttes de la solution de violet de gentiane (pour la coloration du cytoplasme des bactéries), laisser agir 30s après rincer très brièvement en faisant couler de l'eau sur la lame au-dessus du frotti (par directement sur le frotti), ajouter quelques gouttes de lugol (c'est un mordant qui permet sur de fixer le violet dans les bactéries) le frotti, laisser agir 1min, rincer très brièvement à l'eau comme précédemment décrit, décolorer en faisant couler la solution de décoloration (l'alcool, les ports de la paroi des Gram⁺ sont fermés par la déshydratation à l'alcool, la paroi est alors imperméable et le colorant violet reste dans le cytoplasme, la membrane des Gram⁻ est dissoute par l'alcool, la paroi plus mince et de composition différente laisse alors sortir la coloration violette) sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frotti (10 à 20s), rincer à l'eau. Contre-couleur en déposant la solution de fischine ou safranine (permet de visualiser les bactéries à Gram⁻ décolorées à l'étape précédente, cette coloration moins

forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram⁺) pendant 30s, rincer à l'eau, observer avec le microscope optique en ajoutant une goutte d'huile à immersion à l'objectif 100.

I-3-4-culture :

On a réalisé la culture après presque 4 mois dès le début du régime alimentaire pour laisser le probiotique bien réagir. Et on a utilisé 4 types des milieux pour la culture :

Milieu GN pour l'isolement des germes non exigent présentent dans les selles.

Milieu MRS (gélosé et liquide) pour l'isolement des bactéries lactiques.

Milieu Colombia au sang du mouton pour l'isolement des *bactéroides* (Gram⁻)

Milieu Colombia au sang du cheval pour l'isolement des *Clostridium* (*firmicutes*) (Gram⁺)

Méthodologie :

a- pour le milieu GN :

Met 5ml d'eau physiologique dans un tube à essai, ajouter peu des selles sur les 5ml de l'eau physiologique et fait bien mélanger avec le vortex.

Couler les boites de pétri avec le milieu GN, après la gélification du milieu, ensemencement par râteau sur le milieu, incubé à 37°C pendant 24h.

b- pour le milieu MRS :

Préparer une série de 4 dilutions, où vous mettez 9ml d'eau physiologique dans un tube à essai, ajouter 1g des selles sur les 9ml de l'eau physiologique, mélanger avec le vortex. Prend 1ml à partir du 1^{er} tube, ajouté les 1ml dans le 2^{eme} tube qui contient 9ml d'eau physiologique, mélanger avec le vortex. Prend 1ml à partir du 2^{ème} tube, ajouté les 1ml dans le 3^{ème} tube qui contient 9ml d'eau physiologique, mélanger avec le vortex. Prend 1ml à partir du 3^{ème} tube, ajouté les 1ml dans le 4^{ème} tube qui contient 9ml d'eau physiologique, giter avec le vortex.

A l'aide d'une pipete en plastique graduée, met 1ml à partir du 4eme tube à essai dans une boite de pétri, près le froidement du milieu MRS (47°C), ajout le milieu sur la solution, mélanger sous forme de 8, après la solidification du milieu, incuber a 37°C pendant 48h dans une jarre pour la création de l'anaérobiose.

c- Pour le milieu Columbia au sang du mouton :

Préparer une série de 4 dilutions, met 9ml d'eau physiologique dans un tube à essai, ajouter 1g des selles sur les 9ml de l'eau physiologique, mélanger avec le vortex. Prend 1ml à partir du 1^{er} tube, ajouté les 1ml dans le 2^{ème} tube qui contient 9ml d'eau physiologique, mélanger avec le vortex. Prend 1ml à partir du 2^{ème} tube, ajouté les 1ml dans le 3^{ème} tube qui contient 9ml d'eau physiologique, mélanger avec le vortex. Prend 1ml à partir du 3^{ème} tube, ajouté les 1ml dans le 4^{ème} tube qui contient 9ml d'eau physiologique, Vortexer.

Après l'autoclavage et le refroidissement du milieu (47°C), ajouter l'ampoule su sang au flacon et homogénéisé bien le milieu, a l'aide d'une pipete en plastique graduée, met 1ml à partir du 4eme tube à essai dans une boite de pétri, ajout le milieu sur les 1ml, mélanger en mouvement sous forme de 8, après la solidification du milieu, incubation en anaérobiose a 37°C pendant 48h dans une jarre.

d- pour le milieu Columbia au sang de cheval :

Préparer une série de 4 dilutions, met 9ml d'eau physiologique dans un tube à essai, ajouter 1g des selles sur les 9ml de l'eau physiologique, mélanger avec le vortex. Prend 1ml à partir du 1^{er} tube, ajouté les 1ml dans le 2^{ème} tube qui contient 9ml d'eau physiologique, mélanger avec le vortex. Prend 1ml à partir du 2^{ème} tube, ajouté les 1ml dans le 3^{ème} tube qui contient 9ml d'eau physiologique, mélanger avec le vortex. Prend 1ml à partir du 3^{ème} tube, ajouté les 1ml dans le 4^{ème} tube qui contient 9ml d'eau physiologique, mélanger avec le vortex.

Après l'autoclavage et le refroidissement du milieu (47°C), ajouter l'ampoule du sang au flacon et homogénéisé bien le milieu. A l'aide d'une pipete en plastique graduée, met 1ml partir du 4eme tube à essai dans une boite de pétri, ajout le milieu sur les 1ml, mélanger en

mouvement sous forme de 8, après la solidification du milieu, incubation a 37°C pendant 48h dans une jarre pour la création de l'anaérobiose.

II- Résultats et discussion :

II-1-résultats :

Dans notre mémoire, nous avons réalisés une étude prospective quantitative comportant 4 sujets à partir de l'université Amar Thlidji Laghouat, sur une période de 4 mois, du 14 décembre 2017 au 14 avril 2018.

