

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université DJILALI LIABES

Sidi Bel Abbès

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de la Biologie



2^{ème} Année Master : Biotechnologie

Mémoire

De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master

Intitulé du thème :

ÉTUDE COMPARATIVE ENTRE LE MICROBIOTE INTESTINAL DES BÉBÉ NÉS PAR CÉSARIENNE ET CEUX NÉS PAR VOIE BASSE

Présenté par : *Mlle Baghdaoui Fadhéla Amina*

Mlle Boulaledj Mimouna

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

Président : Dr. BENIN Amine

MCA Université Sidi Bel Abbès

Examineur : Dr. KANOUNE Khedoudja

MCA Université Sidi Bel Abbès

Promoteur : Dr. BENABBOU Amina

MCB Université Sidi Bel Abbès

Co-Promoteur : Dr. CHAMA Zouaouia

MCB Université Sidi Bel Abbès

Année Universitaire 2019/2020

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciement

Nous remercions ALLAH de nous avoir donné volonté et nous aider afin d'achever notre travail.

Nous tenons à remercier les membres de jury :

Dr. BENINE A. président de jury d'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance

Dr. KANOUNE Kh. Examinatrice d'avoir accepté d'examiner ce travail

Mme BENABBOU A : l'encadreur, qui a accepté d'encadrer notre travail, nous le remercions pour son soutien, conseils, orientations durant l'élaboration de ce travail de notre formation.

Mme CHAMA Z : co-encadreur, pour avoir accepté de collaborer dans ce travail.

Nous remercions : nos familles pour leur soutien tout au long de notre cursus universitaire.

Nous tenons à remercier toutes les personnes qui nous ont aidées pour la réalisation de notre travail.

Dédicaces

*A nos chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour,
leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de nos
études,*

*A nos famille pour leur soutien tout au long de nos parcours
universitaire*

Toute la promotion du Master 2 de l'année 2019 -2020

*Toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce
travail*

Nous dédions ce modeste travail

Résumé

Objectifs : Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à l'impact de mode d'accouchement sur le microbiote intestinal chez les nouveaux nés. Pour cela, nous avons caractérisé les bactéries isolées à partir des selles de nourrissons de la population de l'ouest algérien (Sidi Bel Abbès). Des informations concernant le sexe, le mode d'accouchement et la prise d'antibiotiques ont été recueillies. **Matériels et méthodes :** Différentes approches ont été utilisées pour l'identification des souches bactériennes isolées. Un premier tri des isolats a été réalisé sur la base des critères phénotypiques.

Résultats et Discussion : vue l'état de santé majeur que passe le monde à cause de la pandémie Covid-19, la réalisation de notre étude a été interrompue et de ce fait aucun résultat n'est présenté.

Conclusion : cette étude préliminaire est la première à comparer les communautés bactériennes des selles des nourrissons des bébés nés par césarienne et ceux nés par voie basse,; ainsi qu'une corrélation entre leur prévalence et de la population Algérienne. Pour compléter notre étude, il serait intéressant d'élargir l'échantillonnage et d'étudier d'autres genres bactériens afin de déterminer d'une manière plus précise la diversité bactérienne dans notre population.

Mots clés : *microbiote intestinal ; selles de nourrissons ; Bactéries ; mode d'accouchement ; césarienne ; voie basse.*

Abstract

Objectives : In this study, we are interested in the impact of mode of delivery at intestinal microbiota in newborns, . For this, we characterized bacteria from infant feces of the northwest Algerian population (Sidi Bel Abbes). Information on age, , sex, mode of delivery were collected.

Material and methodes : Different approaches have been used for the identification of isolated bacterial strains. An initial screening of isolates was performed on the basis of phenotypic criteria.

Results and Disscution : given the major state of health that the world is going through due to the covide-19 pandemic, the carrying out of our study was interrupted and therefore we have got no results to present.

Coclusion : According to our bibliographic investigations, this preliminary study is the first to compare the bacterial communities of infant feces born with caesarean and those born with natrual childbirth of the Algerian population. To complete our study, it would be interesting to expand the sampling and study other bacterial genera in order to determine more precisely the bacterial diversity in our population.

Key words: *Intestinal micobiota; ; infant feces; bacteria; delivery mode ; caesarean ; natrual childbirth.*

ملخص

الموضوع : في هذه الدراسة نحن مهتمون بتأثير طريقة الولادة على الجراثيم المعوية للرضع لهذا ميزنا بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة من براز الرضع من سكان غرب الجزائر (سيدي بلعباس) وقد جمعت معلومات عن العمر و الوزن و طريقة الولادة .

الوسائل و الطرق : و قد استخدمت أساليب مختلفة لتحديد السلالات البكتيرية المعزولة تم إجراء الفرز الأول للعزل على أساس المعايير المظهرية .

النتائج و المناقشة : نظرا للحالة الصحية الرئيسية التي يمر بها العالم بسبب وباء كوفيد-19 فقد تم وقف تنفيذ دراستنا و بالتالي لم يتم الحصول على أي نتائج .

الخاتمة : وفقا لأبحاثنا هذه الدراسة الأولية هي الأولى في مقارنة المجتمعات البكتيرية في براز الرضع المولودين بالولادة الطبيعية و المولودين بالقيصرية عند سكان الجزائر . لأتمام هذه الدراسة سيكون من المثير للاهتمام توسيع اخذ العينات و دراسة أجناس بكتيرية اخرى لتحديد بطريقة أدق التنوع البكتيري في وسطنا .

الكلمات المفتاحية :

البكتيريا المعوية ؛ البكتيريا ؛ براز الرضع ؛ طريقة الولادة ؛ الولادة الطبيعية ؛ الولادة القيصرية .

Table des matières

Remerciement	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des figures	I
Liste des tableaux.....	II
Liste des annexes.....	III
Liste des abréviations.....	IV
Introduction.....	1

Partie 1

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Les premiers colonisateurs : Le développement de la flore intestinale dès la naissance...5

<i>1.1</i>	Le microbiote intestinal	6
<i>1.2</i>	Le développement de la flore intestinale chez le	
<i>1.3</i>	nouveau-né.....	7
<i>1.2.1</i>	La période prénatale	7
<i>1.2.2</i>	la période postnatale.....	8
	Les facteurs influençant la flore microbienne	
	digestive.....	10

1.3.3	Le terme de naissance.....	11
1.3.4	Le mode d'accouchement.....	11
1.3.5	L'antibiothérapie.....	12
1.3.6	Le mode d'alimentation.....	12
1.4	Les fonctions du microbiote intestinal.....	13
1.4.1	Effet barrière et fonctions immunitaires.....	13
1.4.2	Fonctions métaboliques.....	14
1.4.2.1	Métabolisme des glucides.....	14
1.4.2.2	Métabolisme des gaz.....	17
1.4.2.3	Métabolisme des protéines.....	17
1.4.2.4	Métabolisme des lipides.....	19
1.5	Implication du microbiote en pathologie humaine...	20
1.5.1	Microbiote intestinal et obésité.....	20
1.5.2	Microbiote intestinal et cancer.....	21
1.5.3	Microbiote intestinal et autisme.....	22
1.5.4	Microbiote intestinal et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).....	23
1.6	Les pistes de traitement utilisant le microbiote pour le traitement des pathologies intestinales.....	24
1.6.1	Le transfert de flore.....	24
1.6.2	L'utilisation des probiotiques.....	24
1.6.3	La recherche et l'utilisation de molécules d'origine bactérienne.....	25
1.7	Les conséquences cliniques des perturbations dans l'établissement de la flore intestinale.....	25
1.7.1	Entérocolite ulcéro-nécrosante.....	26
1.7.2	Allergie.....	26

1.8 Faut-il moduler la flore intestinale du nouveau-né...	27
1.8.1 Les probiotiques.....	28
1.8.2 Les prébiotiques, les bactéries non viables et les métabolites bactériens.....	30
1.8.3 Les nucléotides.....	32

***Chapitre 2 : Les risques d'accouchement par
césarienne.....33***

2.1 Césarienne : les risques à court terme.....	34
2.1.1 Pour le bébé.....	34
2.1.2 Pour la mère.....	34
2.2 Césarienne : Les risques à long terme.....	35
2.2.1 Pour le bébé.....	35
2.2.2 Pour la mère.....	36
2.3 Ces risques peuvent-ils être évités.....	37

Chapitre 3 : Les bactéries lactiques.....39

3.1 Généralités.....	40
3.2 Habitat.....	41
3.3 taxonomie des bactéries lactiques.....	41
3.4 Les principaux genres de bactéries lactiques.....	43
3.4.1 Le genre Lactobacillus.....	43
3.4.2 Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus	46
3.4.2.1 Le genre Streptococcus.....	46
3.4.2.2 Le genre Lactococcus.....	47
3.4.2.3 Le genre Enterococcus.....	48
3.4.2.4 Le genre Vagococcus	49
3.5 Identification et typage des bactéries lactiques..	49
3.5.1 Méthodes phénotypiques.....	50
3.5.2 Méthodes génotypiques.....	52
3.5.2.1 Contenu en guanine et cytosine de l'ADN	52
Chromosomique.....	
3.5.2.2 Hybridation ADN-ADN.....	52
3.5.2.3 Méthodes d'empreintes moléculaires	53
(Fingerprinting).....	
3.5.2.3.1 Amplified Fragment Length	53
Polymorphism (AFLP).....	
3.5.2.3.2 Random Amplified Polymorphic DNA	53
(RAPD).....	
3.5.2.3.3 Repetitive extragenic palindromic-Polymerase	54
Chain Reaction (rep-PCR).....	

3.5.2.3.4	L'électrophorèse en champs pulsé de l'ADN chromosomique digéré (Puled Field Gel Electrophoresis).....	55
3.5.2.3.5	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA).....	55
3.5.2.3.6	Les espaces intergéniques de l'ADN ribosomal (ITS).....	55
3.5.2.4	Multilocus Sequence Typing (MLST).....	56
3.5.2.5	Séquençage du gène qui code pour l'ARNr 16S.....	56
3.5.2.6	Approches métagénomique.....	57
3.5.3	Méthodes phylogénétiques.....	58
3.5.3.1	Méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques.....	58
3.5.3.1.1	Méthodes de distance.....	59
3.5.3.1.2	Méthode du maximum de vraisemblance ou « Maximum Likelihood-ML».....	59
3.5.3.1.3	Méthodes de maximum de parcimonie...	60
3.5.3.2	Fiabilité de l'arbre phylogénétique.....	60
3.5.3.2.1	Evaluation statistique de la robustesse des arbres phylogénétiques.....	60
3.5.3.2.2	Enracinement de l'arbre.....	61
3.6	Rôle et intérêts des bactéries lactiques.....	61
3.6.1	Le domaine agroalimentaire.....	61
3.6.2	Le domaine médical.....	62
3.6.3	Utilisation des bactéries lactiques recombinantes...	63
3.6.3.1	Vaccination orale.....	63
3.6.3.2	Induction et restauration d'une tolérance immunitaire.....	64
3.6.3.3	Production et transport de protéines d'intérêt.....	64
3.7	Innocuité.....	65

Partie 2

Etude expérimental

Chapitre 4

<i>Matériel et Méthodes.....</i>	<i>67</i>
<i>4.1 Problématique et objectifs.....</i>	<i>68</i>
<i>4.2 Echantillonnage.....</i>	<i>69</i>
<i>4.3 Isolement et purification des souches bactériennes...</i>	<i>69</i>
<i>4.3.1 Milieux de culture.....</i>	<i>70</i>
<i>4.3.1.1 Milieu MRS (de Man-Rogosa-Sharpe).....</i>	<i>70</i>
<i>4.3.1.2 Milieu CBA (Columbia blood agar).....</i>	<i>70</i>
<i>4.3.2 Dénombrement des bactéries lactiques.....</i>	<i>70</i>
<i>4.3.3 Purification.....</i>	<i>72</i>
<i>4.4 Caractérisation phénotypiques des souches bactériennes.....</i>	<i>73</i>
<i>4.4.1 Etude morphologique.....</i>	<i>73</i>
<i>4.4.1.1 Caractérisation macroscopique.....</i>	<i>73</i>
<i>4.4.1.2 Caractérisation microscopique.....</i>	<i>73</i>
<i>4.4.2 Etude biochimique.....</i>	<i>73</i>
<i>4.4.2.1 Test catalase.....</i>	<i>73</i>
<i>4.4.2.2 Test oxydase.....</i>	<i>74</i>
<i>4.5 Analyse statistique.....</i>	<i>74</i>

Chapitre 5

Résultats et76

5.1 Résultats..... 77

Chapitre 6

Conclusion.....78

6.1 Conclusion..... 79

6.2 Références bibliographiques..... 80

6.3 Annexe..... 96

Liste de figure

Figure 1 : Colonisation naturelle de l'intestin d'un nouveau-né au cours des dix premiers jours de vie.....	9
Figure 2 : Schéma global de la chaîne trophique de dégradation et de fermentation des glucides par la microflore colique.....	16
Figure 3 : Principales voies du métabolisme des protéines dans le côlon.....	18
Figure 4 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et les genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S.....	43
Figure 5 : Contraste de phase (A-E) et d'électron (F) des micrographies montrant les différentes morphologies cellulaires des lactobacillus.....	44
Figure 6 : Morphologie cellulaire de <i>Streptococcus thermophilus</i> observée par microscopie électronique.....	47
Figure 7 : Morphologie cellulaire de <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> observée par microscopie électronique.....	48
Figure 8 : morphologie cellulaire d' <i>Enterococcus faecalis</i> observée par microscopie électronique.....	49
Figure 9 : Résolution des techniques de taxonomie utilisées.....	50
Figure 10 : Positions des régions conservées de l'opéron ribosomique 16S-23S chez <i>Escherichia coli</i>	56
Figure 11 : Schéma représentant les étapes principales des méthodes de caractérisation dites culture indépendantes.	58
Figure 12 : Schéma illustrant le dénombrement des bactéries en milieu solide	71
Figure 13 : Schéma illustrant la purification des bactéries en milieu solide /liquide.....	72

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux genres bactériens produisant les acides gras à courte chaîne carbonée.....	15
Tableau 2 : Principales amines formées par la microflore colique.....	19

Liste des annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de culture 96

Annexe 2 : Coloration de gram..... 97

Liste des abréviations

%: Pourcentage

°C: Celsius

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNr 16S : le gène codant pour l'ARNr 16S

AFLP : Amplified Fragment-Length Polymorphism

API : Analytic Programme Index

ARDRA : Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

ARNr 16S : Acide Ribonucléique Ribosomique constituant la petite sous-unité chez les procaryotes.

ARNr 23S : Acide Ribonucléique Ribosomique constituant la grande sous-unité 50S des ribosomes de procaryotes.

ARNt : Acide Ribonucléique de transfert.

BET : Bromure d'Ethidium

BLR : Bactéries Lactiques Recombinantes

C : Cytosine

CBA : Columbia Blood Agar

CD : cellules dendritiques

CFU : Colony Forming Unit

CO₂ : Dioxyde de Carbone

D: dilution

E. : Enterococcus

E. coli: Escherichia coli

EDTA: Ethylène Diamine Tétra Acétique

EPS : Exopolysaccharides

ERIC : Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

FISH : Fluorescent In-Situ Hybridization

g : gramme

G : Guanine

GETAID: Groupe D'étude Thérapeutique des Affections Inflammatoires

GRAS : Generally Regarded As Safe

H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène

HAS : Haute Autorité de Santé

HMO : Human Milk Oligosaccharides

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HPV-16 : Papillomavirus Humain de type 16

IBD : Inflammatory Bowel Disease

Ig A : Immunoglobulines A

Ig G1: Immunoglobuline G-1

IL-10 : Interleukine 10

ITS : Internally Transcribed Spacer Kcal : Kilocalorie

KDa : kilodalton

Lb. : Lactobacillus

Lt. : Lactococcus

m : masse

MC : Maladie de Crohn

mg : milligramme

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

ML : Maximum Likelihood

MLST : Multilocus Sequence Typing

mol : molaire
MRS : Man, Rogosa, Sharpe
NaCl : Chlorure de Sodium
ng : nanogramme
NJ : Neighbor Joining
nm : nanomètre
OMS : Organisation Mondiale de la Santé.
OTU : Operationnal Taxonomic Units.
Pb: Paire de base
PCR : Polymerase Chain Reaction
PCR RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis
pH: potentiel Hydrogène qPCR: Real-time quantitative Polymerase-Chain-Reaction
RAPD : Random Amplification of Polymorphic DNA
RCH : Retrocolite Hémorragique
reg : Lymphocyte T régulateur
REP : Repetitive Extragenic Palindromic
REP-PCR : Repetitive Element Palindromic
RISA : Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
SDS-PAGE : Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du Dodécysulfate de Sodium
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
sp : species (espèces) spp : Toutes les espèces d'un genre
ssp : sub-species (sous-espèces)
St. : Streptococcus T
TAE : Tris, Acétate, EDTA
Th17 : Lymphocyte T hepler-1
TNF α : Tumor Necrotizing Factor α
U : Unité
Ul : microlitre
Um : micromolaire
UNFPA : Le Fonds des Nations Unies pour la Population
UNICEF : United Nations Children's Fund
UPGMA : Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
UV: Ultraviolet
v : volume

Introduction

Introduction

Souvent on associe le mot bactérie aux maladies et aux épidémies qui ont de tous temps marqué l'histoire des sociétés humaines. Et pourtant, ces petites créatures ne sont pas toujours nos ennemies, la plupart sont nécessaires à la protection et au fonctionnement de l'organisme.

Notre tube digestif est peuplé par plusieurs centaines d'espèces bactériennes, formant une communauté écologique complexe, désignée sous le nom de flore ou microbiote intestinal. C'est la flore la plus importante de l'organisme et son rôle est d'autant moins négligeable qu'elle exerce non seulement des fonctions métaboliques essentielles à la digestion mais aussi forme une barrière en s'opposant à l'implantation des germes pathogènes. L'équilibre de cet écosystème intestinal est fragile ; de nombreuses causes peuvent entraver le bon déroulement de la digestion et entraîner une dysbiose et une hyperperméabilité intestinale. Un déséquilibre au niveau de l'intestin et de sa flore, a des conséquences fonctionnelles importantes et est impliqué dans de nombreuses pathologies digestives (**Sokol, 2014**).

Chaque être humain a son propre microbiote. Cependant, l'établissement et la composition du microbiote restent mystérieux malgré de nombreuses études qui donnent des pistes sur l'identité des bactéries présentes et leurs fonctions.

L'implantation du microbiote intestinal à la naissance et sa maturation dans les premières années de vie est une étape primordiale qui conduit à la formation d'une flore intestinale spécifique à l'hôte.

De nombreux facteurs internes liés à l'hôte et externes influencent l'implantation du microbiote intestinal. Ainsi, les microbiotes maternels notamment vaginal et fécal sont les premières sources de bactéries.

Introduction

Dans cet esprit, nous avons mené cette étude pour déterminer l'impact de mode d'accouchement sur la composition de la flore intestinale des nourrissons dans la population d'Ouest Algérien.

Pour ce faire, nous avons prélevé des échantillons des selles des nourrissons à partir d'un groupe de 20 nourrissons respectifs. L'utilisation des milieux de culture, MRS (Man-Rogosa-Sharpe) et CBA (Columbia Blood Agar).

Enfin, l'analyse statistique a été effectuée afin de comparer entre la distribution des communautés bactériennes dans les selles des bébés nés par césarienne et ceux nés par voie basse, et pour déterminer l'impact de mode d'accouchement sur l'établissement du microbiote intestinal des jeunes enfants.

Partie I :
Revue Bibliographique

CHAPITRE 1

Les premiers colonisateurs : Le développement de la flore intestinale dès la naissance

1.1	Le microbiote intestinal.....	6
1.2	Le développement de la flore intestinale chez le nouveau-né.....	7
1.3	Les facteurs influençant la flore microbienne digestive.....	10
1.4	Les fonctions du microbiote intestinal.....	13
1.5	Implication du microbiote en pathologie humaine.....	20
1.6	Les pistes de traitement utilisant le microbiote pour le traitement des pathologies intestinales.....	24
1.7	Les conséquences cliniques des perturbations dans l'établissement de la flore intestinale.....	25
1.8	Faut-il moduler la flore intestinale du nouveau-né ?.....	26

CHAPITRE 1

Les premiers colonisateurs : Le développement de la flore intestinale dès la naissance

1.1 Le microbiote intestinal

Le mot microbiote (du grec mikros : petit et bios : vie) désigne les espèces microscopiques qui prédominent et/ou sont durablement adaptées à la surface et à l'intérieur d'un organisme vivant. Microbiote dérive de l'anglais microbiota et remplace aujourd'hui les termes désuets de flore microbienne ou de microflore.

Le microbiote intestinal est un écosystème complexe qui comprend l'ensemble des êtres unicellulaires hébergés dans le tube digestif, principalement des bactéries mais aussi des virus, des champignons et des archées. Après la colonisation du tube digestif de la naissance à l'âge de 2 ans environ, le microbiote intestinal est propre à chaque individu et stable dans le temps. Par ailleurs, il existe un phénomène de résilience, c'est-à-dire le retour à l'équilibre après un événement perturbateur (comme la prise d'antibiotiques par exemple). Si la composition en termes d'espèces est propre à chaque individu, les caractéristiques sont très conservées en termes de composition au niveau des phyla et grands groupes phylogénétiques.

Pendant de très nombreuses années, le microbiote digestif n'a été que peu ou superficiellement étudié, car plus de 90 % des bactéries qui le composent ne sont pas cultivables par les méthodes classiques. L'avènement de la biologie moléculaire a permis de commencer à l'étudier dans sa globalité et d'en décrire la grande diversité, en s'affranchissant des limites de la culture.

On le savait depuis longtemps que le microbiote intestinal contient un grand nombre de bactéries. Le rapport de dix bactéries pour une cellule humaine (10:1) est régulièrement mentionné, sans pour autant être appuyé par des données précises et bien établies. Une récente étude vient cependant réévaluer ce rapport à environ 1:1, en estimant le nombre de bactéries de la flore intestinale à $3,8.10^{13}$, et le nombre de cellules humaines à $3,0.10^{13}$ (Sender et al, 2016).

Au total, plus de 1000 espèces bactériennes ont été identifiées, avec environ 160 chez un individu donné, appartenant majoritairement à 4 phyla bactériens : Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, et Proteobacteria. Les Firmicutes et les Bacteroidetes constituent les deux phyla dominants du microbiote avec une représentativité respective de 60–75 % et 30–40 %. Au sein de ces phyla, 6 genres bactériens sont retrouvés en dominance (Eubacterium, Lactobacillus, Enterococcus, Clostridium, Bacteroides et Bifidobacterium) (Hooper & Gordon, 2001; Landman & Quevrain, 2016). Le microbiote intestinal peut peser jusqu'à 2 kg et possède à lui seul environ 3 millions de gènes si l'on considère le génome global. Les produits de ces gènes confèrent des capacités métaboliques non codées par le propre génome de l'hôte (Hooper et al, 2002). La flore digestive possède de très nombreuses fonctions utiles à l'hôte. Elle participe à un certain nombre d'activités fonctionnelles et interfère avec la digestion et l'absorption de certains nutriments. Ce qui fait qu'elle est considérée par certains comme un « organe » caché (Beaugerie & Sokol, 2014).

