

N° d'ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILLALI LIABES SIDI BEL ABBES

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Département de Biologie

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par :

M^{elle} BOUCHACHIA Souad

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Enzymes, Micro-organismes et Bio-industries

Intitulé

**Connaissance de la microflore digestive : évaluation de
l'allaitement maternel sur la mise en place du
microbiote intestinal du nouveau-né**

Soutenu le

Devant le Jury composé de :

Président :	Mr M. Missouri	(Maître de Conférences "A", UDL de Sidi Bel-Abbès)
Examineurs:	M^{me} K.D Derkaoui	(Maître de Conférences "A", Université Ahmed Benbella Oran 1)
	Mr R. Kerroucha	(Maître de Conférences "A", Université Ahmed Benbella Oran 1)
Directrice de thèse:	M^{me} H. Mahdjoub Bessam	(Maître de Conférences "A", UDL de Sidi Bel-Abbès)

Année universitaire 2017/2018

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

DEDICACE

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance... Aussi, c'est tout simplement que... Je dédie cette thèse à

A Mes Très Chers Parents

Comment parler de moi sans parler de vous

Mes très chers parents je vous dois tant.

C'est grâce à vous que ma vie ne connaît pas de grands remous

Mes chers parents que j'aime plus que tout au monde

Puisse mon dieu, le tout puissant, vous protège et vous accorde meilleure santé et longue vie.

A MES CHERS ET ADORABLE FRÈRES ET SŒURS

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

Remerciement

Au terme de ce travail, c'est avec émotion que je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce projet de thèse.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à ma directrice de thèse, M^{me} Mahdjoub Bessam Hassiba, pour son amabilité, sa gentillesse et pour son soutien continu. Je la remercie profondément pour ses conseils qu'elle m'a prodigués, ses encouragements et pour son encadrement et sa disponibilité pour m'écouter. Je lui dis que c'était un plaisir de travailler avec vous.

Je tiens à remercier vivement les membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail. Merci à Mr Missouri Miloud, Maître de Conférence Classe A à l'université Djillali Liabes de Sidi-Bel-Abbès, d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je tiens à remercier Mr Kerroucha Rabah de l'université Ahmed Benbella Oran 1 pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Je remercie également M^{me} Derkaoui Kheira Dalia pour l'honneur qu'elle me fait d'être dans mon jury de thèse.

J'adresse ma plus grande gratitude et mes plus chaleureux remerciements au Mr Belahcene Miloud, Professeur au centre universitaire d'Aïn Temouchent, pour ses conseils et son aide précieuse. Je te serai toujours redevable

Je remercie énormément Mr Ghezlaoui Baha-Eddine, Maître de Conférence Classe A à l'université de Tlemcen, pour son aide et son soutien.

Un grand merci à Monsieur Mr Rebiahi Sid Ahmed chef de département de Biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de Tlemcen pour tout son soutien et pour m'avoir permis de mener mon travail expérimental dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres du laboratoire de microbiologie (Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen) et plus particulièrement Aicha, Yazid, Yasser et Salim pour votre aide précieuse.

Mes sincères remerciements et ma gratitude vont aussi à Mr Sabri Rachid (Université de Tlemcen) pour son aide, ses encouragements et pour tous ses précieux conseils.

Je tiens à remercier vivement toute l'équipe du laboratoire d'hygiène d'Aïn Témouchent au niveau du Centre de toxicomanie, particulièrement M^{me} Rahma pour sa gentillesse, son entière disponibilité et surtout pour avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour mener à bien ce travail.

Un grand merci pour toutes les mamans et leurs nourrissons qui ont accepté de contribuer à cette étude.

J'adresse mes remerciements particuliers à mes parents pour leur amour et leur soutien inconditionnel tout au long de cette thèse et durant toutes mes années d'études. Leurs encouragements étaient pour moi une force qui m'aidait à avancer et progresser. Je leur dis infiniment merci et je ne les remercierai jamais assez.

Un grand merci aussi à mes sœurs (Nawal et Chahrazed) pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral et à mes frères (Mohamed et Othman) pour leur appui et leur encouragement, toujours présents dans les bons moments comme dans les moments plus difficiles.

Résumé :

À la naissance, le nouveau-né ne possède aucune bactérie dans son tube digestif. Ce dernier est rapidement colonisé par une flore microbienne (microbiote) provenant, principalement de la mère et de l'environnement. Par ailleurs, le lait maternel joue un rôle important sur le développement et l'installation, dans l'organisme du bébé, du microbiote (aussi appelé flore intestinale). Ainsi, le microbiote intestinal exerce de nombreuses fonctions essentielles pour le maintien de la santé de l'hôte. Les micro-organismes qui le composent possèdent en particulier un potentiel métabolique et physiologique considérable. Il existe donc un lien entre allaitement, digestion et défenses immunitaires : c'est le microbiote intestinal, l'ensemble de bactéries qui habitent dans l'intestin. Le microbiote intestinal se constitue peu à peu et va jouer un rôle essentiel dans l'éducation du système immunitaire. Ainsi, l'intestin sera capable de reconnaître et tolérer les bactéries utiles ou neutres pour l'organisme et d'identifier les bactéries pathogènes pour les combattre. La composition du microbiote intestinal reste mystérieuse malgré de nombreuses études qui donnent des pistes sur l'identité des bactéries présentes et leurs fonctions. La plupart des études de ce microbiote sont basées sur des techniques de culture, mais des techniques de biologie moléculaire permettent de mieux compléter ces données. Le lait maternel contient une population diversifiée de bactéries, mais on en sait peu sur le transfert vertical des bactéries de la mère à l'enfant par l'allaitement.

Pour mieux comprendre l'influence de l'allaitement maternel dans la mise en place de la flore intestinale des bébés, nous avons exploré l'existence d'un lien dynamique entre le microbiote intestinal des nourrissons et celui des mères via l'allaitement. L'intérêt premier est d'éclaircir l'origine du microbiote intestinal du nouveau-né. L'objectif secondaire de ce travail est de se livrer à l'étude de la diversité bactérienne des selles des nourrissons allaités au sein et des nourrissons allaités au biberon. Notre étude a porté sur cinq paires mère / nouveau-nés ou nourrissons allaités maternellement et artificiellement. Les échantillons sont prélevés au 1^{er}-7^{ème}-30^{ème} et 90^{ème} jour puis analysés sur différents milieux de culture. Les résultats de l'étude quantitative et qualitative de la flore microbienne du lait maternel des cinq mères témoignent de l'abondance de bactéries lactiques tels que *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. L'étude de la flore microbienne à partir des échantillons fécaux de nourrissons allaités maternellement et artificiellement atteste d'une grande diversité bactérienne avec une certaine similitude entre les dix nourrissons.

La détermination de la séquence d'ADN du gène de l'ARNr 16S est la méthode privilégiée pour étudier la taxonomie des membres du microbiome et du microbiote. Le microbiote et la métagénomique sont les deux mots tendances de ces dernières années dans les laboratoires de microbiologie. Derrière eux se cacheraient les réponses à de nombreuses maladies comme le Diabète, la maladie de Crohn et même l'Autisme. L'application des outils d'écologie moléculaire au microbiote intestinal a conduit à des améliorations très significatives de notre compréhension de cet écosystème, en termes de composition et de dynamique de la diversité des espèces. Ces travaux se sont cependant basés sur l'utilisation du gène codant l'ARN ribosomal comme marqueur phylogénétique universel, pour cette raison, nous avons identifié les bactéries par la méthode PCR appliquée à la région variable V3-V4 du gène ARNr 16S. Le choix de l'ARN 16S plutôt que 23S ou 5S est d'ordre technique (taille du gène, nombre d'informations) et, surtout, les banques de données de séquences du gène 16S sont aujourd'hui très développées. D'après les résultats obtenus de séquençage de la région V3-V4 de l'ARNr 16S, le lait maternel n'est pas stérile, les bactéries trouvées correspondant aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Stenotrophomonas*. *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Escherichia* sont les genres révélés dans la flore microbienne des échantillons fécaux de nouveaux nés nourris exclusivement au sein. Cette étude a montré que certaines paires mère-nourrissons partagent des souches bactériennes appartenant à différents genres bactériens, ce qui suggère que le lait maternel peut-être inclus parmi les sources potentielles de bactéries dans l'intestin du nourrisson. Le lait maternel a des propriétés uniques et inimitables et constitue donc le liquide nutritif de référence pour le nouveau-né. Nos connaissances actuelles confirment que notre flore intestinale est indispensable au bon fonctionnement de notre organisme. En conséquence, elle doit être protégée, en utilisant par exemple des souches bactériennes probiotiques dont l'activité aura été scientifiquement prouvée.

Mots clés: Microbiote intestinal, Nourrissons, Allaitement, Lait maternel, Probiotique, Métagénome, ARNr16s, Bactéries lactiques.

Abstract

At birth, the newborn has no bacteria in its digestive tract. The latter is rapidly colonized by a microbial flora (microbiota) derived mainly from the mother and the environment. In addition, breast milk plays an important role in the development and installation of the microbiota (also called intestinal flora) in the baby's body. Thus, the gut microbiota performs many essential functions for maintaining the health of the host. The micro-organisms that compose it have in particular a considerable metabolic and physiological potential. There is therefore a link between breastfeeding, digestion and immune defenses: it is the intestinal microbiota, the set of bacteria that live in the intestine. The gut microbiota is gradually being constituted and will play a vital role in the education of the immune system. Thus, the intestine will be able to recognize and tolerate useful or neutral bacteria for the body and identify pathogenic bacteria to fight them. The composition of the intestinal microbiota remains mysterious despite numerous studies that give insights into the identity of the bacteria present and their functions. Most studies of this microbiota are based on culture techniques, but molecular biology techniques can better complement this data. Breast milk contains a diverse population of bacteria, but little is known about the vertical transfer of bacteria from mother to child through breastfeeding.

To better understand the influence of breastfeeding in the establishment of the intestinal flora of babies, we explored the existence of a dynamic link between the intestinal microbiota of infants and that of mothers via breastfeeding. The primary interest is to clarify the origin of the intestinal microbiota of the newborn. The secondary objective of this work is to study the bacterial diversity of the stools of breastfed infants and bottle-fed infants. Our study focused on five mother / newborn pairs or infants breastfed maternally and artificially. The samples are taken on the 1st-7th-30th and 90th days then analyzed on different culture media. The results of the quantitative and qualitative study of the microbial flora of the mother's milk of the five mothers testify to the abundance of lactic bacteria such as *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. The study of microbial flora from fecal samples of infants breastfed maternally and artificially attests to great bacterial diversity with a certain similarity between the ten infants.

The determination of the DNA sequence of the 16S rRNA gene is the preferred method for studying the taxonomy of members of the microbiome and the microbiota. Microbiota and metagenomics are the two trend words of recent years in microbiology laboratories. Behind them would hide the answers to many diseases like Diabetes, Crohn's disease and even Autism. The application of molecular ecology tools to the gut microbiota has led to very significant improvements in our understanding of this ecosystem, in terms of composition and dynamics of species diversity. This work, however, relied on the use of the gene encoding ribosomal RNA as a universal phylogenetic marker, for this reason, we have identified bacteria by the PCR method applied to the V3-V4 variable region of the 16S rRNA gene. The choice of 16S RNA rather than 23S or 5S is technical (gene size, number of information) and, above all, the 16S gene sequence databases are now highly developed. According to the results obtained by sequencing the V3-V4 region of 16S rRNA, breast milk is not sterile, the bacteria found corresponding to the genera *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococci*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Stenotrophomonas*. *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Escherichia* are the genera revealed in the microbial flora of fecal samples of newborns fed exclusively on the breast. This study showed that some mother-infant pairs share bacterial strains belonging to different bacterial genera, suggesting that breast milk may be included as a potential source of bacteria in the infant's gut. Breast milk has unique and inimitable properties and is therefore the reference nutrient for the newborn. Our current knowledge confirms that our intestinal flora is essential to the proper functioning of our body. As a result, it must be protected, for example by using probiotic bacterial strains whose activity has been scientifically proven.

Key words: Intestinal microbiota, Infants, Breastfeeding, Breast milk, Probiotics, Metagenome, RNAr16s, Lactic bacteria.

ملخص

عند الولادة، لا يوجد لدى المولود أي بكتيريا في الجهاز الهضمي. هذا الأخير يستعمر بسرعة من قبل الكائنات الميكروبية (الجراثيم) التي تنشأ أساساً من الأم والبيئة. وبالإضافة إلى ذلك، حليب الثدي يلعب دوراً هاماً في تطوير وتركيب الجراثيم (وتسمى أيضاً الكائنات المعوية) في جسم الطفل. وهكذا، فإن جراثيم الأمعاء لديها العديد من الوظائف الأساسية للحفاظ على صحة المضيف. الكائنات الحية الدقيقة التي يؤلفها لديها على وجه الخصوص إمكانات التمثيل الغذائي والفيزيولوجي. بالتالي هناك صلة بين الرضاعة الطبيعية، والهضم والدفاعات المناعية: هو البيكتيريا المعوية، ومجموعة من البكتيريا التي تعيش في الأمعاء. يتم تشكيل الجراثيم المعوية تدريجياً، وسوف تلعب دوراً حيوياً في تعلم الجهاز المناعي، وبالتالي، فإن الأمعاء تكون قادرة على التعرف والتسامح مع البكتيريا مفيدة أو محايدة للجسم وتحديد البكتيريا المسببة للأمراض لمخبرتهم. لا يزال تكوين الجراثيم المعوية غامضاً على الرغم من العديد من الدراسات التي توفر رؤى حول هوية البكتيريا الحالية ووظائفها. وتستند معظم دراسات هذه الجراثيم على تقنيات كلاسيكية لنمو البكتيريا، ولكن تقنيات البيولوجيا الجزيئية يمكن أن تكمل هذه البيانات بشكل أفضل. حليب الثدي يحتوي على مجموعة متنوعة من البكتيريا، ولكن لا يعرف سوى القليل عن نقل البكتيريا من الأم إلى الطفل من خلال الرضاعة الطبيعية.

لنهم أفضل لتأثير الرضاعة الطبيعية في إنشاء البكتيريا المعوية للأطفال، استكشفنا وجود علاقة ديناميكية بين الجراثيم المعوية للرضع والأطفال والأمهات عن طريق الرضاعة الطبيعية. الهدف الأساسي هو توضيح أصل الجراثيم المعوية للمواليد الجدد. الهدف الثانوي من هذا العمل هو دراسة التنوع البكتيري من البراز من الرضع الذين يتلقون رضاعة طبيعية ورضاعة اصطناعية. ركزت دراستنا على خمسة أزواج من الأم، الرضع حديثي الولادة الذين يتلقون رضاعة طبيعية و اصطناعية. تؤخذ العينات في اليوم الأول، السابع، بعد مرور شهر إلى ثلاثة أشهر و يتم تحليلها في عدة أوساط لنمو البكتيريا. نتائج الدراسة الكمية والنوعية للكائنات الميكروبية لحليب الأم للأمهات الخمس تشهد على وفرة البكتيريا البنية مثل العقدية، الملبنة والبيفيدو بكتيريوم. دراسة الكائنات الميكروبية من عينات البراز من الرضع الرضاعة الطبيعية والاصطناعية تشهد على التنوع البكتيري مع تشابه معين بين الأطفال العشرة.

تحديد تسلسل الحمض النووي من الجينات الرياسي S16 هو الأسلوب المفضل لدراسة تصنيف أعضاء الميكروبيوم والمجهرية الميكروبات والميتاجينوميك هي كليات الاتجاه من السنوات الأخيرة في مختبرات علم الأحياء الدقيقة. وراءها سوف تخفي الأجوبة على العديد من الأمراض مثل مرض السكري، مرض كرون وحتى التوحد. وقد أدى تطبيق أدوات البيئة الجزيئية إلى الكائنات الحية الدقيقة في الأمعاء إلى تحسينات كبيرة جداً في فهمنا لهذا النظام الإيكولوجي، من حيث تكوين وديناميات تنوع الأنواع. هذه الأبحاث اعتمدت على استخدام الجينات ترميز الحمض النووي الريبي الرياسي كعلامة للشئ والتطور العالمي، ولهذا السبب حددنا البكتيريا بواسطة طريقة البلمرة سلسلة التفاعل ويتم تطبيقها على المنطقة المتغيرة V3-V4 من الجينات الرياسي S16. اختيار S16 بدلاً من S23 أو S5 ذو طبيعة تقنية (حجم الجينات، وعدد من المعلومات)، وقبل كل شيء، قواعد بيانات تسلسل الجينات S16 هي الآن متقدمة للغاية. وفقاً للنتائج التي تم الحصول عليها من خلال تسلسل المنطقة V3-V4 من الرياسي S16، حليب الثدي غير معقم، وجدت البكتيريا المقابلة لعقد العقدية، المكورات العنقودية، المكورات العنقودية، الزائفة، المعوية، إروينا، ليوكونوستوك، ستيغوتروفوموناس. المكورات العنقودية، الملبنة، العقدية و القولونية هي أجناس كشفت في الكائنات الميكروبية من عينات البراز من حديثي الولادة التي تشمل تغذيتهم على الثدي. وأظهرت هذه الدراسة أن بعض أزواج الأم والرضع يشتركون في سلالات بكتيرية تنتمي إلى جنسيات بكتيرية مختلفة، مما يشير إلى أن حليب الثدي قد يتم تضمينه كمصدر محتمل للبكتيريا في أمعاء الرضع. حليب الثدي له خصائص فريدة من نوعها والغذاء، وبالتالي هو غذاء مرجعي لحديثي الولادة. وتؤكد معرفتنا الحالية أن كائناتنا المعوية ضرورية لعمل الجسم بشكل سليم. ونتيجة لذلك، يجب أن تكون محمية، على سبيل المثال باستخدام السلالات البكتيرية بروبيوتيك التي ثبت علمياً فائدتها الكبيرة.