II-1-1- Les résultats de l'évaluation de l'état de digestion :

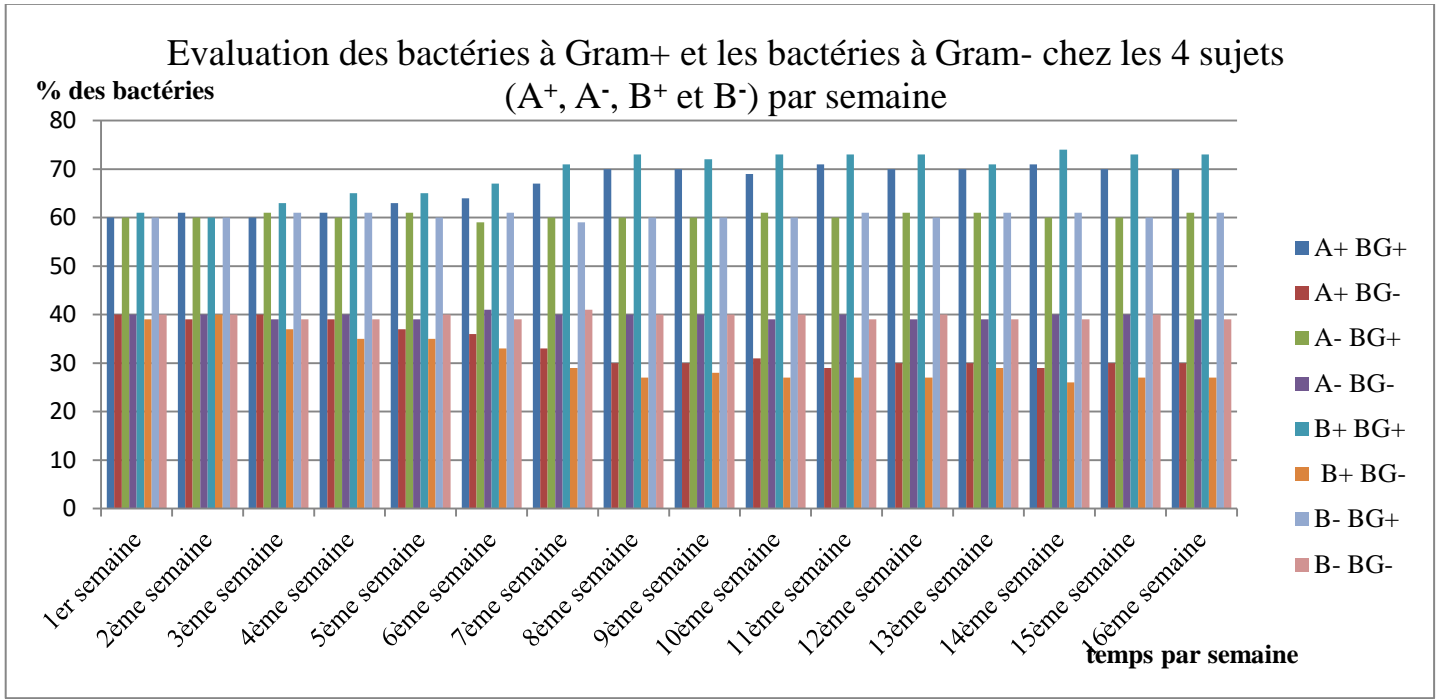
On a observé que les deux sujets qui consomment le probiotique souffraient d'une constipation avant la consommation mais après la consommation du probiotique chez le sujet B+ on a observé la disparition de la constipation dès la 1^{er} semaine et chez de 2^{ème} consommateur A+ elle disparaît dès la moitié de la 2^{ème} semaine, malgré que la digestion est normale chez les 2 sujets où nous n'avons pas observé des symptômes ou des douleurs liées à une mauvaise digestion.

II-1-2-étude de l'état des selles

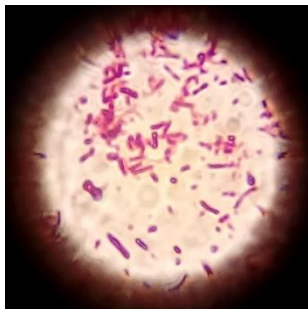
Voir l'annexe 02

II-1-3-résultats des examens microscopiques :

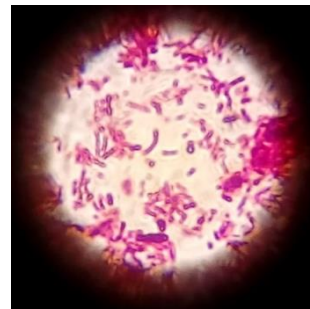
II-1-3-1-Évaluation des bactéries à Gram⁺ et les bactéries à Gram- chez les deux groupes (A et B) par la coloration de Gram :



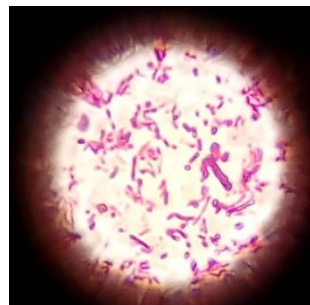
Un graphe représente l'évaluation des bactéries à Gram⁺ et les bactéries à Gram- chez les 4 sujets (A⁺, A⁻, B⁺ et B⁻) par semaine.



A+



A-

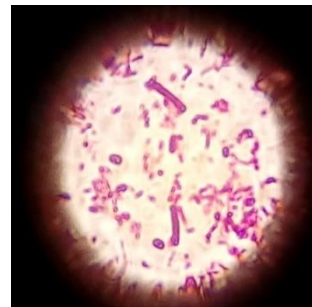
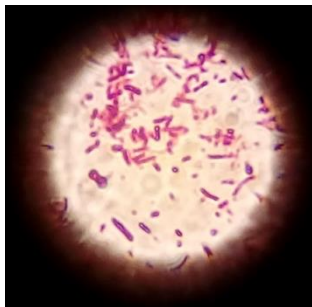


B+

B-

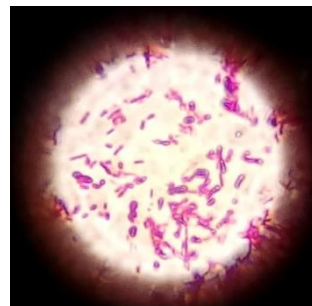
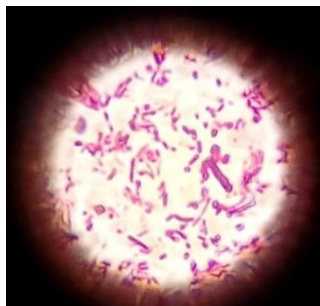
Commentaire :

On a remarqué que le pourcentage des Gram⁺ est de 60% et le pourcentage des Gram⁻ est de 40% presque chez tous les sujets au début de régime et qui dure jusqu'à la 3^{ème} semaine.