1.2 Le développement de la flore intestinale chez le nouveau-né

1.2.1 La période prénatale

Auparavant, les chercheurs considéraient que le placenta était stérile au cours d'une grossesse normale et que le fœtus vivait dans un état axénique physiologique. La présence de bactéries dans les cultures cliniques était le diagnostic pour une infection intra-utérine et lié un risque important d'accouchement prématuré (Hillier et al, 1988).

Peu d'études ont examiné le microbiote utérin chez les femmes saines ayant des naissances à terme. Toutefois, la présence de bactéries est détectée, dans le liquide amniotique et les membranes fœtales de bébés indemnes de toute inflammation. Ces études révèlent une communauté complexe à faible abondance dominée par les phylas Firmicutes, Tenericutes, Proteobacteria, Bacteroidetes et Fusobacteria (Steel et al, 2005; Aagaard et al, 2014).

Il a été constaté que le microbiote placentaire ressemble plus au microbiote oral qu'à celui du vagin et des selles. Cela implique que l'origine des bactéries placentaires n'est probablement pas ascendante ni issue d'une contamination fécale ou vaginale mais plutôt de la cavité orale par propagation hématogène (**Aagaard et al, 2014**).

Depuis quelques années les parodontites, en tant que pathologies chroniques d'origine bactérienne, ont également été suspectées comme facteurs endogènes pouvant augmenter la probabilité de survenue des accouchements prématurés (**Offenbacher et al, 1996; Goldenberg et al, 2000; Dridi et al, 2008; Offenbacher et al, 2009; Macones et al, 2010**).

De même, *Fusobacterium nucleatum* est un pathogène buccal que l'on retrouve fréquemment dans les diagnostics bactériologiques après un accouchement prématuré, une rupture prématurée des membranes ou une mortinatalité (**Cahill et al, 2005; Dridi et al, 2008; Funkhouser & Bordenstein, 2013**). Ce qui confirme l'hypothèse d'une propagation hématogène de la cavité buccale vers le placenta. Cette théorie est renforcée par la découverte de bactéries dans le sang du cordon ombilical de nouveau-nés en bonne santé nés par césarienne (**Jimenez et al, 2005; Funkhouser & Bordenstein, 2013**).

1.2.2 la période postnatale

Après la naissance, le bébé est exposé chaque jour à de nombreuses espèces bactériennes, que ce soit dans son environnement ou dans son alimentation. Dès les premières heures de vie, une flore bactérienne dite "normale", physiologique ou saprophyte s'installe : le Streptocoque alpha-hémolytique prédomine au niveau de la gorge ; le Staphylocoque blanc au niveau de la peau, du rhinopharynx et de l'ombilic (**Guediche, 1990; Sokol, 2014**).

La flore bactérienne digestive est cependant plus complexe ; elle atteint à partir de la 48 heure de vie des taux de 10⁸ à 10¹⁰ micro-organismes par gramme de fèces, chiffres proches de ceux observés chez l'adulte. Les premiers colonisateurs de l'intestin sont les bactéries anaérobies facultatives (telles que: *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp,

CHAPITRE 1 : Les premiers colonisateurs : Le développement de la flore intestinale dès la naissance

Staphylococcus sp, Enterococcus sp et Lactobacillus sp). Ces bactéries consomment l'oxygène de la lumière intestinale afin de créer les conditions les plus favorables pour le développement des bactéries anaérobies strictes (Vael & Desager, 2009; Scholtens et al, 2012) (Figure 1)

Après une semaine de vie, les genres anaérobies stricts, tels que : les Bifidobactéries, les Bacteroides et Clostridium sont détectés dans les selles des nourrissons. Une flore complexe et stable, proche de celle de l'adulte, semble obtenue entre l'âge de 2 à 4 ans. Le processus de colonisation microbienne est dynamique et conduit à la formation d'un microbiote intestinal spécifique à l'hôte (Yoshioka et al, 1983; Scholtens et al, 2012).

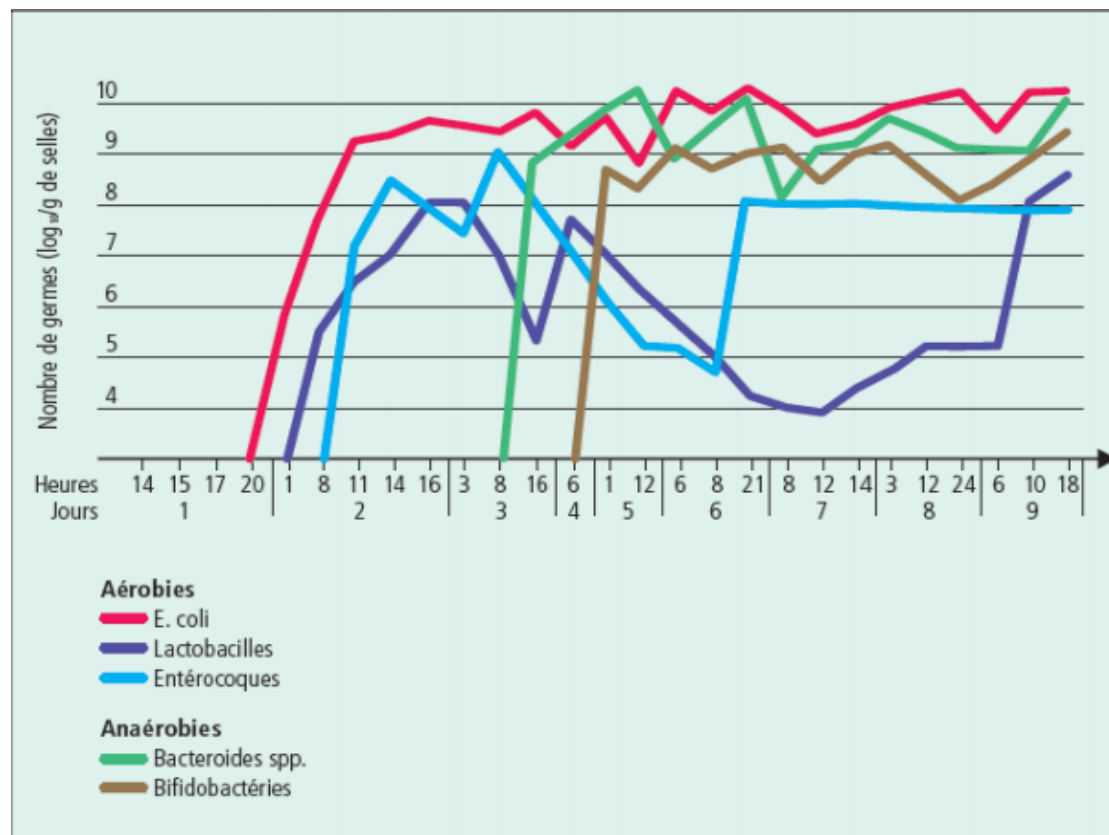


Figure 1 : Colonisation naturelle de l'intestin d'un nouveau-né au cours des dix premiers jours de vie. (Hoogkamp-Korstanje et al, 1979)

1.3 Les facteurs influençant la flore microbienne digestive :

De nombreux éléments vont influencer cette cinétique d'implantation et la composition de la flore intestinale du nouveau-né parmi lesquels les facteurs génétiques, l'environnement, l'âge gestationnel, le mode d'accouchement, l'antibiothérapie et le type d'alimentation.

1.3.1 Les facteurs génétiques

La composition du microbiote serait déterminée dès le départ par notre génétique. L'existence d'un effet des caractères génétiques de l'hôte sur la composition de son microbiote a été très tôt suggérée grâce à l'observation des jumeaux qui avaient une flore cultivable très semblable. Ainsi, l'impact des caractéristiques génétiques semble important, la composition de la flore étant plus similaire entre des jumeaux monozygotes (c'est-à-dire qui proviennent de la division d'un oeuf fécondé unique) vivants dans les mêmes conditions et dans le même environnement, qu'entre des personnes partageant le même style de vie mais non apparentées ou génétiquement moins proches (fratrie, parent et enfant, couple). Le génotype déterminerait la susceptibilité de l'individu face à certaines familles de bactéries et favoriserait leur colonisation ou pas, mais il ne peut pas à lui seul conditionner les modifications de la composition de la flore (Stewart et al, 2005; Rofes, 2014).

1.3.2 L'environnement et les conditions d'hygiène

L'environnement peut influencer la colonisation intestinale. Dans les pays industrialisés, les nourrissons naissent et grandissent avec des normes hygiéniques élevées, alors que les nourrissons nés et élevés dans les pays en développement rencontrent des expositions bactériennes plus élevées, ce qui peut avoir des conséquences pour le processus de colonisation intestinale. Il est bien admis que la colonisation par des espèces commensales habituelles, comme *Escherichia coli*, est souvent retardée dans les pays industrialisés comparée aux pays en développement (Nowrouzian et al, 2003). Fallani et al, ont

récemment montré dans une étude à grande échelle que les différences entre le régime alimentaire et le mode de vie même entre les pays européens peuvent conduire à des modèles différents de la colonisation intestinale (**Fallani et al, 2010**). Leurs observations suggèrent un éventuel gradient géographique nord-sud caractérisé par une plus grande proportion de bifidobactéries, d'*Atopobium*, de *Clostridium perfringens* et *Clostridium difficile* dans les villes du nord de l'Europe (**Glasgow, Stockholm**) et des *Bacteroides*, des entérobactéries et des lactobacilles dans les villes du sud de l'Europe (**Grenade, Reggio Emilia**) (**Scholtens et al, 2012**).

1.3.3 Le terme de naissance

Chez les enfants prématurés, il existe un retard de colonisation par les bactéries anaérobies strictes du genre *Bifidobacterium* et *Bacteroides*. La colonisation se fait également par un nombre plus réduit d'espèces bactériennes (**Mackie et al., 1999 ; Campeotto et al., 2007**).

Les *Bifidobactéries* vont alors apparaître vers dix jours et ne seront dominantes qu'au bout de la deuxième ou troisième semaine. Cela serait dû au fait que la plupart des enfants prématurés naissent par césarienne, pour être tout de suite placés dans un environnement très aseptisés et soumis à une antibiothérapie à large spectre. Il n'y aurait donc aucun contact avec la flore entérique et vaginale de la mère et très peu de bactéries environnantes (**Mackie et al., 1999 ; Campeotto et al., 2007**).

1.3.4 Le mode d'accouchement

Une étude du département de biologie de Puerto Rico a montré que la composition du méconium prélevé dans les premières 24 heures était déjà très différente 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*) (**Dominguez-Bello et 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 et al, 2006; Biasucci et al, 2010; Bonaiti, 2012).

1.3.5 L'antibiothérapie

Quelle soit per partum (avant le terme) ou post-natale, l'antibiothérapie aura des conséquences. Soit elle va modifier la flore barrière, soit elle va sélectionner des germes résistants à l'antibiotique. Avec pour conséquence, une diminution de la résistance à la colonisation par des bactéries pathogènes, notamment des entérobactéries résistantes (Campeotto, 2007).

La plupart des antibiotiques passent dans le lait. Le plus souvent, les quantités auxquelles l'enfant est exposé sont faibles et le traitement antibiotique ne constitue pas une contre-indication à l'allaitement (Mathew, 2004).

1.3.6 Le mode d'alimentation

L'allaitement maternel favorise l'implantation du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*. Les bactéries de la flore intestinale de la mère sont retrouvées dans les selles de l'enfant allaité. En effet, durant la grossesse et l'allaitement, il existe une translocation bactérienne, qui est un phénomène physiologique, permettant aux bactéries de la flore intestinale de la mère de se retrouver dans les glandes mammaires (Mackie et al., 1999 ; Perez et al., 2007).

Les bactéries sont englobées dans les monocytes, macrophages, sans être phagocytés. Ceux-ci seraient capables de reconnaître les bactéries comme des agents bénéfiques et non pathogènes. Et, c'est à l'intérieur des monocytes que les bactéries sont transportées jusque dans les glandes mammaires, puis se retrouvent dans le lait maternel et enfin, dans les selles du nourrisson allaité (Mackie et al., 1999 ; Perez et al., 2007).

1.4 Les fonctions du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal exerce de nombreuses fonctions physiologiques dont les répercussions pour l'hôte sont, pour la plupart, bénéfiques. Parmi les grandes fonctions du microbiote, la fermentation des substrats disponibles au niveau du côlon, le rôle de barrière à la colonisation par les micro-organismes pathogènes, le développement et la maturation du système immunitaire intestinal et les interactions avec les cellules épithéliales ont des rôles essentiels pour le maintien de la santé de l'hôte. Le microbiote intestinal doit ainsi être considéré dans son contexte environnemental, incluant l'hôte et l'aliment. Les interactions entre ces différents constituants assurent l'homéostasie de l'écosystème microbien digestif. Toute rupture de l'équilibre entre ces constituants est susceptible de perturber le fonctionnement de l'écosystème et d'être à l'origine de pathologies digestives (fonctionnelles, inflammatoires, infectieuses...) (**Gérard & Bernalier-Donadille, 2007**).

1.4.1 Effet barrière et fonctions immunitaires

Il existe dans la lumière intestinale une compétition pour les nutriments et les sites d'adhérence épithéliaux entre pathogènes et bactéries commensales. Par ailleurs, le microbiote produit des bactériocines et il est capable de stimuler la production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales. Il induit également la production des IgA sécrétoires et favorise le bon fonctionnement des jonctions serrées entre les cellules épithéliales, ce qui diminue l'invasion par des bactéries pathogènes. Outre ses propriétés de barrière, le microbiote intestinal joue un rôle fondamental dans le développement et la maturation du système immunitaire. La découverte de cette fonction essentielle vient de l'observation des différences entre souris axéniques (élevées en milieu stérile et donc dépourvues de microbiote) et souris conventionnelles (élevées en animalerie classique) (**Macpherson & Harris, 2004**). Les souris axéniques présentaient de nombreuses anomalies au niveau du système immunitaire intestinal : hypoplasie des plaques de Peyer, diminution des lymphocytes intra-épithéliaux, déficit en certaines populations lymphocytaires T, diminution de la sécrétion intestinale d'IgA, de la concentration d'immunoglobulines

sériques et de la production de cytokines. Mais le plus intéressant est que ces anomalies ne se cantonnaient pas au système immunitaire intestinal, puisqu'on observait dans la rate et les ganglions lymphatiques des zones lymphocytaires atrophiées. Par ailleurs, quelques semaines après l'inoculation du microbiote de souris conventionnelles à ces souris axéniques, l'ensemble de ces anomalies disparaissaient (**Landman & Quevrain, 2016**).

Au-delà de ces observations sur les fonctions globales du microbiote, il semble que certaines espèces bactériennes aient des propriétés spécifiques. L'homéostasie intestinale est notamment sous la dépendance d'un équilibre entre les lymphocytes T effecteurs (Th17 principalement) et les lymphocytes T régulateurs (Treg). Il a récemment été montré que certaines bactéries stimulent particulièrement les populations Th17 intestinales (**Gaboriau-Routhiau et al, 2009**) alors que d'autres stimulent les Treg (**Atarashi et al, 2011**) par l'intermédiaire des acides gras à chaînes courtes qu'elles produisent (**Smith et al, 2013**). Elles participent ainsi au maintien de l'homéostasie intestinale.

1.4.2 Fonctions métaboliques

Les fonctions métaboliques de la microflore intestinale sont nombreuses et diversifiées. Le microbiote intestinal contribue ensuite à la digestion des aliments au niveau du tube digestif, en ayant une action complémentaire des sucs intestinaux, en produisant des enzymes digestives. Les métabolites produits par la flore étant majoritairement absorbés et métabolisés dans l'organisme.

1.4.2.1 Métabolisme des glucides

Il se fait grâce à la flore dite de fermentation (également nommée flore hydrolytique ou fibrolytique) ; elle est dominante dans la première partie du côlon droit et est composée d'espèces saccharolytiques. Les substrats utilisés sont les hydrocarbures tels que les fibres insolubles, les amidons résistants et l'inuline ; ainsi, grâce à leurs glucosidases et leurs polysaccharidases. Ce métabolisme s'accompagne de la formation d'Acides Gras à Chaîne Courte (AGCC), mais aussi de gaz (CO₂ et H₂). Le dioxyde de carbone formé sera en partie absorbé par l'intestin et en partie utilisé par le microbiote. Une autre flore, la flor

CHAPITRE 1 : Les premiers colonisateurs : Le développement de la flore intestinale dès la naissance

hydrogénotrophe, vient compléter la précédente avec des espèces méthanogènes utilisant comme substrat l'hydrogène, les lactates, les succinates et l'éthanol, et des espèces sulfatoréductrices utilisant comme substrat des dérivés sulfates et nitrates (**Annick, 2004 ; Bernalier et Dore ; 2008 ; Marieb et al., 2014**).

Tableau 1 : Principaux genres bactériens produisant les acides gras à courte chaîne carbonée (**Bernalier et Dore ; 2008**)

Métabolites finaux	Principaux genres bactériens producteurs
Acétate	<i>Bacteroides, Bifidobacterium, Eubacterium, Lactobacillus, Clostridium, Ruminococcus, Propionibacterium, Veillonella, Faecalibacterium, Butyrivibrio ...</i>
Propionate	<i>Bacteroides, Propionibacterium, Veillonella</i>
Butyrate	<i>Clostridium, Eubacterium, Butyrivibrio, Peptostreptococcus, Faecalibacterium, Roseburia, Anaerostipes</i>

Selon **Marieb et al. (2014)** Plusieurs facteurs vont influencer le métabolisme des glucides au niveau du côlon :

- Le substrat : la taille, la forme, la composition chimique, la solubilité à pH 7, etc.
- L'hôte : le temps de transit intestinal.
- Les microorganismes : les espèces présentes, la régulation de la synthèse des enzymes hydrolytiques, la régulation du transport dans la cellule, etc.
- Le site colique : côlon proximal ou distal.

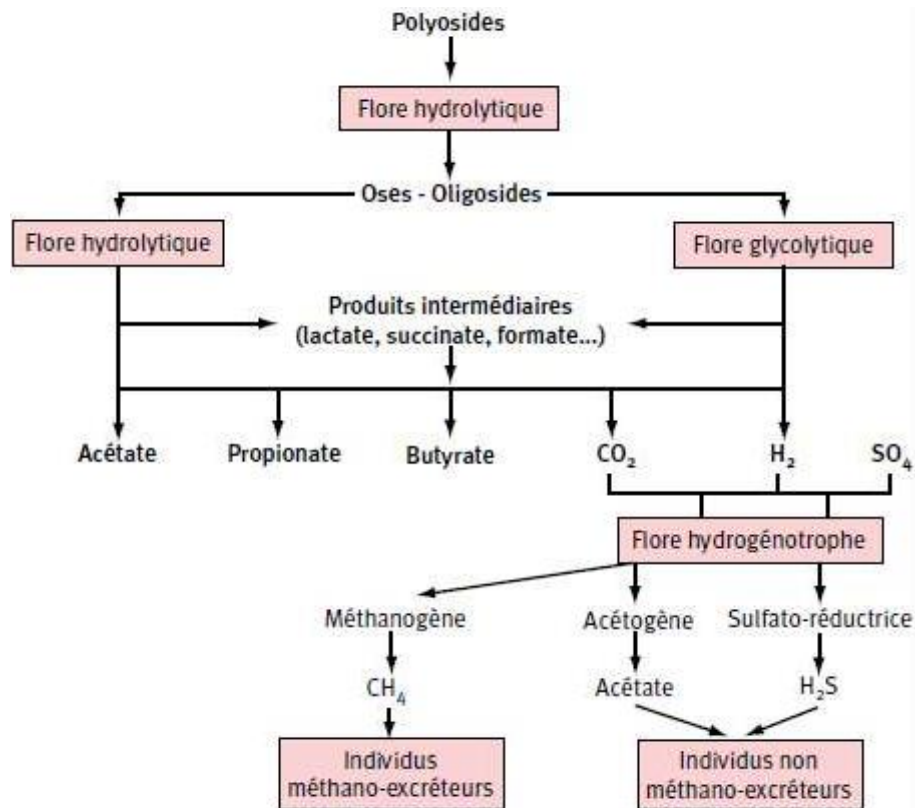


Figure 2 : Schéma global de la chaîne trophique de dégradation et de fermentation des glucides par la microflore colique (Annick, 2004). Le microbiote dominant responsable de ce métabolisme est principalement composé de: *Bactéroïdes*, *Eubactérium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, *Propionobacterium* et *Actinomyces* (Marieb et al., 2014).

1.4.2.2 Métabolisme des gaz

L'hydrogène est le gaz majoritairement produit lors des processus fermentaires, et ce, en grande quantité de façon quotidienne dans le côlon. Son élimination, essentielle à l'efficacité du processus fermentaire, est possible de plusieurs manières. Il peut être excrété par l'émission de gaz rectaux ou par voie pulmonaire, mais la plus grande partie de l'hydrogène est transformée in situ par des bactéries du microbiote colique dites hydrogénotrophes (**Christl et al, 1992**). Les trois types de transformation principaux sont : en méthane par les archées méthanogènes (présentes dans le microbiote colique de 30 à 50 % des adultes), en acétate par les bactéries acétogènes, et enfin, en sulfures au potentiel délétère pour le colonocyte, par les bactéries sulfatoréductrices (dont le genre prédominant est *Desulfovibrio*) (**Landman & Quevrain, 2016**).

1.4.2.3 Métabolisme des protéines

Les protéines et les peptides étant la principale source azotée dans le côlon, les bactéries doivent hydrolyser ces polymères pour disposer des carbones et de l'azote qui les composent. Elle repose sur la flore protéolytique prédominante dans le côlon distal car leurs enzymes ne fonctionnent que dans des conditions strictes de pH (6-9) ; cette flore est constituée principalement de : *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*, *Clostridium*, *Escherichia* et *Fusobacterium*. Les protéases bactériennes sont, soit extra-cellulaires (*Clostridium* ou *Propionibacterium*), soit associées à la cellule (*Lactobacillus*), les mécanismes régulant cette activité variant considérablement d'une espèce à l'autre . (**Annick, 2004**).

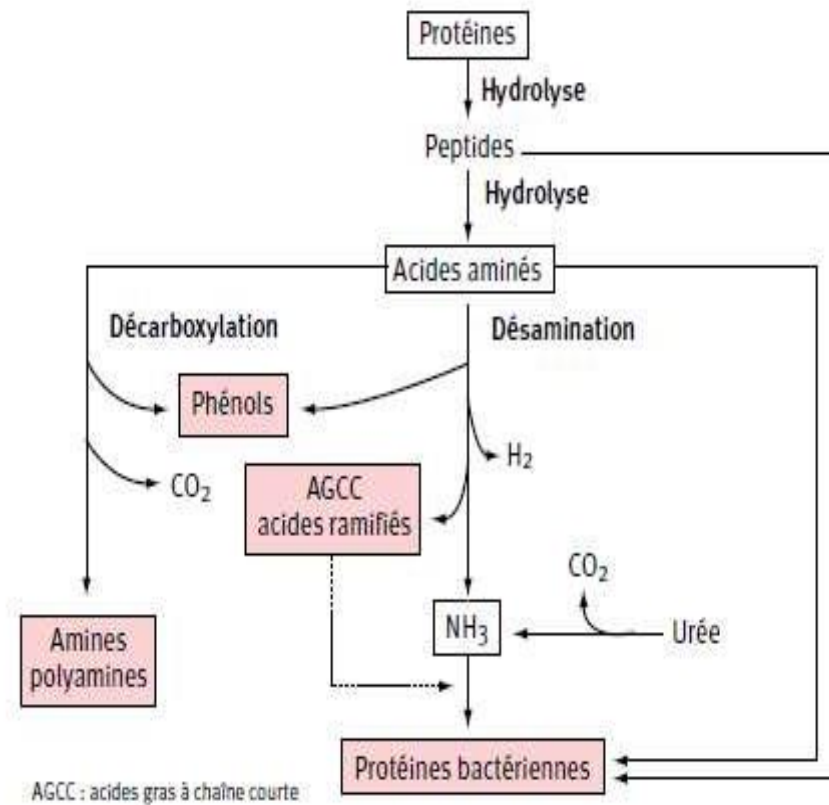


Figure 3. Principales voies du métabolisme des protéines dans le côlon (Annick, 2004) Les protéines, dérivés protéiques et peptides sont hydrolysés par des bactéries protéolytiques possédant des activités protéases (sérine et cystéine protéase) et métalloprotéases (thermolysine et protéase de la matrice extracellulaire) en acides aminés.