الكلمات المفتاحية: الجراثيم المعوية، الرضع، الرضاعة الطبيعية، حليب الثدي، البروبيوتيك، ميتاجينوم، الحمض الريبوزي S16، البكتيريا البنية.

Liste des Abréviations

ACTH :adrénocorticotrophine

ADN : L'acide désoxyribonucléique

AIEC : Escherichia Coli adherent-invasifs

ARNr 16S : L'ARN ribosomique 16S

CR : Cancer colorectal

DID : diabète insulino-dépendant

DL3: Echantillons de lait maternel N°3

DM3: Matière fécale N°3

FAO : Food and Agriculture Organisation

FL2 : Echantillons de lait maternel N°2

FLASH: Fast Length Adjustment of Short reads

FM2: Matière fécale N°2

GL1: Echantillons de lait maternel N°1

GM1: Matière fécale N°1

IgA : immunoglobulines A

IgG : immunoglobulines G

IgM : immunoglobulines M

J : Jour

Log : logarithme

LF : Lait de femme

LV : Lait de vache

NNM : Nouveau-né allaité maternellement

NNA : Nouveau-né allaité artificiellement.

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Ob : obèse

OMS :L'Organisation mondiale de la santé

OTU : Operational Taxonomic Unit

PBMC : Les cellules mononucléées périphériques

Peptide YY : peptide tyrosine tyrosine

QIIME :Quantitative Insights Into Microbial Ecology

RDP : Ribosomal Database Project

SII : Syndrome de l'intestin irritable

TRH :L'hormone thyroïdienne

Th2 : T helper 2

TSH : thyroïdostimuline

TLR : Toll-like récepteurs

UFC : «unité formant colonie»

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Table des matières

Introduction.....	1
Revue bibliographique	
Chapitre I : Le microbiote intestinal	
I-1-Anatomie et physiologie du système gastro-intestinal.....	5
I-2-Le microbiote intestinal	7
I-2-1- Définition.....	7
I-3-Répartition topographique de la flore intestinale.....	8
I-4-Composition du microbiote intestinal et son évolution.....	10
I-5- Établissement du microbiote intestinal chez le nouveau-né.....	12
I-6-Développement normal de la flore intestinale.....	14
I-7- Facteurs agissant sur la colonisation bactérienne.....	15
I-7-1-Influence du mode d'accouchement	15
I-7-2-Influence du terme de naissance.....	16
I-7-3- Influence de l'alimentation.....	16
I-7-4-Influence de l'antibiothérapie.....	17
I-7-5-Influence de l'environnement et des conditions d'hygiène.....	18
I-7-6- Influence du terrain génétique.....	18
I-8-1-Fonctions métabolique et nutritionnelle.....	19
I-7-7- Facteurs n'influençant pas la colonisation intestinale	20
I-8- Fonctions du microbiote intestinal.....	20
I-8-1-1-Métabolisme des glucides.....	21
I-8-1-2-Métabolisme des protéines	21

I-8-1-3- Métabolisme des lipides.....	22
I-8-1-4-Métabolisme des gaz.....	22
I-8-1-5-Synthèse de facteurs vitaminiques.....	22
I-8-2- Fonction protectrice: effet barrière	23
I-9-Systèmes de communication au sein du super-organisme.....	25
I-9-1-Dialogue bactéries-bactéries	25
I-9-2-Dialogue hôtes - Microbes.....	26
I-10- Microbiote intestinal et système immunitaire.....	26
I-10-1- Développement du système immunitaire intestinal	26
I-11- Implication du microbiote en pathologie humaine.....	27
I-11-1-Obésité.....	28
I-11-2- Allergie.....	29
I-11-3- Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)	30
I-11-4-Syndrome de l'intestin irritable.....	30
I-11-5- Cancer colorectal (CR)	31
I-11-6- Autisme	31
I-11-7-Diabète.....	32

Chapitre II: L'allaitement

II- L'allaitement	34
II-1-L'allaitement maternel.....	34
II-1-1- Définition.....	34
II-1-2- Anatomie et physiologie de la glande mammaire.....	34
II-1-2-1- Anatomie.....	34

II-1-2-2- Physiologie.....	36
II-1-3- Physiologie de la lactation.....	37
II-1-3-1- Le rôle de la fonction hormonale.....	37
II-1-3-1-1- L'ocytocine.....	37
II-1-3-2- La prolactine	38
II-1-4- Composition et variation du lait maternel.....	40
II-1-4-1- Composition.....	41
II-1-4-1-1- Énergie.....	41
II-1-4-1-2- Protéines et substances azotées.....	41
II-1-4-1-3- Glucides.....	42
II-1-4-1-4- Lipides et digestibilité des graisses.....	43
II-1-4-1-5- Les sels minéraux.....	44
II-1-4-1-6- Les vitamines.....	45
II-1-4-1-7- Les hormones.....	46
II-1-4-2- Variation du lait maternel.....	47
II-1-4-2-1- Stade de lactation.....	47
II-1-4-2-2- Au cours d'une tétée.....	48
II-1-5- Les différents stades de la production de lait.....	48
II-1-6- Influence de l'état nutritionnel de la mère.....	50
II-1-6-1- État nutritionnel de la mère et production de lait.....	50
II-1-6-2- Besoins énergétiques de la mère au cours de l'allaitement.....	51
II-1-7- Les positions pour allaiter.....	51
II-1-7- Les bénéfices de l'allaitement maternel.....	53
II-1-7- 1-Pour le nouveau-né.....	53

II-1-7-1-1-Protection contre les infections.....	53
II-1-7-1-2-Protection contre l'allergie.....	54
II-1-7-1-3-Prévention de pathologies cancéreuses.....	54
II-1-7-1-4-Prévention du diabète de type 1.....	54
II-1-7-1-5-Prévention du risque vasculaire.....	54
II-1-7- 2-Pour la mère.....	55
II-1-7- 2-1-Les suites de couche	55
II-1-7-2-2-Prévention des cancers du sein et de l'ovaire.....	55
II-1-7-2-3-Prévention des risques cardio-vasculaires.....	55
II-1-8- Contre- indications de l'allaitement.....	56
II-2-L'allaitement Artificiel.....	56
II-2-1-L'équipement.....	56
II-2-2- Les laits infantiles.....	57
II-2-2-1- Laits pour nourrissons standard (ou laits premier âge standard).....	57
II-2-2-2- Laits de suite standard (ou laits deuxième âge standard)	58
II-2-2-3- Laits de croissance (ou laits pour enfants en bas âge)	58
II-2-2-4-Laits pré-épaissis.....	59
II -2-2-5-Lait avec probiotiques, prébiotiques ou ferments lactiques.....	59
II-2-2-6-Lait appauvri en lactose.....	59
II-2-2-7-Préparations à base de protéines de soja.....	59
II-2-2-8-Lait hypoallergénique ou lait HA.....	60
II-2-2-9-Formules à base de protéines du lait de vache entières.....	60
II-2-2-10-Préparations à effets fonctionnels.....	61

II-2-3- Durée de l'allaitement artificiel.....	62
II-3-Allaitement mixte.....	62
CHAPITRE III: Probiotiques et Prébiotiques	
III-1-Les probiotiques.....	63
III-1-1-Définition.....	63
III-1-2- Découverte.....	66
III-1-3- Nomenclature	66
III-1-4- Caractéristiques des souches probiotiques.....	67
III-1-5- Rôle des probiotiques.....	68
III-1-5-1-Probiotiques et diarrhées.....	70
III-1-5-2-Diarrhée liée à l'antibiothérapie.....	70
III-1-5-3-Effets des probiotiques sur la digestion du lactose.....	70
III-1-5-4-Cancer colorectal.....	71
III-1-5-5- Éradication d' <i>Helicobacter pylori</i>	71
III-1-5-6- Rôle des probiotiques dans la maladie de Crohn.....	72
III-1-5-7- Probiotiques et infections urinaires.....	72
III-1-5-8- Effet des probiotiques dans les phénomènes allergiques.....	73
III-1-5-9- Stimulation de l'immunité innée par les probiotiques.....	73
III-2-Les prébiotiques.....	74
III-2-1- Définition.....	74
III-2-1- Composition.....	75
III-2-2- Critères de sélection des prébiotiques.....	77
III-3- Les symbiotiques.....	77

CHAPITRE IV :Méthodes moléculaires d'étude de la flore microbienne basées sur l'ADN et l'ARN ribosomique

IV-1- Les acides nucléiques en écologie microbienne	79
IV-1-1- L'ARN ribosomique.....	79
IV-1-2-L'ARN 16S	79
IV-1-3-Le choix de l'ARN 16S.....	81
IV-2- L'analyse du métagénome	81
IV-3- Les techniques moléculaires d'étude de la flore microbienne intestinale.....	82
IV-3-1-La PCR	82
IV-3-2- Le pyroséquençage	83
IV-3-3- L'électrophorèse sur gel dénaturant	85

Partie expérimentale

Chapitre V : Matériels et Méthodes

V-1-Matériels biologiques.....	87
V-1-1- Prélèvement des échantillons de fèces.....	87
V-1-2-Prélèvement du lait maternel.....	87
V-2- Dénombrements microbiens.....	88
V-2-1- Analyses microbiologiques.....	88
V-2-1-1-Préparation des suspensions de dilution.....	88
V-2-1-2-Isolement et identification des bactéries lactiques.....	88
V-2-1-2-1-Les bifidobactéries.....	88
V-2-1-2-2-Les lactobacilles et les streptocoques.....	89
V-2-1-2-3-Purification des isolats de bactéries lactiques.....	89

V-2-1-2-4-Conservation des isolats.....	89
V-2-1-3-1-Examen macroscopique.....	90
V-2-1-3-2-Examen microscopique.....	90
V-2-1-3-Tests d'orientation pour l'identification des bactéries lactiques.....	90
V-2-1-3-3-Recherche de la catalase.....	90
V-2-1-3-4-Recherche de type fermentaire.....	91
V-2-1-3-5-Test de croissance dans les conditions hostiles	91
V-2-1-3-6-Test de croissance à différentes températures	92
V-2-1-3-7-Test d'utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron (TSI)	92
V-2-1-3-8-Test Mannitol-Mobilité.....	92
V-2-1-3-9-Identification des bactéries lactiques par galerie API 20 Strep.....	92
V-2-1-3-10-Identification des bactéries lactiques par galerie API 50 CHL.....	95
V-2-1-4-Isolement et identification des staphylocoques.....	95
V-2-1-4-1-L'activité catalytique.....	96
V-2-1-4-2-Recherche de la coagulase.....	96
V-2-1-4-3-Identification par plaque API STAPH (Biomérieux)	97
V-2-1-5-Isolement et identification des <i>Escherichia</i>	97
V-2-1-5-1-Test oxydase.....	97
V-2-1-5-2-Test Mannitol-Mobilité	97
V-2-1-5-3-Test d'utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron (TSI)	98
V-2-1-5-4-Identification de <i>Escherichia par</i> galerie API 20 E.....	98
V-2-1-6-Isolement et identification des Levures et Moisissures.....	98
V-2-1-7-Analyses statistiques.....	99

V-3- Analyse du métagénome par séquençage de l'ARNr 16S.....	99
V-3-1-Extraction des acides nucléiques	100
Chapitre VI :Résultats et Discussion	
VI-1-Influence de l'allaitement maternel dans la mise en place de la flore microbienne du nouveau-né.....	102
VI-1-1-Résultats qualitatifs du lait maternel.....	102
VI-1-2-Établissement de la première flore chez le nourrisson allaité maternellement.....	102
VI-1-3- Résultats quantitatifs.....	103
VI-1-3-1- Dénombrement bactérien des différents échantillons étudiés.....	103
VI-2-Évaluation de la flore intestinale de nouveau-nés allaités maternellement ou par des laits maternisés.....	112
VI-3-1-Les bifidobactéries.....	119
VI-3-2-1- Les Lactobacilles.....	120
VI-3-2-2- Les Streptocoques	124
VI-3-3-Identification de Staphylococcus.....	132
VI-3-4-Identification d' <i>Escherichia</i>	134
VI-3-5-Identification des levures et moisissures.....	135
Conclusion	166
Références bibliographique	

Liste des figures :

Figure N° 1 : Parties de l'estomac.....	5
Figure N°2: Les modifications structurales de la paroi de l'intestin grêle	6
Figure N°3: Vue antérieure du gros intestin	6
Figure N°4: Le petit monde dans l'intestin	7
Figure N° 5: Représentation schématique du tractus intestinal montrant la répartition et l'abondance des bactéries (UFC/ml) au niveau des différents segments	9
Figure N°6 : Arbre phylogénétique des principaux groupes bactériens du microbiote fécal dominant chez l'adulte en bonne santé	11
Figure N°7: Facteurs externes capables d'influencer l'établissement du microbiote intestinal chez le nourrisson	19
Figure N°8: Fonction du microbiote intestinal sur la physiologie de l'hôte	20
Figure N°9: Les cellules de l'épithélium intestinal.....	24
Figure N° 10 : Répartition relative des différents phyla au sein des microbiotes intestinaux de sujets sains ou atteints de désordres métaboliques aux différentes étapes de la vie.....	28
Figure N° 11 : Obésité : maladie de systèmes.....	29
Figure N° 12 : Proportion moyenne des 11 genres bactériens les plus abondants entre les sujets diabétiques et sains	33
Figure N° 13: Coupe sagittale d'une glande mammaire au repos.....	35
Figure N° 14: Schéma d'Histologie de la glande mammaire en coupe	36
Figure N° 15: La fonction hormonale du corps	38
Figure N° 16 : Régulation de la synthèse de la prolactine (PRL)	39
Figure N°17: Les cinq voies de la synthèse du lait dans un lactocyte	50
Figure N°18: Les bonnes positions pour allaiter	52

Figure N° 19: Principales souches probiotiques commercialisées.....	67
Figure N° 20: Caractéristiques des souches probiotiques	68
Figure N° 21: Les effets bénéfiques de probiotiques sur la santé	69
Figure N° 22 : Activation de l'immunité innée par les probiotiques	74
Figure 23 : Schéma illustrant l'ARNr 16S	80
Figure 24 : Étapes de l'amplification PCR	83
Figure 25 : Le pyroséquençage.....	84
Figure N°26 : Distribution des différents genres bactériens dans le lait maternel (1 ^{er} Jour)...	103
Figure N°27: Distribution des différents genres bactériens dans les fèces des nouveau-nés (1 ^{er} Jour).....	103
Figure N°28: Distribution des différents genres bactériens dans le lait maternel (7 ^{ème} Jour).....	106
Figure N°29: Distribution des différents genres bactériens dans les fèces de nouveau-nés (7 ^{ème} Jour).....	106
Figure N°30 : Distribution des différents genres bactériens dans le lait maternel	108
Figure N°31: Distribution des différents genres bactériens dans les fèces de nouveau-nés	108
Figure N°32: Distribution des différents genres bactériens dans le lait maternel (90 ^{ème} Jour).....	110
Figure N°33: Distribution des différents genres bactériens dans les fèces des nouveau-nés. (90 ^{ème} Jour).....	110
Figure N°34: Évolution de la flore fécale du 1 ^{er} nouveau-né allaité maternellement.....	112
Figure N°35: Évolution de la flore fécale du 2 ^{ème} nouveau-né allaité maternellement.....	113
Figure N°36: Évolution de la flore fécale du 3 ^{ème} nouveau-né allaité maternellement.....	113

Figure N°37: Évolution de la flore fécale du 4 ^{ème} nouveau-né allaité maternellement.....	114
Figure N°38 : Évolution de la flore fécale du 5 ^{ème} nouveau-né allaité maternellement.....	114
Figure N°39 : Évolution de la flore fécale du 1 ^{er} nouveau-né allaité artificiellement.....	115
Figure N°40 : Évolution de la flore fécale du 2 ^{ème} nouveau-né allaité artificiellement.....	115
Figure N°41 : Évolution de la flore fécale du 3 ^{ème} nouveau-né allaité artificiellement.....	116
Figure N°42 : Évolution de la flore fécale du 4 ^{ème} nouveau-né allaité artificiellement.....	116
Figure N°43: Évolution de la flore fécale du 5 ^{ème} nouveau-né allaité artificiellement.....	117
Figure N°44 : Aspect des Colonies de la souche <i>Bifidobacterium</i> sur gélose MRS cystéine.....	119
Figure N°45: Aspect microscopique de la souche SC1 après coloration de Gram (Gr.x 100).....	120
Figure N°46 : Aspect des colonies sur MRS solide.....	120
Figure N°47 : Culture dans milieu MRS liquide.....	120
Figure N°48 : Aspect microscopique du genre <i>Lactobacillus</i> (Grossissement x 100).....	121
Figure N°49: Test biochimique de fermentation des hydrates de carbone sur galerie API 50 CHL pour l'identification de la souche SN4 (<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>).....	123
Figure N°50: Aspect des colonies sur M17solide.....	124
Figure N°51: Aspect microscopique du genre <i>Streptococcus</i> (Grossissement ×100).....	124
Figure N°52: Aspect des colonies de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Chapman.....	133
Figure N°53 : Aspect microscopique de la souche <i>Staphylococcus</i> , après coloration de Gram (Grossissement ×100).....	133
Figure N°54 : Aspect des colonies de <i>Staphylococcus hominis</i> sur milieu Chapman.....	133
Figure N°55: Résultat des tests biochimiques de la galerie API STAPH pour l'identification de la souche <i>Staphylococcus hominis</i>	134