A+

A-

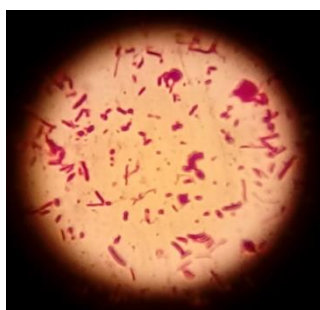


B+

B-

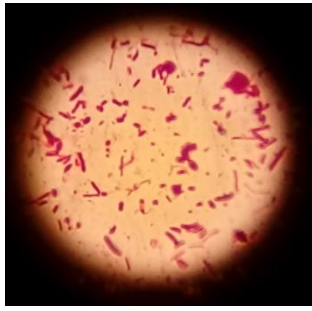
Commentaire :

On a remarqué que le pourcentage des Gram⁺ vas s'augmenté chez le sujet consommateur du 2^{ème} groupe dès la 3^{ème} semais de consommation du probiotique.

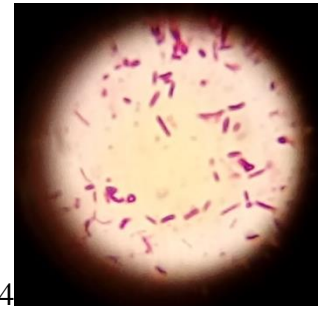


A+

A-



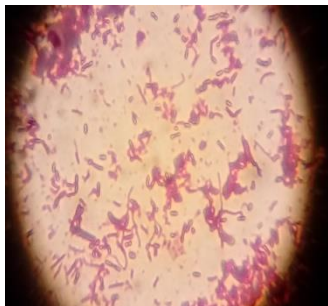
B+



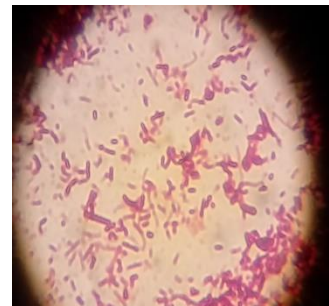
B-

Commentaire :

Chez le sujet consommateur du 1^{er} groupe le changement du pourcentage et l'augmentation des Gram⁺ ne commence que dès la 5^{ème} semaine de la consommation du probiotique et que les deux témoins des deux groupes reste toujours la même.



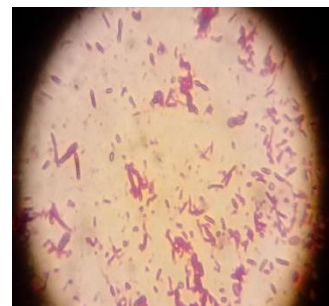
A+



A-



B+



B-

Commentaire :

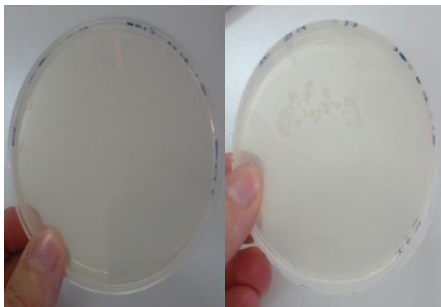
A la fin du régime le pourcentage reste stable dès le 2^{ème} mois presque le début de régime comme suit :

- 70% des Gram⁺ et 30% des Gram⁻ presque chez le consommateur du groupe A (A⁺).

- 73% des Gram⁺ et 27% des Gram⁻ presque chez le consommateur du groupe B (B⁺).
- 60% des Gram⁺ et 40% des Gram⁻ presque chez les témoins soit dans le groupe A ou le groupe B (A⁻ et B⁻).

II-1-4-Les résultats de la culture :

II-1-4-1- pour le milieu GN :



A+

Boite 01 :11 colonies.

Boite 01 :53 colonies.



A-

Boite 01 :02 colonies.

Boite 01 :05 colonies.



B+

Boite 01 :18 colonies.

Boite 01 :25 colonies.

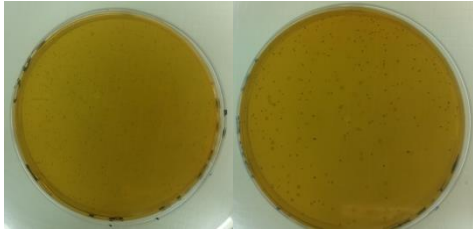


B-

Boite 01 :02 colonies.

Boite 01 :00 colonies.

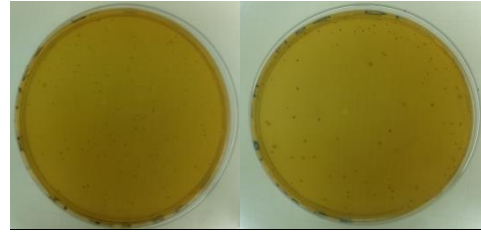
II-1-4-2-pour le milieu MRS :



A+

Boite 01 : >300 colonies (685).

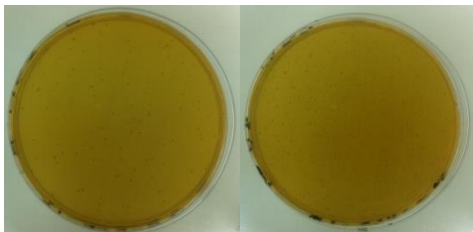
Boite 01 : >300 colonies (568).



A-

Boite 01 : 129 colonies.

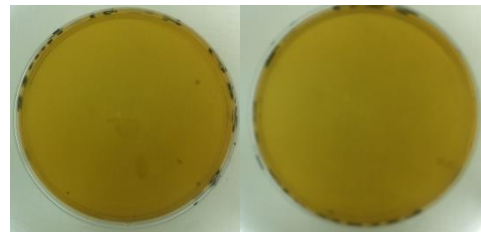
Boite 01 : 138 colonies.



B+

Boite 01 : 275 colonies.

Boite 01 : 128 colonies.

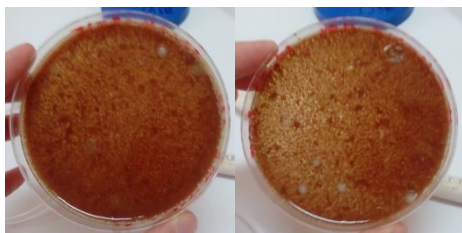


B-

Boite 01 : 08 colonies.

boite 01 : 08 colonies.

II-1-4-3-pour le milieu Colombia au sang du mouton :



A+

Boite 01 : 08 colonies.

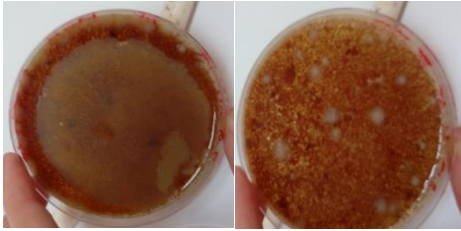
Boite 01 : 04 colonies.



A-

Boite 01 : 18 colonies.

Boite 01 : 08 colonies.



B+

Boite 01 : 19 colonies.