Tableau 2 : Principales amines formées par la microflore colique (Annick, 2004).

Amines	Précurseurs	Réactions impliquées
Méthylamine	Glycine	Décarboxylation
Diméthylamine	Choline	N-Désalkylation
Propylamine	Acide amino-butyrique	Décarboxylation
Pyrrolidine	Putrescine	Désamination oxydative
Piperidine	Cadavérine	Désamination oxydative
2-méthylbutylamine	Valine	Décarboxylation
Putrescine	Ornithine	Décarboxylation
	Arginine	Décarboxylation et hydrolyse
Cadavérine	L-lysine	Décarboxylation
Agmatine	Arginine	Décarboxylation
Phényléthylamine	Phénylalanine	Décarboxylation
Tyramine	Tyrosine	Décarboxylation
Ethylamine	Alanine	Décarboxylation

1.4.2.4 Métabolisme des lipides

Les lipides de la lumière colique comprennent les lipides non absorbés dans l'intestin grêle, ceux provenant de la desquamation des colonocytes et les lipides bactériens. Ces acides gras sont transformés (hydrolyse, oxydation, réduction, hydroxylation...) par les bactéries du microbiote colique. Le cholestérol colique provient pour la majorité de la bile (70 %) et pour le reste de l'alimentation (20 %) et de la desquamation des cellules épithéliales intestinales (10 %). Il est converti par le microbiote en coprostanol qui n'est pas absorbé et donc est éliminé dans les fèces (Lichtenstein et al, 2006). Cette efficacité est très variable d'un sujet à l'autre et le taux fécal de coprostanol pourrait être impliqué dans la réduction du risque cardiovasculaire et la cancérogénèse colique. Les acides biliaires, produit de transformation du cholestérol par le foie, sont conjugués à la glycine ou à la taurine, ce qui a pour conséquence une amphiphilie accrue. Quatre-vingt-quinze pourcent des acides biliaires suivent le cycle entéro-hépatique : sécrétion biliaire, réabsorption au niveau de l'iléon

terminal, retour au foie via le système porte, avant d'être à nouveau sécrété dans la bile. Seuls 5 % des acides biliaires sécrétés dans la bile parviennent donc au côlon où ils sont métabolisés (déconjugaison, oxydation, épimérisation, 7-alpha-déshydroxylation, désulfatation, etc.) par les bactéries du microbiote en acides biliaires dits secondaires (**Ridlon et al, 2006**). La déconjugaison (espèces des genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, etc.) rend les acides biliaires plus hydrophobes et favorise leur absorption passive. Les acides cholique et chénodésoxycholique, acides biliaires primaires principaux chez l'homme, sont transformés par 7-alpha-déshydroxylation par les espèces du genre *Clostridium* en acides desoxycholique et lithocholique (acides biliaires secondaires) qui pourraient avoir un effet carcinogène sur la muqueuse colique. Les hormones stéroïdes et des xénobiotiques suivent également un cycle entéro-hépatique et les mêmes voies métaboliques avec conjugaison hépatique et déconjugaison par le microbiote colique.

En considérant le rôle fondamental que le microbiote intestinal joue dans la réponse immunitaire ainsi que dans différentes voies métaboliques essentielles de l'hôte, on peut facilement imaginer l'impact fonctionnel d'un déséquilibre de ce microbiote sur le développement de différentes pathologies immunitaires et métaboliques (**Landman & Quevrain, 2016**).

1.5 Implication du microbiote en pathologie humaine

Il est aujourd'hui clairement établi que le microbiote intestinal joue un rôle dans certaines pathologies du système digestif (cancer colorectal, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin) mais également dans les cas d'obésité et d'autisme.

1.5.1 Microbiote intestinal et obésité

L'augmentation de la prévalence de l'obésité ces dernières années est telle qu'elle peut être uniquement due à des facteurs génétiques. Les chercheurs se sont intéressés au microbiote intestinal comme pouvant être un facteur environnemental influençant l'obésité. Son rôle dans le stockage des graisses et l'obésité a donc été récemment investigué. Des résultats parus dans le journal *Nature* en 2006 suggèrent que le microbiote intestinal contribue à l'absorption par l'hôte de glucides et de lipides et régule le stockage des graisses

(Turnbaugh et al, 2006). Ces effets seraient liés à l'induction par le microbiote de la lipogenèse hépatique et du stockage des triglycérides dans les adipocytes. D'autre part, la même équipe a montré que le microbiote de souris obèses (ob/ob), invalidées pour le gène de la leptine, comportait une proportion anormalement élevée de *Firmicutes* et anormalement basse de *Bacteroidetes*. De plus, le transfert du microbiote de ces souris obèses à des souris axéniques induisait une augmentation de l'extraction énergétique des aliments ingérés supérieure à celle induite par le transfert d'un microbiote de souris minces. Chez l'homme obèse, il existe, dans le microbiote fécal, une proportion augmentée de *Firmicutes* et diminuée de *Bacteroidetes*, comparativement aux sujets minces et la perte de poids semble corrélée avec l'augmentation de la proportion de *Bacteroidetes*. Ces données récentes suggèrent donc un lien entre le microbiote intestinal et l'obésité (Backhed et al, 2005; Turnbaugh et al, 2006).

1.5.2 Microbiote intestinal et cancer

Dans le domaine du cancer, le microbiote intervient à deux niveaux : tout d'abord celui de la cancérogenèse elle-même. Un certain nombre de données permet en effet d'affirmer que certaines tumeurs sont liées à la présence de micro-organismes précis, ou encore d'une dysbiose au niveau intestinal. Par exemple, un déséquilibre du microbiote en faveur de certaines espèces (*fusobacterium*) augmenterait le risque de cancer colorectal ; la présence d'*Helicobacter pylori* favorise la survenue de cancer gastrique. Des données recueillies chez l'animal montrent encore une augmentation de l'incidence et de la sévérité de tumeurs mammaires chez des souris soumises à des régimes antibiotiques fréquents. Ces données sont corrélées à une étude épidémiologique dans laquelle les femmes jeunes ayant reçues en moyenne plus de deux antibiothérapies par an ont un risque de cancer du sein supérieur aux autres. Dans ce domaine toutefois, la difficulté est de discriminer le rôle du microbiote et celui d'autres facteurs de risque cancérogènes – tabac, alcool...- qui favorisent eux-mêmes une dysbiose.

Outre la cancérogenèse, l'efficacité des thérapies anticancéreuses serait aussi sous l'influence du microbiote. Il existerait une synergie d'action entre certains médicaments anticancéreux et la flore intestinale : on sait ainsi que l'efficacité du cyclophosphamide - couramment utilisé en oncologie - est influencée par le microbiote qui favorise la perméabilité intestinale

et la migration de bactéries immunogènes vers le système immunitaire tumoral. Elles provoqueraient une réponse immunitaire en synergie avec le médicament antitumoral.

L'immunothérapie, utilisée depuis peu dans le traitement du mélanome et des cancers bronchiques et rénaux, bénéficierait aussi d'un coup de pouce de la part des bactéries de type *Bacteroides*. Elles influenceraient la capacité du système immunitaire à résister naturellement au mélanome. Par ailleurs, l'efficacité d'un traitement anti-mélanome par ipilimumab est elle-même corrélée à la présence de l'une ou l'autre de deux espèces de bactéries de la famille *Bacteroides*.

D'autres thérapeutiques (sels de platine, nivolumab) et d'autres cibles cancéreuses pourraient répondre aux mêmes mécanismes. Les perspectives thérapeutiques sont nombreuses : l'analyse du microbiote pourrait devenir un test systématique avant la mise en œuvre d'un traitement, prédictif de la réponse thérapeutique. Si nécessaire, des traitements spécifiques du microbiote y seraient adjoints : des probiotiques connus pour être capables de booster les lymphocytes intratumoraux pourraient être associées au traitement conventionnel anticancéreux (**Rémy B et al, 2019**).

1.5.3 Microbiote intestinal et autisme

Des études préliminaires ont montré qu'il existait une forme de dysbiose chez les enfants autistes avec une diminution d'*Akkermansia muciniphila* et de *Bifidobacterium spp.* dans les selles de ces patients (**Wang et al, 2011**). Une autre étude récente a montré, sur des biopsies réalisées chez des enfants présentant un trouble autistique et souffrant de troubles gastro-intestinaux, une augmentation des phylotypes appartenant à la famille *Alcaligenaceae* et au genre *Sutterella*, particulièrement les espèces *S. wadsworthensis* et *S. stercoricanis* (**Williams et al, 2012**). Pour témoigner de l'influence des bactéries intestinales sur le comportement, l'administration de certains probiotiques a été étudiée. Par exemple, la consommation pendant 2 mois du probiotique *Lactobacillus casei* conduisait à une diminution de l'anxiété chez des patients atteints du syndrome de fatigue chronique (**Rao et al, 2009**). En 2013, un groupe de chercheurs américains a montré que, chez des souris avec

des troubles autistiques, l'intestin contenait moins de bactéries de l'espèce *Bacteroides fragilis* que chez les souris témoins. L'administration de cette souche bactérienne a permis une amélioration des troubles psychomoteurs liés à l'anxiété et une amélioration de la communication entre individus (Hsiao et al, 2013).

1.5.4 Microbiote intestinal et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

Comme la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, sont liées à une activation inappropriée du système immunitaire dans l'intestin. Derrière leur survenue se cachent des facteurs génétiques et environnementaux (alimentation, âge...). En parallèle, l'amélioration des symptômes de patients sous traitement antibiotique, ou encore la disparition de lésions inflammatoires intestinales chez des personnes dont la paroi intestinale n'est plus au contact des fèces (dérivation fécale), ont aussi permis de suspecter le rôle du microbiote.

Un déséquilibre du microbiote en espèces bactériennes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, tout comme la prédominance de certaines familles de bactéries (*Entérobactéries*, *Fusobactéries*), ou la raréfaction d'autres espèces (*Clostridia*, *Faecalibacterium*) ont été décrits chez des personnes atteintes de MICI. Pour l'heure, il n'est pas possible de savoir s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de ces maladies, ni de déterminer si la dysbiose à l'origine de la maladie est innée ou consécutive à un autre facteur environnemental (alimentation, médicament...). Une hypothèse séduisante est avancée : la dysbiose apparaîtrait sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux, mais jouerait elle-même un rôle dans l'initiation, le maintien ou la sévérité de l'inflammation, engendrant un cercle vicieux.

Par ailleurs, parmi les dizaines de gènes de prédisposition aux MICI aujourd'hui identifiés, certains jouent un rôle déterminant vis-à-vis du microbiote. La mutation du gène NOD2 est la plus fréquemment retrouvée chez les malades atteints par la maladie de Crohn : ce gène code pour un récepteur de l'immunité innée chargé de détecter un composant de la paroi bactérienne. Muté, il ne peut plus jouer ce rôle et favoriser le maintien de la barrière intestinale. D'autres mutations ont été rapportées, comme celle du gène ATG16L1, impliqué dans l'autographe des cellules immunitaires en présence des bactéries, ou comme celle

de MUC2, qui joue un rôle dans la synthèse du mucus intestinal.

Le microbiote constitue une cible thérapeutique de choix dans ces maladies inflammatoires. Jusqu'à présent, les premiers essais cliniques conduits avec des probiotiques ou des prébiotiques n'ont pas été concluants. Toutefois, de nouvelles études sont attendues, fondées sur une sélection plus rationnelle des micro-organismes ou composés à mettre en œuvre. Parallèlement, certaines équipes essayent de créer des probiotiques génétiquement modifiés qui permettraient d'implanter le micro-organisme d'intérêt tout en la dotant de propriétés supplémentaires, comme la sécrétion de médiateurs immunomodulateurs (Rémy B et al, 2019).

1.6 Les pistes de traitement utilisant le microbiote pour le traitement des pathologies intestinales

1.6.1 Le transfert de flore

Cette technique a montré des résultats encourageants en cas d'infections récurrentes par *Clostridium difficile* ou dans le traitement de troubles intestinaux après un traitement antibiotique (Dinh et al, 2015). Cependant, l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé préconise la limitation de la transplantation de flore fécale aux cas graves et pour lesquels, les traitements conventionnels n'ont pas d'effet. Récemment, des médecins néerlandais ont recensé les essais de transplantation de microbiote fécal dans différentes pathologies digestives. Il a été montré que dans les cas d'infections récidivantes à *C. difficile*, la transplantation de microbiote avait une efficacité de 90 %. Dans le cas de la rectocolite hémorragique (RCH), les résultats sont prometteurs puisqu'on observe jusqu'à 68 % de rémission après la transplantation. Dans le cas de la MC, de la constipation chronique et du syndrome de l'intestin irritable, les études sont encore trop limitées en termes de nombre de patients pour livrer des résultats interprétables (Rossen et al, 2015)

1.6.2 L'utilisation des probiotiques

Par définition, les probiotiques sont des microorganismes vivants, non pathogènes, qui lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, impactent positivement sur la santé de l'hôte. Les effets bénéfiques apportés par les probiotiques peuvent être : une normalisation de la perméabilité membranaire, un retour à un état de normobiose ou encore une régulation négative de la réponse intestinale pro-inflammatoire. Plusieurs études ont déjà montré l'efficacité des probiotiques dans le cadre des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : ainsi par exemple, la souche *E. coli* Nissle 1917 (**dénomination commerciale Mutaflor®**) présente une efficacité similaire à celle d'anti-inflammatoires de synthèse tels que la mésalazine dans le maintien en rémission de la RCH. À ce jour, les preuves de l'efficacité des probiotiques dans le maintien en rémission et de la prévention des rechutes en postopératoire dans les cas de MC, restent peu nombreuses et surtout contradictoires.

1.6.3 La recherche et l'utilisation de molécules d'origine bactérienne :

Dans la course à la recherche de traitement pour soulager et soigner les patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les chercheurs s'intéressent aux métabolites issus des bactéries composant le microbiote intestinal. Par exemple, la perte de *Faecalibacterium prausnitzii* associée au développement de la MC a suggéré un rôle anti-inflammatoire de cette bactérie. Cela a pu être vérifié in vitro sur des modèles cellulaires épithéliaux intestinaux et in vivo sur un modèle de colite murine (**Sokol et al, 2008**).

L'identification des composés bactériens responsables de cette activité anti-inflammatoire a fait l'objet de recherches approfondies. Un fractionnement bioguidé du surnageant de *F. prausnitzii* a permis d'attribuer l'activité anti-inflammatoire à une protéine bactérienne de 15 kDa, la protéine MAM et à 7 peptides issus de cette protéine (**Quevrain et al, 2016**). L'utilisation de cette protéine pourrait être envisagée comme traitement de l'inflammation intestinale ou comme marqueur de la dysbiose associée à la MC.

1.7 Les conséquences cliniques des perturbations dans l'établissement de la flore intestinale

Les conséquences cliniques de ces modifications de flore sont actuellement mal connues, mais ces modifications pourraient altérer les fonctions physiologiques de la flore,

entre autres l'effet barrière et la stimulation adéquate du système immunitaire intestinal .

1.7.1 Entérocolite ulcéro-nécrosante

L'altération de l'effet barrière, responsable de la résistance à la colonisation par des bactéries à potentialité pathogène et/ou multirésistantes aux antibiotiques, peut être responsable de l'augmentation de pathologies à point de départ digestif. Cette absence de flore de barrière efficace est surtout cruciale chez le grand prématuré, sujet plus sensible que le nouveau-né à terme aux infections et dont la colonisation intestinale par une flore commensale normale est extrêmement retardée (Gewolb IH et al, 1999 ; Butel MG et al, 2001). La colonisation à haut niveau par le genre Clostridium est ainsi favorisée, genre impliqué dans l'entérocolite ulcéro-nécrosante du nouveau-né (ECUN) (Butel MJ et al, 2001). La colonisation anormale du tube digestif du nouveau-né est reconnue comme un facteur de risque important dans la genèse de l'ECUN (Claud EC et al 2001).. Dans une étude récente, nous avons mis en évidence des différences de flore entre des prématurés ne souffrant d'aucun signe digestif (19 enfants) et des prématurés suspects d'ECUN (12 enfants) (Kapel N et al, 2003). Chez les prématurés suspects d'ECUN la colonisation par le genre Bifidobacterium a été significativement plus faible ($P = 0,04$) — aucun prématuré suspect d'ECUN n'étant colonisé par ce genre —, et le genre Clostridium significativement plus fréquemment dominant au sein de la flore anaérobie ($P = 0,02$). Une analyse de la flore par TTGE a confirmé la relation entre cette colonisation précoce par le genre Clostridium et la survenue d'ECUN (Cochetière MF et al, 2004). L'implication de ce genre bactérien dans la genèse des lésions digestives a été confirmée dans un modèle animal d'ECUN. (Butel MJ et al, 1998 ; Waligora-Dupriet AJ, 2005)

1.7.2 Allergie

Outre cet effet barrière, la flore et son établissement séquentiel sont maintenant reconnus avoir un rôle important dans le développement du système immunitaire intestinal (SII), immature à la naissance Moreau MC 2004 . En effet, la flore représente un stimulus important et un des premiers signaux pour la maturation postnatale du SII, jouant un rôle dans l'activation des lymphocytes T. Cette stimulation permet la mise en place de la réponse de type inducteur impliquée dans la protection vis-à-vis des pathogènes , mais aussi de type suppresseur pour le développement de la tolérance orale. De plus la composition de la flore

intervient vraisemblablement dans la stimulation des T helper (Th) afin d'établir un équilibre Th1/Th2/Treg, le nouveau-né naissant avec un profil Th2. Un déséquilibre dans ces sous-populations est un facteur de risque de maladie allergique ou de maladie inflammatoire chronique intestinale. Enfin, les cellules épithéliales intestinales, par l'intermédiaire de récepteurs comme les Toll Like Receptors (TLR), sont capables de réagir aux structures bactériennes, participant ainsi à la réponse immunitaire innée ou adaptative par l'envoi de signaux aux cellules immunitaires de la lamina propria.

Certaines études semblent montrer un lien entre l'établissement de la flore et le risque allergique. En effet, des différences quantitatives et qualitatives de la flore fécale entre des enfants allergiques et des enfants non allergiques ont été décrites par différentes équipes (**Björkstén B et al, 2001 ; Kalliomaki M, 2001 ; Watanabe S, 2003**). Ces différences portaient principalement sur le genre *Bifidobacterium* avec une colonisation de plus faible niveau chez les enfants allergiques. De plus, la répartition des espèces de bifidobactéries serait différente entre les 2 groupes avec une fréquence d'isolement plus faible des espèces *infantis*, *breve* et *bifidum* et plus élevée de l'espèce *adolescentis* chez les enfants allergiques (**Ouwehand AC et al, 2001**). Un retard de colonisation par le genre *Bifidobacterium* et par certaines espèces serait donc un facteur de risque de développer une affection allergique. Cependant, les bifidobactéries ne sont certainement pas les seules bactéries jouant un rôle dans la stimulation de l'immunité. Une corrélation entre la colonisation par le genre *Bacteroides* à un mois de vie et un pourcentage de cellules productrices d'IgA et d'IgM dans le sang périphérique plus élevé a été montrée (**Grönlund MM et al, 2000**). Le rôle de cette flore semble conforté par le fait que des études menées chez des enfants nés par césarienne (**Kero J et al, 2002 ; Laubereau B, 2004**), grands prématurés (**Agosti M et al, 2003**), ou nés de mères ayant reçu une antibiothérapie pendant la grossesse (**McKeever TM et al, 2002**), facteurs modifiant l'implantation de la flore, ont un risque plus élevé d'atopie.

1.8 Faut-il moduler la flore intestinale du nouveau-né ?

L'importance que revêt aujourd'hui l'établissement de la flore fait que les recherches actuelles portant sur l'amélioration des laits infantiles dans le but de favoriser l'implantation d'une flore physiologiquement bénéfique sont de plus en plus séduisantes. Différentes approches existent actuellement : l'ajout de bactéries probiotiques vivantes dans le lait ou au

cours de processus de fabrication, de prébiotiques, de bactéries non viables et de métabolites bactériens ou de nucléotides. Un rapport de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) a fait en 2003 le point sur l'utilisation de ces ingrédients dans les préparations lactées pour nourrissons .

1.8.1 Les probiotiques

Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, ont un bénéfice pour la santé de l'hôte (FAO/WHO) . De nombreuses études ont été conduites chez le nourrisson de plus de un mois, avec des probiotiques appartenant principalement aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Les effets bénéfiques recherchés ont été principalement une amélioration ou la prévention de la diarrhée, la réduction d'infections (infections respiratoires, urinaires, bactériémies) (Kullen MJ et al, 2005). Les effets concernant le traitement des diarrhées semblent relativement bien établis, mais sont fonction de la souche probiotique administrée (Szajewska Het al, 2006) . Les études documentant les effets sur d'autres infections gastro-intestinales sont peu nombreuses, cependant certains résultats préliminaires sont prometteurs, mais là encore sont souches dépendants (Kullen MJ et al, 2005). Une amélioration des symptômes d'eczéma atopique chez le jeune enfant a été observée par plusieurs auteurs (Kullen MJ et al, 2005). En revanche, lorsque le probiotique a été donné beaucoup plus tardivement (malades de 13 à 36 ans), aucun effet n'a été observé, suggérant de nouveau l'importance de la colonisation Initiale (Helin Tet al, 2002). Des essais d'intervention très précoces semblent donc intéressants. Un essai clinique contrôlé contre placebo a été réalisé en administrant une souche de *Lactobacillus GG* à la mère au cours du dernier mois de grossesse, administration poursuivie pendant 6 mois chez la mère après l'accouchement en cas d'allaitement ou au nouveau-né en cas d'alimentation avec un lait infantile. Le risque d'eczéma atopique a été diminué dans le groupe probiotique avec un recul de 2 ans (Kalliomaki Met al, 2001) et de 4 ans (Kalliomaki Met al, 2003) . De plus, une telle supplémentation a montré une augmentation significative du taux d'IgM, IgA et IgG chez des nouveau-nés allaités et supplémentés avec des probiotiques par rapport à un groupe placebo (Rinne M et al, 2005) . Cependant, si les probiotiques semblent prometteurs dans la prévention de l'allergie, ces effets doivent être confirmés. En dehors de cette étude, très peu de données sur les conséquences santé de l'administration d'un probiotique chez le nouveau-né ont été publiées

CHAPITRE 1 : Les premiers colonisateurs : Le développement de la flore intestinale dès la naissance

Cependant cette administration précoce pourrait favoriser l'acquisition d'une flore de barrière efficace et/ou la stimulation correcte de son système immunitaire. Des études de supplémentation par des souches de probiotiques ont fréquemment montré une augmentation de la colonisation par les bifidobactéries chez le nouveau-né à terme (**Langhendries JP, 1995 ; Uhlemann M, 1999**) comme chez le nouveau-né prématuré (**Millar M et al, 2003**) .