Figure N°56 : Aspect macroscopique de la souche <i>Escherichia coli</i> sur milieu Hecktoen.....	134
Figure N°57 : Aspect microscopique de la souche <i>Escherichia coli</i> (Grossissement ×100) après coloration de Gram.....	138
Figure N°58 : Résultat des tests biochimiques sur galerie API20E pour l'identification de la souche <i>Escherichia coli</i>	135
Figure N°59: Aspect macroscopique des colonies de <i>Candida sp</i> sur milieu de Sabouraud.....	135

Liste des Tableaux

Tableau N° 1: Taxonomie des principales espèces bactériennes constitutives du microbiote intestinal humain.....	12
Tableau N°2: Comparaison des composition du lait de femme et du lait de vache	44
Tableau N°3: Vitamines et minéraux du lait maternel	45
Tableau N° 4: « Facteurs anti-infectieux » du lait de femme	44
Tableau N°5: Principales espèces microbiennes utilisées comme probiotiques.....	65
Tableau N°6: Structures et sources des prébiotiques.....	76
Tableau N°7: Proposition de critères de sélection des prébiotiques à application intestinale.....	77
Tableau N°8 : Les tests de API 20 Strep.....	94
Tableau N°9: Taux de bactéries dans les échantillons de lait maternel et de fèces de nouveau-nés (1 ^{er} Jour).....	105
Tableau N°10: Taux de bactéries dans les échantillons de lait maternel et de fèces de nouveau-nés (7 ^{ème} jour).....	107
Tableau N°11: Taux de bactéries dans les échantillons de lait maternel et de fèces de nouveau-nés (30 ^{ème} jour).....	109
Tableau N°12: Taux de bactéries dans les échantillons de lait maternel et de fèces de nouveau-nés (90 ^{ème} jour).....	111

Tableau N°13: Utilisation des hydrates de carbone par les souches dans une galerie API 50

CHL.....121

Tableau N °14 : Description de l'aspect microscopique des différentes souches lactiques

purifiées à partir de lait maternel et de fèces infantiles.....125

Tableau N°15 : Profil fermentaire des souches sur galerie API 20 Strep.....127

Tableau N°16: Caractéristiques Physiologiques des différentes souches lactiques purifiées à

partir de lait maternel et de fèces de nouveau-nés.....129

Tableau N°17 : Résultat de l'identification des espèces.....131

Introduction :

La microflore intestinale joue un rôle crucial dans le maintien et l'amélioration de la santé **(Perdigon et al., 2001)**. Ces dernières décennies, un grand intérêt s'est développé en vue d'une communauté microbienne mieux équilibrée **(Gibson, 1998)**, quoique les relations micro-organismes-hôte aient longtemps été essentiellement considérées sous l'angle de la pathogénicité.

Les processus complexes qui sous-tendent l'acquisition de la flore intestinale du nouveau-né restent toutefois peu étudiés car la colonisation est influencée par divers facteurs tels que le mode de livraison, l'âge gestationnel et une éventuelle antibiothérapie de la mère et/ou du nourrisson **(Butel et al., 2007)**, bien que le type d'alimentation puisse également affecter la colonisation bactérienne, peu d'études ont été réalisées.

À la naissance, le tube digestif du nouveau-né est dépourvu de bactéries. La colonisation microbienne débute dès l'accouchement. Le tube digestif du nouveau-né est un environnement particulièrement permissif et les niveaux de population y atteignent rapidement 10^{11} bactéries par gramme de contenu **(Quévrain & seksik, 2013)**.

La naissance, moment unique et privilégié du premier contact entre les bactéries et l'hôte, notamment au niveau de la muqueuse intestinale, est le point de départ de l'ensemble des mécanismes immunitaires. La flore intestinale qui en résulte est composée d'une très grande variété de bactéries évoluant au cours de la première année, mettant en place un système d'interaction entre bactéries et muqueuse intestinale **(Langhendries, 2006)**.

Le microbiote intestinal contient environ 10^{14} bactéries réparties en 4 phylums bactériens : Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobactéries, et Proteobactéries. Le microbiote intestinal d'un individu adulte est représenté par plusieurs centaines d'espèces bactériennes différentes et est stable au cours du temps **(Eckburg et al., 2005)**.

Le microbiote intestinal du nouveau-né se développe et mature très lentement, atteignant une composition proche de celle de l'adulte vers l'âge de trois ans. Pendant cette période, plusieurs facteurs médicaux, culturels et environnementaux tels que le mode d'accouchement et l'alimentation du nouveau-né (formule infantile ou complémentation en probiotiques) vont influencer sa séquence d'implantation et, à plus long terme, le risque de maladies **(Matamoros et al., 2013)**.

L'estimation de la biodiversité des bactéries a longtemps été limitée, par les techniques de culture qui ne permettaient pas d'identifier de multiples espèces bactériennes incultivables. Mais depuis une vingtaine d'années, comme le souligne **Jean Weissenbach (2002)** l'un des plus grands pionniers mondiaux de l'exploration et de l'analyse des génomes, en particulier de celles du génome humain : « l'utilisation de méthodes moléculaires consistant à analyser la séquence d'ADN d'un gène particulier (gène de l'ARN ribosomique 16S), présent chez tous les organismes, a permis d'évaluer l'étendue de cette diversité. Ce gène universellement répandu présente, d'une espèce à l'autre, de petites variations qui sont caractéristiques de chaque espèce (**Bernard, 2016**).

Depuis 2006, il est possible d'obtenir directement le contenu génique d'un prélèvement de flore sans contrainte d'isolement ou de culture, par utilisation de séquenceurs à ADN de seconde génération. Selon la méthode de séquençage, il est soit possible d'amplifier spécifiquement des régions contenant des marqueurs phylogénétiques d'une espèce ou d'amplifier aléatoirement l'ADN (ou l'ARN) présent dans le prélèvement. Ces méthodes permettant d'étudier collectivement des fragments d'ADN des organismes d'une flore et d'analyser l'abondance relative de chaque fragment au sein d'un prélèvement sont des méthodes dites de métagénomique quantitative (**Almeida, 2013**).

Il est reconnu que l'originalité du microbiote intestinal a des répercussions à long terme sur la santé et l'immunité. Le fait que la colonisation bactérienne, et la susceptibilité aux maladies, soient différentes chez les nouveaux-nés allaités naturellement, et ceux nourris avec des formules infantiles ; suggère que l'allaitement maternel joue un rôle primordial dans le développement du microbiote intestinal, et de l'immunité chez le nourrisson. Intérêt que nous rapportons dans le chapitre bibliographique.

L'importance de l'écosystème intestinal est maintenant reconnue, de même que le rôle de l'alimentation dans son implantation et le maintien de son équilibre. La consommation d'aliments ou de complément alimentaire qui contient des probiotiques a reçu une attention considérable pour son rôle dans le maintien de la santé gastro-intestinale (**Uyeno et al, 2008**).

Au-delà, de l'exposition directe du nouveau-né au microbiote maternel lors de l'accouchement, et pour mieux comprendre l'influence de l'allaitement maternel dans la mise en place de la flore intestinale des bébés, nous avons essayé d'explorer l'existence d'un lien dynamique entre le microbiote intestinal des nourrissons et l'allaitement.

Plusieurs questions se posent alors

Comment le lait maternel peut-il avoir un impact sur la composition du microbiote intestinal du nouveau-né ?

Quelle est la différence entre les nouveau-nés allaités maternellement et ceux nourris avec des formules infantiles à l'égard de la composition de la microflore?

Il est donc important d'avoir une meilleure compréhension de ce facteur si primordiale impliqué dans l'établissement de ce microbiote, chose que nous avons essayé de mettre en évidence dans la présente étude par l'évaluation des premiers colonisateurs microbiens de nourrissons allaités maternellement et autres allaités artificiellement par une approche de culture microbiologique classique.

L'étude microbiologique respective de lait/selles a permis de démontrer qu'il existe un lien entre le microbiote intestinal des nourrissons nourris au sein et celui de leur mère.

Les mêmes espèces bactériennes, appartenant aux genres *Streptococcus*, *Staphylococcus*, et *Bifidobacterium* sont présentes dans le lait des mères allaitantes et dans le microbiote intestinal de leurs enfants ; fait que nous confirmons.

Selon divers auteurs, ces espèces sont également présentes dans le sang et le lait des mères, ce qui suggère leur transit depuis les cellules intestinales aux glandes mammaires à travers le sang. Ces bactéries sont ensuite transmises au bébé à travers le lait maternel.

Les travaux réalisés dans cette thèse sont présentés en six chapitres, nous y abordons une étude bibliographique avec présentation du contexte du travail, la présentation des travaux par un détail méthodologique pour expliciter le choix des outils et méthodes utilisés, une discussion sur les résultats apportés par l'étude. Enfin un dernier chapitre présente la conclusion et perspectives des travaux.

Une première partie présente les différents termes et concepts biologiques apportés par les méthodes dites culture dépendante, permettant d'évaluer qualitativement et quantitativement la flore intestinale. Une deuxième partie traite de la métagénomique et des méthodes culture indépendante associées, constituant un tournant majeur dans les méthodes de caractérisation des flores. Enfin, une présentation de travaux sous forme de papier scientifique.

En perspective, on essayera d'aborder différentes méthodes bioinformatiques de caractérisation d'échantillons métagénomiques, en présentant leurs limites sur des échantillons peu caractérisés et de forte complexité.

I-1-Anatomie et physiologie du système gastro-intestinal:

Le système digestif se compose du tractus digestif, des organes et glandes qui lui sont associés. Le tractus digestif comprend la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le gros intestin et l'anus. Les organes annexes sont le foie, le pancréas et la vésicule biliaire **(Wolff & McLean Heitkemper, 2011)**.

Le tractus digestif est un tube mesurant environ neuf mètres de long, qui s'étend de la bouche jusqu'à l'anus. Sa paroi se compose sur toute sa longueur des mêmes quatre tuniques qui sont, de l'intérieur vers l'extérieur : **(Figure N°1) (Figure N°2) (Figure N°3)**

- ✧ la muqueuse,
- ✧ la sous- muqueuse
- ✧ la musculieuse
- ✧ la séreuse

Dans l'œsophage, la couche externe est l'adventice, qui est formée de tissu fibreux plutôt que d'une véritable séreuse. La musculieuse se compose de deux couches : une couche circulaire (interne) et une couche longitudinale (externe) **(Wolff & McLean Heitkemper, 2011)**.

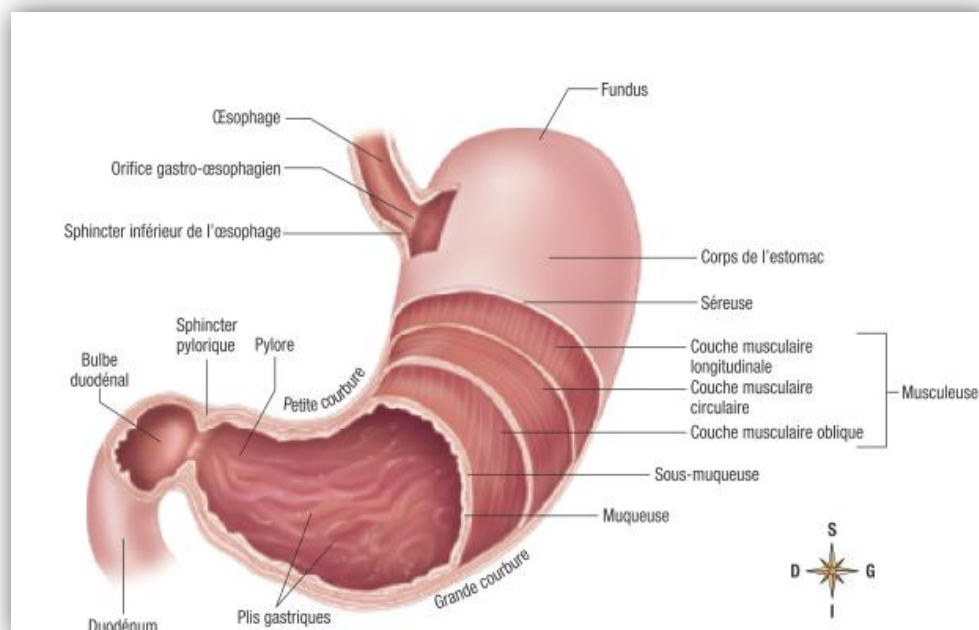


Figure N° 1 : Parties de l'estomac (Wolff & McLean Heitkemper, 2011)

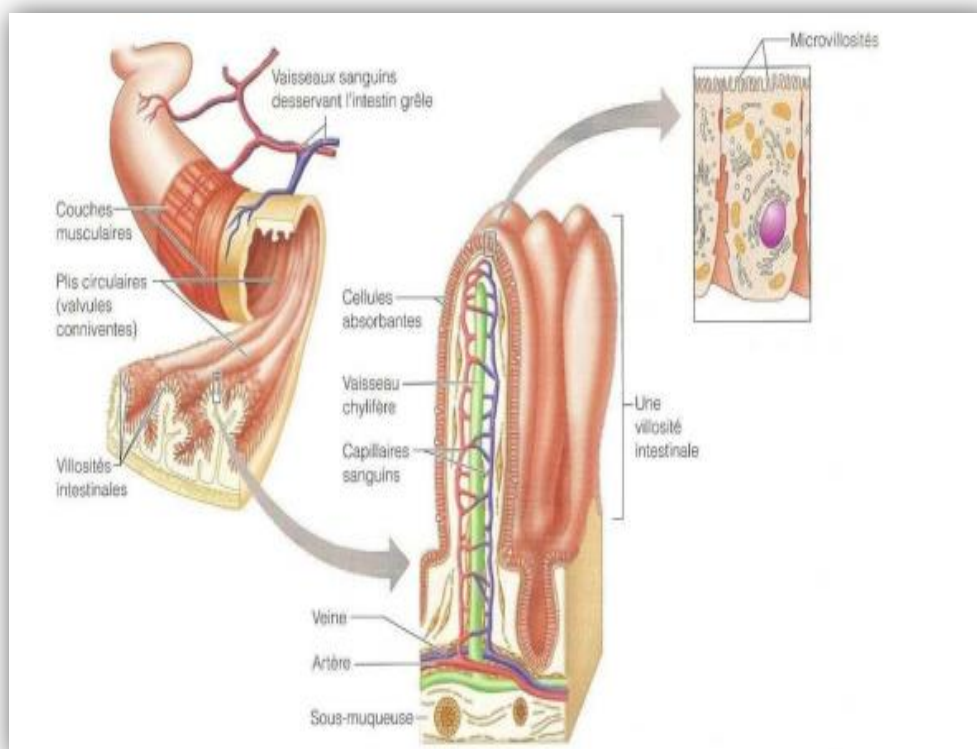


Figure N°2: Les modifications structurales de la paroi de l'intestin grêle (Marieb, 2006)

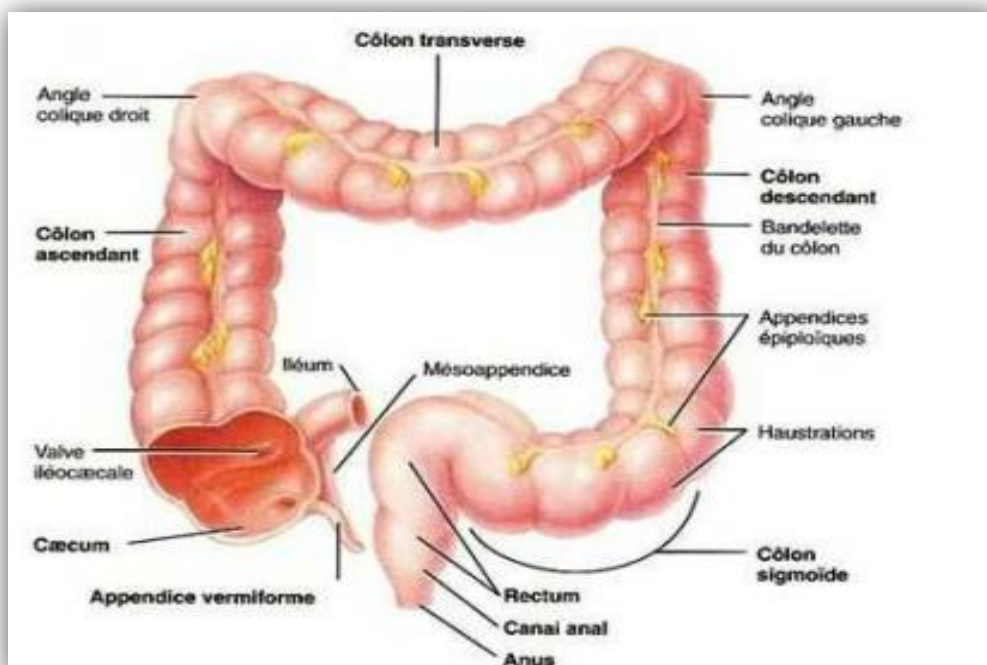


Figure N°3: Vue antérieure du gros intestin (Tortora & Derrickson, 2007)

I-2-Le microbiote intestinal :

I-2-1- Définition:

Le microbiote, que l'on l'appelait flore, désigne les communautés de micro-organismes qui résident ou transitent dans le tube digestif. Sa composition varie dans différentes niches aux conditions écologiques très différentes (gencives, estomac, mucus, côlon, etc.) **(Marteau, 2013)**.