Boite 01 : 23 colonies.

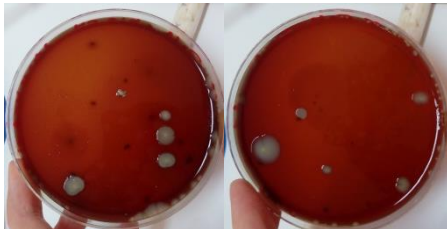


B-

Boite 01 : 26 colonies.

Boite 01 : 33 colonies.

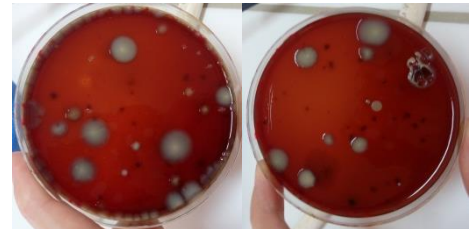
II-1-4-4-pour le milieu colombia au sang du cheval :



A+

Boite 01 : 15 colonies.

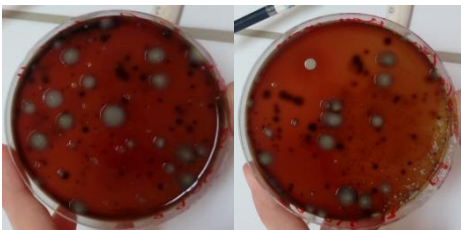
Boite 01 : 11 colonies.



A-

boite 01 : 59 colonies.

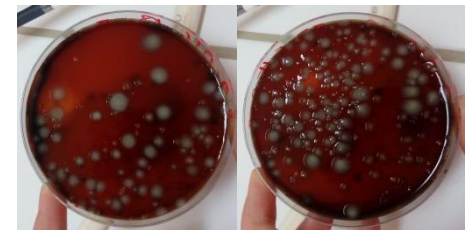
boite 01 : 47 colonies.



B+

Boite 01 : 25 colonies.

Boite 01 : 14 colonies.



B-

boite 01 : 105 colonies.

boite 01 : 52 colonies.

II-2-Discution :

Les probiotiques ont pour but d'aider la flore microbienne naturelle de l'intestin. En général, la plus grande évidence pour les probiotiques concerne leur rôle sur l'intestin (microbiote intestinal) et sur l'amélioration de la fonction immunitaire (**Francisco et al, 2008**).

Selon les résultats obtenus depuis les analyses réalisées on a remarqué que la digestion est amélioré a cause du changement dans le microbiote intestinal dès a la consommation du probiotique où ces bactéries consommé jouent un rôle dans les réactions enzymatiques non catalysées par le mammifère hôte (**Alessio, 2009**).

Comme on a observé une différence dans les taux des bactéries a Gram⁺ et les bactéries a Gram⁻ où la diminution des bactéries à Gram⁻ dû à la présence des acides lactiques, selon **Duculzeau.R et Raibaud.p en 1989**: dû à la capacité des bactéries lactiques à produire l'acide lactique qui agisse sur les entérobactéries (Gram⁻) en les détruisant et l'augmentation des bactéries à Gram⁺ dû à la consommation du probiotique qui est à base des bactéries à Gram⁺.

Au niveau des espèces et des souches, la diversité microbienne entre individus est hautement remarquable : chaque individu héberge sa propre flore « composition bactérienne », déterminée en partie par le génotype de l'hôte et par la colonisation initiale à la naissance via une transmission verticale (**Francisco et al, 2008**). C'est pour sa on a trouvé une différence dans les taux des cellules bactériennes entres les sujets étudiés.

En raison de la complexité des évènements de signalisation cellulaire et des interactions bactériennes dans le microbiote, il n'est pas surprennent que les études ne donne pas des résultats bien claires et suffisantes pour mieux comprendre cette synergie.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Nous avons pu constater au cours de ce travail que la santé de notre intestin est très importante et il faut donc lui apporter les aliments et nutriments indispensables à son bon fonctionnement.

La variabilité du microbiote intestinal peut conditionner la résistance de notre organisme face à des pathologies et on peut même dire qu'elle conditionne notre état de santé global. La colonisation bactérienne intestinale est un sujet vaste et très complexe. En effet, nous savons que notre microbiote est déséquilibré grâce aux symptômes qui en découlent tels que les désordres intestinaux.

Très intéressants sur le plan nutritionnel, les probiotiques ne suffisent pas à eux seuls à assurer une bonne santé.

Consommer des probiotiques est une chose, mais il est également indispensable, pour maintenir florissante cette flore microbienne favorable, de la nourrir adéquatement. C'est le rôle des prébiotiques. Contrairement aux probiotiques qui sont des bactéries, les prébiotiques sont des glucides alimentaires constituant une source nutritionnelle pour les micro-organismes bénéfiques de la flore intestinale. On peut dire, d'une certaine façon que le prébiotique est l'aliment du probiotique.

Et d'après tout ça on peut dire qu'il y'a un effet du probiotique sur notre microbiote intestinal mais cet effet est ce diffère chez une personne par rapport à une autre et marger l'évolution de la technologie et les techniques utilisé dans les études des effets et les réactions de ces dernies on ne peut pas bien étudie toutes ces réactions et comment ça se passe réellement et tout ça grasse a la complexité de la fonctionnalité de notre microbiote et notre organisme.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Abedi, D., Feizizadeh, S., Akbari, V., and Jafarian-Dehkordi, A. (2013).** In vitro anti-bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* on *Escherichia coli*. *Research in pharmaceutical sciences* 8, 260-268.
- Aderem A. and Ulevitch R.J.** Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406:782-7.
- Aires J, Doucet-Populaire F, Butel MJ.** Tetracycline resistance mediated by tet(W), tet(M), and tet(O) genes of *Bifidobacterium* isolates from humans. *Appl Environ Microbiol* 2007;73: 2751—4.
- Alessilo Fasano (2009),** comprendre le dialogue : l'interaction entre les microorganismes et l'hôte, *Annales Nestlé*, p14
- Arunachalam K., Gill H.S. and Chandra R.K.** Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur J Clin Nutr* 2000;54:263-7.

B

- Benson, Andrew K, Scott A Kelly, Ryan Legge, Fangrui Ma, Soo Jen Low, Jaehyoung Kim, Min Zhang, et al.** « Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, no. 44 (novembre 2, 2010): 18933-18938.
- Betoret, N., Puente L., Díaz M. J., Pagán M.J., García, M. J., Gras M.L., Martínez Monzó J. and Fito P., 2003.** Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*, 56pp : 273-277.
- Berg R., Fowler D., Gautreaux M.** Inhibition of *Candida albicans* translocation from the gastrointestinal tract of mice by oral administration of *Saccharomyces boulardii*. *J Infect Dis* 1993;168:1314-8.
- Beutler B., Hoebe K., Du X., Ulevitch R.J.** How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* 2003;74:479-85.
- Bevins, C.L., and Salzman, N.H. (2011).** Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature reviews Microbiology* 9, 356-368.