La recherche d'effets santé par la modulation de la flore apparaît particulièrement intéressante chez le nouveau-né prématuré, chez lequel l'établissement d'une flore aberrante est un fort risque d'infections digestives telles que l'ECUN. De plus, l'effet protecteur de l'administration de bifidobactéries a été montré dans 2 modèles animaux d'ECUN, relié à une diminution significative du niveau de colonisation des Clostridium (**Butel MJ et al, 1998**) ou des médiateurs de l'inflammation (**Caplan MS et al, 1999**) . Les probiotiques administrés chez le nouveau-né prématuré ont été dans la plupart des études donnés dès la première semaine de vie et étaient soit des souches appartenant au genre Bifidobacterium ou au genre Lactobacillus, soit des E. coli, soit une association de souches (**Millar Met al, 2003**) . Les effets étudiés ont été selon les études l'implantation de la flore, le développement de l'immunité, et la protection vis-à-vis de certaines infections. Aucune étude n'a relevé d'effet délétère lié à cette supplémentation. Lorsque la flore a été analysée, les prématurés ayant reçu le probiotique ont été plus fréquemment colonisés par des bifidobactéries ou des lactobacilles au cours de la supplémentation. Dans l'étude de Li et al., l'administration de B. breve chez des prématurés d'âge gestationnel moyen de 32,8 semaines a favorisé l'établissement d'une flore plus équilibrée et ce d'autant plus que la souche de probiotique était donnée précocement (**Li Yet al, 2004**) . Les effets sur l'immunité n'ont été étudiés que lors de la supplémentation avec E. coli, qui a été corrélée à une augmentation des IgA et IgM (**Cukrowska Bet al, 1917**) . Enfin, un des aspects intéressant est l'effet protecteur vis-à-vis de l'ECUN. Trois études ont observé une diminution significative de l'incidence de l'ECUN lors de l'administration de probiotiques : l'étude de Hoyos, dans laquelle la comparaison de l'effet des probiotiques a été faite par rapport à un groupe historique (**Hoyos AB et al, 1999**) et 2 études récentes contre placebo (**Bin- Nun A, 2005 ; Lin HC**) . Le probiotique administré a été dans ces 3 études une association de 2 ou 3 souches bactériennes contenant au moins une souche de bifidobactérie et une souche de lactobacille. Les 2 études contrôlées ont montré une diminution significative de l'incidence des ECUN (4 % versus 16,4 %, P = 0,03 (**Bin- Nun A, 2005**)), associée à une diminution de leur sévérité et des décès

(0 décès versus 6 décès, $P = 0,03$, dans la 1^{re} étude (Bin- Nun A, 2005) et 9 décès ou ECUN de sévérité ≥ 2 versus 24, $P = 0,009$, dans la 2^{ème} étude (Lin HC et al, 2005)). En revanche, l'administration d'une souche seule de Lactobacillus GG n'a pas eu d'effet protecteur vis-à-vis des infections urinaires, bactériémies et ECUN (Dani C et al, 2002) .

1.8.2 Les prébiotiques, les bactéries non viables et les métabolites bactériens

Un des risques de l'utilisation des bactéries vivantes est le risque de translocation bactérienne pouvant être responsable d'une infection. Jusqu'à présent, seules des infections liées aux souches probiotiques de Lactobacillus ont été décrites, cependant l'incidence en reste extrêmement rare et le plus souvent liée à des pathologies sous-jacentes comme le syndrome du grêle court ou une immunodépression (Land MH et al, 1995) . Le risque de translocation apparaît donc très faible, les souches utilisées étant des souches non pathogènes, mais il ne peut être totalement écarté, et ce d'autant plus que la perméabilité du tube digestif du nouveau-né et plus encore du prématuré est plus élevée dans les premiers mois de vie. L'utilisation d'autres stratégies que l'adjonction de souches vivantes pour moduler la flore intestinale du nouveau-né est donc intéressante.

Les prébiotiques sont des ingrédients alimentaires non digestibles capables de stimuler de façon sélective, au niveau colique, la croissance et/ou l'activité d'un nombre limité de bactéries susceptibles d'améliorer la physiologie de l'hôte (Gibson GR, 1995) . Par l'adjonction de prébiotique dans les formules infantiles, l'effet recherché est l'augmentation du nombre de bifidobactéries et de bactéries productrices d'acide lactique, bénéfiques pour l'hôte. Cette approche est intéressante car physiologique, se rapprochant de l'effet bifidogène du lait maternel par la présence d'oligosaccharides, prébiotiques naturels. Cependant la composition extrêmement complexe en oligosaccharides du lait maternel ne peut être reproduite industriellement. Ce sont donc des oligosaccharides synthétiques ou hémisynthétiques d'origine animale ou végétale qui sont utilisés. Leur propriété d'être non digestible les rapproche des oligosaccharides du lait maternel. Les prébiotiques les plus couramment utilisés sont des fructo-oligosaccharides (FOS) ou des galacto-oligosaccharides (GOS), correspondant à des unités répétées de fructose ou de galactose, respectivement. Ils sont non hydrolysables par les enzymes humaines et leur effet bifidogène a été démontré in vitro et in vivo. Un certain nombre d'études cliniques ont montré l'effet bifidogène de ces

formules infantiles. Contrairement aux formules infantiles contenant des probiotiques, la plupart des formules testées ont souvent été administrées dans les premières semaines de vie. Les prébiotiques ajoutés sont plus souvent un mélange de GOS et de FOS (rapport 9/1), afin de se rapprocher de l'équilibre du lait maternel entre les oligosaccharides acides et les oligosaccharides neutres (Boehm G, 2002 ; Knol J, 2005 ; Rinne MM, 2005) . Cette supplémentation favorise l'implantation d'une flore riche en bifidobactéries, se rapprochant de la flore des nouveau-nés allaités. En outre, les espèces stimulées seraient les même que celles retrouvées en flore dominante chez le nouveau-né allaité (Rinne MM, 2005 ; Haarman M et al, 2005) . Cet effet bifidogène apparaît dose dépendant (Moro G et al, 2002) . Une seule étude a utilisé un lait infantile ne contenant que du FOS (Euler AR et al, 2005) . Si l'augmentation des bifidobactéries n'a pas été significative dans le groupe FOS, ces nouveau-nés avaient un niveau de bifidobactéries supérieur au groupe des allaités. Enfin, les effets d'une formule supplémentée avec du FOS et du GOS ont été également été analysés chez des prématurés et comparés à une formule infantile standard et une alimentation à base de lait humain fortifié (Boehm G, 2002) . L'implantation des bifidobactéries a été similaire entre les enfants nourris avec la formule prébiotique et le lait maternel et significativement plus élevé qu'avec la formule standard. Cependant, il est important de noter que cette étude a été effectuée dans une population de prématurés colonisés précocement avec les bifidobactéries, ce qui n'est pas la description actuelle de la flore du prématuré en France. L'intérêt thérapeutique d'un prébiotique chez des prématurés colonisés très tardivement par les bifidobactéries reste à démontrer.

Des effets bénéfiques pourraient également être reliés à l'adjonction de bactéries non viables et de métabolites bactériens (Salminen S et al, 1999 ; Yazourh A, 2000). L'alimentation de nouveau-nés, nés à terme, de la naissance à 4 mois par une formule infantile (Calisma[®], Blédina, Villefranche sur Saône, France) dont le procédé de fermentation comporte une phase de fermentation par 2 souches, *B. breve* et *Streptococcus thermophilus*, a favorisé l'implantation d'une flore plus riche en bifidobactéries (Mullie C et al, 2004) . Cet effet bifidogène a été corrélé à l'augmentation de la production d'IgA spécifiques antipoliavirus après vaccination. L'utilisation de cette formule infantile a également été corrélée à la diminution de la sévérité des diarrhées chez des enfants âgés de 4 à 6 mois (Thibault H et al, 2004) . Le mécanisme d'action serait d'une part la production de

métabolites actifs au cours du processus de fabrication, d'autre part l'action directe des structures bactériennes (ADN bactérien, peptidoglycane) (Wang LS et al, 2001).

1.8.3 Les nucléotides

D'autres approches sont développées, comme l'adjonction de nucléotides. En effet, les nucléotides jouent un rôle clé dans de nombreux processus biologiques et des études menées chez l'homme et dans des modèles animaux suggèrent que les nucléotides d'origine alimentaire pourraient exercer des effets significatifs sur les systèmes immunitaires et gastro-intestinaux (Carver JD et al, 1999) . Les nucléotides représenteraient 2 à 5 % de l'azote non protéinique du lait de femme. Cet azote pourrait contribuer à une utilisation plus efficace des protéines par les nouveau-nés allaités, qui reçoivent une quantité relativement faible de protéines comparativement à ceux alimentés par une formule. Plusieurs études ont montré les effets bénéfiques d'une formule infantile supplémentée en nucléotides sur les épisodes diarrhéiques du nourrisson (Carver JD et al, 1999) . L'étude de Gil et al. a montré que l'ajout de nucléotides pouvait favoriser l'implantation d'une flore plus riche en bifidobactéries (Cosgrove M, 1998) , cependant ces résultats n'ont pas été confirmés (Balmer SE et al, 1994) . D'autres travaux ont montré également un effet sur la réponse immunitaire en modèle animal et chez le nourrisson.

CHAPITRE 2

Les Risques D'accouchement Par Césarienne

2.1 Césarienne : les risques à court terme.....	34
2 .2 Césarienne : les risques à long terme	35
2.3 Ces risques peuvent-ils être évités ?.....	37

CHAPITRE 2 : Les risques d'accouchement par césarienne

2.1 Césarienne : les risques à court terme

2.1.1 Pour le bébé

La détresse respiratoire transitoire, également connue sous le nom de tachypnée transitoire du nouveau-né, est le risque majeur auquel les bébés nés par césarienne sont exposés. Elle est liée à ce que l'on appelle un retard de résorption du liquide pulmonaire, explique, Le fœtus, dans le ventre de sa mère, inhale du liquide amniotique qui sert à maturer le poumon. Lors d'un accouchement par voie basse, le déclenchement d'un système hormonal pendant le travail et le passage du bébé dans la filière génitale de sa mère font que toute cette eau qui remplit le poumon sort. Tandis qu'en cas de césarienne, le bébé ne subit pas les contractions et risque ainsi de naître avec de l'eau dans les poumons. (**Amina Y,2019**)

Le traitement consiste en l'administration d'oxygène, qui permet généralement de guérir le nouveau-né sous 2 à 3 jours (**Arcangela L, 2019**).

2.1.2 Pour la mère

Pour la mère, les risques sont plus nombreux. Parmi les principaux :

- L'infection du site opératoire.
- La thrombose veineuse profonde qui peut se compliquer en embolie pulmonaire .
- L'hémorragie.

Cette dernière constitue d'ailleurs la première cause de mortalité pendant l'accouchement.

Chaque année en France, environ 80 femmes décèdent des suites de leur accouchement, dont 40 d'une hémorragie, précise la gynécologue. Quand le taux de césariennes d'un hôpital commence à augmenter, il augmente également le taux de décès maternels par cause d'hémorragie.

Tous ces risques sont liés à l'acte chirurgical en lui-même. Ils nécessitent des traitements spécifiques, voire une réintervention (©Haute Autorité de Santé).

2 .2 Césarienne : les risques à long terme

2.2.1 Pour le bébé

Actuellement, les scientifiques cherchent à savoir si la césarienne a des conséquences à long terme sur le bébé, qui ne seraient pas présentes chez les enfants nés par voie basse. Certaines études ont déjà mis en évidence des risques accrus d'obésité, d'asthme et d'allergies (**Huh SY, 2012 ; Thavagnanam S ; 2008 ; Bager P, 2008**).

Cette association serait dû au fait que l'enfant né par césarienne présente un déficit en colonisation du microbiote intestinal, indique (**Amina Y, 2019**). Ces bactéries du tube digestif jouent un rôle dans la digestion, l'immunité et ainsi potentiellement l'apparition de nombreuses maladies. Lors d'un accouchement par voie basse, le bébé, en passant par le vagin, est colonisé par le microbiote vaginal de sa mère et reçoit donc l'ensemble des micro-organismes nécessaires à son bon développement, ce qui ne serait pas le cas avec une césarienne.

Autres risques, cette fois d'ordre psychologique : des troubles de l'attachement. Plupart, après une césarienne la mère et l'enfant sont séparés, pour des raisons de surveillance maternelle notamment. Or, on sait que la séparation mère-bébé est très délétère pour la mise en œuvre de l'attachement du petit à sa mère,

(Amina **Y**, 2019), qui rappelle que l'instinct maternel n'existe pas : l'attachement d'un petit à sa mère ne relève pas de l'instinct, mais des apprentissages, et cela commence dès la naissance. Et plus vous séparez un nouveau-né précocement et longuement de sa mère, plus vous avez de risques d'entraver les processus d'attachement.

2.2.2 Pour la mère

Les deux risques principaux pour un futur accouchement par les voies naturelles après une césarienne sont l'échec d'un accouchement par les voies naturelles et la rupture utérine (déchirure de la cicatrice sur l'utérus) (©**Haute Autorité de Santé**). Ainsi, on estime qu'une femme sur deux ayant accouché par césarienne aura de nouveau une césarienne.

Or, c'est précisément le fait d'avoir recours plusieurs fois à cette pratique qui expose la femme à des complications chirurgicales, (Amina **Y**, 2019) en particulier le placenta accreta. Cette condition, causée par un accolement excessif du placenta à la cicatrice de l'utérus, peut avoir une conséquence fatale : l'hémorragie fœto-maternelle massive. Le passage d'hématies fœtales dans la circulation maternelle peut s'avérer mortel pour le bébé et la maman. Ce sont des complications rares mais redoutables, et plus les femmes ont des cicatrices sur leur utérus, plus elles sont fréquentes.

De la même façon que la césarienne peut entraîner des troubles de l'attachement chez le bébé, elle augmenterait également les risques de dépression post-partum et autres troubles psychologiques chez la maman, notamment lorsqu'elle est réalisée en urgence (Valentina **T**, 2019) 30% des femmes qui subissent des césariennes non programmées ont un syndrome de stress post-traumatique. Entre autres, leur caractère inattendu et la douleur occasionnée joueraient un rôle dans cette association.

2.3 Ces risques peuvent-ils être évités ?

Finalement, les séquelles d'un accouchement par césarienne sont trois fois plus lourdes que lors d'un accouchement par voie basse. Mais ces risques peuvent-ils être évités ? Concernant ceux liés à l'acte chirurgical, la Haute Autorité de Santé rappelle qu'un traitement anticoagulant (piqûre quotidienne) est instauré pendant la période de l'hospitalisation afin de réduire le risque de phlébite ou d'une embolie pulmonaire.

Des antibiotiques sont également administrés à la future mère afin de réduire le risque d'infection. « Nos techniques opératoires sont quand même relativement abouties. Je ne pense pas que l'on puisse davantage réduire ce chiffre, qui est déjà très bas » (**Amina Y, 2019**)

En revanche, selon la gynécologue, des efforts restent à faire pour éviter certaines conséquences psychologiques. Il y a un énorme travail à faire pour que les nouveau-nés restent près de leur mère après la naissance, y compris en salle de réveil. Cela suppose par exemple que les infirmiers ou les puéricultrices soient formés à surveiller un nouveau-né et soient suffisamment nombreux. Et les raisons pour lesquelles tout cela ne se fait pas, c'est un manque de moyens hospitaliers.

Rappelons toutefois que la césarienne est recommandée lorsque ses risques sont considérés inférieurs à ceux d'un accouchement naturel : Si une équipe médicale est dans la nécessité de faire une césarienne, c'est parce que la santé de la mère ou de l'enfant représente un tel danger qu'il y a moins de risques à faire une césarienne qu'un accouchement par voie basse.

Qu'en est-il des césariennes sur demande maternelle ? Exposent-elles à des risques inutiles ? Loin de là, selon la gynécologue. D'abord, parce qu'elles représentent moins d'1 % de la totalité des césariennes réalisées. Ensuite, parce que la plupart de ces césariennes

CHAPITRE 2 : les risques d'accouchement par césarienne

sont faites chez des patientes qui redoutent la douleur à la suite d'un événement traumatique, comme un viol, une césarienne précédente réalisée en urgence ou un accouchement extrêmement compliqué. Pour ces femmes, le recours à la césarienne s'avère donc nécessaire, malgré l'absence d'indication médicale à proprement parler (**Huh SY, 2012 ; Thavagnanam S ; 2008 ; Bager P, 2008**).

CHAPITRE 3

Les bactéries lactiques

3.1 Généralités.....	40
3.2 Habita.....	41
3.3 Taxonomie des bactéries.....	41
3.4 Les principaux genres des bactéries lactiques.....	43
3.5 Identification et typage des bactéries lactiques	49
3.6 Rôle et intérêts des bactéries lactiques.....	61
3.7 Innocuité.....	65

CHAPITRE 3 : Les bactéries lactiques

3.1 Généralités

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen en 1919, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène de microorganismes dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres (**Orla-Jensen, 1919**). Ce sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont à gram positif, en forme allongées ou sphériques, généralement immobiles, asporulées, acido-tolérantes et capables de croître à des températures entre 10°C et 45°C. Elles ne possèdent ni catalase (certaines souches possèdent une pseudocatalase), ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase. Elles sont en général aérotolérantes, cependant certaines espèces sont anaérobies strictes. En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux. Leur ADN présente un pourcentage en base Guanine/Cytosine (G+C) compris entre 30 et 60%. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les glucides fermentescibles, les acides gras, les acides aminés, les peptides, les vitamines et les sels (**Holzappel et al, 2001**).

Selon le type de fermentation utilisé, les bactéries lactiques sont dites : Homofermentaires (l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose); Hétérofermentaires (la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique et d'autres composés : éthanol, CO₂ et autres acides organiques) (**Vandamme et al, 1996; Wenjun et al, 2014**).

Les bactéries lactiques sont responsables de la fermentation des produits alimentaires. Elles améliorent la conservation, et agissent sur les textures et les saveurs des aliments. Elles sont utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et se voient attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Generally Regarded As Safe). Cependant, quelques membres du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* ainsi que d'autres

bactéries lactiques sont considérées comme pathogènes opportunistes (Drouault & Corthier, 2001).

3.2 Habitat

Les bactéries lactiques sont présentes dans de nombreux milieux naturels, allant du sol, des plantes en décomposition, aux animaux. Chez ces derniers, on les trouve dans les cavités buccales et vaginales, les fèces et le lait. Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques comme *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weissella*.

3.3 Taxonomie des bactéries lactiques

Depuis la description de *Bacterium Lactis* (actuellement *Lactococcus Lactis*) données par Lister en 1873, la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dix dernières années. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme nouveau genre (Axelsson, 2004; Pot, 2008).

Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques : la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, la configuration de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone. Les études basées sur l'analyse comparative du séquençage de l'ARN ribosomal 16S, cependant, ont montré que certains taxons générés sur la base des caractéristiques phénotypiques ne correspondent pas aux relations phylogénétiques suggérées. Ainsi, certaines espèces ne sont pas facilement distinguables par des caractéristiques phénotypiques. Ceci est particulièrement vrai pour les espèces *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus paracasei*, et certaines bifidobactéries dont

les souches ont été introduites dans de nombreux aliments probiotiques (**Holzappel et al, 2001**).

Par conséquent, les méthodes de typage moléculaire telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), la réaction de polymérisation en chaîne utilisant des éléments répétés (rep-PCR), ainsi que les Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) sont extrêmement précieux pour la caractérisation et la détection des bactéries lactiques (**Wood & Holzappel, 1995; Axelsson, 2004**).

La grande majorité des bactéries lactiques appartiennent au phylum des Firmicutes, classe des Bacilli, ordre des Lactobacillales. Dans cet ordre, les gènes orthologues couvrent en moyenne 86% de l'ensemble des génomes bactérien ; ce qui explique leur évolution. Elles sont caractérisées par un faible pourcentage de G+C dans leur ADN (< 55 mol%). Elles représentent six familles (*Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae et Streptococcaceae*), formées de plusieurs genres dont 15 seulement forment le groupe lactique (*Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Enterococcus, Oenococcus, Carnobacterium, Weissella, Aerococcus, Alloicoccus, Dolosigranulum, Globicatella, Tetragenococcus et Vagococcus*) (**Figure 2**) (**Holzappel et al, 2001**). Il faut noter que seulement les neuf premiers genres sont utilisés à grande échelle dans l'industrie alimentaire et sont répertoriés comme microorganismes « GRAS » (Generally Reegarded As Safe) (**Stiles & Holzappel, 1997**). Avec les travaux récents, de nouveaux genres ont également été décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec les groupes des bactéries lactiques (*Abiotrophia, Eremococcus, Facklamia, Ignavigranum, Alkalibacterium, Allofustis, Atopobacter, Atopococcus, Atopostipes, Bavariococcus, Desemzia, Dolosigranulum, Granulicatella, Isobaculum, Lacticigenium, Marinilactibacillus, Trichococcus, Lactosphaera, Catellicoccus, Melissococcus, Pilicacter, Paralactobacillus, Fructobacillus, Lactovum*) (**Holzappel & Wood, 2014**).

Les bactéries lactiques typiques ont une teneur molaire en Guanine et Cytosine dans leur ADN inférieure à 55 mol% alors que le genre *Bifidobacterium* a une teneur supérieure ou égale à 55 mol%. D'un point de vue phylogénétique, le genre *Bifidobacterium* appartient à la branche des *Actinomycètes* (qui comprend aussi *Propionibacterium et Brevibacterium*) et non au vrai groupe des bactéries lactiques. Cependant, en raison de son utilisation dans

l'alimentation et de son rôle probiotique dans le tractus Intestinal humain, le genre *Bifidobacterium* est souvent répertorié avec les bactéries lactiques (Figure 4) (Stiles & Holzapfel, 1997).

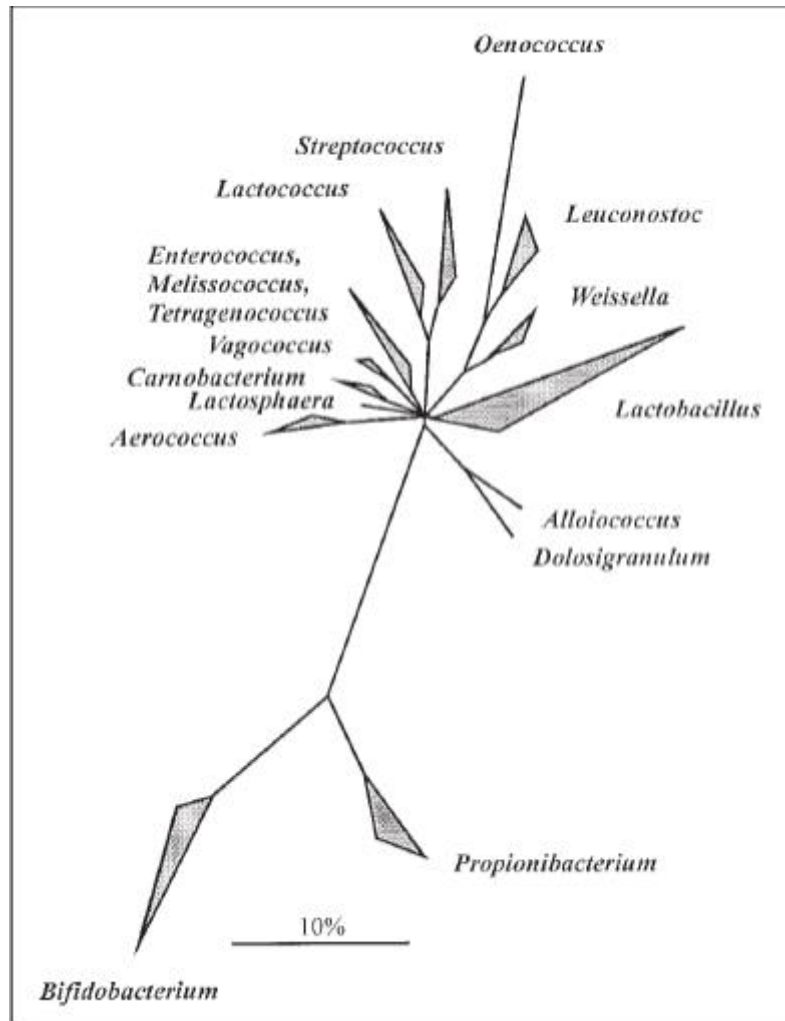


Figure 4 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et les genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S.