L'organisme humain est habité par de nombreuses bactéries principalement situées dans l'intestin et connues sous le nom de microbiote intestinal. Pour donner quelques chiffres, 1 gramme de selles humaines contient environ 100 milliards de bactéries et il est admis que l'intestin d'un individu contient 1 à 2 kilogrammes de bactérie **(Nicolas, 2016)**.

Le microbiote intestinal représente une biomasse et un potentiel génétique considérable avec 10^{14} bactéries correspondant à environ 1000 espèces bactériennes, et plus 5 millions de gènes ce qui dépasse largement le nombre de cellules et gènes eucaryotes **(Sommer & Backhed, 2013) (Figure N°4)**.

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 **(Landmana & Quévrain, 2015)**.

Le terme de microbiote intestinal a remplacé celui plus ancien de flore **(Marteau, 2013)**.

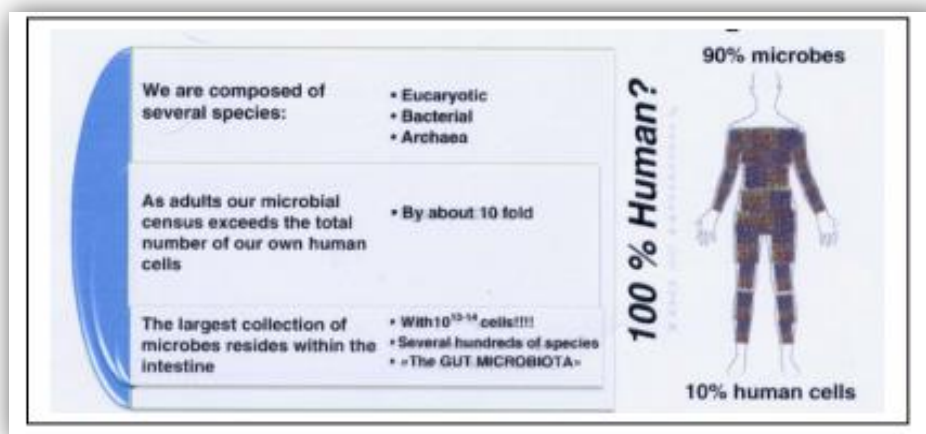


Figure N°4: Le petit monde dans l'intestin Disponible sur :

<http://www.drobionov.com/fr/human-microbiome/the-intestinal-microbiota/>

I-3-Répartition topographique de la flore intestinale:

La flore intestinale varie longitudinalement tout le long de l'intestin, mais aussi transversalement entre lumière et muqueuse intestinale. En fonction des niveaux de l'intestin, une flore différente est retrouvée, correspondant à des habitats différents ou niches écologiques spécifiques. Les méthodes classiques de culture ont montré que la flore bactérienne se densifie de l'intestin grêle à motricité importante au côlon à motricité réduite (**Rambaud et al., 2004**).

Dans l'ensemble, la distribution de la flore intestinale dépend essentiellement du pH et du gradient d'oxygène. Un gradient croissant du nombre des espèces est observé de l'estomac vers le côlon. Le pH, très bas dans l'estomac (pH=2), augmente progressivement jusqu'au voisinage d'un pH 7-8 dans le côlon distal. Ce gradient est créé par les cellules de notre organisme, via la sécrétion d'acide gastrique, mais également via le métabolisme de la flore elle-même (**Burcelin & Amar, 2009**).

- ⌘ **Au niveau de l'estomac:** l'estomac contient très peu de bactéries résidentes ($<10^3$ UFC/g) composées d'espèces des genres *Lactobacillus* et *Enterococcus* ainsi que des levures. La flore est quasi inexistante en raison de pH bas autour de 2 (**Marteau et al., 1993**).
- ⌘ **Au niveau de l'intestin grêle:** après le passage de l'estomac à pH acide, le pH redevient neutre, l'oxygène se raréfie et la flore bactérienne qui a survécu au passage gastrique va augmenter progressivement du duodénum à l'iléon. La flore du duodénum-jéjunum n'excède pas 10^4 à 10^6 UFC/g de contenu intestinal et est composée d'espèces aérobie-anaérobie facultatives (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*) appartenant à la flore de passage. La flore iléale est plus importante, atteignant 10^5 à 10^7 UFC/g de contenu intestinal avec une flore anaérobie stricte prédominante appartenant au genre *Bacteroides* associée à une flore anaérobie facultative. Cette flore bactérienne ne dépassant pas 10^7 UFC/g n'assurerait pas de fonctions majeures en dehors de situations pathologiques (**Rambaud et al., 2004**).
- ⌘ **Au niveau du côlon:** le côlon est le segment le plus riche en bactéries. Les taux atteignent 10^9 à 10^{11} UFC/g de contenu. Dans le côlon, le transit, très fortement ralenti et associé à un très bas potentiel d'oxydoréduction, est à l'origine de l'augmentation importante de la population bactérienne anaérobie.

Le côlon, où la compétition pour l'espace et les nutriments contribue à maintenir l'intégralité de la microflore, est la seule zone colonisée de façon permanente par une flore résidente (**Rambaud et al., 2004**).

✂ **Au niveau de fèces** : la flore fécale a été la plus étudiée et contient 10^9 à 10^{11} UFC/g de fèces. Quarante pour cent du poids des selles correspond à des micro-organismes (**Rambaud et al., 2004**) (**Figure N° 5**).

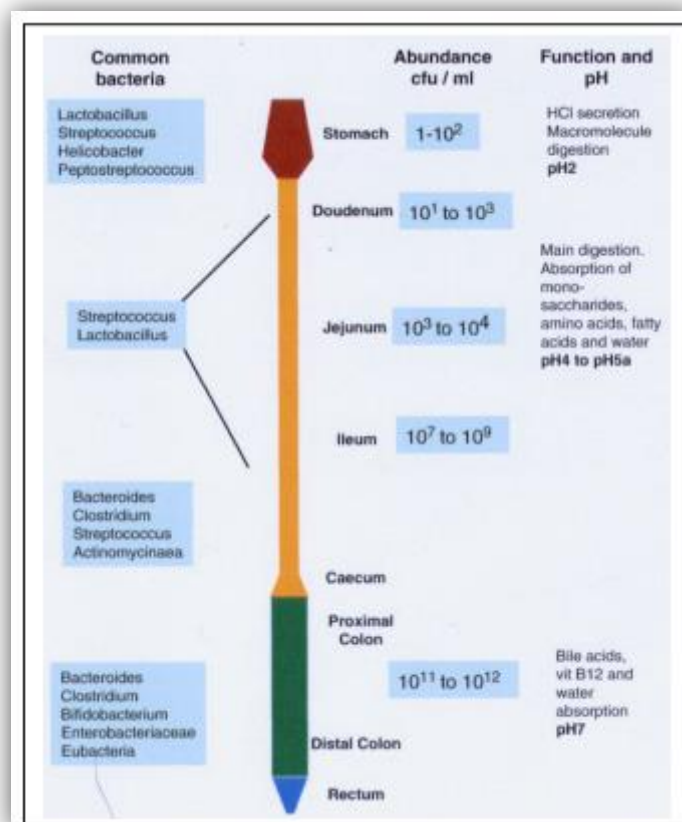


Figure N° 5: Représentation schématique du tractus intestinal montrant la répartition et l'abondance des bactéries (UFC/ml) au niveau des différents segments (**Arulampalam & Korecka, 2012**)

A côté de la flore résidente ou autochtone, comprenant la flore dominante et la flore sous-dominante, on trouve aussi une flore de passage ou allochtone. (**Rambaud et al., 2004**).

La flore dominante, présente à des taux de 10^9 à 10^{11} UFC/g, est essentiellement composée de bactéries anaérobies strictes, parmi lesquelles des bacilles à Gram négatif du genre *Bacteroides* en nombre important, des bacilles des Gram positif des genres *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, ainsi que des cocci à Gram positif comme des *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*. (Rambaud et al., 2004).

La flore sous dominante, présente des taux de 10^6 à 10^8 UFC/g, se compose des bactéries aéro-anaérobies facultatives. Ces bactéries appartiennent à différentes espèces de la famille de *Enterobacteriaceae* (surtout *Escherichia coli*) et aux genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*. (Rambaud et al., 2004).

La flore de passage est variable et ne s'implante pas au sein du tube digestif, sauf lors de circonstances pathologiques. Cette flore se trouve à des taux inférieurs à 10^6 UFC/g. Très polymorphe, elle est représentée par des entérobactéries du genre *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* ou *Enterobacter* mais aussi par des *Pseudomonas*, des staphylocoques et des levures essentiellement *Candida* (Rambaud et al., 2004).

I-4-Composition du microbiote intestinal et son évolution:

Le microbiote intestinal est composé de 10^{14} micro-organismes réparti en 160 espèces bactériennes chez un individu donné parmi le millier d'espèces qui ont pu être identifiées dans différentes cohortes humaines. Ces 10^{14} bactéries sont réparties en 4 phyla bactériens : Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteries, et Proteobacteries. Les Firmicutes et les Bacteroidetes constituent les deux phyla dominants du microbiote avec une représentativité respective de 60–75 % et 30–40 %.(Landmana & Quévrain, 2015) (Figure N°6).

Les genres cultivables du microbiote fécal dominant des adultes sont *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium* et *Bifidobacterium* (Moore & Holdeman, 1974; Finegold et al., 2002).

La prise en compte des microorganismes non cultivables a affiné cette vision et l'a placée dans un cadre phylogénétique. Le phylum des Firmicutes est toujours fortement représenté. Il comprend les *Eubacterium rectale* – *Clostridium coccoides*, souvent les plus représentés (14 à 31 % des bactéries totales selon les études) (Franks et al., 1998; Seksik et al., 2003).

Il est constitué d'espèces appartenant aux genres *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*. Le phylum des Firmicutes comprend également le groupe *Clostridium leptum* avec les espèces *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus albus* et *R. flavefaciens* ; ce groupe est également très souvent dominant (16 à 22 % en moyenne) (Sghir *et al.*, 2000; Lay *et al.*, 2005) . Les Bacteroidetes sont représentés par des genres liés à *Bacteroides*. Ils sont toujours présents et partagent la dominance avec les groupes indiqués ci-dessus (9 à 42 % des bactéries totales en moyenne). Le phylum des Actinobacteria est moins systématiquement détecté comme dominant, mais il représente un petit pourcentage des bactéries totales. Il comprend les bifidobactéries (0,7 à 10 %) et les bactéries du groupe Collinsella-Atopobium (0,3 à 3,7 % en moyenne) (Rigottier-Gois *et al.*, 2003; Harmsen *et al.*, 2000) (Tableau N° 1) .Les entérobactéries sont plus rarement observées dans les deux logarithmes supérieurs de la population du microbiote fécal (0,4 à 1 %), comme c'est également le cas des lactobacilles et des streptocoques (2 %) (Lay *et al.*, 2005).

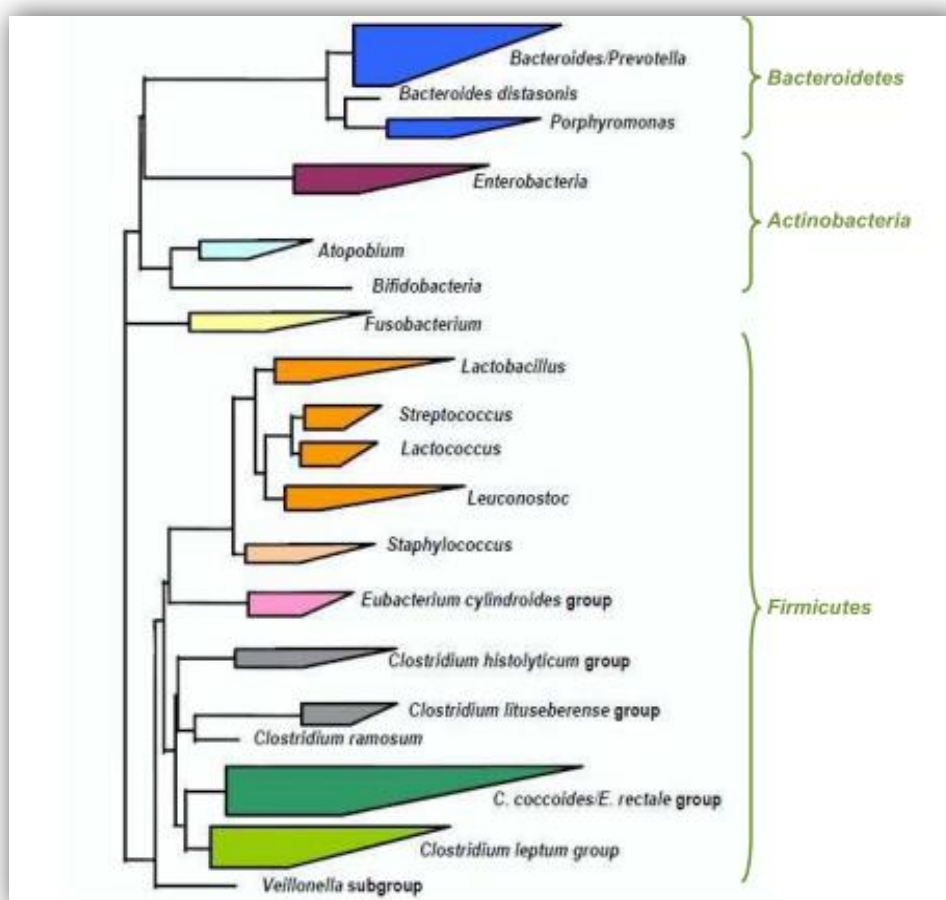


Figure N°6 : Arbre phylogénétique des principaux groupes bactériens du microbiote fécal dominant chez l'adulte en bonne santé (Bocle & Thomann, 2005)

Tableau N° 1: Taxonomie des principales espèces bactériennes constitutives du microbiote intestinal humain (**Breban, 2016**)

Abondance relative	Phylum	Genre	Métabolisme anaérobie	Coloration de Gram
Flore dominante 30-52%	Firmicutes	<i>Eubacterium</i> <i>Clostridium</i> <i>Clostridium</i> <i>Ruminococcus</i> <i>Butyrivibrion</i>	Strict Strict Strict Strict Strict	++ ++ ++ ++ ++
9-42%	Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i> <i>Prevotella</i> <i>Porphyromonas</i>	Strict Strict Strict	- - -
1-13%	Actinobactéries	<i>Bifidobacterium</i> <i>Colinsella</i> - <i>Atopobium</i>	Strict Strict	++ ++
Flore sous-dominante 2% 2% 0.4-1%	Lactobacillae Streptocoques Entérobactéries		Strict Facultatif Facultatif	++ ++ -

I-5- Établissement du microbiote intestinal chez le nouveau-né:

Le nouveau-né, stérile in utero, se retrouve à la naissance en contact avec des bactéries qui vont rapidement coloniser son tube digestif. Fluctuant au début de la vie, l'assemblage du microbiote intestinal humain s'équilibre après quelques années chez l'enfant puis reste relativement stable au cours du temps chez l'individu adulte sain, en l'absence de perturbations extérieures (infections, antibiothérapies. . .) (**Gérarda, 2014**) .

La première exposition à la flore maternelle a lieu lors du passage du vagin pendant l'accouchement (**Mandar & Mikelsaar, 1996**).

À la naissance, un écosystème riche et dynamique se développe à partir d'un environnement stérile (**Palmer et al., 2007**). En quelques heures, les bactéries commencent à apparaître dans les selles. Dans un premier temps, le tube digestif est colonisé par les anaérobies facultatifs, mais progressivement, la consommation d'O₂ par ces bactéries permet la croissance ultérieure des anaérobies stricts (**Vael & Desager, 2009**). Le niveau de colonisation de l'intestin du nouveau-né est estimé à 10⁸ à 10¹¹ UFC/g de fèces, 48 heures après sa naissance (**Gothefors, 1980; Campeotto et al., 2007**).

En effet, des études indiquent qu'en général, les nouveaux-nés sont premièrement colonisés par des entérobactéries (*Escherichia coli*), des staphylocoques, des entérocoques (*Enterococcus faecalis*), des streptocoques et des lactobacilles qui semblent créer un environnement réduit favorable à l'établissement deux à trois jours après la naissance des bactéries appartenant à des genres comme *Bacteroides*, *Bifidobacterium* et *Clostridium* ainsi que les lactobacilles supportant mal l'oxygène (**Favier et al., 2002 ; Coudeyras & Forestier, 2010**).

La transmission des bactéries des flores vaginale et fécale de la mère a été clairement montrée. Toutefois, la flore fécale maternelle apparaît être le déterminant essentiel des premières bactéries à s'implanter, les nouveau-nés étant colonisés plutôt par les entérobactéries et bifidobactéries d'origine fécale que par les lactobacilles d'origine vaginale (**Tannock et al., 1990**).

Le nouveau-né est ensuite continuellement exposé à de nouvelles bactéries provenant de l'environnement, de la nourriture et des bactéries cutanées de l'adulte via les tétées. Son microbiote intestinal va alors progressivement se diversifier. On considère qu'un microbiote fonctionnellement stable proche de celui de l'adulte est atteint entre deux et quatre ans (**Kleessen et al., 2000**).

I-6-Développement normal de la flore intestinale:

Lorsque la naissance se passe de façon naturelle, le profil de colonisation bactérienne intestinale du nouveau-né est assez stéréotypé. On peut le diviser en 4 phases durant la première année chez l'enfant allaité. Au-delà, le profil bactérien de la flore intestinale se rapproche de celui de l'adulte avec 10^{10-11} UFC/g de contenu colique (**Langhendries, 2006**).