- Bezirtzoglou, E.** « The intestinal microflora during the first weeks of life ». *Anaerobe* 3, no. 2-3 (juin 1997): 173-177.
- Biasucci, Giacomo, Monica Rubini, Sara Riboni, Lorenzo Morelli, Elena Bessi, et Cristiana Retetangos.** « Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut ». *Early Human Development* 86 Suppl 1 (juillet 2010): 13-15.
- Bollinger, R.R., Barbas, A.S., Bush, E.L., Lin, S.S., and Parker, W. (2007).** Biofilms in the normal human large bowel: fact rather than fiction. *Gut* 56, 1481-1482.
- Bouchefra A.** Yaourts probiotiques algériens et ferments commerciaux utilisés dans leur fabrication : contrôle de qualité et de l'étiquetage.[Thèse]. Biotechnologie Alimentaire. Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA).2012.135p
- Brown, K., DeCoffe, D., Molcan, E., and Gibson, D.L. (2012).** Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients* 4, 1095-1119.
- Buttriss J., 2000.** Is Britain ready for FOSHU? *Nutrition Bulletin*, 25 pp: 159–161.

C

- Campeotto, F., Waligora-Dupriet, A.J., Doucet-Populaire, F., Kalach, N., Dupont, C., and Butel, M.J. (2007).** [Establishment of the intestinal microflora in neonates]. *Gastroenterologie clinique et biologique* 31, 533-542.
- Carlisle, Erica M, Valeriy Poroyko, Michael S Caplan, John A Alverdy, et Donald Liu.** « Gram negative bacteria are associated with the early stages of necrotizing enterocolitis ». *PloS One* 6, no. 3 (2011): e18084.
- Chung, H., S. J. Pamp, J. A. Hill, N. K. Surana, S. M. Edelman, E. B. Troy, N. C. Reading, E. J. Villablanca, S. Wang, J. R. Mora, Y. Umesaki, D. Mathis, C. Benoist, D. A. Relman & D. L. Kasper (2012)** Gut immune maturation depends on colonization with a hostspecific microbiota. *Cell*, 149, 1578-93.
- Cinquin, C. (2005).** Développement et validation d'un nouveau modèle de fermentation colique in vitro avec cellules immobilisées. In Quebec (Université Laval).

Coppa, Giovanni V, Stefano Bruni, Lorenzo Morelli, Sara Soldi, et Orazio Gabrielli. « The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides ». *Journal of Clinical Gastroenterology* 38, no. 6 (juillet 2004): S80-83.

Corrieu G. et Luquet F. M., 2008. Bactéries lactiques : de la génétique aux ferments. *Tec et Doc, Lavoisier, Paris* : 269-306.

Corthier, G. (2007). Le microbiote intestinal: un monde polymorphe aux fonctions multiples. *Cahier de nutrition et diététique* 42, 21-26.

D

Da Cruz A.G., Adriano Gomes C., Jose de Assis F. F . and Susana Marta I. S., 2010. High pressure processing and pulsed electric fields: potential use in probiotic dairy foods processing. *Trends in Food Science and Technology* pp: 1-11.

Dacosta Y. et Aou T., 2000. La bioprotection des aliments : l'antagonisme bactérien au service de la sécurité et de la qualité microbiologique. *Ed. Yves Dacosta. Paris*: 3-21.

De Preter, V., and Verbeke, K. (2013). Metabolomics as a diagnostic tool in gastroenterology. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics* 4, 97-107.

Dellaglio F., de Roissart H., Torriani S., Curk M. C. and Janssens D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: *Bactéries Lactiques*, vol. I, pp. 25–116. Edited by H. de Roissart and F. M. Luquet, Loriga, Uriage, France.

Deplancke, B. & H. R. Gaskins (2001) Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr*, 73, 1131S-1141S.

Dethlefsen, L., Eckburg, P.B., Bik, E.M., and Relman, D.A. (2006). Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends in ecology & evolution* 21, 517-523.

Dominguez-Bello, Maria G, Elizabeth K Costello, Monica Contreras, Magda Magris, Glida Hidalgo, Noah Fierer, et Rob Knight. « Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, no. 26 (juin 29, 2010): 11971-11975.

- Dong X., Cheng G. and Jian W., 2000.** Simultaneous identification of five Bifidobacterium species isolated from human beings using multiple PCR primers. *Syst. App. Micr. Université de Laval.*, 23 pp : 386-390.
- Dore, J., and Corthier, G. (2010).** [The human intestinal microbiota]. *Gastroenterologie clinique et biologique 34 Suppl 1*, S7-15.
- DOROSZ (2012).** Guide pratique des médicaments-Dorosz, 31ème édition edn.
- Dridi, B., Raoult, D., and Drancourt, M. (2011).** Archaea as emerging organisms in complex human microbiomes. *Anaerobe 17*, 56-63.
- Ducluzeu.R et Raibaud.P, (1989),** les interactions bactériennes dans le tube digestif, *Rev sci tech Off int Epiz*, p292
- Dunne C., Omahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., Ohalloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O'sullivan G. C., Shanahan F. and Collins J. K., 2001.** In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73 pp: 386-392.

E

- EFSA.** Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from EFSA on the maintenance of the QPS list of microorganisms intentionally added to food or feed. *EFSA J* 2008;923:1—48.

F

- Fabia R., Ar'rajab A., Johansson M.L., Willen R., Andersson R., Molin G., Bengmark S.** The effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and oat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1993;28:155-62.
- Fanaro, S., R. Chierici, P. Guerrini & V. Vigi (2003)** Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl*, 91, 48-55.
- FAO/ OMS, 2001.** World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: 34.
- FAO/WHO. 2002.** Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working group on Drafting Guidelines for the evaluation of Probiotics in Food.

- Farnworth E.R., 2008.** Kefir: from folklore to regulatory approval. *J. Nutraceuticals Funct. Med. Foods*, 1 pp: 57-68.
- Finegold, S.M., and Sutter, V.L. (1978).** Fecal flora in different populations, with special reference to diet. *The American journal of clinical nutrition* 31, S116-S122.
- Fooks L. J. et Gibson G. R., 2002.** Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88 pp : 39-49.
- Francisco Guarner, Aamir G. Khan, James Garisch, Rami Eliakim, Alfred Gangl, Alan Thomson, Justus Krabshuis, Ton Le Mair (2008),** *Probiotiques et Prébiotiques, Organisation mondiale de Gastroentérologie, p 07, 12*
- Fuller R., 1989.** Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66 pp:365-78.