(Stiles & Holzapfel, 1997)

3.4 Les principaux genres de bactéries lactiques

3.4.1 Le genre *Lactobacillus*

Les *lactobacilles* sont des bactéries à Gram positif, microaérophiles se trouvant couramment dans une grande diversité environnementale, y compris les environnements laitiers riches en éléments nutritifs, les habitats microbiennes d'hôtes tels que les muqueuses humaines, ainsi que les niches écologiques naturels tels que les plantes et le sol. Le genre *Lactobacillus* appartient au phylum *Firmicutes*, la classe des *Bacilli*, et l'ordre des *Lactobacillales* (Barrangou et al., 2012).

La multiplicité des niches écologiques de lactobacilles se reflète dans la diversité et phylogénie hétérogène du genre. Le genre comprend plus de cent espèces différentes, parmi d'autres beaucoup d'entre eux sont caractérisé biologiquement, technologiquement et commercialement tels que : *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbruekii* *susp. Bulgaricus*, *L. plantrum*, *L. rhamnosus* et *L. sarivaruus* (Kleerebezem et Vaughan, 2009).

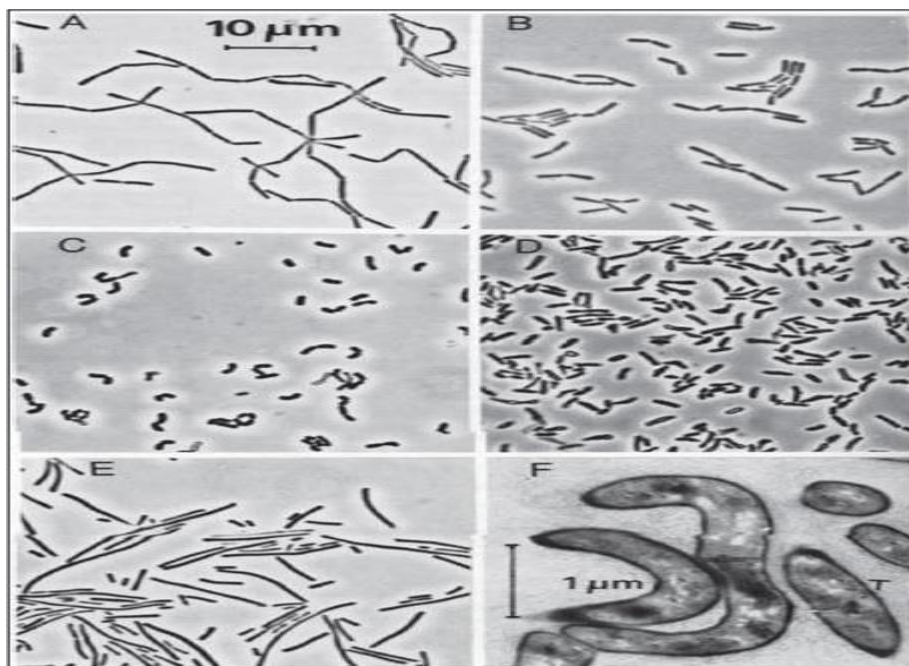


Figure 5 : Contraste de phase (A–E) et d'électron (F) des micrographies montrant les différentes morphologies cellulaires des *lactobacillus*.

A, *Lactobacillus gasseri*; *B*, *Lactobacillus agilis*; *C*, *Lactobacillus curvartus*; *D*, *Lactobacillus minor*; *E*, *Lactobacillus fermentum*; et *F*, involution de *Lactobacillus* dans une section mince de grain de kéfir.

(Vos et al, 2009)

Les *lactobacilles* forment une partie de la microflore naturelle des animaux hôtes et occupent diverses niches à l'intérieur de l'hôte, tels que le tractus gastro-intestinal, le tractus urogénital, la cavité buccale, et de la peau. Les *lactobacilles* sont présents dans les produits laitiers et sont particulièrement abondants dans les produits laitiers fermentés. En outre, les *lactobacilles* sont naturellement présents dans les plantes et le sol. *L. plantarum* a été signalée à être naturellement dominante survenant espèces bactériennes dans les légumes comme le chou et la laitue (Yang et al., 2010). Sa température optimale de croissance est le plus souvent comprise entre 30 et 40°C. L'écart de pH pour la croissance se situe entre 3 et 8. En générale, elles tolèrent l'oxygène mais se développent bien dans des conditions anaérobies. Elles produisent de l'acide lactique en tant que principale produit de fermentation à partir de sucre.

Les *lactobacilles* ont des propriétés assez importantes, commençant par l'activité protéolytique pour couvrir ces besoins de croissance. Les systèmes protéolytiques contribuent aux changements biochimiques se produisant au cours de la maturation des divers produits alimentaires laitiers et non laitiers fermentés, conduisant à la production de peptides bioactifs avec des effets immunologiques et sur la santé (Matar et al., 2001). Ils sont également responsables des propriétés organoleptiques des produits finis. Les propriétés fonctionnelles (corps, texture, fondre et extensibles). L'activité protéolytique des souches de *L. plantarum* peut avoir un rôle dans la préservation de la formation de toxine de *Clostridium botulinum* dans aliments réfrigérés (Skinner et al., 1999). La lipolyse aussi est éventuellement essentielle dans l'affinage du fromage, des acides gras libres sont en outre convertis en cétones méthyliques, des lactones, des thioesters... etc., contribuent, en plus des acides gras libres, de la saveur du produit fini. Les lipases / estérases des bactéries lactiques semblent être exclusivement intracellulaires (Castillo et al., 1999 ; Chich et al., 1997), avec l'activité remarquable la plus élevée chez *L. delberckii subsplactis* et *L. acidophilus* (ElSoda et al., 1986). Il se trouve qu'un large éventail de souches de *Lactobacillus* est couramment utilisé comme probiotiques en raison de leur fonction favorables à la santé inhérentes ont été proposées (Barrangou et al., 2012).

3.4.2 *Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus, Vagococcus*

Ces genres étaient précédemment inclus dans un seul genre : *Streptococcus*. Schleifer & Kilper-Balz (1987) ont proposé de subdiviser le genre *Streptococcus* en 4 genres. Il s'agit de *Streptococcus sensu stricto*, *Lactococcus*, *Vagococcus* et *Enterococcus* (Kilpper-Balz & Schleifer, 1987). Ce sont des coques en paires ou en chaînes, leur fermentation est homolactique. La présence dans leur enveloppe d'antigène spécifique a été d'une grande utilité dans leur identification et leur classification par groupes sérologiques de Lancefield (1933) (Lancefield, 1933; Vos et al, 2009).

3.4.2.1 Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre généralement divisé en trois groupes : pyrogène (la plupart des espèces sont pathogènes et hémolytiques « hémolyse β »), oral (à hémolyse α ou γ et pathogènes opportunistes, tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres streptocoques (Kilpper-Balz & Schleifer, 1987).

La seule espèce de *streptocoques* qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques », mais ensuite transférée au groupe des *streptocoques* oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Streptococcus salivarius* (Stiles & Holzappel, 1997).

Streptococcus thermophilus se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *St. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Figure 6) (Holzapfel & Wood, 2014).

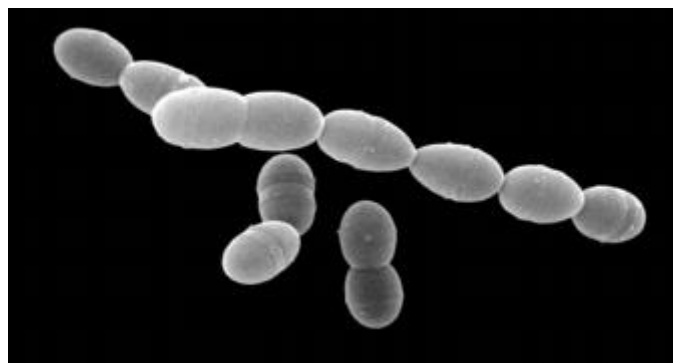


Figure 6 : Morphologie cellulaire de *Streptococcus thermophilus* observée par microscopie électronique. (Durso et Hutkins , 2003)

3.4.2.2 Le genre *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* comprend sept espèces (Batt, 2000). Morphologiquement les lactoques sont des coques à Gram positif de 0,5-1,5 μm , formant des chaînes courtes. Elles sont mésophiles, capables de fermenter les hexoses par voie homofermentaire, produisant de l'acide lactique L (+), et ont des exigences complexes pour sa croissance (Kim, 2014 ; Wright, 2012). Les Lactocoques ont été isolés à partir des végétaux (Cai et al., 2010 ; Carr et al 2002), du lait, ou à partir d'autres sources animales, y compris l'intestin humain (Kubota et al., 2010). La bactériocine découverte en 1927, nommée «Nisine» produite par *Lc. Lactis* est utilisée de façon courante comme additif alimentaire (E234) pour la conservation de certains aliments, dont celle de la viande. Elle est par ailleurs la seule bactériocine pouvant légalement être utilisée comme agent de conservation.

Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactis ssp. Lactis* (Figure 7), *Lc. lactis ssp. cremoris* et *Lc. lactis ssp. hordniae* (Pot, 2008)



Figure 7 : Morphologie cellulaire de *Lactococcus lactis subsp. lactis* observée par microscopie électronique.

(Neve et al, 1987).

3.4.2.3 Le genre *Enterococcus*

Les entérocoques sont des cocci ovoïdes à Gram positif se présentant isolées, en paires, en chaînes courtes ou elles peuvent être disposées en groupes en particulier si la morphologie des cellules est étudiée à partir des cultures cultivées sur un support solide. Les cellules sont souvent allongées dans la direction de la chaîne.

Le genre *Enterococcus* du groupe sérologique D de Lancefield, présente une hémolyse de type α , β , ou γ . Ces espèces peuvent se développer à 10°C et 45°C et en présence de 6,5% de NaCl. Ils sont présents dans le tube digestif de l'homme et des animaux et parmi eux certaines espèces sont pathogènes opportunistes. Schleifer & Kilpper-Bälz (1987) ont proposé de transférer certaines espèces du genre *Streptococcus* dans le nouveau genre : *Enterococcus*. Il s'agit de *Streptococcus faecalis*, et *Streptococcus faecium*, qui sont devenues ainsi *Enterococcus faecalis* (espèce type, **Figure 8**), et *Enterococcus faecium* (**Kilpper-Balz & Schleifer, 1987**).

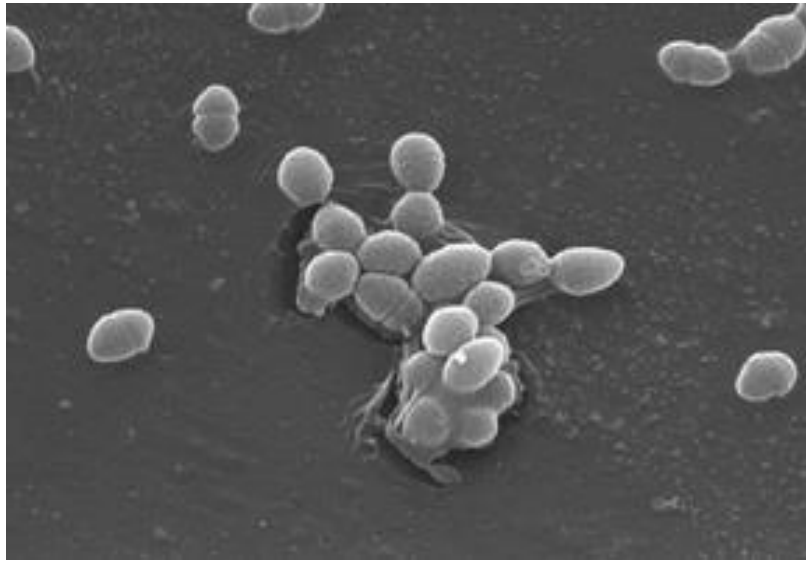


Figure 8: morphologie cellulaire d'*Enterococcus faecalis* observée par microscopie électronique.

(Schleifer & Kilpper-Bälz, 1984)

3.4.2.4 Le genre *Vagococcus*

Les espèces du nouveau genre *Vagococcus* sont facilement confondues avec les lactocoques au niveau morphologique, mais elles se distinguent principalement par leur composition en acides gras et leur mobilité grâce à la présence de flagelles péritriches (Collins et al, 1989; Holzappel & Wood, 2014).

3.5 Identification et typage des bactéries lactiques

La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique / biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes (Figure 9) (Holzapfel et al, 2001).

Ci-dessous, un aperçu concis des techniques les plus importantes utilisées pour la classification et l'identification des bactéries lactiques.

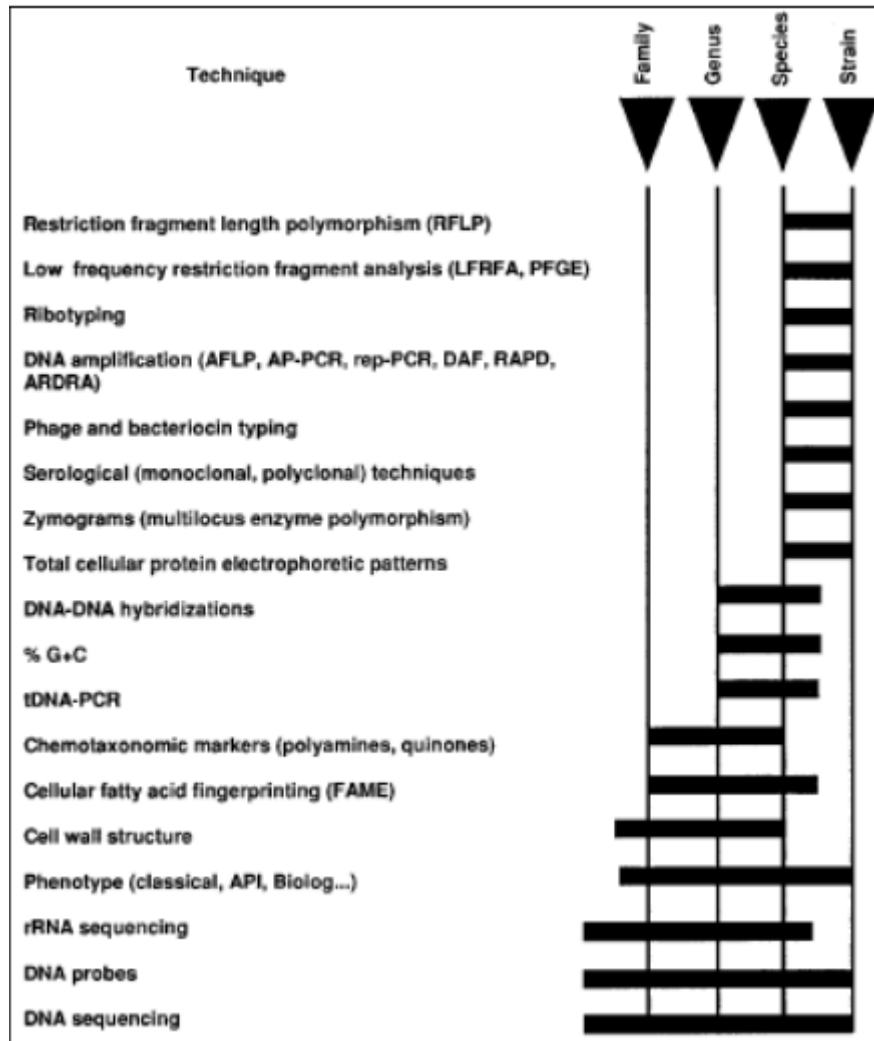


Figure 9 : Résolution des techniques de taxonomie utilisées.(Vandamme et al, 1996)

3.5.1. Méthodes phénotypiques

Les tests phénotypiques classiques reposent sur l'étude des caractéristiques morphologiques, physiologiques, biochimiques. Ils constituent la base de description et de différenciation des bactéries lactiques. L'étude morphologique comprend à la fois des caractéristiques cellulaires (forme, endospore, flagelles, corps d'inclusion, coloration de

Gram) et coloniales (couleur, dimensions, forme). Les méthodes physiologiques incluent, principalement, la croissance à certaines températures, à certaines concentrations de sel et sur gélose citratée. Les méthodes biochimiques ou métaboliques incluent, principalement, la production de gaz à partir de glucose, le profil d'hydrolyse des sucres, type d'hémolyse, l'hydrolyse de l'arginine et la détermination de la configuration de l'acide lactique (Axelsson, 2004).

Parmi les méthodes biochimiques utilisées, les microméthodes ont connu un développement important, avec la commercialisation de systèmes d'identification associant, pour un groupe bactérien donné, une galerie miniaturisée de tests biochimiques, et des documents ou des programmes informatiques permettant d'interpréter les résultats obtenus. La première galerie biochimique miniaturisée destinée à l'identification des bactéries lactiques a été la galerie API (Analytic Programme Index) 50 CHL, commercialisée en 1970 pour l'étude des souches du genre *Lactobacillus*, puis rapidement étendue à d'autres genres (*Leuconostoc* et *Lactococcus*). (Roissart & Luquet, 1994; Holzapfel & Wood, 2014).

L'analyse quantitative des marqueurs chimiotaxonomiques par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est également utilisée pour la caractérisation des bactéries lactiques ; comme la présence et le type de menaquinones, d'acide teichoïque et la composition des acides gras (Axelsson, 2004).

L'analyse sérologique suivant la méthode de Lancefield est basée sur l'utilisation des polysaccharides de l'enveloppe cellulaire en tant qu'antigènes. Certaines bactéries sont dépourvues d'antigène de groupe, dont *S. viridans*, et sont dites « non groupables » (Lancefield, 1933). Actuellement, l'utilisation de cette technique est devenue très rare à l'exception de l'identification des *streptocoques* pathogènes (Pot et al, 1994).

La comparaison des profils des protéines totales de la cellule obtenus par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), s'est révélée être extrêmement fiable pour l'identification au niveau de l'espèce voir même de la sous-espèce, à condition d'avoir une base de données des profils protéiques numérisés et normalisés de toutes les espèces connues de bactéries lactiques (Pot et al, 1994; Vandamme et al, 1996). Pour certaines espèces, le pouvoir discriminatoire de cette technique est limité, c'est le cas du complexe *Lactobacillus*

acidophilus, et les espèces *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* et *Lactobacillus paraplantarum* (Holzapfel & Wood, 2014).

3.5.2 Méthodes génotypiques

Les techniques basées sur l'analyse de l'ADN permettent une meilleure différenciation des micro-organismes à différents niveaux, allant du genre jusqu'à la souche en fonction des méthodes utilisées. En général, elles ont l'avantage sur les méthodes d'identification phénotypique de ne pas être influencées par les conditions de culture (Mohania et al, 2008).

3.5.2.1 Contenu en guanine et cytosine de l'ADN chromosomique

L'intérêt de la mesure du contenu en G+C (mol%) est lié à la grande diversité de la composition en guanine et en cytosine de l'ADN des microorganismes, puisqu'elle va de 25% pour *Mycoplasma capricolum* à 75% pour *Micococcus luteus* (Muto & Osawa, 1987). On ne peut conclure que deux isolats bactériens sont d'espèces différentes que si la différence de leur contenu G+C est d'au moins 5% ; toutefois, deux souches ayant le même G+C ne sont pas forcément semblables parce que cette valeur ne prend pas en compte l'arrangement linéaire des nucléotides dans l'ADN (Schleifer & Stackebrandt, 1983; Ammor, 2004).

3.5.2.2 Hybridation ADN-ADN

L'hybridation ADN-ADN repose sur la dénaturation de molécules d'ADN totaux appartenant à deux souches, puis à leur réappariement. La formation d'hétéroduplex (brin de chaque souche) sera gouvernée par le degré de ressemblance des deux génomes. Le pourcentage de réassociations hétérologues est ensuite calculé. La stabilité thermique est également un paramètre important car elle permet de mesurer le degré de mauvais réappariement au sein de l'hétéroduplex. Il est généralement admis qu'au-dessus de 70% d'homologie, deux souches font partie de la même espèce. Néanmoins, le niveau exact permettant d'affirmer que deux bactéries sont d'espèces différentes varie selon le genre bactérien (Stackebrandt & Goebel, 1994; Ammor, 2004).

3.5.2.3 Méthodes d'empreintes moléculaires (Fingerprinting)

Les méthodes impliquant le typage ADN ciblé de bactéries sont des outils puissants pour la détermination de la parenté inter-et intra-espèces. Ces méthodes étudient les génomes entiers (AFLP, RAPD, REP-PCR et PFGE), le gène ADNr 16S (ARDRA) ou les régions espaces intergéniques de l'ARNr 16S-23S (ITS). Les méthodes basées sur l'empreinte génomique totale ou partielle sont particulièrement recommandées pour examiner si les souches appartiennent à la même espèce. On considère que les souches présentant des motifs de bandes très similaires appartiennent à la même espèce, même s'il est parfois difficile d'interpréter des profils très similaires qui n'indiquent pas forcément des espèces différentes. A ce jour, une méthode de typage universelle et idéale n'a pas été trouvée. Chaque méthode présente ses avantages et ses inconvénients en ce qui concerne la facilité d'application, la reproductibilité, l'exigence d'équipement et le niveau de résolution. Une normalisation supplémentaire de ces techniques est nécessaire afin d'améliorer la reproductibilité entre les laboratoires avant que ces méthodes puissent être proposées comme des critères minimaux alternatifs équivalents à l'hybridation ADN-ADN (**Holzappel & Wood, 2014**).

3.5.2.3.1 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

L'AFLP est une méthode d'analyse hautement sensible utilisée fréquemment dans l'analyse de la diversité génétique. Elle combine les techniques RFLP et l'amplification du DNA par PCR. Cette technique a été signalée comme l'un des outils les plus reproductibles permettant de discriminer les souches au niveau de l'espèce et intra-spécifique (**Janssen et al, 1996**).