§ Phase 1 :

La colonisation du tube digestif débute dès la rupture des membranes fœtales et se poursuit pendant plusieurs mois. À la naissance, le nouveau-né se colonise principalement à partir des flores maternelles fécale et vaginale, L'écologie bactérienne de l'environnement immédiat du lieu de la naissance est également importante, avec une flore assez rudimentaire qui atteint cependant en une semaine un niveau quantitatif de l'ordre de 10^{10} à 10^{11} unités formant colonie (UFC) par gramme de selles (**Goulet, 2009**).

§ Phase 2:

Dans les jours qui suivent, la concentration des germes anaérobies stricts (bifidobactéries et lactobacilles) augmente jusqu'à avoisiner 10^9 UFC/ml au dixième jour. Par ailleurs, le profil bactérien se diversifie avec augmentation en nombre d'*Escherichia coli*, *Bacteroides spp* et pour une moindre part de Clostridia. Le groupe des staphylocoques diminue parallèlement. Cette deuxième phase est clairement influencée par l'alimentation. Dès la fin de la première semaine, mais surtout à 1 mois de vie, les enfants nourris exclusivement au sein ont un contenu intestinal nettement plus riche en bactéries anaérobies strictes notamment en bifidobactéries et, dans une moindre mesure, en lactobacilles (**Langhendries, 2006**).

§ Phase 3:

La troisième phase démarre avec le début de la diversification alimentaire. Les différences entre l'enfant nourri au sein et celui nourri au lait artificiel s'estompent. Les entérobactéries augmentent en nombre de même que les streptocoques et les Clostridia. La flore anaérobie stricte plus diversifiée augmente également durant cette phase, au profit de variétés microbiennes très spécifiques du côlon (*Fusobacterium*, *Eubacterium*, etc.). (**Langhendries, 2006**).

§ Phase 4:

À la fin de la première année, la composition de la flore intestinale se rapproche de celle de l'adulte. Cette quatrième phase est marquée par la très grande augmentation de la flore anaérobie stricte dans la partie distale du côlon. Cela suggère que la flore anaérobie stricte, surtout composée de bifidobactéries et de lactobacilles, et majoritaire chez les enfants non allergiques, soit la mieux à même de contrôler la réponse immunitaire innée du chorion sous-muqueux, étape fondamentale de l'initiation ultérieure de l'immunité adaptative (Langhendries, 2006).

I-7- Facteurs agissant sur la colonisation bactérienne:

Différents facteurs exercent une influence sur la composition de la flore intestinale qui s'implante : l'âge gestationnel, le mode d'accouchement, par voie vaginale ou par césarienne ainsi que l'environnement du lieu de naissance. L'hygiène de plus en plus stricte entourant les accouchements dans les pays à haut niveau de vie est, sans doute, responsable d'une moindre colonisation par les bactéries de la flore maternelle par rapport à la colonisation par des bactéries de l'environnement (Gronlund *et al.*, 1999) (Figure N°7).

I-7-1-Influence du mode d'accouchement :

Le mode d'accouchement influence fortement les conditions de la colonisation du tractus gastro-intestinal du nouveau-né. Des études rapportent que les enfants nés par césarienne présentent une composition du microbiote différente de celle des enfants nés par voie basse. De plus, la population bactérienne du microbiote intestinal des enfants nés par voie basse est semblable à celle du microbiote vaginal de leur mère tandis que le microbiote intestinal des enfants nés par césarienne présente des similitudes avec le microbiote cutané de la mère (Huurre *et al.*, 2008, Reid *et al.*, 2011, Biasucci *et al.*, 2010, Dominguez-Bello *et al.*, 2010). Une césarienne entraîne une diminution de la proportion de bifidobactéries et de *Bacteroides fragilis*, tandis que parallèlement la proportion d'*E. coli*, de *Staphylococcus*, de *Streptococcus* et de *C. Difficile* est plus importante (Penders *et al.*, 2006a).

Les enfants nés ainsi sont souvent amenés à passer un séjour plus long à l'hôpital et à recevoir un traitement antibiotique. De plus, a été constaté une hausse de 20% de la prévalence d'asthme et de phénomènes allergique chez les enfants nés par césarienne (Bjorksten *et al.*, 1999).

Ce sont les enfants nés par voie vaginale au domicile de la mère, et exclusivement nourris au sein, qui ont la flore la plus bénéfique, avec une proportion importante de bifidobactéries et une abondance diminuée en *E. coli* et en *C. difficile* (Penders *et al.*, 2006a).

I-7-2-Influence du terme de naissance:

Le microbiote intestinal des nouveau-nés prématurés est moins diversifié et présente un retard d'implantation, notamment pour les espèces anaérobies strictes, comparé à celui des nouveau-nés à terme (Campeotto *et al.*, 2007). Si la flore aérobie colonise assez rapidement le prématuré, la flore anaérobie (*Bifidobacterium* et *Bacteroides*) est retardée. Ce retard d'implantation peut s'expliquer par le fait que les enfants plus fréquemment nés par césarienne, sont rapidement séparés de leurs mères et placés dans un environnement de soins intensifs très aseptisé et fréquemment soumis à une antibioprophylaxie à large spectre. D'autre part, il a été observé une colonisation considérablement plus importante en fréquence mais aussi en quantité de *Clostridium difficile* (Penders *et al.*, 2006a).

I-7-3- Influence de l'alimentation:

La composition chimique du régime alimentaire apparait avoir un rôle déterminant pour la définition du microbiote intestinal du tractus gastro-intestinal immature (Poroyko *et al.*, 2011).

Les enfants nourris au sein développent une flore qui est dominée par des bifidobactéries et des lactobacilles qui représentent entre 60 et 91% de la microflore intestinale (Cinquin, 2005). De plus on observe une diminution de la proportion d'*Escherichia coli* et de *Clostridium difficile* pour ces enfants exclusivement allaités (Penders *et al.*, 2006a).

En revanche, les enfants nourris au lait infantile développent une microflore plus complexe avec une baisse de l'abondance des bifidobactéries qui dominent toujours mais à 40% seulement, avec des bactéries anaérobies strictes telles que *Bacteroides*, *Clostridium* et *Staphylococcus*. Il a de plus été observé que les enfants nourris avec des formules infantiles sont plus touchés par les troubles gastro-intestinaux telles les diarrhées infectieuses (à rotavirus en particulier), et ont un risque plus élevé de développer des allergies, notamment alimentaires. L'absence d'allaitement représente, après la prématurité et l'accouchement par césarienne, un risque important de dysbiose (**Association Française de Médecine Orthomoléculaire, 2010**).

La diversification du régime alimentaire étant une période critique, les caractéristiques des aliments consommés notamment leur teneur en bactéries et en nutriments, pourront influencer la variabilité du microbiote intestinal. Par exemple, le microbiote intestinal des individus végétariens ne semble pas contenir le groupe *Faecalibacterium prausnitzii* qui peut être associé à une consommation plus importante de viandes et de poissons (**Hayashi et al., 2002**).

I-7-4-Influence de l'antibiothérapie:

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

Une étude chez le rat a montré qu'un traitement à base d'amoxicilline durant la période du sevrage affecte la maturation de 10 à 30% des gènes impliqués dans la fonction de barrière intestinale, ces effets étant dus à l'altération du microbiote intestinal (**Schumann et al., 2005**).

D'autres médicaments comme les anti-acides, les inhibiteurs des pompes à protons, ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent modifier l'environnement intestinal et donc perturber l'équilibre au sein du microbiote (**Huffnagle, 2010**).

I-7-5-Influence de l'environnement et des conditions d'hygiène:

L'environnement joue un rôle important dans la colonisation intestinale. Certaines études ont mis en évidence une colonisation par les bifidobactéries plus fréquentes et à un niveau plus important chez les enfants nés dans les pays en voie de développement. Les procédures strictes d'obstétrique et d'hygiène appliquées dans les maternités au moment de la naissance semblent être à l'origine de la réduction de l'exposition aux microorganismes provenant de la mère et de l'environnement. Cela a pour conséquence de modifier le processus de colonisation du tractus gastro-intestinal du nouveau-né (**Campeotto et al., 2007**).

La théorie "hygiéniste" qui s'est développée dans les années 1990, suggère qu'une faible exposition à des agents infectieux durant l'enfance favoriserait l'émergence des maladies atopiques par défaut de mise en place des mécanismes de régulation du système immunitaire (**Strachan, 1989**).

I-7-6- Influence du terrain génétique:

Malgré le fait que le nouveau-né se retrouve confronté à une multitude de microorganismes à la naissance, son tractus gastro-intestinal ne sera colonisé que par certaines bactéries capables d'interagir de façon symbiotique avec l'hôte. L'influence du terrain génétique sur la modulation de la colonisation bactérienne a été mise en évidence par l'observation de l'importante similarité entre des microbiotes provenant de jumeaux. Différentes études rapportent en effet que les similarités au niveau de la composition du microbiote intestinal sont liées au degré de similitude du terrain génétique (**Hoeksma & Winkler, 1963; Van de Merwe et al., 1983; Stewart et al., 2005; Zoetendal et al., 2001**).

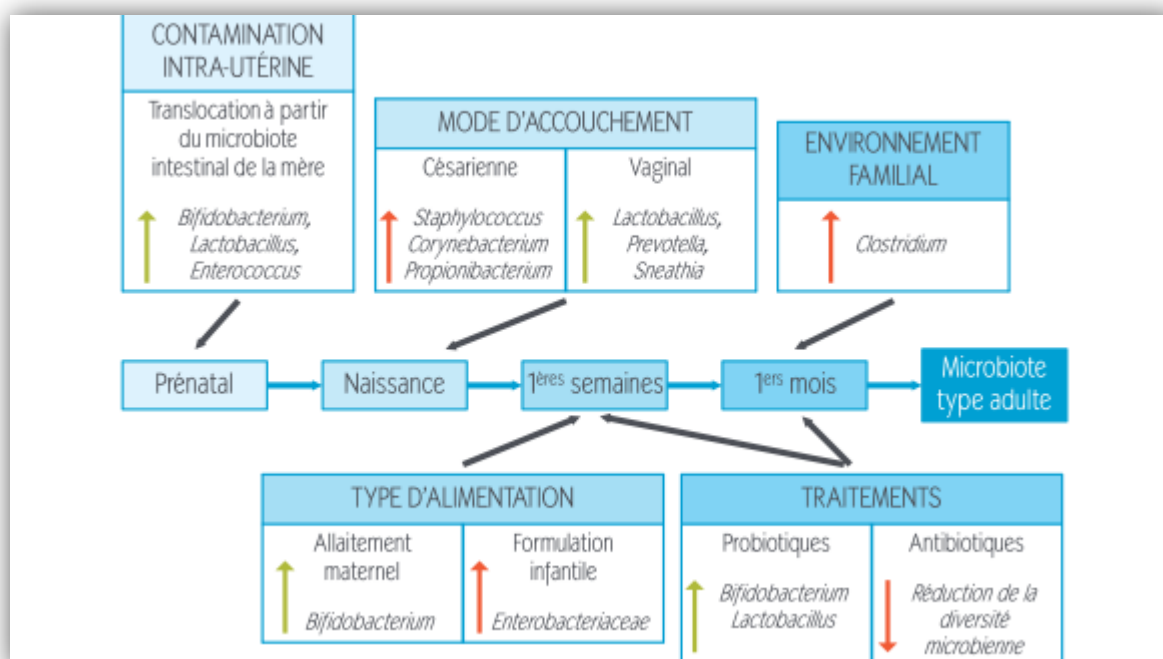


Figure N°7: Facteurs externes capables d'influencer l'établissement du microbiote intestinal chez le nourrisson ;

↑ : modifications bénéfiques ; ↑↓ : modifications considérées comme néfastes pour un développement sain. (Matamoros *et al.*, 2013).

I-7-7- Facteurs n'influençant pas la colonisation intestinale :

D'autres facteurs ont été étudiés, mais aucune corrélation n'a pu être trouvée avec la colonisation bactérienne dans la rupture des membranes amniotiques arrivant plus de 24 heures avant la délivrance, la saison de l'accouchement, la prise ou non d'antibiothérapie par la mère pendant la grossesse (à l'exception du traitement avant l'accouchement chez les femmes porteuses de *Streptococcus agalactiae*) et la survenue d'une fièvre chez l'enfant. De plus, l'âge et le sexe de l'enfant n'influencent pas le microbiote (Penders *et al.*, 2006).

I-8- Fonctions du microbiote intestinal:

La présence permanente d'une importante biomasse bactérienne dans l'intestin exerce des effets physiologiques, pour la plupart bénéfiques pour l'hôte. Le microbiote intestinal peut même être considéré comme un véritable organe à part entière (Landmana & Quévrain, 2015) (Figure N°8).

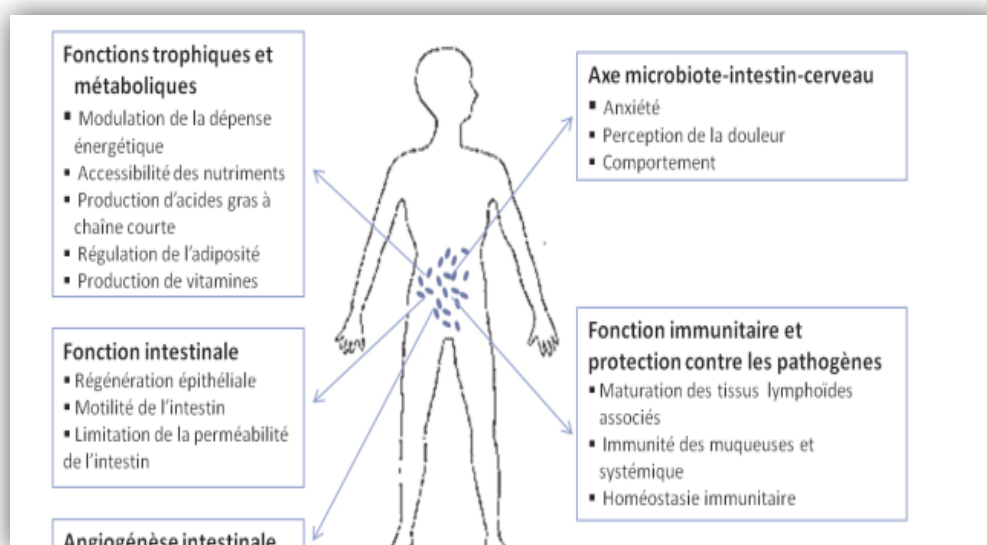


Figure N°8: Fonction du microbiote intestinal sur la physiologie de l'hôte
(Sommer & Bäckhed, 2013).

I-8-1-Fonctions métabolique et nutritionnelle:

Les principales sources d'énergie du microbiote intestinal sont les glucides et les protéines contenues dans les fibres alimentaires non digérées par l'hôte dans le tractus digestif supérieur et qui parviennent dans le côlon. La nature et la quantité des substrats disponibles dépendent donc des individus et de leur régime alimentaire qui constitue un facteur environnemental susceptible d'influencer l'équilibre du microbiote. La biotransformation de ces différents substrats par le microbiote colique, d'une part, permet aux bactéries d'obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance et, d'autre part, génère la production d'une diversité de métabolites qui sont pour la plupart absorbés et utilisés par l'hôte (Landmana & Quévrain, 2015) .

I-8-1-1-Métabolisme des glucides:

La quantité de glucides fermentescibles arrivant au côlon varie de 10 à 60 g/j selon les individus et leur régime alimentaire. Différents groupes bactériens du microbiote colique humain participent à la dégradation anaérobie de ces substrats. La première étape de cette transformation est l'hydrolyse des polymères glucidiques en fragments de petite taille, assurée par des bactéries dites « fibrolytiques ». Les bactéries glycolytiques peuvent ensuite participer à la deuxième phase consistant à transformer les glucides produits. La majorité des espèces utilisent la glycolyse pour convertir les glucides en pyruvate qui est lui-même transformé en produits finaux de la fermentation (acétate, propionate, butyrate) qui sont des acides gras à chaîne courte (AGCC). Ils apportent de l'énergie, stimulent l'absorption colique de sodium et exercent des propriétés d'immunomodulation locale (**Quévrain & Seksik, 2013**).

I-8-1-2-Métabolisme des protéines

Dans un premier temps, l'hydrolyse des protéines par les enzymes protéolytiques (protéases) aboutit à la libération dans le côlon de peptides utilisables par la flore bactérienne, puis à des acides aminés. L'activité protéolytique est supportée par un nombre important de bactéries coliques (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*). Puis, la fermentation des acides aminés met en jeu des réactions d'oxydation et de réduction qui vont aboutir à la formation d'acides gras à chaînes courtes (butyrate, propionate et acétate), d'acides gras à chaînes courtes ramifiés (isobutyrate, 2-méthylbutyrate et isovalérate), de phénols, d'indole et d'ammoniac. Les phénols et l'indole sont ensuite détoxifiés par la muqueuse colique, puis excrétés dans les urines. L'ammoniac suit 2 voies distinctes, une partie est absorbée par l'intestin puis transformée en urée par le foie pour être éliminée dans les urines, l'autre partie est utilisée par les bactéries avec des hydrates de carbones pour former des acides aminés pour la synthèse de protéines bactériennes (**Cummings & Macfarlane, 1991**).

I-8-1-3- Métabolisme des lipides:

La flore intestinale exerce une action indirecte en modifiant le métabolisme du cholestérol et des sels biliaires. Les lipides servent de substrat aux lactobacilles et aux bifidobactéries, d'où la production d'acides gras à chaînes courtes, et notamment de propionate. Le propionate agirait alors de la même façon que les résines chélatrices de sels biliaires, en fixant les acides biliaires sous forme d'un complexe insoluble. Le cycle entéro-hépatique des acides biliaires est alors inhibé et leur élimination fécale augmentée. De plus, le cholestérol absorbé est alors utilisé pour la synthèse de nouveaux acides biliaires et le taux sanguin de cholestérol diminue (**Gibson, 2004**).