G

- Garcia-Lafuente A., Antolin M., Guarner F., Crespo E., Malagelada J.R.** Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. *Gut* 2001;48:503-7.
- Gibson G.R. and Roberfroid M.B.** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125:1401-12.
- Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada : FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization), 2002.
- Guiraud J. P. et Rosec J. P., 2004.** Pratique des normes en microbiologie alimentaire, *Dunod, Paris* : 238-245.
- Guyard, C., Dehecq, E., Magliani, W., Polonelli, L., and Cailliez, J. (2000).** Les toxines killers de levure. *J Mycol Med* 10, 9-20.

H

- Hasler C. M., 1998.** Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. *Food Technology*, 52 pp: 63–70.
- Hill, M. J. (1997)** Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev*, 6 Suppl 1, S43-5.

- Hooper, L. V., M. H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P. G. Falk & J. I. Gordon (2001)**
Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine.
Science, 291, 881-4.
- Holzapfel W. H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. and Huis-Veld H. J., 2001.** Overview
of gut flora and probiotics. *Int. J. of Food Micr.*, 41 pp :85-101.
- Hufeldt, Majbritt Ravn, Dennis S Nielsen, Finn Kvist Vogensen, Tore Midtvedt, et Axel
Kornerup Hansen.** « Variation in the gut microbiota of laboratory mice is related to
both genetic and environmental factors ». *Comparative Medicine* 60, no. 5 (octobre
2010): 336-347.

I

- Isolauri E., Majamaa H., Arvola T., Rantala I., Virtanen E.? Arvilommi H.** Lactobacillus
casei strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in
suckling rats. *Gastroenterology* 1993;105:1643-50.
- Izquierdo E., 2009.** Les protéines bactériennes entant que biomarqueurs de l'activité
probiotique. Thèse de Doctorat, *Université de Strasbourg* : 8-141.

J

- Jenke A, Ruf EM, Hoppe T, Heldmann M, Wirth S.** Bifidobacterium septicaemia in an
extremely low-birthweight infant under probiotic therapy. *Arch Dis Child Fetal
Neonatal Ed* 2012;97:F217—8.
- Joly, F., Coffin, B., and Messing, B. (2007).** Role de la flore dans les pathologies digestives
(maladie de Crohn, rectocolite ulcérohémorragique, cancer colorectal exclus).
Nutrition clinique et métabolisme 21, 89-94.

K

- Klaenhammer T., Altermann E., Arigoni F., Bolotin A. and Breidt F., 2002.** Discovering
lactic acid bacteria by genomics, Antonie Van Leeuwenhoek, *Int. J. Gen. Mol.
Microbiol.*, 82 pp: 29–58.

Kuitunen M. Probiotics and prebiotics in preventing food allergy and eczema. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013;13: 280—6.

Kunz AN, Noel JM, Fairchok MP. Two cases of *Lactobacillus* bacteremia during probiotic treatment of short gut syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38:457—8.

L

Lagier, J.C., Million, M., Hugon, P., Armougom, F., and Raoult, D. (2012). Human gut microbiota: repertoire and variations. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2, 136.

Land MH, Rouster-Stevens K, Woods CR, Cannon ML, Cnota J, Shetty AK. *Lactobacillus* sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics* 2005;115:178—81.

Leahy S. C., Higgins D. G., Fitzgerald G. F. and Van Sinderen D., 2005. Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 98 pp: 1303-1315.

Lilly D. M. and Stillwell R. H., 1965. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science*, pp : 147-747.

Link-Amster H., Rochat F., Saudan K.Y., Mignot O., Aeschlimann J.M. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994;10:55-63.

Liong MT. Safety of probiotics: translocation and infection. *Nutr Rev* 2008;66:192—202.

Louis, E., and Marteau, P. (2010). *Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin*, Wolter Kluwer France edn (R. Zittoun).

M

Macdonald, T. T. & G. Monteleone (2005) Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*, 307, 1920-5.

Madsen KL. Inflammatory bowel disease: lessons from the IL-10 gene-deficient mouse. *Clin Invest Med* 2001;24:250-7.

Magne, Fabien, Antonia Suau, Philippe Pochart, et Jehan-François Desjeux. « Fecal microbial community in preterm infants ». *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 41, no. 4 (octobre 2005): 386-392.

- Margoles A. and Garcia L., 2003.** Characterisation of a bifidobacterium strain with acquired resistance to cholera: A preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, 80 pp : 191–198.
- Marin M.I., Tejada-Simon M.V., Lee J.H., Murtha J., Ustunol Z., Pestka J.** Stimulation of cytokine production in clonal macrophage and T-cell models by *Streptococcus thermophilus*: comparison with *Bifidobacterium sp.* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J Food Prot* 1998;61:859-64.
- MARTEAU P., SHANAHAN F.** « Basic aspects and pharmacology of probiotics : an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects ». *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. octobre 2003. Vol. 17, n°5, p. 725-740.
- Marteau P.** « Facteurs de contrôle de la flore. Définitions et mode d'action des probiotiques et prébiotiques ». In : *Flore microbienne intestinale : physiologie et pathologie digestive*. Montrouge : John Libbey Eurotext, 2004. p. 37-58.
- Marteau P., Seksik P.** « Probiotiques et aliments ». In : *Bactéries lactiques et probiotiques*. Paris : Lavoisier, 2005. p. 255-289.
- Marteau, P. (2013).** *Microbiote intestinal*. EMC Gastroenterologie 8, 1-8.
- Matilla-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R. and Saarela M., 2002.** Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12 pp: 173-182.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A.** A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7.
- Miettinen M., Vuopio-Varkila J., Varkila K.** Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect Immun* 1996;64:5403-5.
- Mitsuoka, T. (1992).** Intestinal flora and aging. *Nutrition reviews* 50, 438-446.

N

- Ninane V., Mukandayambaje R. et Berben G., 2009.** Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir : le point sur la situation réglementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13(3) pp : 459-466.

O

O'Hara, A. M. & F. Shanahan (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*, 7, 688-93.

P

Penders, John, Carel Thijs, Cornelis Vink, Foekje F Stelma, Bianca Snijders, Ischa Kummeling, Piet A van den Brandt, et Ellen E Stobberingh. « Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy ». *Pediatrics* 118, no. 2 (août 2006): 511-521.