2.5.2.3.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (Random Amplified Polymorphic DNA ou RAPD) est une technique qui a été développée par Williams (1990) afin de construire des cartes génétiques. Le principe consiste à utiliser des amorces d'environ 10 paires de bases avec des températures d'appariement basses, 36°C (**Williams et al, 1990**) à 45°C (**Pravin, 2007**). Des appariements plus ou moins spécifiques ou des mésappariements permettent

l'amplification d'une série de fragments de tailles différentes. Les fragments obtenus dépendent de l'appariement des amorces et de la distance entre ces appariements (**De Wolf, 2004**). Le peu de matériel nécessaire à la RAPD en fait une technique de base. Particulièrement intéressante pour observer des variations de population même si la faible reproductibilité entre laboratoires est un sujet fréquent de critiques. La présence d'artéfacts a souvent été décrite, présence d'amplification dans le témoin négatif et variation entre analyses d'un même échantillon. Afin de contrôler les résultats obtenus, il convient de multiplier les essais en variant la quantité d'ADN de départ. En utilisant une concentration d'ADN suffisante sans être trop élevée (entre 10 et 100ng) et en standardisant au maximum le matériel comme la méthode (même polymérase, même cycleur, même manipulateur...), la reproductibilité de la manipulation peut être fortement améliorée (**Huybens et al, 2009**).

3.5.2.3.3 Repetitive extragenic palindromic-Polymerase Chain Reaction (rep-PCR)

Les séquences répétitives existent en multiples copies dans le génome de la plupart des bactéries Gram négatives et Gram positives (**Lupski & Weinstock, 1992**). Trois types de séquences répétitives ont été identifiés chez les bactéries : des séquences répétitives inversées REP (**Sharples & Lloyd, 1990**), des consensus entérobactériens à séquences répétitives intergéniques ERIC (**Hulton et al, 1991**) et les éléments BOX (**Versalovic et Lupski, 1998**). Ces séquences sont localisées en orientation inverse dans des zones distinctes sur le chromosome bactérien. Ces séquences paraissent hautement conservées chez les souches apparentées et très distinctes entre les différentes espèces ou genres bactériens (**Versalovic et al., 1991, 1992**). L'amplification sélective des régions existant entre ces séquences conservées génèrent des amplicons de tailles variables qui seront séparés par électrophorèse sur gel d'agarose ensuite comparés aux profils des souches de référence (**Heyndrickx et al., 2007**). Pour les bactéries lactiques l'amorce (GTG)₅ est considérée comme une très bonne approche pour le typage et l'identification des *Lactobacillus* et des *Enterococcus* (**Gevers et al. 2001 ; Svec et al. 2005**).

3.5.2.3.4 L'électrophorèse en champs pulsé de l'ADN chromosomique digéré (Puled Field Gel Electrophoresis)

Cette technique est souvent considérée comme la meilleure des méthodes de typage moléculaire, car elle a un pouvoir discriminatoire puissant et une plus grande reproductibilité (Tenover et al., 1995). Cependant, cette méthode assez laborieuse nécessite une approche spécifique à chaque espèce (différentes enzymes de restriction et conditions d'électrophorèse). Elle est donc principalement utilisée pour étudier la diversité intra-spécifique et vérifier l'origine des souches (clonalité) (McCartney, 2002).

3.5.2.3.5 Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)

L'ARDRA consiste, après amplification par PCR d'une partie de la séquence du gène de l'ADNr 16S, à analyser, après digestion enzymatique, les profils de restriction obtenus entre différents échantillons d'ADNr 16S. Cette méthodologie est, d'une façon générale et quel que soit le gène auquel elle est appliquée, appelée analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). En revanche, lorsqu'elle est appliquée à des ADN ribosomiaux (ADNr), on parle plutôt d'analyse de restriction d'ADN ribosomiaux amplifiés ou d'ARDRA (Moyer et al, 1994).

3.5.2.3.6 Les espaces intergéniques de l'ADN ribosomal (ITS)

Les espaces intergéniques de l'ADN ribosomal (Internally Transcribed Spacer ou ITS) sont des séquences très variables en taille et en composition dans l'opéron des trois ARNr (16S, 23S, 5S) (Figure 10). Le premier est le plus utilisé et il est présent entre l'extrémité 3' du 16S rDNA et l'extrémité 5' du 23S rDNA (Gonzalez et al, 2003). Sa taille varie de 400 à 1600 pb (Fisher & Triplett, 1999). Il peut contenir des séquences codantes pour des ARN de transfert ou aucune séquence codante (Boyer et al, 2001). Les régions conservées du gène 16S et 23S l'entourant permettent l'appariement des amorces universelles ou plus spécifiques et donc l'amplification de l'ITS. Tout comme le 16S rDNA, l'ITS peut être présent en multiples copies dans un même génome mais également variable d'une copie à l'autre sur le chromosome (Sadeghifard et al, 2006). L'analyse de l'espace intergénique de

l'ADN ribosomal (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis ou RISA) est le nom donné à l'étude par PCR puis électrophorèse de l'ITS (Nocker et al, 2007).

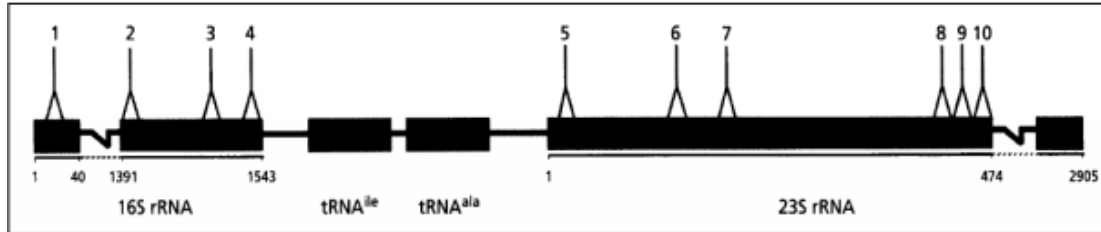


Figure 10 : Positions des régions conservées de l'opéron ribosomique 16S-23S chez *Escherichia coli*.

Les zones encadrées représentent les différents gènes de l'Opéron d'ARNr bactérien. Les lignes noires représentent la région ITS qui sépare les ARNr 16S et 23S. Cette région contient les gènes d'ARNt (ARNt^{Ile} et ARNt^{Ala}) (Gurtler & Stanisich, 1996).

3.5.2.4 Multilocus Sequence Typing (MLST)

Le principe du typage MLST est d'amplifier, puis de séquencer plusieurs séquences choisies dans des gènes de ménage (house keeping genes) codant pour des protéines essentielles, qui présentent des polymorphismes stables dans le temps. Les séquences des gènes étudiés sont donc relativement conservées entre les souches, mais elles présentent néanmoins un nombre limité mais suffisant de SNP (Single Nucleotide Polymorphism) pour distinguer les souches entre elles. En pratique, après séquençage, les polymorphismes de chacun des gènes sont répertoriés pour chaque souche, décrivant ainsi le génotype. Les haplotypes d'une souche sont ensuite associés pour former un génotype qui est donc la combinaison des différents haplotypes. Enfin, les génotypes de chaque souche sont comparés (Cassier, 2015).

3.5.2.5 Séquençage du gène qui code pour l'ARNr 16S

L'analyse microbienne mettant en oeuvre le séquençage du gène qui code pour l'ARN ribosomique (ARNr 16S) est une méthode couramment appliquée à l'étude phylogénétique et taxonomique des bactéries. Cette approche a été abordée pour la première fois par Carl

Woese au début des années 1980 (**Woese, 1987**). En effet, le gène codant l'ARNr 16S (ADNr 16S) présente différentes caractéristiques intéressantes. Il est l'un des gènes les mieux conservés parmi les organismes procaryotes. Il est composé de régions conservées permettant l'appariement d'amorces « universelles » et de 9 zones hypervariables (de V1 à V9) permettant la distinction de l'espèce. En plus, sa taille est suffisamment courte (~1500 pb) pour être analysée rapidement (**Huybens et al, 2009**).

Le séquençage direct de l'ADNr 16S est l'une des méthodes les plus puissantes pour l'identification en une seule étape d'une souche inconnue. Toutefois, il existe quelques limites (**Rossello-Mora & Amann, 2001; Vandamme et al, 1996**). A titre d'exemple certaines espèces qui sont différentes peuvent avoir les mêmes séquences de l'ADNr 16S et la fiabilité de certaines séquences hébergées dans la base de données peut être discutable (**Fox et al, 1992**). Un autre inconvénient à l'utilisation du gène 16S est son nombre variable de copies. En effet, certaines espèces peuvent posséder entre 1 et 15 opérons ribosomiques dans leur génome, ce qui ne permet pas une étude quantitative des espèces présentes dans la flore (**Fogel et al, 1999**).

De ce fait, de nombreuses études ont montré l'intérêt d'utiliser d'autres marqueurs que l'ADNr 16S pour affiner la classification de ces marqueurs, tels que les gènes *rpoB*, *argS* ou *leuS*, sont choisis pour leur propriété d'universalité dans les différents domaines connus du vivant, leur présence en copie unique dans le génome, et la présence de domaines conservés permettant de créer des amorces spécifiques pour l'amplification de ces gènes (**Almeida, 2013**).

3.5.2.6 Approches métagénomique

Les méthodes cultures dépendantes de caractérisation de flore microbienne ont permis de poser les grands principes de la microbiologie actuelle, de la classification des microorganismes au niveau phénotypique par utilisation de différents milieux sélectifs ou de microscopes optiques et électroniques, jusqu'à leur classification génotypique par le biais des méthodes de séquençage de leur ADN et ARN. Cependant, toutes ces méthodes nécessitent d'obtenir un isolat de ces organismes, en leur permettant de croître sur des milieux simplifiés de laboratoire. Malheureusement, la grande majorité des microorganismes de flores

complexes ne peuvent être isolées et cultivées facilement du fait de leur dépendance à des conditions très restrictives de vie : anaérobie, combinaison complexe de substrats pour la survie, symbiose avec un hôte, etc. Par exemple, seules 0,1% des cellules bactériennes océaniques ont pu être cultivées sur des milieux de laboratoires (**Connon & Giovannoni, 2002**). Pour la flore du sol, ce chiffre est de 1% des cellules bactériennes (**Kirk et al, 2004**), et environ 30% pour la flore bactérienne intestinale distale (**Qin et al, 2010**).

Après les années 1995, diverses études ont montré l'intérêt d'étudier les flores microbiennes par utilisation de méthodes cultures indépendantes appelées méthodes de Caractérisation métagénomique (**Amann et al, 1995**). Ces nouvelles stratégies de dénombrement d'espèces visent à caractériser le matériel génétique contenu dans un échantillon sans passer par des étapes d'isolement cellulaire (**Figure 11**) (**Almeida, 2013**). Ces approches, via le séquençage direct de l'ADN présent dans l'échantillon, permettent une description génomique du contenu de l'échantillon, mais aussi un aperçu du potentiel fonctionnel d'un environnement.

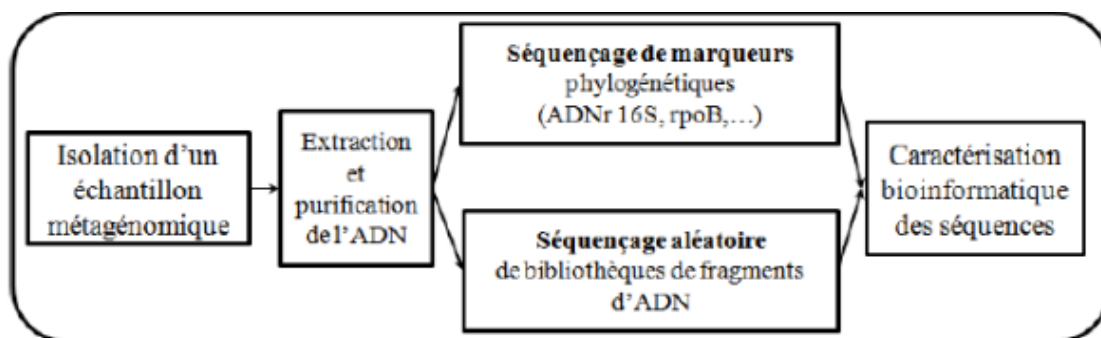


Figure 11 : Schéma représentant les étapes principales des méthodes de caractérisation dites culture indépendantes. (**Almeida, 2013**)

3.5.3 Méthodes phylogénétiques

3.5.3.1 Méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques

La phylogénie moléculaire permet de comprendre les relations de parenté, de retracer l'historique évolutif d'une espèce ou d'un groupe taxonomique supérieur des organismes. De nos jours, l'ADN et les séquences de protéines sont largement utilisés pour déduire la phylogénie des organismes. Les arbres phylogénétiques basés sur certains gènes marqueurs

permettent de schématiser et d'appréhender ces relations rapidement. Nous citons trois méthodes principales et différentes pour la reconstruction des arbres phylogénétiques: Distance (phénétique), Maximum de parcimonie, Maximum de Vraisemblance.

3.5.3.1.1 Méthodes de distance

Ce sont des méthodes de reconstruction d'arbre phylogénétique sans racine basée sur la recherche d'OTU (Operational Taxonomic Units, le plus souvent équivalent à une séquence). Ces méthodes sont rapides et bien adaptées aux séquences présentant un degré de Similarité élevé. Plusieurs méthodes ont été développées pour construire un arbre phylogénétique à partir d'une matrice de distance.

- UPGMA « Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean » : c'est une méthode très simple, basée sur le groupement des séquences les plus similaires, indépendamment de leur vitesse d'évolution et de leurs parentés phylogénétiques, sans déterminer d'ancêtre commun (**Goodfellow, 1971**). En règle générale, on lui préfère maintenant des méthodes plus avancées.

- la méthode de Neighbor-Joining (NJ), développée par Saitou et Nei (1987) (**Saitou & Nei, 1987**), est une amélioration de la précédente autorisant des différences de vitesse d'évolution entre branches. C'est actuellement la plus utilisée pour reconstruire des phylogénies par méthode de distance. Cette méthode a l'avantage d'être rapide et bien adaptée aux séquences présentant un degré de similarité élevé.

3.5.3.1.2 Méthode du maximum de vraisemblance ou « Maximum Likelihood-ML»

C'est une méthode dite de caractères, méthode probabiliste, qui permet d'appliquer les différents modèles d'évolution (par exemple le modèle de Kimura qui prend en compte la différence entre transition et transversion) et d'estimer l'ordre des branchements et la longueur des branches en fonction du changement évolutif. Plusieurs modèles existent pour affiner les reconstructions phylogénétiques et tester plusieurs paramètres (**Yang, 1996**). La

méthode de ML est considérée comme la plus fiable pour reconstruire l'histoire évolutive des séquences. Par contre, c'est une technique qui nécessite des temps de calcul très longs.

3.5.3.1.3 Méthodes de maximum de parcimonie

La méthode de parcimonie permet de construire des arbres de classification hiérarchique après enracinement qui permettent de refléter la structure de parenté d'un ensemble de taxons. Cette méthode utilise des algorithmes basés sur les caractères plutôt que de distances (**Land et Doig, 1960**). Plusieurs programmes utilisent la méthode de maximum de parcimonie pour la reconstruction d'un arbre, dont MEGA 6 (**Tamura et al, 2013**). Cette méthode est rapide en temps de calcul, mais moins précise que la méthode ML.

3.5.3.2 Fiabilité de l'arbre phylogénétique.

3.5.3.2.1 Evaluation statistique de la robustesse des arbres phylogénétiques

La robustesse des noeuds d'un arbre phylogénétique peut être évaluée par la technique de ré-échantillonnage grâce au test de "bootstrap". Cette méthode, introduite par Felsenstein (1985), est largement appliquée, avec beaucoup de succès (**Felsenstein, 1985**). Elle permet de ré-échantillonner les données introduites dans les programmes de calcul (rééchantillonnage des caractères) en construisant autant d'arbres qu'il y a eu de rééchantillonnages. Chaque ré-échantillonnage est un tirage au sort des caractères avec remise. Chaque réplication produit donc un nouvel alignement (pseudo-alignement) qui est utilisé pour construire un pseudo-arbre. Il faudra alors soumettre ces pseudo-arbres à un programme de construction d'arbre consensus. Celui-ci construira l'arbre le plus probable en allouant à chaque branche une valeur correspondant au nombre de pseudo-arbres présentant ce branchement parmi tous les pseudo-arbres construits. Une analyse de bootstrap peut être réalisée avec des approches de distance (1000 réplifications recommandées). Pour chaque branche interne on calcule le pourcentage des arbres "artificiels" contenant cette branche. Seules les branches avec un fort pourcentage (supérieur à 70%) sont considérées comme robustes (**Alauzet, 2009; Riah, 2014**).

3.5.3.2.2 Enracinement de l'arbre

Pour orienter et enraciner un arbre, la séquence choisie ne doit :

- ni être trop éloignée des autres données, pour ne pas induire des erreurs dans la topologie de l'arbre et pouvoir reconnaître les caractères ancestraux et dérivés,
- ni être trop proche des séquences pour représenter un vrai "outgroup". L'utilisation de plus d'un "outgroup" améliore en général l'évaluation de l'arbre.

3.6 Rôle et intérêts des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes utilisés par l'homme depuis fort longtemps, en raison de leurs propriétés métaboliques. Elles sont utilisées pour fermenter les aliments et ainsi, mieux les conserver. Réputées inoffensives pour l'homme, leur usage s'est largement répandu dans l'industrie agroalimentaire. Certaines souches ont même été envisagées pour le traitement de maladies humaines. En effet, le développement de nouvelles technologies de biologie cellulaire ouvre une perspective d'utilisation de ces bactéries comme agents biothérapeutiques (**Mofredj et al, 2007**).

3.6.1 Le domaine agroalimentaire

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation d'une grande variété de matières premières d'origines animale ou végétale, conduisant ainsi à de nouveaux produits comme les produits laitiers (laits fermentés, les fromages, les yaourts), la charcuterie (jambon, saucissons), les légumes fermentés (olives, cornichons, choucroute), les boissons alcooliques fermentées et le pain au levain (**Axelsson, 2004**). Le développement de l'industrie de transformation, en particulier de l'industrie laitière, a conduit à la production de ferments industriels capable d'assurer à la fois la qualité et la constance du produit (**Leveau & BOUIX, 1993**).

Le principal atout des bactéries lactiques réside donc dans leur capacité à acidifier les produits alimentaires. Le L-acide lactique, qui est le produit principal du métabolisme fermentaire, joue un rôle majeur dans la conservation des aliments puisqu'il inhibe fortement la croissance des bactéries pathogènes à bas pH. Outre la diminution du pH par la production des acides organiques, les bactéries lactiques produisent d'autres molécules antimicrobiennes comme le peroxyde d'oxygène, le dioxyde de carbone (produit par les bactéries lactiques hétérofermentaires) et les bactériocines (Stiles, 1996). Ces derniers sont définis comme des molécules de nature protéique ayant une activité bactéricide à spectre étroit dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice qui possède un mécanisme de protection spécifique. Les plus connues sont : la nisine, la diplococcine, l'acidophiline et la bulgaricane (**Dortu & Thonart, 2009**).

Pour les laits fermentés, l'acidification provoque la coagulation du lait et l'augmentation du caillé. De plus, la production d'exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important dans l'amélioration de la texture et la viscosité des produits laitiers (tels que les yaourts) (**Duboc & Mollet, 2001**).

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l'a-acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (**Bourgeois & Larpent, 1996**).

3.6.2 Le domaine médical

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du siècle, en 1907, par le russe Metchnikoff (**Marteau et al, 1990**). Selon lui, les lactobacilles pouvaient réduire la putréfaction intestinale, en modifiant la microflore intestinale, et ainsi prolonger la vie (**Drouault & Corthier, 2001**).

Depuis, un grand nombre d'études sur l'effet potentiel des bactéries lactiques sur la santé ont été publiées. Plus récemment, des études de type pharmaceutique ont été menées à grande échelle dans plusieurs laboratoires afin de démontrer l'effet bénéfique des bactéries lactiques sur la santé (**Elmer et al, 1996; Hitchins & McDonough, 1989; Vanderhoof & Young, 1998**). Seul un petit nombre de bactéries lactiques dont les genres bactériens sont *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *E. faecium* ainsi que les bifidobactéries a été ainsi étudié.

Les effets bénéfiques potentiels cités sont nombreux et variés. Certains sont maintenant bien établis tels que l'amélioration de la digestion du lactose et le traitement des désordres diarrhéiques, d'autres restent encore controversés tels que la diminution du cholestérol sérique ou encore la réduction de la formation de tumeurs (**Drouault & Corthier, 2001**).

Les bactéries lactiques pour lesquelles ces effets sont décrits sont appelées probiotiques. Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants, qui après ingestion, exercent des effets bénéfiques sur la santé allant au-delà des vertus nutritives inhérentes de l'aliment (**Fuller, 1989; Schaafsma, 1996**).

3.6.3 Utilisation des bactéries lactiques recombinantes

Les bactéries lactiques recombinantes (BLR) correspondent à des souches de bactéries lactiques modifiées génétiquement pour synthétiser une protéine hétérologue d'intérêt. Elles sont obtenues par l'introduction d'un vecteur d'expression plasmidique dans le cytoplasme bactérien : on parle de transformation bactérienne (**Gaide, 2013**).

Les BLR ont de très nombreuses applications :

3.6.3.1 Vaccination orale

Il est possible de vacciner des individus contre un antigène protéique, par administration d'une suspension contenant les bactéries lactiques recombinantes. Contrairement aux agents pathogènes atténués, qui peuvent potentiellement réacquérir leur pathogénicité, ces vecteurs bactériens sont inoffensifs (**Wells & Mercenier, 2008**). En plus

de leur facilité d'administration, la voie orale permet d'induire préférentiellement une immunité de type « muqueuse », qui confère aux sujets une protection spécifique au niveau du site d'entrée des agents pathogènes concernés, à titre préventif et curatif. Par exemple, l'administration intranasale de *L. lactis* exprimant la protéine E7 du virus responsable du cancer de col de l'utérus, le papillomavirus Humain de type 16 (HPV-16), confère aux souris une immunité protectrice et partiellement curative (**Bermudez-Humaran et al, 2005**).

3.6.3.2 Induction et restauration d'une tolérance immunitaire

Les vecteurs bactériens permettent de moduler certaines pathologies dys-immunitaires, par la production de molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10. In vitro, la co-incubation de *L. lactis* sécrétant de l'IL-10 et de cellules dendritiques stimule la production de lymphocytes T régulateurs (**Huibregtse et al, 2012**). In vivo, l'administration de souches de *L. lactis* coproduisant la proinsuline humaine et l'IL-10, à des modèles murins de diabète insulino-dépendant, restaure la tolérance à long terme vis-à-vis de la pro-insuline (**Takiishi et al, 2012**).

3.6.3.3 Production et transport de protéines d'intérêt

Les BLR permettent la production de protéines dont on souhaite étudier les fonctions ou les effets sur l'épithélium digestif. Administrées oralement, les BLR produisent les protéines d'intérêt et les libèrent in situ, dans la lumière digestive, par lyse bactérienne ou sécrétion. L'effet biologique étudié est ensuite déterminé (**Bermudez-Humaran, 2009**).

3.7 Innocuité

Les BL sont généralement reconnues comme étant sans danger par les autorités sanitaires (**Food & Drug Administration**). Elles sont à ce titre considérées comme des organismes Generally Regarded As Safe. Des effets indésirables sont toutefois rapportés sporadiquement dans la littérature, chez des individus dont l'état de santé était précaire et où les souches administrées se sont avérées opportunistes. Dans l'étude de Besselink et collaborateurs, l'administration d'un mélange de six souches probiotiques fut même associée à une augmentation du risque de mortalité par deux, chez des patients atteints de pancréatite aigüe (**Besselink et al, 2008**).