I-8-1-4-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, 1992**).

Les trois types de transformation principaux sont : en méthane par les archées méthanogènes (présents 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*) (**Landmana & Quévrain, 2015**).

I-8-1-5-Synthèse de facteurs vitaminiques:

Les microorganismes du côlon jouent aussi un rôle dans la synthèse des vitamines (**Hill, 1997**) et dans l'absorption du calcium, du magnésium et du fer (**Guarner, 2003**).

Enfin, les bactéries participent à la synthèse de facteurs vitaminiques :

- **Vitamine K** : qui intervient dans le processus de la coagulation sanguine et dans le métabolisme des os et d'autres tissus,
- **Cobalamine (B12)** : vitamine hydrosoluble essentielle au fonctionnement normal du cerveau, du système nerveux et à la formation du sang,

- **Acide folique (B9)** : vitamine hydrosoluble précurseur métabolique d'une coenzyme, le tétrahydrofolate, impliquée notamment dans la synthèse des bases nucléiques constituant les acides nucléiques (ADN et ARN) du matériel génétique. Cette coenzyme intervient également dans la synthèse d'acides aminés tels que la méthionine, l'histidine et la sérine,
- **Pyridoxine (B6)** : vitamine hydrosoluble qui intervient dans le métabolisme des acides aminés et du glycogène ainsi que dans la synthèse de l'ADN, de l'hémoglobine et de nombreux messagers chimiques du cerveau,
- **Biotine (B8)** : vitamine hydrosoluble et coenzyme qui participe au métabolisme des acides gras, des glucides et des acides aminés, ainsi qu'à la biosynthèse des vitamines B9 et B12,
- **Riboflavine (B2)** : vitamine hydrosoluble qui joue un rôle important dans la transformation des aliments simples (glucides, lipides et protéines) en énergie. Elle intervient dans le métabolisme de réparation des muscles. Les facteurs vitaminiques synthétisés constituent un apport complémentaire par rapport à l'alimentation. (Rofes, 2014).

I-8-2- Fonction protectrice: effet barrière :

Les bactéries du microbiote intestinal s'opposent à la colonisation du tractus gastro-intestinal par des bactéries de l'environnement externe pouvant être potentiellement pathogènes. De plus, elles permettent également de contrôler le développement excessif de bactéries pathogènes faiblement représentées au sein du microbiote intestinal. Cette fonction protectrice des bactéries commensales du microbiote intestinal est essentiellement due à la compétition pour les nutriments mais aussi à l'exclusion compétitive pour l'occupation des sites d'adhérence épithéliaux (Srikanth & McCormick, 2008).

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 (Hooper, 2004), 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 (Macpherson & Harris, 2004).

La flore intestinale est donc un biotope majeur, indispensable à l'acquisition et au maintien des fonctions digestives et immunitaires. Elle subit de nombreuses influences contrôlables ou elle doit être à tout prix préservée de toute altération dans son équilibre et peut être positivement modulée. Il convient de connaître les circonstances au cours desquelles la flore intestinale peut être altérée et, à l'inverse, comment il est possible de la moduler pour en augmenter son potentiel bénéfique **(Goulet, 2009)**.

La muqueuse intestinale comporte des invaginations, appelées cryptes de Lieberkühn, où sont situées les cellules souches dont la différenciation et la prolifération sont à l'origine du renouvellement de l'épithélium intestinal. Les cellules de Paneth situées au fond des cryptes, produisent des lysosymes et des défensines. De ce fait, elles participent activement à l'immunité innée. Les cellules calciformes produisent le mucus, les cellules entéro-endocrines produisent des hormones (catécholamines) et les entérocytes absorbants ont pour fonction d'absorber les nutriments. Le microbiote intestinal peut moduler la teneur en mucines du mucus en stimulant la différenciation des cellules calciformes. Il peut également influencer le niveau de production et de sécrétion des mucines **(Deplancke & Gaskins, 2001) (Figure N°9)**.

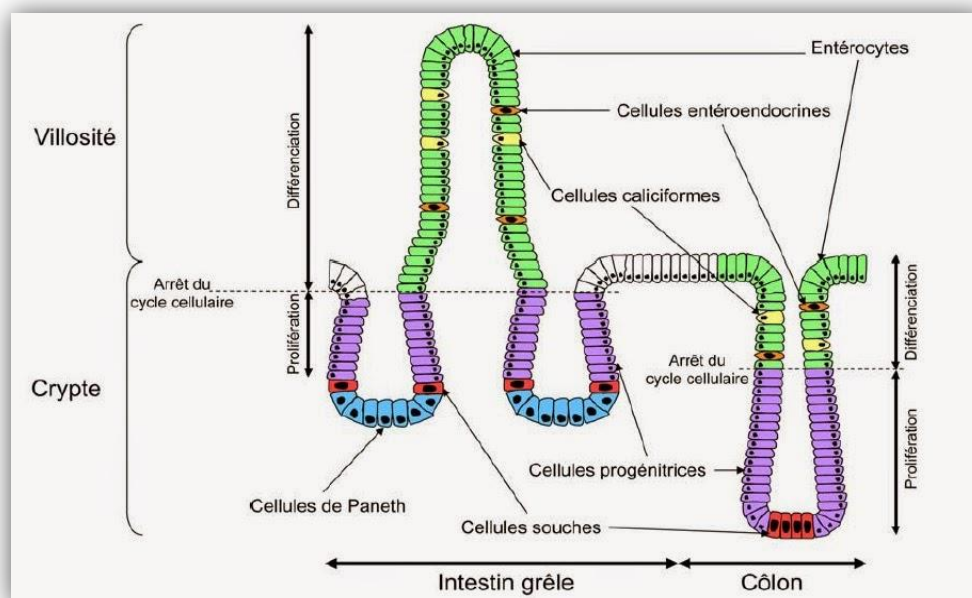


Figure N°9: Les cellules de l'épithélium intestinal

Disponible sur : <http://lescellulesouches.blogspot.com/p/les-cellules-souches-de-lintestin>.

La composition du mucus en mucines est régulée par le microbiote à la fois via la stimulation de la différenciation des cellules caliciformes qui les produisent et via la modification de leurs niveaux de synthèse et de sécrétion par ces mêmes cellules. Elles piègent les microorganismes grâce à la viscosité du réseau qu'elles forment et à leurs résidus glycosylés sur lesquels les bactéries se fixent par l'intermédiaire d'adhésines. Une partie des microorganismes fixés au mucus est d'ailleurs régulièrement éliminée avec le mucus flottant sous l'effet du passage du bol alimentaire dans le tube digestif ou sous l'action de l'épithélium cilié dans les voies respiratoires **(Coudeyras & Forestier, 2010)**.

I-9-Systèmes de communication au sein du super-organisme:

Autrefois considérées comme des organismes unicellulaires indépendants et peu coopératifs, les bactéries ont progressivement dévoilé leur forte capacité d'interaction et une nouvelle conception de leur organisation en société bactérienne a vu le jour, notamment au sein de l'écosystème complexe que représente le microbiote du tube digestif. Par sa densité et les diverses fonctions qu'il exerce, le microbiote intestinal peut être considéré comme un véritable organe. Cet organe n'est pas irrigué par un réseau vasculaire ou lymphatique mais développe d'autres systèmes de connexion, internes et externes, assurant son développement et sa stabilité au sein de l'hôte **(Lécuyer, 2012)**.

I-9-1-Dialogue bactéries-bactéries :

Les bactéries qui s'établissent dans l'intestin ne sont pas isolées les unes des autres mais organisées en réseau trophique, véritable organe bactérien, au sein duquel elles établissent différents systèmes de communication. Ce dialogue permet de coordonner l'activité du réseau trophique bactérien, de faciliter son adaptabilité face à des changements brutaux dans l'environnement digestif, et d'assurer ainsi sa pérennité. Les bactéries ont ainsi développé une pléthore de moyens au travers desquels elles sont capables d'échanger de l'information génétique, notamment par le système de transfert horizontal de gène, mais également de réguler l'expression de leur gène par le « quorum sensing » **(Lécuyer, 2012)**.

I-9-2-Dialogue hôtes - Microbes :

L'adhésion des microorganismes aux surfaces est essentielle. Des recherches récentes suggèrent que les cellules épithéliales de l'hôte peuvent exprimer des glycoconjugués spécifiques en réponse à la microflore intestinale indigène **(Lu & Walker, 2001)**. La bile est un puissant agent sélectif, puisqu'elle élimine la majorité des espèces bactériennes à des concentrations relativement faibles, quelque espèces y sont résistantes. Le suc pancréatique qui est riche en enzymes protéolytiques, lipolytiques, et saccharolytiques est aussi un puissant agent antimicrobien exerçant une action sélective sur la microflore **(Hill & Marsh, 1990)**.

I-10- Microbiote intestinal et système immunitaire:**I-10-1- Développement du système immunitaire intestinal :**

Le système immunitaire intestinal, dont les fonctions peuvent sembler contradictoires, joue un rôle très important dans la physiologie des mammifères. Il doit d'abord développer des réponses protectrices cellulaire et humorale envers les virus, bactéries ou parasites entéropathogènes. La réponse humorale est réalisée essentiellement grâce à la sécrétion d'anticorps spécifiques des muqueuses, les IgA, bloquant l'adhésion de bactéries pathogènes, la multiplication virale dans l'entérocyte et neutralisant les entérotoxines. La réponse cellulaire, quant à elle, fait appel aux lymphocytes intraépithéliaux qui permettent de maintenir l'intégrité de l'épithélium intestinal. Parallèlement à cette fonction protectrice, le système immunitaire intestinal doit également empêcher l'induction de réponses immunes envers les composants des aliments et des bactéries commensales présentes dans le tube digestif. Ce phénomène est nommé la tolérance orale **(Mowat, 2003)**.

Des études comparatives entre des souris axéniques et leurs homologues élevés classiquement en animalerie ont démontré le rôle essentiel joué par le microbiote dans le développement et la maturation du système immunitaire et donc sur ses fonctions. Les animaux axéniques présentent en effet de nombreuses anomalies au niveau du système immunitaire intestinal : hypoplasie des plaques de Peyer, nombre de lymphocytes intraépithéliaux réduits, concentration d'immunoglobulines sériques et production de cytokines limitées. Les anomalies observées ne se limitent cependant pas à l'épithélium intestinal puisque la rate et les ganglions lymphatiques des animaux axéniques sont non structurés et présentent des zones lymphocytaires atrophiées **(Macpherson & Harris, 2003)**.

L'ensemble de ces anomalies peut-être « réparé » en quelques semaines en inoculant un microbiote de souris conventionnelle à ces souris axéniques. Certains des mécanismes mis en jeu ont été établis et il a par exemple été montré que le polysaccharide A de *Bacteroides fragilis* était capable, à lui seul, d'induire la maturation du système immunitaire de souris axéniques (**Mazmanian et al., 2005**).

Les connaissances les plus récentes en immunologie ont permis de démontrer un lien entre la flore bactérienne, la muqueuse intestinale et le système immunitaire, notamment par l'intermédiaire du système immunitaire inné dont les « toll-like récepteurs » (TLR), sont les principaux acteurs. Cette colonisation bactérienne est donc essentielle dans la maturation du système immunitaire, notamment en stimulant la capacité de sécréter des immunoglobulines A, contribuant ainsi à la barrière immunitaire intestinale. Plus récemment, il a été établi que le système immunitaire du nouveau-né est immature, caractérisé par une réponse déséquilibrée des lymphocytes T helper 2 (Th2) supérieure à celle des Th1 de même qu'une insuffisance de lymphocytes T régulateurs. La colonisation progressive du tube digestif est, à cet égard, essentielle pour établir un équilibre entre les Th2 et les autres types de lymphocytes (Th1 et Th3) (**Ruemmele & Goulet, 2007**).

Le fonctionnement optimal du système immunitaire se situe alors entre infections et allergies. Insuffisant, il ne s'oppose pas assez efficacement à la pénétration des micro-organismes et de leurs toxines; excessif, il induit des réactions d'hypersensibilité : soit réactions allergiques (allergies digestives), soit intolérances digestives (maladie cœliaque), soit emballement du système immunitaire (maladie de Crohn, entérocolites auto-immunes etc.). Les mécanismes permettant au système immunitaire de différencier les pathogènes des bactéries du microbiote et de réagir en conséquence sont encore mal connus (**Coudeyras & Forestier, 2010**).

I-11- Implication du microbiote en pathologie humaine:

Des modifications de ce microbiote peuvent induire un état de dysbiose caractérisé par un déséquilibre de la composition comprenant des bactéries commensales bénéfiques (symbiontes), les bactéries pathogènes et les bactéries commensales ayant la capacité d'induire une inflammation excessive dans certaines conditions (pathobiontes) (**McLoughlin & Mills, 2011**) (**Figure N° 10**).

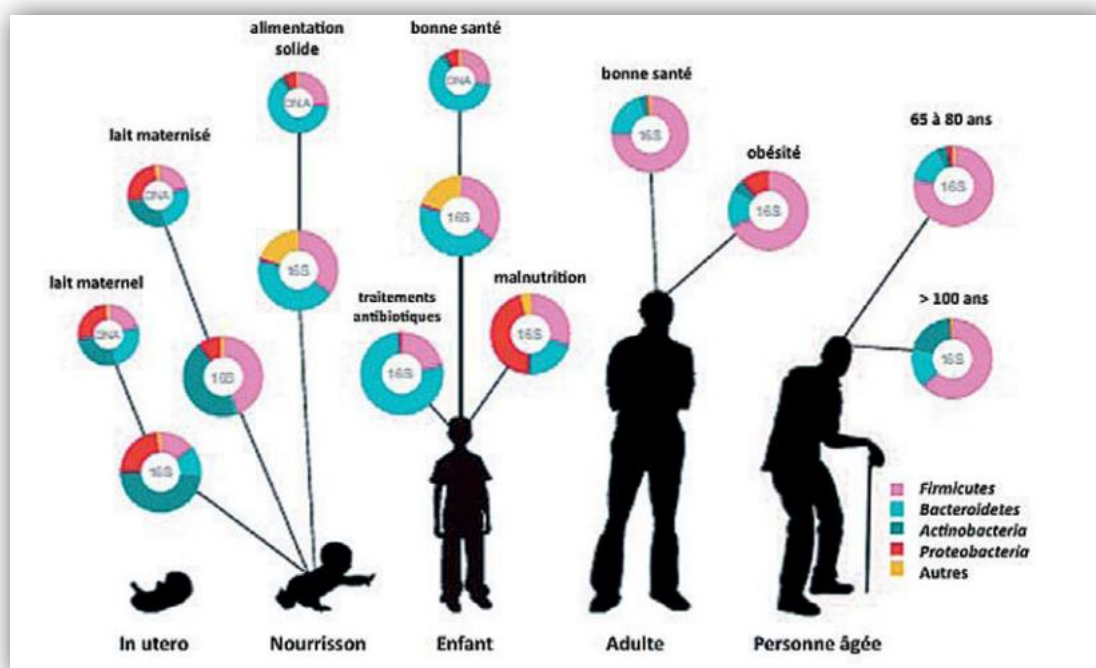


Figure N° 10 : Répartition relative des différents phyla au sein des microbiotes intestinaux de sujets sains ou atteints de désordres métaboliques aux différentes étapes de la vie (Ottman *et al.*, 2011).

I-11-1-Obésité:

L'obésité est définie comme un excès de poids qui est associé à de possibles conséquences sur la santé humaine comme un risque important de diabète, de maladies coronariennes, de cancers ou de maladies dégénératives (Bessesen, 2008).

L'obésité est associée à une dérégulation du bilan d'énergie en lien avec des interactions complexes entre notre biologie (notre génome) et nos modes de vie. Cette complexité s'étend aux perturbations tissulaires avec des altérations métaboliques et immuno-inflammatoire des tissus comme les tissus adipeux, foie, muscle, cerveau ainsi que l'intestin et, directement en lien avec lui, le microbiote intestinal (Clément, 2015) (Figure N° 11).

Le rôle du microbiote intestinal dans le stockage des graisses et l'obésité ont été récemment investigués. Des résultats parus dans le journal Nature suggèrent que le microbiote intestinal contribue à l'absorption par l'hôte de glucides et de lipides et régule le stockage des graisses. 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 obèse (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 Bacteroidetes et diminuée de Firmicutes, 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 possible lien entre le microbiote intestinal et l'obésité (**Backhed et al., 2005; Turnbaugh et al., 2006**).