Panel on biological hazards EFSA (BIOHAZ). Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2012 update). *EFSA J* 2012;10:3020—84.

Perdigon G., De Macias M.E., Alvarez S., Oliver G., De Ruiz Holgado A.P. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology* 1988;63:17-23.

Probert, H.M., and Gibson, G.R. (2002). Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Current issues in intestinal microbiology* 3, 23-27.

R

Rawls, J. F., B. S. Samuel & J. I. Gordon (2004) Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4596-601. Renard A.C., 2000. Les ingrédients santé à la conquête de l'Europe. *Rev. Lait. Fr.*, 598 pp : 16-21.

Robinson, C.J., and Young, V.B. (2010). Antibiotic administration alters the community structure of the gastrointestinal microbiota. *Gut microbes* 1, 279-284.

S

Saarela M., Lahteenmaki L., Crittenden R., Salminen S. and Mattila-Sandholm T., 2000. Gut bacteria and health foods: the European perspective. *Int. J. Food Micr.*, 78 pp: 99-117.

Sander M., 2001. Lactic acid bacteria and human health. *Dairy and Food Cul. Tec. USA*, 73 pp:361-364.

- Sartor, R.B. (2008).** Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134, 577-594.
- Scaldaferri, F., Gerardi, V., Lopetuso, L.R., Del Zompo, F., Mangiola, F., Boskoski, I., Bruno, G., Petito, V., Laterza, L., Cammarota, G., et al. (2013).** Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility. *BioMed research international* 2013, 435268.
- Shah N.P., 2007.** Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal.*,17(11) pp :60-65.
- Shu Q. and Gill H.S.** A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2001;189:147-52.
- Sillanpaa J., 2001.** Tissue-adherence in lactic acid bacteria: Identification and characterization of the collagen-binding S-Layer protein of *Lactobacillus crispatus*. Academic Dissertation in General Microbiology. Faculty of Science of the University of Helsinki. Finland.
- Simren, M., Barbara, G., Flint, H.J., Spiegel, B.M., Spiller, R.C., Vanner, S., Verdu, E.F., Whorwell, P.J., Zoetendal, E.G., and Rome Foundation, C. (2013).** Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut* 62, 159-176.
- Snydman DR.** The safety of probiotics. *Clin Infect Dis* 2008;46(Suppl. 2):S104—11.
- Srikanth, C. V. & B. A. McCormick (2008)** Interactions of the intestinal epithelium with the pathogen and the indigenous microbiota: a three-way crosstalk. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2008, 626827.
- Stephani, J., Radulovic, K., and Niess, J.H. (2011).** Gut microbiota, probiotics and inflammatory bowel disease. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 59, 161-177.
- Stoll, Barbara J, Nellie Hansen, Avroy A Fanaroff, Linda L Wright, Waldemar A Carlo, Richard A Ehrenkranz, James A Lemons, et al.** « Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very low-birth-weight infants ». *The New England Journal of Medicine* 347, no. 4 (juillet 25, 2002): 240-247.

Suzuki T., Itoh K., Kaneko T., Suzuki H. Inhibition of bacterial translocation from the gastrointestinal tract of mice by oral administration of a culture condensate of *Bifidobacterium longum*. *J Vet Med Sci* 1997;59:665-9.

Swidsinski, A., V. Loening-Baucke, F. Theissig, H. Engelhardt, S. Bengmark, S. Koch, H.Lochs & Y. Dörffel (2007) Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut*, 56, 343-50.

T

Tannock G. W., 2002. Probiotics and prebiotics: where are we going? In: Tannock G.W., ed. Probiotics and prebiotics: where are we going? Norfolk, U.K. *Caister Academic Press*: 1-40.

Tlaskalova-Hogenova, H., Stepankova, R., Hudcovic, T., Tuckova, L., Cukrowska, B., Lodinova-Zadnikova, R., Kozakova, H., Rossmann, P., Bartova, J., Sokol, D., et al. (2004). Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology letters* 93, 97-108.

Toivanen, P, J Vaahtovuori, et E Eerola. « Influence of major histocompatibility complex on bacterial composition of fecal flora ». *Infection and Immunity* 69, no. 4 (avril 2001): 2372-2377.

V

Van Reenen CA, Dicks LM. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Arch Microbiol* 2011;193: 157—68.

W

Westerbeek, Elisabeth A M, Anemone van den Berg, Harrie N Lafeber, Jan Knol, Willem P F Fetter, et Ruurd M van Elburg. « The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: a review of the literature ». *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)* 25, no. 3 (juin 2006): 361-368.

Wonodi A and Panigrahi P. Effects of *Lactobacillus plantarum* on Caco-2 cell tight junction proteins after infection with enteric bacteria. [Abstract]. *Gastroenterology* 2003;T1073:A479.

Woodmansey, E.J. (2007). Intestinal bacteria and ageing. *Journal of applied microbiology* 102, 1178-1186.

Z

Zanello G, Meurens F, Berri M, Salmon H. *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal diseases. *Curr Issues Mol Biol* 2008;11:47—58.

Annexes

ANNEXES

Annexe 1 :**I- Les milieux de culture :**

I-1-Le milieu GN (gélose nutritive) :

Peptone.....	6,0 g/L
Extrait de bœuf.....	1,0 g/L
Extrait de levure.....	2,0 g/L
Chlorure de sodium.....	5,0 g/L
Agar.....	14,0 g/L
pH final.....	7,3 ± 0,2

I-2-Le milieu MRS :

- Polypeptone.....	10,00 g/L
- Extrait de viande	10,00 g/L
- Extrait autolytique de levure	5,00 g/L
- Glucose.....	20,00 g/L
- Tween 80.....	1,08 g/L
- Phosphate dipotassique	2,00 g/L
- Acétate de sodium.....	5,00 g/L
- Citrate d'ammonium.....	2,00 g/L
- Sulfate de magnésium.....	0,20 g/L
- Sulfate de manganèse.....	0,05 g/L
- Agar agar bactériologique.....	15,00 g/L
-pH final	5,7 ± 0,1

I-3-Le milieu Columbia :

- Polypeptone	17,0 g/L
- Peptone pancréatique de coeur.....	3,0 g /L
- Extrait autolytique de levure.....	3,0 g/L
- Amidon de maïs	1,0 g/L
- Chlorure de sodium.....	5,0 g/L
- Agar agar bactériologique.....	13,5 g /L
-pH final.....	7,3 ± 0,2

II- Les colorants :

II-1- Violet de gentiane :

-Phénol.....	20g
-Éthanol 90%.....	100ml
-Eau distillé.....	1L

II-2- Lugol :

-Iodure de potassium.....	2g
-Iode métalloïde I ₂	1g
-eau distillé.....	100ml

II-3-fuschine :

-phéno.....	1 50g
- Éthanol.....	100ml
-Eau distillé.....	1L

II-4-Eau physiologique :

-Nacl.....	9g
------------	----

-Eau distillé..... 1L

Résumé

Durant 4 mois d'études et analyses bactériologiques de coprocultures des sujets jeunes sous un régime de probiotique.