Partie II : Etude expérimental

CHAPITRE 4

Matériel et méthode

4.1	Problématique et objectifs.....	68
4.2	Echantillonnage.....	69
4.3	Isolement et purification des souches bactériennes.....	69
4.4	Caractérisation phénotypiques des souches bactériennes.....	73
4.5	Analyse statistique.....	74

4.1 Problématique et objectifs

Le microbiote intestinal humain joue un rôle déterminant dans la préservation de la santé de l'homme car il interfère de manière significative avec les systèmes métaboliques, cognitifs et immunitaires. Son établissement est une étape cruciale qui commence dès la naissance.

Le processus de colonisation microbienne est dynamique, il est influencé par plusieurs facteurs internes et externes qui auront probablement un effet sur la composition du microbiote ainsi que sur la santé de l'individu durant toute sa vie.

Ces dernières années, de nombreux chercheurs se sont penchés sur le thème du microbiote et les facteurs influençant son implantation. Car, en ayant des connaissances sur le microbiote à l'état sain, les scientifiques pourront établir de nouvelles méthodes thérapeutiques pour les maladies associées au déséquilibre de la flore intestinale.

Notre étude est en estimation la première à comparer les communautés bactériennes des selles des nourrissons nés par césarienne et ceux nés par voie basse de la population Algérienne. En ce sens, nous avons isolé et caractérisé des souches bactériennes à partir des selles de nourrissons.

Pour conclure, une analyse statistique a été effectuée pour mettre en relief la distribution des communautés bactériennes dans les selles, et pour déterminer l'impact de mode d'accouchement sur l'établissement du microbiote intestinal des jeunes enfants.

Diverses études ont mis l'accent sur l'effet de ces facteurs relatifs à la composition de la flore intestinale .

4.2 Echantillonnage

Des échantillons des selles des nouveau-nés allaités , ont été choisis pour réaliser des isolements de leurs flores microbiennes. Ils ont été recrutés dans différentes maternités : Sidi Bel Abbes / Sfisef

Les échantillons ont été collectés à partir d'un groupe de vingt nourrissons (moins de 24h). Les sujets sont d'origine algérienne. Neuf de ces nourrissons sont nés par voie basse, tandis que onze ont été accouchés par césarienne. Ils sont tous nés à terme et n'ont pas été sous antibiothérapie. Tous les participants étaient en bonne santé et sans aucun problème prénatal. Après l'accouchement, toutes les mamans ont été sous antibiotique pendant une semaine .

L'échantillonnage a été effectué dans des conditions stériles. Les échantillons de matières fécales ont été prélevés avec des écouvillons stériles. Les échantillons ont été conservés au frais jusqu'à leur livraison au laboratoire et immédiatement traités.

4.3 Isolement et purification des souches bactériennes

L'isolement et la purification des souches ainsi que les tests morphologiques ont été réalisés au laboratoire. Les souches ont été cultivées sur le milieu MRS (Man-Rogosa-Sharpe, Oxoid) supplémenté de 0.05 % de Cystéine-HCL et le milieu CBA (Columbia blood agar, Biomerieux). Les boîtes de Pétri gélosées ont été incubées à 37°C en condition d'anaérobie pendant 48-72 heures.

4.3.1 Milieux de culture

4.3.1.1 Milieu MRS (de Man-Rogosa-Sharpe)

Le milieu MRS (**De MAN et al, 1960**) est utilisé pour la culture et l'isolement des bactéries lactiques, en particulier les lactobacilles (**Annexe 1**). Utilisé sous forme liquide ou solide par l'ajout 1% (m/v) d'agar-agar.

4.3.1.2 Milieu CBA (Columbia blood agar)

La gélose Columbia au sang (5%) (**Ellner et al, 1966**) est un milieu très nutritif permettant la culture et isolement d'une grande variété de microorganismes et plus particulièrement des genres très exigeants tels que streptocoques (**Annexe 1**).

Ce milieu permet d'apprécier l'hémolyse qu'effectuent certaines bactéries. Les bactéries capables de détruire complètement les globules rouges (β -hémolytiques) formeront des colonies entourées d'une zone claire facilement visible sur la gélose rouge; si l'hémolyse est incomplète (α -hémolytique), la zone d'hémolyse sera moins claire et verdâtre.

4.3.2 Dénombrement des bactéries lactiques

Le dénombrement des bactéries lactiques a été effectué sur le milieu MRS/CBA. La solution mère a été préparée en prélevant 1 g de matières fécales de chaque échantillon qui a été ajouté à 9 ml d'eau physiologique stérile. A partir de cette solution mère, des dilutions sériées allant de 10^{-1} à 10^{-10} pour les selles ont été effectuées. 0,1 ml a été prélevé de chaque dilution choisie et étalé dans 3 boîtes de Pétri du milieu MRS/CBA. Ensuite, les boîtes ont été incubées à 37°C en condition d'aérobiose pendant 48-72 heures (**figure 12**). Les colonies ont été comptées pour chaque dilution pour déterminer le nombre d'UFC/g en utilisant la formule suivante :

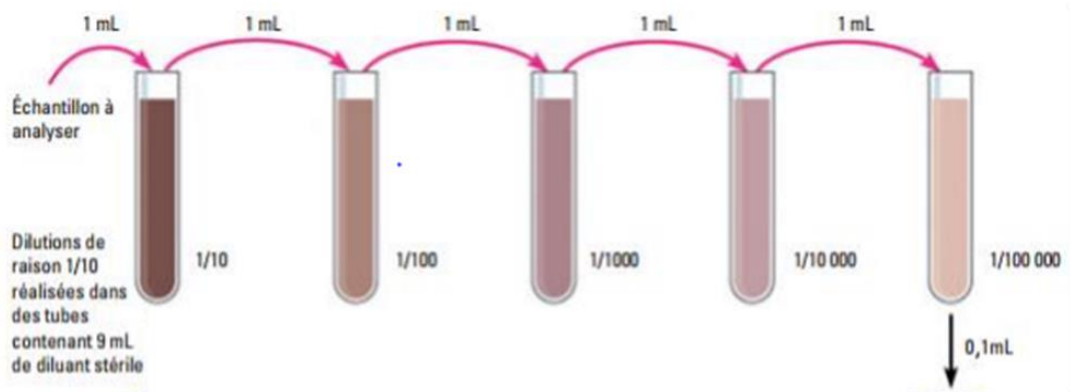
Calcul de la concentration bactérienne N en UFC par g de produit :

$$N = \text{nombre de colonies} \times 1/V_e \times 1/D$$

UFC : Unités formant colonies

V_e : le volume d'ensemencement

D : la dilution prise en compte.



0,1ml transféré et ensemencé profondément
dans les milieux MRS/CBA



Incubation à 37°C pendant 48-72 heures



Les colonies



Figure 12 : Schéma illustrant le dénombrement des bactéries en milieu solide

4.3.3 Purification

Les colonies isolées sont repiquées de façon alternée sur milieu liquide et solide jusqu'à purification (**Figure 13**). La pureté des souches est vérifiée par l'observation macroscopique ; l'aspect des colonies (forme, couleur, taille) et l'aspect caractéristique de la culture des bactéries lactiques en milieu liquide. Mais la pureté des cellules doit être impérativement contrôlée par observation microscopique ; la forme des cellules qui doit être identique dans toute la lame ainsi que le Gram.

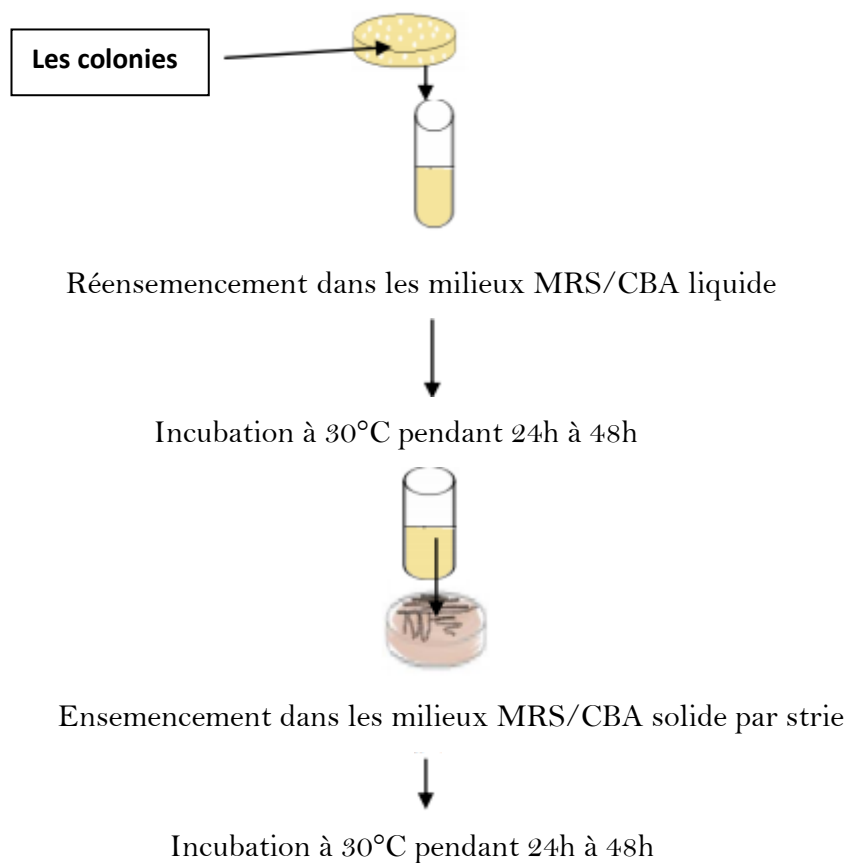


Figure 13 : Schéma illustrant la purification des bactéries en milieu solide /liquide

4.4 Caractérisation phénotypiques des souches bactériennes

4.4.1 Etude morphologique

L'étude de la morphologie bactérienne est le premier acte effectué pour identification des bactéries. L'observation de la morphologie bactérienne permet une orientation préliminaire du diagnostic.

4.4.1.1 Caractérisation macroscopique

Ce test permet en première étape de voir la morphologie des colonies obtenues sur gélose (taille, couleur, forme et l'aspect).

4.4.1.2 Caractérisation microscopique

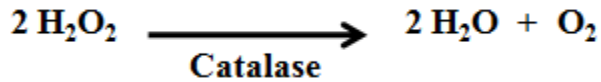
Un frottis destiné à la coloration de Gram est préparé à partir d'une colonie bien isolée. Une fois réalisé, il est observé au microscope optique (**Annexe 2**).

La coloration de Gram permet de classer les bactéries en deux grandes catégories : les bactéries Gram positif qui garde leur coloration violette après décoloration par l'alcool et les bactéries Gram négatif décolorées par l'alcool, sont teintées par la fuchsine et apparaissent roses. Ceci permet aussi, la mise en évidence de la morphologie des cellules et le mode de regroupement (**Coico, 2001**). Les bactéries lactiques fixent le violet de gentiane, elles sont Gram positif et donc donnent une couleur violette.

4.4.2 Etude biochimique

4.4.2.1. Test catalase

La catalase est mise en évidence en émulsionnant la colonie bactérienne à tester sur une lame, dans l'eau oxygénée (H₂O₂) à 10 volumes. La présence d'une catalase, enzyme capable de dégrader l'eau oxygénée, se manifeste par l'apparition des bulles d'oxygène abondantes dans l'émulsion (**Stiles & Holzapfel, 1997**). La réaction biochimique réalisée est la suivante :



Les bactéries lactiques sont catalase négatives

4.4.2.2 Test oxydase

Test de détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries Gram négative qui produisent cette enzyme, telles que *Neisseria* ou *Pseudomonas*. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif le « N-Diméthyl Paraphénylène Diamine ». L'activité oxydase a été déterminée selon le protocole décrit par (Kovacs, 1956).

Ce test consiste à déposer une colonie pure sur un papier Watman imbibé de réactif d'oxydase. Le développement d'une couleur bleue signifie que le test est positif et que l'isolat possède l'enzyme oxydase. Les bactéries lactiques sont oxydase négatives.

4.5 Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été faites par l'utilisation du logiciel SPSS 20 d'IBM. Le test de Khi-deux a été retenu, d'une part, pour comparer la distribution des genres bactériens dans les selles des nourrissons nés par césarienne et ceux nés par voie basse, d'autre part, pour étudier l'indépendance entre différents facteurs et la prévalence des genres bactériens dans ces deux milieux.

La valeur p représente le degré de signification qui correspond à la probabilité qu'un résultat d'une étude épidémiologique puisse être attribué au seul hasard. Si l'effectif théorique sous une catégorie est inférieur à 5 le test exact de Fisher remplace le test de Khi-deux. Le test a été considéré comme étant significatif si P-valeur < 0,05. Toutes les données sont décrites en nombre (n) et pourcentage (%).

CHAPITRE 5

Résultats et discussion

5.1 Résultats.....77

Résultats

Vue l'état de santé majeur que passe le monde à cause de la pandémie Covid-19, la réalisation de notre étude été interrompue et de ce fait aucun résultat n'est présenté

CHAPITRE 6

Conclusion

6.1 Conclusion	79
6.2 Références bibliographiques.....	80
6.3 Annexes.....	96

Conclusion

Le développement de l'homme, dans la santé et la maladie, va de pair avec le développement de son microbiote. Comprendre les facteurs qui influent sur les changements de composition et de fonction des communautés bactériennes aidera à concevoir des thérapies qui ciblent le microbiote intestinal en tant qu'organe humain. Cet objectif est difficile en raison de la grande diversité d'espèces, des variations interindividuelles et des fluctuations temporelles de la composition, en particulier au cours de son implantation.

La composition et les variations des microbiotes sains ainsi que la dynamique d'installation des communautés pendant l'enfance et les modifications physiologiques durant la vie sont des connaissances indispensables pour comprendre le rôle du microbiote dans l'état de maladie.

Dans la présente étude, nous avons caractérisé certaines espèces appartenant aux selles nourrissons allaités.

Pour compléter notre étude, il faudra effectuer des analyses complémentaires, telle que les méthodes moléculaire pour la caractérisation des isolats au niveau de la souche. afin de connaître si les selles des bèbè nès par cècarienne et ceux nés par voie basse partagent les mêmes souches.

Pour comparer la flore intestinale selon les différents modes d'accouchement nous suggérons d'augmenter le nombre d'échantillons pour de meilleurs résultats.

A notre connaissance, il s'agit de la première étude à comparer la flore de matière fécale chez les nourrissons nés par voie basse et césarienne de la population algérienne.

Ainsi, nous proposons d'effectuer d'autres études pour explorer d'autres genres tels que les bifidobactéries et de caractériser les isolats au niveau de la souche. Cela pourrait confirmer ou infirmer nos résultats sur le rôle de différents facteurs étudiés dans l'établissement de la flore intestinale des nouveau-nés.

Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J (2014) The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine* 6: 237ra265

AFSSA . Rapport du groupe de travail « Alimentation infantile et modification de la flore intestinale »,2003

Agosti M , Vegni C , Gangi S , Benedetti V, Marini A. Allergic manifestations in very low-birthweight infants : a 6-year follow-up. *Acta Paediatr Suppl* 2003 ; 91 : 44-7.

Alauzet C (2009) Taxonomie des bactéries anaérobies : De la reclassification à la découverte de nouveaux pathogènes. Ph.D. Thesis, Ecole Doctorale Biologie Sante et Environnement, Nancy 1, Nancy, France

Almeida M (2013) Caractérisation de flores microbiennes intestinale humaine et fromagère par méthode de métagénomique quantitative. Doctorat Thesis, Ecole doctorale Gènes Génomes Cellules, Université Paris Sud XI Orsay, Paris

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews* 59: 143-169

Amina Yamgnane gynécologue-obstétricienne et chef de service de la maternité de l'Hôpital Américain de Paris - Interview.

Annick, 2004 ; Bernalier et Dore ; 2008 ; Marieb et al.,2014

Arcangela Lattari Balast, MD, University of Pittsurgh, School of Medicine Dernière révision totale oct . 2019_ Dernière modification du contenu oct 2019

Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov, II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K (2011) Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* 331: 337-341

Axelsson L (2004) Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Salminen S, Von Wright A, Ouwehand A (eds), 1, p 656. New York: Marcel Dekker

Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307: 1915-1920

Bager P, Wohlfahrt J, Westergaard T. Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: meta-analyses. *Clin Exp Allergy*. 2008 Apr;38(4):634-42. doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.02939.x. Epub 2008 Feb 11

Balmer SE, Hanvey LS, Wharton BA. Diet and faecal flora in the newborn : nucleotides. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1994 ; 70 : F137-F140.

Batt C.A. 2000. Lactococcus introduction. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, Eds. Academic press, San Diego.1164-1166

Beaugerie L, Sokol H (2014) Les fondamentaux de la digestive, CDU-HGE edn. France: Elsevier-Masson.

Bermudez-Humaran LG (2009) lactis as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins. *Human vaccines* 5: 264-267

Barrangou R., Lahtinen S.J., Ibrahim F et Ouwehand A.C. 2012. Genus *Lactibacillus*, Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects, Fourth edition. Taylor et Francis Group.13: 77-91. Bermudez-Humaran LG, Cortes-Perez NG, Lefevre F, Guimaraes V, Rabot S, AlcocerGonzalez JM, Gratadoux JJ, Rodriguez-Padilla C, Tamez-Guerra RS, Corthier G, Gruss A, Langella P (2005) A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J Immunol* 175: 7297-7302

Besselink MG, van Santvoort HC, Buskens E, Boermeester MA, van Goor H, Timmerman HM, Nieuwenhuijs VB, Bollen TL, van Ramshorst B, Witteman BJ, Rosman C, Ploeg RJ, Brink MA, Schaapherder AF, Dejong CH, Wahab PJ, van Laarhoven CJ, van der Harst E, van Eijck CH, Cuesta MA, Akkermans LM, Gooszen HG (2008) [Probiotic prophylaxis in patients with predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebocontrolled trial]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* 152: 685-696

Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C (2010) Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early human development* 86 Suppl 1: 13-15

Bin-Nun A, Bromiker R, Wilschanski M, Kaplan M, Rudensky B, Caplan M, et al. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *J Pediatr* 2005 ; 147 : 192-6

Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2001 ; 108 : 516-20.

Boehm G, Lidestri M, Casetta P, Jelinek J, Negretti F, Stahl B, et al. Supplementation of a bovine milk formula with an oligosaccharide mixture increases counts of faecal bifidobacteria in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2002 ; 86 : F178-F181.

Bourgeois CM, Larpent JP (1996) *Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires*, Paris : Tec & Doc , Lavosier .

Boyer SL, Flechtner VR, Johansen JR (2001) the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics population genetics? A case study in cyanobacteria. *Molecular biology and evolution* 18: 1057-1069

Butel MJ. La flore du prématuré. In : Dupont C, Gauthier F, Goulet O, Moktari Vodovar, M, eds. *L'intestin du prématuré*. Noisiel : Guigoz Éditions, 2001 : 111-42

Butel MJ, Roland N, Hibert A, Popot F, Favre A, Tessèdre AC, et al. Clostridial pathogenicity in experimental necrotising enterocolitis in gnotobiotic quails and protective role of bifidobacteria. *J Med Microbiol* 1998 ; 47 : 391-9.

Références Bibliographiques

Cahill RJ, Tan S, Dougan G, O'Gaora P, Pickard D, Kennea N, Sullivan MH, Feldman RG, Edwards AD (2005) Universal DNA primers amplify bacterial DNA from human fetal membranes and link *Fusobacterium nucleatum* with prolonged preterm membrane rupture. *Molecular human reproduction* 11: 761-766

Cai H., Thompson R., Budinich M.F., Broadbent J.R et Steele J. 2009. Genome sequence and comparative genome analysis of *Lactobacillus casei*: insights into their niche-associated evolution. *Genome Biol. Evol.* 14:239-57.

Campeotto F, Waligora-Dupriet AJ, Doucet-Populaire F, Kalach N, Dupont C, Butel MJ (2007) [Establishment of the intestinal microflora in neonates]. *Gastroenterologie clinique et Références bibliographiques* 109 biologique 31: 533-542

Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, Russell T, Lickerman M, Amer M, et al. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology* 1999 ; 117 : 577-83.

Carver JD. Dietary nucleotides : effects on the immune and gastrointestinal systems. *Acta Paediatr Suppl* 1999 ; 430 : 83-8.

Castilo I., Requena T., Fernandez P., Fontecha J et Gobetti M. 1999. Isolation and characterisation of an intracellular esterase from *Lactobacillus casei* subsp .*casei*. IFPL731. *J.Appl.Microbiol.* 8:653-9.logie, Université Claude Bernard - Lyon I, France

Chelo IM, Ze-Ze L, Tenreiro R (2007) Congruence of evolutionary relationships inside the *Leuconostoc-Oenococcus-Weissella* clade assessed by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, *dnaA*, *gyrB*, *rpoC* and *dnaK*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 57: 276-286

Christl SU, Murgatroyd PR, Gibson GR, Cummings JH (1992) Production, metabolism, and excretion of hydrogen in the large intestine. *Gastroenterology* 102: 1269-1277

Claud EC, Walker WA. Hypothesis : inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *FASEB J* 2001 ; 15 : 1398-403.

Cochetière MF, Piloquet H, Des Robert C, Darmaun D, Galmiche JP, Rozé JC. Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants : the putative role of *Clostridium*. *Pediatr Res* 2004 ; 56 : 1-5.

Coico R (2001) Gram staining. *Current protocols in immunology* Appendix 3: Appendix 30

Références Bibliographiques

Collins MD, Ash C, Farrow JA, Wallbanks S, Williams AM (1989) 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. *The Journal of applied bacteriology* 67: 453-460

Collins MD, Williams AM, Wallbanks S (1990) The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS microbiology letters* 58: 255-262

Connon SA, Giovannoni SJ (2002) High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Applied and environmental microbiology* 68: 3878-3885

Cosgrove M. Nucleotides. *Nutrition* 1998 ; 14 : 748-51

Cukrowska B, Lodinova-Zadnikova R, Enders C, Sonnenborn U, Schulze J, Tlaskalova-Hogenova H. Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scand J Immunol* 2002 ; 55 : 204-9.

Dani C, Biadaioli R, Bertini G, Martelli E, Rubaltelli FF. Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. A prospective double-blind study. *Biol Neonate* 2002 ; 82 : 103-8.

De La Cochetière MF, Piloquet H, Des Robert C, Darmaun D, Galmiche JP, Rozé JC. Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants : the putative role of *Clostridium*. *Pediatr Res* 2004 ; 56 : 1-5.

De MAN JC, ROGOSA M, ELISABETH SHARPE M A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of applied Bacteriology* 23: 130-135

De Wolf HB, R. Backeljau, T. (2004) The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutation Research Reviews in Mutation Research* 566: 249-262

Dinh A, Bouchand F, Le Monnier A (2015) [Current treatment and epidemiology of *Clostridium difficile* infections]. *La Revue de medecine interne* 36: 596-602

Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R (2010) 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: 11971-11975

Dortu C, Thonart P (2009) Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *biotechnol agron soc env* 13: 143- 154

Références Bibliographiques

Dridi SM, Ejeil AL, Gamgne Guiadem C, Lallam-Laroye C (2008) Spontaneous premature births and periodontal diseases : the debate continues ! *Revue d'Odonto-Stomatologie* 37: 19- 42

Drouault S, Corthier G (2001) Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research, BioMed Central* 32 101-117

Duboc P, Mollet B (2001) Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int Dairy J* 11: 759-768

Durso L ., & Hutkins R ., 2003 : starter culture. University of Nebraska, Lincol, NE, USA. Elsevier Science Ltd , PP :5583-5593

Ellner PD, Stoessel CJ, Drakeford E, Vasi F (1966) A new culture medium for medical bacteriology. *Technical bulletin of the Registry of Medical Technologists* 36: 58-60

Elmer GW, Surawicz CM, McFarland LV (1996) Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *Jama* 275: 870-876

El soda M., El Wahad H.A., Ezzat N., Desmazeaud M.J et Ismail A. 1986. The esterolytic and lipolytic activities of the lactobacilli 2. Detection of esterase system of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Le lait* 66: 431-43.