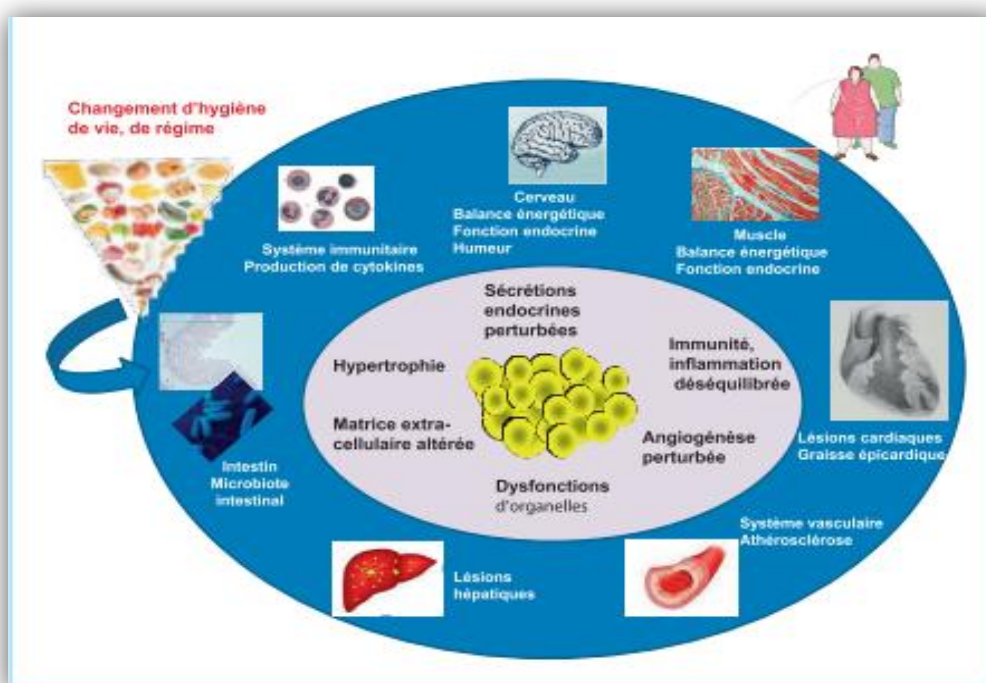


Figure N° 11 : Obésité : maladie de systèmes (Clément, 2015).

I-11-2- Allergie:

La relation entre le microbiote intestinal et le développement de maladies allergiques est évoquée dans la « microflora hypothesis » qui suggère qu'elle provient de la capacité du microbiote à moduler les réponses immunitaires au niveau intestinal dans les périodes précoces du développement ce qui peut directement affecter le développement de la réaction allergique et pourrait donc en partie expliquer l'émergence de maladies allergiques dans les pays industrialisés (**Vael et al., 2011; Nakayama et al., 2011**).

Parmi les données de la littérature, on retrouve également des études qui observent une diminution des bifidobactéries et une augmentation des espèces *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* dans le microbiote de patients allergiques (Vael *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2003). L'étude de Thompson-Chagoyan *et al.* (2010) rapporte l'observation de dysbioses au sein du microbiote intestinal d'enfants souffrant d'une allergie alimentaire (lait de vache) par rapport à des enfants non allergiques (Thompson-Chagoyan *et al.*, 2010).

I-11-3- Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI):

Le terme de MICI est une appellation générale désignant un ensemble de lésions inflammatoires chroniques, d'étiologie inconnue, atteignant le tractus digestif. Ces affections sont récidivantes, se cantonnent à certains segments du tube digestif avec des manifestations cliniques variées et souvent une évolution chronique peu prévisible. Ce terme recouvre notamment les colites ulcéreuses et la maladie de Crohn. Ces lésions inflammatoires sont la conséquence d'une activation du système immunitaire intestinal, pour laquelle les facteurs environnementaux (mode de vie, micro-organismes intestinaux, virus) et génétiques (prédisposition) commencent à être mieux connus (Macfarlane *et al.*, 2009).

Chez les patients atteints de MICI, il a été donc mis en évidence la présence d'un déséquilibre dans la composition du microbiote intestinal ou dysbiose. Cette dysbiose est caractérisée par un déficit en certaines bactéries, telles que *Faecalibacterium prausnitzii*, du groupe *Clostridium leptum*, mais aussi par une augmentation de certains pathogènes tels que *Escherichia coli* AIEC ou *Mycobacterium avium paratuberculosis* (Sokol *et al.*, 2009 ; Darfeuille-Michaud, 1998).

I-11-4-Syndrome de l'intestin irritable:

Le SII est un désordre gastro-intestinal chronique, caractérisé par des douleurs abdominales, des dysfonctionnements intestinaux (tels que la constipation) et des ballonnements (Agrawal & Whorwell, 2006).

Parmi de nombreuses études, une étude menée chez 6 patientes se plaignant de ballonnements a montré qu'elles présentaient une production de gaz supérieure à la normale avec un régime standardisé, et donc que ces symptômes pouvaient être reliés à une anomalie du microbiote aboutissant à une production anormale de gaz (King *et al.*, 1998).

I-11-5- Cancer colorectal (CR):

Comme dans de nombreuses pathologies tumorales ou auto-immunes, il est reconnu que le cancer du côlon est le résultat d'un mélange de facteurs tels que la génétique, l'environnement, le régime et l'hygiène de vie. Tous ces paramètres pourraient interagir avec le microbiote intestinal et avoir pour résultat une altération du profil de la flore durant la genèse et la croissance de la tumeur (**Zhang et al., 2011**).

Il existe une dysbiose, c'est-à-dire une modification de la composition du microbiote intestinal, chez les sujets souffrant d'un cancer colorectal (**Marchesi et al., 2011**).

Il a également été montré l'implication de toxines bactériennes dans la survenue du cancer colorectal. Par exemple, la génotoxicité de souches d'*Escherichia coli* produisant la colibactine, une toxine capable d'induire des cassures double-brin de l'ADN et une instabilité génétique au sein de cellules épithéliales intestinales en culture a été largement démontrée (**Nougayrede et al., 2006**).

I-11-6- Autisme :

Le lien entre le microbiote intestinal et l'autisme, qui est un trouble du développement neural et social, est suggéré par les observations suivantes : 1) Le début de maladie suit souvent une thérapie antimicrobienne, 2) des anomalies gastro-intestinales sont souvent présentes au début de l'autisme et persistent fréquemment, et 3) les symptômes de l'autisme sont parfois réduits par un traitement oral de vancomycine, tandis que la rechute arrive à l'arrêt du traitement (**Sekirov et al., 2010**).

Des études préliminaires ont montré qu'il existait une forme de dysbiose chez les enfants autistes avec une diminution de *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**).

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 (**Rao et al., 2009**).

De plus, l'examen de selles d'enfants atteints d'autisme a montré un taux multiplié par dix de *Clostridium spp* (**Finegold et al., 2002**).

I-11-7-Diabète:

Le diabète de type I, diabète insulino-dépendant (DID) est une maladie auto-immune médiée par les cellules T entraînant la destruction des cellules bêta du pancréas responsables de la sécrétion d'insuline. De manière surprenante, certains articles ont associé altération de la flore intestinale et progression du DID (**Brugman et al., 2006**).

En 2011, une première étude métagénomique pour comparer des selles d'enfants touchés par le DID (malades), d'enfants sains (contrôles) a été réalisée (**Brown et al., 2011**). Les principales différences sont rencontrées avec le genre *Bacteroides*, augmenté chez les diabétiques alors que le genre *Prevotella* était fortement diminué chez ces derniers. La diminution des *Bacteroides* chez les sujets sains comparés aux malades est entièrement compensée par les *Prevotella* et les bactéries productrices de butyrate telles qu'*Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Anaerostipes*, *Roseburia*, *Subdoligranulum* et *Faecalibacterium*. (**Figure N° 12**).

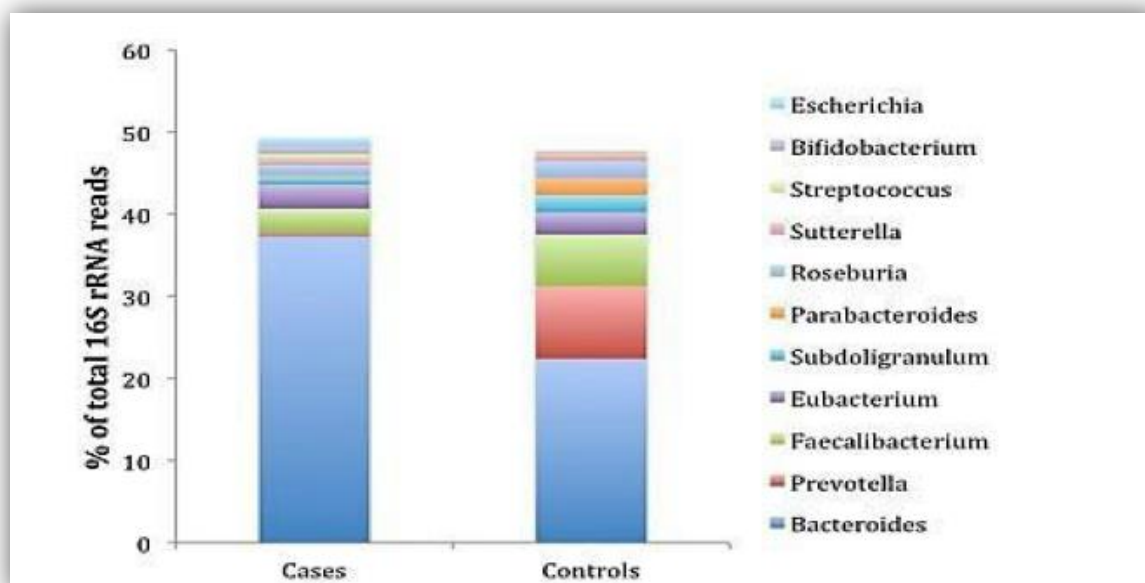


Figure N° 12 : Proportion moyenne des 11 genres bactériens les plus abondants entre les sujets diabétiques et sains (**Brown et al., 2011**).

II- L'allaitement :**II-1-L'allaitement maternel:****II-1-1- Définition:**

L'allaitement maternel est défini comme exclusif lorsque le nouveau-né ou le nourrisson reçoit uniquement du lait maternel à l'exception de tout autre ingesta, solide ou liquide, y compris l'eau. L'allaitement est partiel lorsqu'il est associé à une autre alimentation comme des substituts de lait, des céréales, de l'eau sucrée ou non ou toute autre nourriture (**Anaes, 2003**).

L'OMS recommande un allaitement maternel exclusif durant les six premiers mois de vie du bébé. Selon les experts, la poursuite de l'allaitement exclusif pendant six mois, par rapport à une durée de trois ou quatre mois, permet un développement optimal des nourrissons et doit être encouragée, l'introduction d'une alimentation complémentaire entre quatre et six mois n'apportant aucun bénéfice particulier (**Anaes, 2003**).

II-1-2- Anatomie et physiologie de la glande mammaire:**II-1-2-1- Anatomie :**

Le sein contient de 10 à 15 canaux galactophores, s'abouchant pour constituer un pore mamelonnaire après une dilatation appelée sinus lactifère. Ces canaux se ramifient en canaux secondaires jusqu'aux lobules. Les lobules sont constitués d'un canalicule extralobulaire se prolongeant par un canalicule intra-lobulaire dans lequel se jettent plusieurs canalicules terminaux ou acini . La paroi des acini est constituée par une couche de cellules épithéliales bordant la lumière des acinis et reposant sur des cellules myoépithéliales à activité contractile. L'ensemble se dispose sur une membrane basale .Les lobes sont classés en quatre types selon le nombre de lobules qui les constituent. Les lobes de type 1 sont les premiers à se former et sont ceux qui contiennent le moins de lobules, 11 lobules pour 80 lobules dans les lobes de types 3. (**Figure N° 13 et 14**). Le type 4 ne sera présent que durant la gestation et la lactation et correspond à la période de différenciation maximale des cellules épithéliales (**Russo, 2004**).

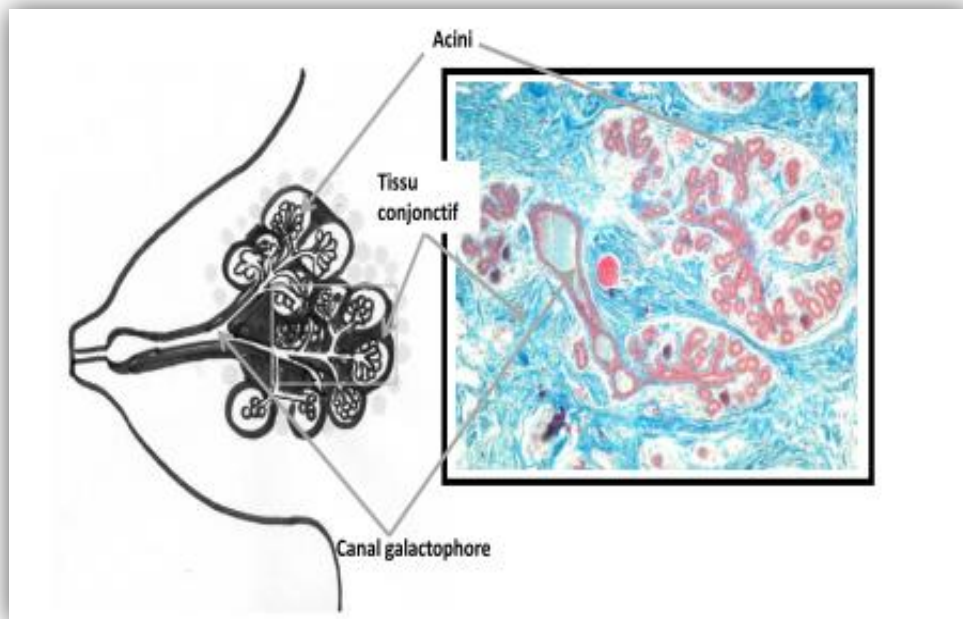


Figure N° 13: Coupe sagittale d'une glande mammaire au repos (**Basset, 2014**).

Le schéma de la glande mammaire à gauche est comparé avec la photographie de glande observée en MO (grossissement x100, coloration au trichrome de Masson) à droite. Sur la photographie, le bleu indique le collagène du tissu conjonctif, les acini et canaux apparaissent roses.

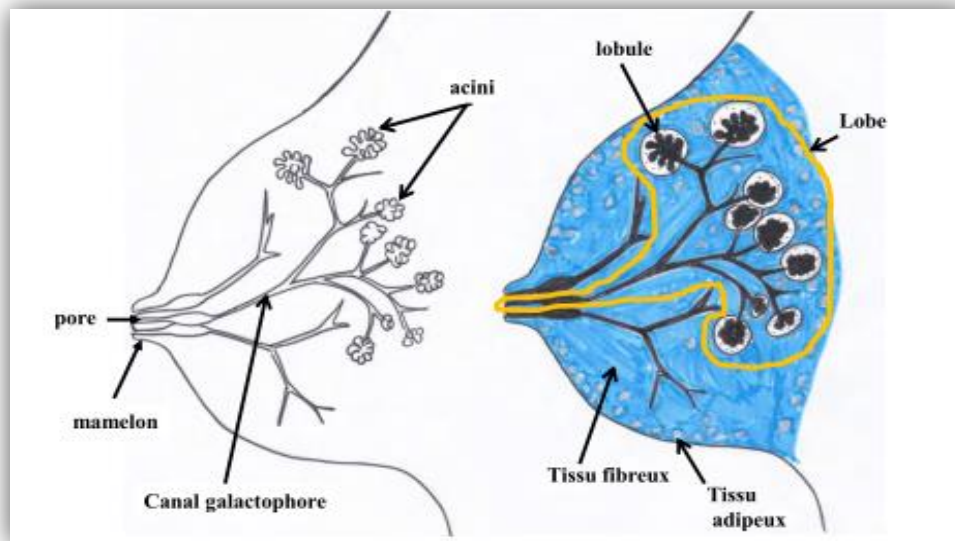


Figure N° 14: Schéma d'Histologie de la glande mammaire en coupe transversale (Basset, 2014).

Gauche : les canaux galactophores naissent au niveau de pores situés à la surface cutanée du mamelon. En pénétrant vers la profondeur de la glande, ils vont se ramifier et les dernières ramifications correspondent aux portions sécrétrices nommées acini. Droite : trois lobes sont représentés, dont un complet entouré en jaune avec ses lobules. La couleur bleue schématise le tissu conjonctif et les ronds gris le tissu adipeux.

II-1-2-2- Physiologie :

La glande mammaire est un organe spécialisé dans la nutrition du nourrisson. Le développement de la glande mammaire durant l'embryogenèse est identique chez l'homme et chez la femme. Le développement spécifique du sein de la femme commence à la puberté et est dépendant des œstrogènes produits par les ovaires ainsi que de la progestérone et de la prolactine. Après la puberté, la croissance et l'involution (régression du tissu) de la glande mammaire sont régulées par les cycles menstruels, la grossesse et la lactation. Chez la femme, le développement du sein se caractérise par la formation progressive des canaux et des lobes à partir de bourgeons terminaux. A chaque cycle menstruel la formation de cette structure progresse un peu et ce, jusqu'à l'âge de 35 ans. Les bourgeons terminaux forment les bourgeons alvéolaires qui formeront les acini au moment de la différenciation maximale qui a lieu durant la gestation et la lactation (Payre, 2008).

II-1-3- Physiologie de la lactation:**II-1-3-1- Le rôle de la fonction hormonale:**

Pour obtenir une production de lait maternel, il est nécessaire d'avoir un stimulus hormonal. Deux hormones jouent un rôle essentiel, il s'agit de l'ocytocine et de la prolactine (**Europe europa, 2010**).

II-1-3-1-1- L'ocytocine:**§ Sécrétion**

L'ocytocine est une hormone polypeptidique sécrétée par les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus puis stockée dans le lobe postérieur de l'hypophyse;

§ Régulation

La régulation de la sécrétion d'ocytocine est sous la dépendance d'un facteur nerveux. La succion du mamelon par l'enfant crée un arc réflexe dont les voies partent du sein pour atteindre l'hypothalamus et y stimuler la sécrétion d'ocytocine (**Figure N° 15**).

§ Rôle dans la lactation

L'ocytocine a pour propriété de stimuler les muscles lisses. Au niveau du sein, elle stimule la contraction des cellules myo-épithéliales péri-acineuses et péricanalaires, ainsi que les fibres du muscle aréolaire (**Groussin-Weyland, 2010**).