Ou cour de cette étude nous avons utilisé des milieux de cultures ; GN, MRS, Colombia au sang du mouton et Colombia au sang du cheval, pour le dénombrement des germes totaux, la flore lactique et pour l'isolement des *bactéroides* et les *firmicutes* ; plus des examens complémentaires microscopique des frottis coloré en Gram pour l'évaluation des bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻ plus des tests statistiques pour comparer entre les témoins et les sujets à étudier sous régime probiotique.

Les résultats de dénombrement sur milieu GN(A⁺ 11/53 A⁻ 02/05 B⁺ 18/25 B⁻ 02/00) ont montré qu'il y'a une différence de nombre des souches chez les consommateurs par rapport au témoins, sur milieu MRS (A⁺ 685/568 A⁻ 129/138 B⁺ 275/128 B⁻ 08/08) démontre que le nombre des bactéries lactiques s'augmente chez le consommateur après la consommation du probiotique ,sur Colombia au sang du mouton (A⁺ 08/04 A⁻ 18/08 B⁺ 19/23 B⁻ 26/23) démontre que ce probiotique a un effet inhibiteur sur les bactéries à Gram-, sur milieu Colombia au sang de cheval (A⁺ 15/11 A⁻ 59/47 B⁺ 25/14 B⁻ 105/52) démontre que le probiotique est un catalyseur des bactéries à Gram+, aussi l'examen microscopique des frottis à montrer que le nombre des bactéries à Gram+ s'augmente par rapport à les bactérie à Gram- chez les consommateur l'augmentation des Gram+ commence à augmenter cher le B⁺ dès la 3^{eme} semaine et chez le A⁺ dès la 5^{eme} semaine, après le 2^{eme} mois chez A⁺ 70% des Gram+ et 30% des Gram- et chez le B⁺ 73% des Gram+ et 27% des Gram-.

Mots clés : microbiote, probiotique, régime, santé.

summary

During 4 months of studies and bacteriological analyzes of stool cultures of young subjects under a probiotic diet.

Or yard of this study we've used culture backgrounds; GN, MRS, Colombia with sheep blood and Colombia with horse blood, for the enumeration of the total germs, the lactic flora and for the isolation of bacteroids and firmicutes; furthermore microscopic examinations of Gram stained smears for evaluation of Gram + and Gram- plus bacteria and statistical tests to compare between controls and probiotic subjects.

The results of enumeration on GN(A⁺ 11/53 A⁻ 02/05 B⁺ 18/25 B⁻ 02/00) medium showed that there is a difference in number of strains in the consumers compared to the controls, on MRS(A⁺ 685/568 A⁻ 129/138 B⁺ 275/128 B⁻ 08/08) medium demonstrates that the number of lactic bacteria increases in the consumer's body after the consumption of the probiotic , on Colombia to the sheep blood (A⁺ 08/04 A⁻ 18/08 B⁺ 19/23 B⁻ 26/23), it demonstrates that this probiotic has an inhibitory effect on Gram- bacteria, on Columbia blood horse (A⁺ 15/11 A⁻ 59/47 B⁺ 25/14 B⁻ 105/52) medium it demonstrates that the probiotic is a catalyst for Gram + bacteria, also microscopic examination of the smears to show that the number of Gram + bacteria increases with respect to gram-negative bacteria in consumers (the increase in Gram + begins to increase in B + as early as the 3rd week and in A + as early as the 5th week, after the 2nd month in A + 70% of Gram + and 30% of Gram- and in B + 73% of Gram + and 27 % of Gram-).

Key words: microbiota, probiotics, diet

ملخص

خلال أربعة أشهر من الدراسات والتحليلات البكتريولوجية لبراز متطوعين تحت نظام غذائي بروبيوتيك.

في ضل هذه الدراسة استخدمنا وسائط التغذية من GN، MRS. كولومبيا مزود بدم الخروف وكولومبيا مزود بدم الحصان؛ وهذا لإحصاء الجراثيم الكلية؛ والفلورا اللبينية وعزل السلالات : Firmicutes، Bacteroides بالإضافة إلى الاستعانة بالفحوص المجهرية للمسحات الملونة بالجرام وهذا لتقييم وتعداد بكتيريا الجرام الموجبة وبكتيريا الجرام السالبة وباستخدام الاختبارات الإحصائية للمقارنة بين المتطوعين تحت الحماية البروبيوتيك والشواهد.

أثبتت النتائج أنه في وسط GN (A⁺ 11/53 A⁻ 02/05 B⁺ 18/25 B⁻ 02/00) يوجد فروق واختلاف في تعداد السلالات بين من هم تحت النظام الغذائي بأقرانهم الشواهد، أيضا في وسط MRS (A⁺ 685/568 A⁻ 129/138 B⁺ 275/128 B⁻ 08/08) يثبت أن عدد بكتيريا اللبينية تتزايد عند الأشخاص تحت الحماية بعد استهلاكهم البروبيوتيك ، في أوساط التغذية كل من كولومبيا المزودة بدم الأغنام (A⁺ 08/04 A⁻ 18/08 B⁺ 19/23 B⁻ 26/23) يوضح أن هذا البروبيوتيك له تأثير مثبط على بكتيريا الجرام السالبة و كولومبيا المزودة بدم الحصان (A⁺ 15/11 A⁻ 59/47 B⁺ 25/14 B⁻ 105/52) توضح أن البروبيوتيك محفز للبكتيريا جرام الموجبة، أيضا يثبت الفحص المجهرية للمسحات أن عدد البكتيريا الجرام الموجبة تتزداد بشكل ملحوظ بالنسبة للبكتيريا الجرام السالبة وهذا عند فئة المستهلكين البروبيوتيك (تبدأ الزيادة في Gram + في الزيادة في B + في وقت مبكر من الأسبوع الثالث وفي A + في وقت مبكر من الأسبوع الخامس ، بعد الشهر الثاني في A + 70 % من Gram + و 30 % من Gram - و B + 73 % من Gram + و 27 % من Gram -).

الكلمات الرئيسية: الجراثيم ، البروبيوتيك ، النظام الغذائي.