Euler AR, Mitchell DK, Kline R, Pickering LK. Prebiotic effect of fructo-oligosaccharide supplemented term infant formula at two concentrations compared with unsupplemented formula and human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005 ; 40 : 157-64.

Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, Aguilera M, Khanna S, Gil A, Edwards CA, Dore J (2010) Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 51: 77-84

FAO/WHO. Health and nutrition properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Administration of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report.

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791

Fisher MM, Triplett EW (1999) Automated approach for riosomal intergenic spacer analysis of microiol diversity and its application to freshater acterial communities . *Applied and eviromental microbiology* 65: 4630-4636

Fogel GB, Collins CR, Li J, Brunk CF (1999) Prokaryotic Genome Size and SSU rDNA Copy Number:

Références Bibliographiques

- Estimation of Microbial Relative Abundance from a Mixed Population. *Microbial ecology* 38: 93-113
- Forchielli ML, Walker WA. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr* 2005 ; 93 (Suppl) : S41-S48.
- Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P, Jr. (1992) How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity *Int J Syst Bacteriol* 42: 166-170
- Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology* 66: 365- 378
- Funkhouser LJ, Bordenstein SR (2013) Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS biology* 11: e1001631
- Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lecuyer E, , Mulder I, Lan A, Bridonneau C, Rochet V, Pisi A, De Paepe M, Brandi G, Eberl G, Snel J, Kelly D, Cerf-Bensussan N (2009) The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 31: 677-689
- Gaïde N (2013) Intérêts et limites de l'utilisation bactéries lactiques recombinantes dans le traitement de la maladie coeliaque Ph.D. Thesis, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est Créteil Val de Marne, Paris
- Cahiers de Nutrition et de Diététique* 42: 28-36
- Gérard P, Bernalier-Donadille A (2007) Les fonctions du microbiote intestinal
- Gewolb IH, Schwalbe RS, Taciak VL, Harrison TS, Panigrahi P. Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999 ; 80 : F167-F173.
- Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota : introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995 ; 125 : 1401-12.
- Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW (2000) Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 342: 1500-1507
- Gonzalez N, Romero J, Espejo RT (2003) Comprehensive detection of bacterial populations by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer region. *Journal of microbiological methods* 55: 91-97
- Goodfellow M (1971) Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *Journal of general microbiology* 69: 33-80
- Grönlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral in early infancy : a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000 ; 83 : F186-F192.
- Gurtler V, Stanisich VA (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142 (Pt 1): 3-16
- Guediche MN (1990) Colonisation Bactérienne du Nouveau-né et Infection. *Médecine du Maghreb* 2
- Haarman M, Knol J. Quantitative real-time assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol* 2005 ; 71 : 2318-24
- Hammes WP, Hertel C (2006) The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *Prokaryote* 4: 320- 403

Haute Autorité de Santé (HAS) est une institution publique indépendante chargée d'améliorer la qualité et la sécurité des soins 2013

Références Bibliographiques

Helin T, Haahtela S, Haahtela T. No effect of oral treatment with an intestinal bacterial strain, *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103), on birch-pollen allergy : a placebo-controlled double-blind study. *Allergy* 2002 ; 57 : 243-6.

Hillier SL, Martius J, Krohn M, Kiviat N, Holmes KK, Eschenbach DA (1988) A case-control study of chorioamnionic infection and histologic chorioamnionitis in prematurity. *N Engl J Med* 319: 972-978

Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Bjorkroth J, Schillinger U (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition* 73: 365S-373S

Holzapfel WH, Wood BJB (2014) *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*: John Wiley & Sons.

Hoogkamp-Korstanje JA, Lindner JG, Marcelis JH, den Daas-Slagt H, de Vos NM (1979) Composition and ecology of the human intestinal flora. *Antonie van Leeuwenhoek* 45: 35-40

Hooper LV, Gordon JI (2001) Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292: 1115-1118

Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI (2002) How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual review of nutrition* 22: 283-307

Hoyos AB. Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit. *Int J Infect Dis* 1999 ; 3 : 197-202.

Huh SY, Rifas-Shiman SL, Zera CA, et al Delivery by caesarean section and risk of obesity in preschool age children: a prospective cohort study *Archives of Disease in Childhood* 2012;97:610-616.

Huibregtse IL, Zaat SA, Kapsenberg ML, Sartori da Silva MA, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ, Braat H (2012) Genetically Modified *Lactococcus lactis* for Delivery of Human Interleukin-10 to Dendritic Cells. *Gastroenterology research and practice* 2012: 639291

Hulton CS, Higgins CF, Sharp PM (1991) ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular microbiology* 5: 825-834

Huybens N, Mainil J, Marlier D (2009) Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. *Annales de Médecine Vétérinaire* 153: 112-128

Références Bibliographiques

- Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M, Kersters K (1996) Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 142 (Pt 7): 1881-1893
- Jimenez E, de Andres J, Manrique M, Pareja-Tobes P, Tobes R, Martinez-Blanch JF, Codoner FM, Ramon D, Fernandez L, Rodriguez JM (2015) Metagenomic Analysis of Milk of Healthy and Mastitis-Suffering Women. *Journal of human lactation : official journal of International Lactation Consultant Association* 31: 406-415
- Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* 2001 ; 107 : 129-34.
- Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease : a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001 ; 357 : 1076-9.
- Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease : 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003 ; 361 : 1869-71.
- Kapel N, Campeotto F, Waligora-Dupriet AJ, Bui C, Dupont C, Voyer M, et al. Calprotectin levels in feces as a non invasive marker of neonatal necrotising enterocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003 ; 36 : 556 (abstract P093).
- Kero J, Gissler M, Gronlund MM, Kero P, Koskinen P, Hemminki E, et al. Mode of delivery and asthma - is there a connection ? *Pediatr Res* 2002 ; 52 : 6-11.
- KH. Schleifer ; R. Kilpper-Balz (1984) "*Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the genus Enterococcus nom. rev. as Enterococcus faecalis comb. nov. and Enterococcus faecium comb. nov.*". *Int. J. Sys. Bacteriol.* 34: 31-34.
- Kilpper-Balz R, Schleifer KH (1987) *Streptococcus suis* sp. nov., nom. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37: 160-162
- Kim. 2014. *The genus Lactococcus, Lactic acid bacteria. Biodiversity and taxonomy.* John Wiley et Sons Ltd. 430-443.
- Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of microbiological methods* 58: 169- 188
- Kleerebezem M et Vaughan E.E. 2009. Probiotic and and gut lactobacilli and bifidobactéria: Molecular approaches to study diversity and activity. *Annu. Rev Microbiol.* 63: 269-290.
- Knol J, Scholtens P, Kafka C, Steenbakkers J, Gro S, Helm K, et al. Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides : more like breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005 ; 40 : 36-42.
- Kovacs N (1956) Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* 178: 703
- Kubota H., Tsuji K., Matsuda K., Kurakawa T., Asahara T et Nojimoto K. 2010. Detection of human intestinal catalase negative Gram positif cocci by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 5440-5451
- Kullen MJ, Bettler J. The delivery of probiotics and prebiotics infants. *Curr Pharm Des* 2005 ; 11 :

Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Gionchetti P, Rizzello F, Caramelli E, et al. Effects of probiotic bacteria DNA : IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *Fems Immunol Med Microbiol* 2003 ; 38 : 165-72.

Lancefield RC (1933) A Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic Streptococci. *The Journal of experimental medicine* 57: 571-595

Landman C, Quevrain E (2016) [Gut microbiota: Description, role and pathophysiologic implications]. *La Revue de medecine interne* 37: 418-423

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

Langhendries JP, Detry J, van Hees J, Lamboray JM, Darimont J, Mozin MJ, et al. Effect of a fermented infant formula containing viable bifidobacteria on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. *J Pediat Gastroenterol Nutr* 1995 ; 21 : 177-81.

Laubereau B, Filipiak-Pittroff B, von BA, Grubl A, Reinhardt D, Wichmann HE, et al. Caesarean section and gastrointestinal symptoms, atopic dermatitis, and sensitisation during the first year of life. *Arch Dis Child* 2004 ; 89 : 993-7.

Leveau JY, BOUIX M (1993) *Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel*, Paris: Tec et Doc Lavoisier

Lichtenstein GR, Olson A, Travers S, Diamond RH, Chen DM, Pritchard ML, Feagan BG, Cohen RD, Salzberg BA, Hanauer SB, Sandborn WJ (2006) Factors associated with the development of intestinal strictures or obstructions in patients with Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology* 101: 1030-1038

Lin HC, Su BH, Chen AC, Lin TW, Tsai CH, Yeh TF, et al. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2005 ; 115 : 1-4.

Li Y, Shimizu T, Hosaka A, Kaneko N, Ohtsuka Y, Yamashiro Y. Effects of *Bifidobacterium breve* supplementation on intestinal flora of low birth weight infants. *Pediatr Int* 2004 ; 46 : 509-15.

Lupski JR, Weinstock GM (1992) Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of bacteriology* 174: 4525-4529

Macpherson AJ, Harris NL (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature reviews Immunology* 4: 478-485 Mackie et al., 1999 ; Campeotto et al., 2007

Makino H, Martin R, Ishikawa E, Gawad A, Kubota H, Sakai T, Oishi K, Tanaka R, BenAmor K, Knol J, Kushiro A (2015) Multilocus sequence typing of bifidobacterial strains from infant's faeces

Références Bibliographiques

and human milk: are bifidobacteria being sustainably shared during breastfeeding? Beneficial microbes: 1-10
Macones GA, Parry S, Nelson DB, Strauss JF, Ludmir J, Cohen AW, Stamilio DM, Appleby D, Clothier B, Sammel MD, Jeffcoat M (2010) Treatment of localized periodontal disease in pregnancy does not reduce the occurrence of preterm birth: results from the Periodontal Infections and Prematurity Study (PIPS). *American journal of obstetrics and gynecology* 202: 147 e141-148

Marteau P, Flourie B, Pochart P, Chastang C, Desjeux JF, Rambaud JC (1990) Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. *The British journal of nutrition* 64: 71-79

Martin R, Makino H, Cetinyurek Yavuz A, Ben-Amor K, Roelofs M, Ishikawa E, Kubota H, Swinkels S, Sakai T, Oishi K, Kushiro A, Knol J (2016) Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. *PloS one* 11: e0158498

Matar C., Valdez M., Medina M., Rachid M and Perdigon G. 2001. Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non proteolytic variant. *J. Dairy Res.* 68 (4):601-609.

Mathew JL (2004) Effect of maternal antibiotics on breast feeding infants. *Postgraduate medical journal* 80: 196-200

McKeever TM, Lewis SA, Smith C, Hubbard R The importance of prenatal exposures on the development of allergic disease : a birth cohort study using the West Midlands General Practice Database. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 ; 166 : 827-32.

Millar M, Wilks M, Costeloe K. Probiotics for preterm infants ? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003 ; 88 : F354-F358

Mofredj A, Bahloul H, Chanut C (2007) [Lactococcus lactis: an opportunistic bacterium?]. *Medicine et maladies infectieuses* 37: 200-207

Mohania D, Nagpal R, Kumar M, Bhardwaj A, Yadav M, Jain S, Marotta F, Singh V, Parkash O, Yadav H (2008) Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of digestive diseases* 9: 190-198

Moreau MC. Influence de la microbiologie intestinale sur l'immunité de l'hôte : conditions physiologiques. In : Rambaud JC, Buts JP, Corthier G, Flourié B, eds. *Flore microbienne intestinale*. Montrouge : John Libbey Eurotext, 2004 : 131-49.

Références Bibliographiques

Moro G, Minoli I, Mosca M, Fanaro S, Jelinek J, Stahl B, et al. Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002 ; 34 : 291-5.

Moyer CL, Dobbs FC, Karl DM (1994) Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Applied and environmental microbiology* 60: 871-879

Mullie C, Yazourh A, Thibault H, Odou MF, Singer E, Kalach N, et al. Increased poliovirus-specific intestinal antibody response coincides with promotion of *Bifidobacterium longum-infantis* and *Bifidobacterium breve* in infants : a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatr Res* 2004 ; 56 : 791-5.

Muto A, Osawa S (1987) The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 166-169

Neve H, Geis A, Teuber M (1987) Conjugation, a common plasmid transfer mechanism in lactic acid streptococci of dairy starter cultures. *Systematic and applied microbiology* 9: 151- 157

Nocker A, Burr M, Camper AK (2007) Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial ecology* 54: 276-289

Nowrouzian F, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard IL, Aberg N, Wold AE, Adlerberth I (2003) *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatric research* 54: 8-14

Offenbacher S, Beck JD, Jared HL, Mauriello SM, Mendoza LC, Couper DJ, Stewart DD, Murtha AP, Cochran DL, Dudley DJ, Reddy MS, Geurs NC, Hauth JC (2009) Effects of periodontal therapy on rate of preterm delivery: a randomized controlled trial. *Obstetrics and gynecology* 114: 551-559

Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, McKaig R, Beck J (1996) Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *Journal of periodontology* 67: 1103-1113

Orla-Jensen S (1919) *The lactic acid bacteria*, Copenhagen: Andr. Fred. Host & Son

Ouwehand AC, Isolauri E, He F, Hashimoto H, Benno Y, Salminen S. Differences in *Bifidobacterium* flora composition in allergic and healthy infants. *J Allergy Clin Immunol* 2001 ; 108 : 144-5.

Références Bibliographiques

Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE (2006) Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118: 511-521

Pot B (2008) The taxonomy of lactic acid bacteria. In *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.), Tec & Doc edn, pp 1-106. Paris: Lavoisier

Pot B, Ludwig W, Kersters K, Schleifer KH (1994) Taxonomy of Lactic Acid Bacteria. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*, De Vuyst L, vandamme EJ (eds), 2, pp 13-90. New York: Chapman & Hall

Pravin DA, K. Purohit, H.J. (2007) Impact of bioaugmentation with a consortium of bacteria on the remediation of wastewatercontaining hydrocarbons. *Environ Sci Pollut Res Int* 14: 7- 11

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, Ehrlich SD (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59-65

Quevrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, Miquel S, Carlier L, Bermudez-Humaran LG, Pigneur B, Lequin O, Kharrat P, Thomas G, Rainteau D, Aubry C, Breyner N, Afonso C, Lavielle S, Grill JP, Chassaing G, Chatel JM, Trugnan G, Xavier R, Langella P, Sokol H, Seksik P (2016) Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 65: 415-425

Rao AV, Bested AC, Beaulne TM, Katzman MA, Iorio C, Berardi JM, Logan AC (2009) A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. *Gut pathogens* 1: 6

Rémy Burcelin (unité Inserm 1048 /université de Toulouse Paul Sabatier, Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires, hôpital Rangueil, Toulouse), Laurence Zitvogel (unité Inserm 1015 /Université Paris Sud, "Immunologie des tumeurs et immunothérapie contre le cancer", Institut Gustave-Roussy, Villejuif), Guillaume Fond (unité Inserm 955 /Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne, Fondation FondaMental, Institut Mondor de recherche biomédicale, hôpital Mondor, Créteil) et Harry Sokol (unité Inserm 1157 /CNRS/UPMC, "Micro-organismes, molécules bioactives et physiopathologie intestinale", Hôpital Saint-Antoine, Paris)

Références Bibliographiques

- Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB (2006) Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of lipid research* 47: 241-259
- Rinne MM, Gueimonde M, Kalliomaki M, Hoppu U, Salminen SJ, Isolauri E. Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005 ; 43 : 59-65.
- Rinne M, Kalliomaki M, Arvilommi H, Salminen S, Isolauri E. Effect of probiotics and breastfeeding on the *Bifidobacterium* and *lactobacillus/enterococcus* microbiota and humoral immune responses. *J Pediatr* 2005 ; 147 : 186-91.
- Roissart Hd, Luquet FM (1994) Bactéries lactiques : aspects fondamentaux et technologiques, Vol. 2, Uriage: Lorica.
- Rossello-Mora R, Amann R (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews* 25: 39-67
- Rossen NG, MacDonald JK, de Vries EM, D'Haens GR, de Vos WM, Zoetendal EG, Ponsioen CY (2015) Fecal microbiota transplantation as novel therapy in gastroenterology: A systematic review. *World journal of gastroenterology* 21: 5359-5371
- Sadeghifard N, Gurtler V, Beer M, Seviour RJ (2006) The mosaic nature of intergenic 16S23S rRNA spacer regions suggests rRNA operon copy number variation in *Clostridium difficile* strains. *Applied and environmental microbiology* 72: 7311-7323
- Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee YK. Probiotics : how should we they be defined ? *Trends in Food Science and Technology* 1999 ; 10 : 107-10.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4: 406-425
- Schleifer KH, Stackebrandt E (1983) Molecular systematics of prokaryotes. *Annual review of microbiology* 37: 143-187
- Scholtens PA, Oozeer R, Martin R, Amor KB, Knol J (2012) The early settlers: intestinal microbiology in early life. *Annu Rev Food Sci Technol* 3: 425-447
- Sender R, Fuchs S, Milo R (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS biology* 14: e1002533
- Sharples GJ, Lloyd RG (1990) A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic acids research* 18: 6503-6508

Références Bibliographiques

Skinner G.E., Solomon H.M and Fingerhut G.A. 1999. Prevention of Clostridium botulinum type A, Proteolytic B and E toxin formation in refrigerated Peasoup by Lactobacillus plantarum, ATCC 8014. J. Food Sci. 64 (4): 724-727.

Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, Glickman JN, Garrett WS (2013) The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. Science 341 : 569-573

Sokol H (2014) Microbiote, ce qu'il faut savoir. Colon Rectum 8: 136-140

Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottiere HM, Dore J, Marteau P, Seksik P, Langella P (2008) Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 16731-16736

Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. International Journal of Systematic Bacteriology 44: 846-849

Steel JH, Malatos S, Kennea N, Edwards AD, Miles L, Duggan P, Reynolds PR, Feldman RG, Sullivan MH (2005) Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. Pediatric research 57: 404-411

Stewart JA, Chadwick VS, Murray A (2005) Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria in the faecal microflora of children. Journal of medical microbiology 54: 1239-1242

Stiles ME (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 70: 331- 345

Stiles ME, Holzapfel WH (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International journal of food microbiology 36: 1-29

Szajewska H, Setty M, Mrukowicz J, Guandalini S. Probiotics in gastrointestinal diseases in children : hard and not-so-hard evidence of efficacy. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2006 ; 42 : 454-75.

Takiishi T, Korf H, Van Belle TL, Robert S, Grieco FA, Caluwaerts S, Galleri L, Spagnuolo I, Steidler L, Van Huynegem K, Demetter P, Wasserfall C, Atkinson MA, Dotta F, Rottiers P, Gysemans C, Mathieu C (2012) Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigen-specific tolerance using genetically modified Lactococcus lactis in mice. The Journal of clinical investigation 122: 1717-1725

Références Bibliographiques

- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30: 2725-2729
- Thavagnanam S, Fleming J, Bromley A, Shields MD, Cardwell CR. A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008 Apr;38(4):629-33. doi: 10.1111/j.1365-2222.2007.02780.x.
- Thibault H, Aubert-Jacquín C, Goulet O. Effects of long-term consumption of a fermented infant formula (with *Bifidobacterium breve* c50 and *Streptococcus thermophilus* 065 on acute diarrhea in healthy infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004 ; 39 : 147-52.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027-1031
- Uhlemann M, Heine W, Mohr C, Plath C, Pap S. Effects of oral administration of bifidobacteria on intestinal microflora in premature and newborn infants. *Z Geburtshilfe Neonatol* 1999 ; 203 : 213-7.
- Vael C, Desager K (2009) The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Current opinion in pediatrics* 21: 794-800
- Valentina Tonei. Mother's mental health after childbirth: Does the delivery method matter? *Journal of Health Economics* Volume 63, January 2019, Pages 182-196.
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews* 60: 407-438
- Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig L, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman W (2009) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3, 2 edn. New York: SpringerVerlag
- Waligora-Dupriet AJ, Dugay A, Auzeil N, Huerre M, Butel MJ. Evidence for clostridial implication in experimental necrotising enterocolitis through bacterial fermentation in a gnotobiotic quail model *Pediat Res* 2005 ; 58 : 629-35.
- Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA (2011) Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. *Applied and environmental microbiology* 77: 6718-6721
- Wang LS, Zhu HM, Zhou DY, Wang YL. Influence of whole peptidoglycan of *Bifidobacterium* on cytotoxic effectors produced by mouse peritoneal macrophages. *World J Gastroenterol* 2001 ; 7 : 440-3 4499
- Waligora-Dupriet AJ, Dugay A, Auzeil N, Huerre M, Butel MJ. Evidence for clostridial implication in experimental necrotising enterocolitis through bacterial fermentation in a gnotobiotic quail model. *Pediat Res* 2005 ; 58 : 629-35.
- Watanabe S, Narisawa Y, Arase S, Okamatsu H, Ikenaga T, Tajiri Y, et al. Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2003 ; 111 : 587-91.

Williams BL, Hornig M, Parekh T, Lipkin WI (2012) Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of *Sutterella* species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. *mBio* 3

Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research* 18: 6531- 6535

Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiological reviews* 51: 221-271

Wood BJB, Holzapel WH (1995) *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Vol. 2, 1 edn.: Springer US.

Yang D, Woese CR (1989) Phylogenetic Structure of the “*Leuconostocs*”: An Interesting Case of a Rapidly Evolving Organism. *Systematic and applied microbiology* 12: 145-149

Yang J., Cao Y., et Terada. 2010. Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. *J. Dairy Sci.* 93 (7): 3136-3145.

Yazourh A, Mullie C, Leroux B, Romond C, Romond MB. Reproduction par effet prébiotique de la flore intestinale du nourrisson. *Arch Pediatr* 2000 ; 7(Suppl 2) : 244s-6s.

Yoshioka H, Iseki K, Fujita K (1983) Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics* 72: 317-321

Annexe 01 : Composition des milieux de culture
- Man Rogosa Sharpe Agar

Pour un litre d'eau distillée :

Composition	(grammes/litre)
Peptone	10,0
Extrait de viande de bœuf	8,0
Extrait de levure	4,0
Glucose	20,0
Tween 80	1,0 ml
Hydrogénophosphate de potassium	2,0
Acétate de sodium 3 H ₂ O	5,0
Citrate d'ammonium	2,0
Sulfate de magnésium 7 H ₂ O	0,2
Sulfate de manganèse 4 H ₂ O	0,05
Agar	10,0
pH 6,2 ± 0,2	

Stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave.

- Columbia blood agar

Pour un litre d'eau distillée :

COMPOSITION	(grammes/litre)
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin)	10,0
Hydrolysate de protéines animales (bovin ou porcin)	10,0
Peptone de cœur (bovin ou porcin)	3,0
Amidon	1,0
Chlorure de sodium	5,0
Agar	13,5
pH 7,3 ± 0,2	

Stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave. Refroidir à 50°C et ajouter stérilement 5 % de sang défibriné stérile.

Annexe 02 : Coloration de Gram

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre.
- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.
- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes.
- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée.
- Couvrir de lugol pendant 30 secondes.
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool
- acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette. - Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes.
- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes.
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement. Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.