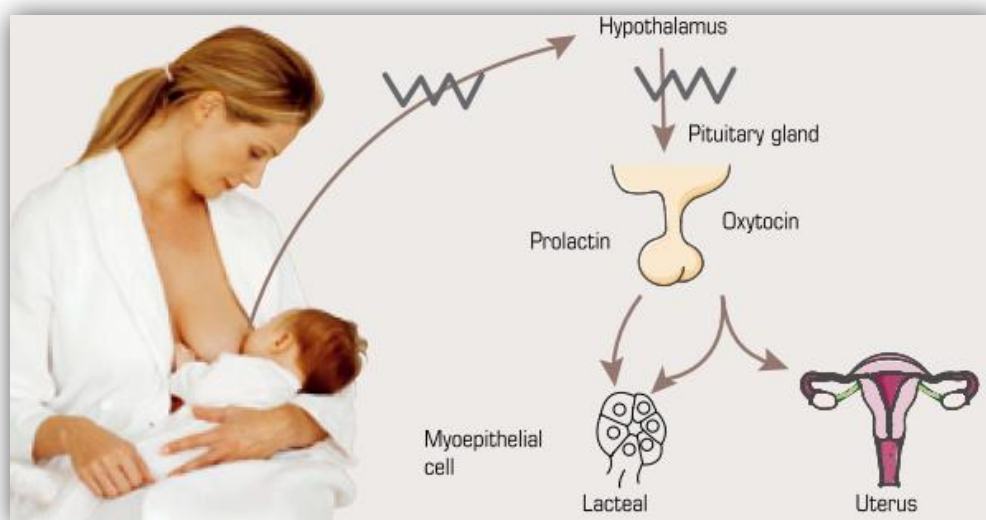


Figure N° 15: La fonction hormonale du corps (**Europe europa, 2010**).

II-1-3-2- La prolactine :

⌘ Sécrétion:

La prolactine est une hormone polypeptidique sécrétée par les cellules lactotropes de l'antéhypophyse. Dès le premier trimestre de la grossesse, le taux de prolactine s'élève progressivement ; il est à l'approche du terme plus de dix fois supérieur au taux initial. La prolactinémie reste élevée dans le post-partum. Cette élévation persiste jusqu'à un an voire 18 mois en cas d'allaitement – et chaque tétée induit des pics sécrétoires qui multiplient le taux de base par trois. Par un mécanisme de rétrofreinage, cette hyperprolactinémie bloque l'ovulation et l'aménorrhée du post-partum s'accompagne d'une infertilité, même si celle-ci n'est pas absolue. Le taux de prolactine dépend surtout du nombre et de la durée des tétées : il chute nettement lorsque la fréquence tombe au-dessous de six par jour (**Groussin-Weyland, 2010**).

⌘ Régulation:

Contrairement à celui des autres hormones hypophysaires, le contrôle hypothalamique de la sécrétion hypophysaire de la prolactine est essentiellement inhibiteur. Le principal facteur inhibiteur est la dopamine, neurotransmetteur synthétisé, entre autres, par les neurones tubéro-infundibulaires de l'hypothalamus. Ce rôle inhibiteur explique que les agonistes de la dopamine, comme la bromocriptine, soient hypoprolactinémisants (**Groussin-Weyland, 2010**).

D'autres facteurs stimulent la sécrétion de prolactine : les œstrogènes agissent directement sur les cellules lactotropes et induisent une hyperplasie sélective des cellules à prolactine de sorte qu'à la fin de la grossesse, l'hypophyse a approximativement doublé de volume (**Groussin-Weyland, 2010**) (Figure N° 16).

⌘ **Activité lactotrope:**

La prolactine est nécessaire à l'initiation et au maintien de la lactation. Son rôle est prépondérant mais non exclusif. Elle agit en synergie avec des hormones hypophysaires [hormones somatotrope, corticotrope (ACTH), thyroïdienne (TSH)] et des hormones périphériques (thyroxine, cortisol, aldostérone, insuline). L'ensemble de ces facteurs constitue le « complexe hormonal lactogénique » (**Groussin-Weyland, 2010**).

Il existe donc d'autres mécanismes de régulation qui prévalent sur l'action de la prolactine ; il n'a d'ailleurs été trouvée aucune corrélation entre la synthèse du lait à court et à long terme et le taux sanguin de prolactine qui n'a qu'un rôle permissif sur la synthèse, laquelle dépend surtout de facteurs de régulation locale (**Cox et al., 1996**).

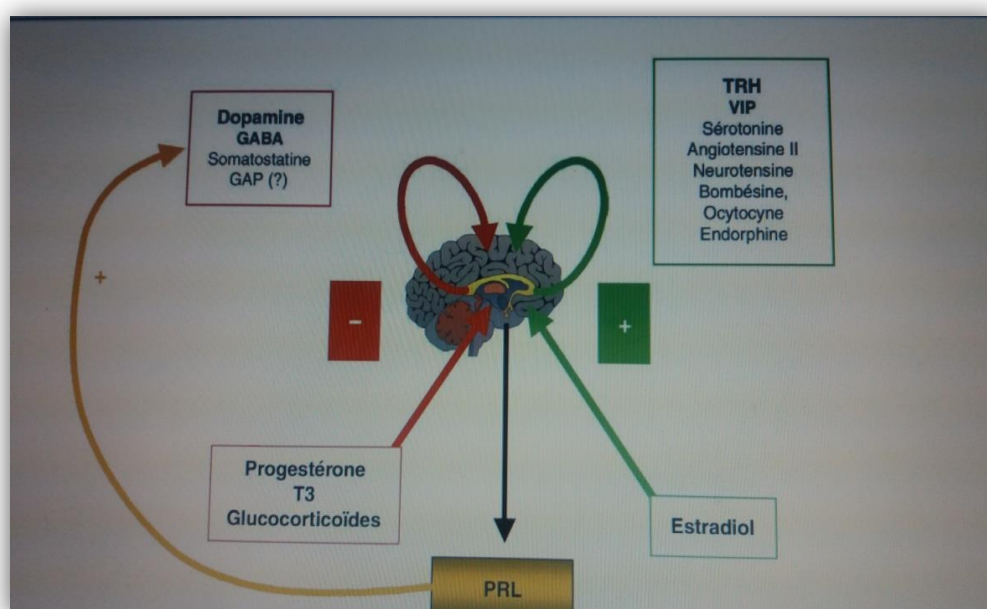


Figure N° 16 : Régulation de la synthèse de la prolactine (PRL) (Touraine& Goffin, 2005).

Les facteurs stimulants sont indiqués par une flèche verte, tandis que les facteurs inhibiteurs sont indiqués par une flèche rouge (**Figure N° 16**). Les facteurs centraux et périphériques sont indiqués respectivement dans les cadres supérieurs et inférieurs de la figure. La prolactine peut exercer un rétrocontrôle de sa propre sécrétion en stimulant la dopamine hypothalamique (flèche orange). TRH : thyrostimulin releasing hormone ; VIP : vaso-intestinal peptide ; GABA : acide gamma aminobutyrique ; GAP : gonadotropin releasing hormone associated peptide.

II-1-4- Composition et variation du lait maternel:

Le colostrum, lait des premiers jours, joue dans la protection immunitaire un rôle essentiel. En effet. C'est véritable concentré d'anticorps qui tapissent en quelques jours toutes les muqueuse de la bouche et du tube digestif. Le lait des jours suivants a tout autant d'importance ; le sucre qu'il contient, le gynolactose, est essentiel dans le développement de la flore microbienne de fermentation qui s'oppose à la prolifération de la flore putréfactive due à la digestion (**Frydman , 2011**).

Le lait comme le sperme et le sang est une des humeurs fondamentales du corps humain chargées d'une haute valeur symbolique (**Rigourd et al., 2011**).

Le lait de femme est un modèle inimitable dont la connaissance se précise au fil des années. Ce n'est pas seulement un ensemble de nutriments, c'est un produit biologique contenant des enzymes, des hormones et peptides trophiques, des facteurs de croissance, des nucléotides, des polyamines, des immunoglobulines (**Ricour et al., 1993**).

Cet aliment dynamique évolue constamment selon les besoins de l'enfant et s'adapte tant quantitativement que qualitativement au cours de la croissance de l'enfant. La réduction de plus de moitié des maladies infectieuses respiratoires et digestives chez les enfants allaités a permis de mettre en exergue également l'importance de l'allaitement maternel afin de compenser le déficit physiologique en début de vie dans la synthèse d'immunoglobuline par le jeune enfant (**Labbok et al., 2004**).

Ainsi, les IgG maternelles transférées in utero et les IgA transmises par le lait maternel spécifiques des agents pathogènes de l'environnement maternel assurent une immunothérapie passive du jeune enfant (**Labbok et al., 2004; Brandtzaeg, 2003**).

Le lait humain est composé de plusieurs phases particulières. La première est constituée par la suspension de particules (micelles) de caséine dont le diamètre (40-45 nm) est environ deux fois plus faible que celui des micelles du lait de vache et rend compte, aussi, de la relative faible opacité du lait humain. Comme dans les autres laits, la matière grasse du lait humain est aussi présente sous forme de particules sphériques, beaucoup plus grosses (2-3 μm). Les cellules, cellules d'origine épithéliales et leucocytes, représentent la troisième phase particulière. La phase aqueuse du lait renferme des protéines (protéines solubles ou protéines du lactosérum), du lactose et des oligosaccharides, des minéraux, des vitamines, des hormones, des facteurs de croissance (**Dubos et al., 2016**).

La composition du lait est relativement stable par le monde et ne varie que dans une faible proportion, en fonction des modes de vie et d'alimentation de maman. Grâce à la spécificité de sa composition, et contrairement au lait de vache, le lait humain se conserve relativement bien (**Picciano, 2001**).

II-1-4-1- Composition:

II-1-4-1-1- Énergie:

Le contenu énergétique du lait humain est de l'ordre de 60 à 70 kcal/dl, un peu plus faible que celui du lait de vache (65-75 kcal/dl). Les graisses représentent plus de 50 % de l'énergie totale. Leur taux varie toutefois considérablement, non seulement au cours de la journée mais aussi au cours de la tétée. Il est intéressant de souligner que le taux de protéines du lait humain étant remarquablement faible, celles-ci ne contribuent que pour 6 % de l'apport énergétique total. Cette proportion est toutefois beaucoup plus importante pour le colostrum, plus riche en protéines mais plus pauvre en graisses et en glucides (**Dubos et al., 2016**).

II-1-4-1-2- Protéines et substances azotées:

La teneur en protéines du lait de femme, comprise entre 8 et 12 g/L, est nettement inférieure à celle des autres mammifères. Néanmoins, elle est parfaitement adaptée aux besoins du nourrisson en raison d'une excellente absorption et d'une parfaite adéquation du profil de ses acides aminés. Les protéines du lait de femme sont aussi très spécifiques ; même les caséines, qui ne représentent que 40 % des protéines (contre 80 % dans le lait de vache) sont différentes (**Turck, 2005**).

Les caséines du lait de femme forment des micelles beaucoup plus petites que celles du lait de vache. Il s'agit surtout de la caséine β dont l'hydrolyse conduit à des peptides (caséomorphines) à propriétés opioïdes et de la caséine κ hautement glycosylée, dont la fraction C terminale a des effets bifidogènes. Enfin, un pourcentage élevé de protéines (60 %) ne précipite pas avec les caséines ; elles sont dites « protéines solubles ». Ce pourcentage élevé de protéines solubles et les micelles de caséine de petite taille expliquent la coagulation plus fine du lait de femme dans l'estomac du nourrisson, contribuant à une vidange gastrique plus rapide. Parmi ces protéines solubles, certaines ont un rôle fonctionnel essentiel comme les immunoglobulines, en particulier les IgA de type sécrétoire (IgAs) (0,5 à 1 g/L), les lactoferrines, le lysozyme, la bétadéfensine 1, des enzymes (en particulier une lipase), des facteurs de croissance comme l'insulin-like growth factor (IGF 1), le transforming growth factor (TGF), les facteurs de croissance leucocytaire (G-CSF) et l'epidermal growth factor (EGF), qui a une action trophique sur les muqueuses gastrique et intestinale (Turck, 2005).

II-1-4-1-3- Glucides:

- Les glucides totaux du lait humain sont plus abondants (7 g/100 ml) que ceux du lait de vache (5 g/ 100 ml);
- Le lactose est le sucre dominant (6 g/ 100 ml);
- Les autres glucides sont constitués essentiellement par des oligosaccharides qui, dans le lait humain, sont caractérisés par leur richesse (environ 1 g/ 100 ml) mais aussi par leur variété (plus de 40 espèces moléculaires alors que quelques-unes seulement sont présentes dans le lait de vache). Ces oligosaccharides entrent dans la composition d'un certain nombre de glycoprotéines comme la lactoferrine ou les immunoglobulines A sécrétoires (IgAs). Ils constituent aussi un facteur de croissance responsable de la prédominance de l'espèce *Bifidobacterium bifidus* dans l'intestin des nouveau-nés nourris au sein. Cette flore intestinale particulière est responsable de la transformation du lactose en acides lactique et acétique et donc de l'abaissement du pH du contenu distal de l'intestin, ce qui contribue à prévenir la croissance d'un bon nombre de bactéries entéropathogènes (Dubos *et al.*, 2016).

II-1-4-1-4- Lipides et digestibilité des graisses:

La teneur en lipides du LF (3,5 g/100 ml en moyenne) est très proche de celle du LV ; par contre, la digestibilité et le coefficient d'absorption des graisses du LF sont très supérieurs (80 % contre 60 % pour le LV dans les premiers jours, atteignant rapidement 95 % contre 80 % à 3 mois pour le LV). La meilleure digestibilité des graisses est due à la présence dans le LF d'une lipase dépendante des acides biliaires du nouveau- né qui compense, au niveau duodénal, l'insuffisance des lipases pancréatiques (**Hamosh, 2001**) ; il s'y ajoute la structure différente des triglycérides 70 % de l'acide palmitique (soit environ 25 % des acides gras totaux) est en position 2 sur le glycérol, ce qui lui permet une excellente absorption intestinale sous forme de 2- monoglycéride, ce qui n'est pas le cas avec le LV. Le LF est riche en cholestérol (20 à 30 mg/100 ml), alors que le LV en contient beaucoup moins (5 à 10 mg/100 ml) (**Neville, 2001**) (**Tableau N°2**).

La présence dans le LF des acides gras polyinsaturés (AGPI), acides gras essentiels (AGE) [acide linoléique (AL : chef de file de la série « n- 6 ») et acide α - linolénique (AAL : chef de file de la série « n- 3 »)], mais aussi de leurs homologues supérieurs à plus longue chaîne (AGPI- LC), en particulier acide arachidonique (AA : 0,46 g/100 g d'acides gras) dans la série linoléique et acide docosahexaénoïque (DHA : 0,25 g/100 g d'acides gras) dans la série α - linolénique, est d'une importance majeure, en raison de leurs rôles dans le développement et la maturité des tissus cérébral et rétinien (**Heird , 2001**).

Tableau N°2: Comparaison des composition du lait de femme et du lait de vache (**Turck et al., 2013**).

Pour 100 ml	Lait de femme	Lait de vache
Calories (kcal)	68	65
Protéines (g)	0,8-1	3,7
Caséines (%)	40	80
Lipides (g)	3,5	3,5
Acide linoléique (mg)	350	90 T
Acide α - linoléique (mg)	37	racés
Glucides (g)	7,5	4,5
Lactose (%)	85	100
Autres sucres (g)	Oligosaccharides (1,2)	0
Sels minéraux (mg)	210	900
Sodium (mg)	16	48
Calcium(mg)	33	125
Calcium/Phosphore	2	1,25
Fer (mg)	0,05	0,03

II-1-4-1-5- Les sels minéraux:

Le lait humain contient environ quatre fois moins de minéraux que le lait de vache. Cela correspond à des besoins faibles chez le nouveau-né et contribue à diminuer la charge osmotique rénale pendant la période de maturation de la fonction rénale des premiers mois de vie. Il y a quatre fois moins de calcium et six à sept fois moins de phosphore dans le lait humain que dans le lait de vache. Cela tient aux richesses différentes de ces laits en caséine qui incorporent du calcium et du phosphore dans leurs molécules. Ces apports limités du lait humain sont cependant suffisants : en effet, d'une part l'absorption intestinale du calcium du lait de femme est très élevée et, d'autre part, le rapport calcium/phosphore y est meilleur (2 contre 1,3 pour le lait de vache). Le fer se trouve à des taux comparables dans les deux laits mais son utilisation est nettement supérieure dans le lait humain (**Dubos et al., 2016**).

II-1-4-1-6-Les vitamines:

-L'apport vitaminique est dépendant de l'état nutritionnel de la mère, mais est globalement suffisant pour l'ensemble des vitamines sauf pour les vitamines D et K.

– La vitamine D est en concentration faible (40 UI/L) mais dépend beaucoup du pool vitaminique de la mère, celui-ci étant plus élevé durant les saisons ensoleillées (été, automne) (**Tableau N°3**).

– La vitamine K est à une concentration inférieure à celle du lait de vache et insuffisante pour couvrir les besoins d'un nouveau-né nourri exclusivement au sein. (**Dubos et al., 2016**).

Tableau N°3: Vitamines et minéraux du lait maternel (**Tackoen, 2012**).

Vitamine	Minéraux
A 670 mg/l	Calcium 280 mg/l
B1 210 mg/l	Phosphore 140 mg/l
B2 350 mg/l	Magnésium 35 mg/l
PP 1.500 mg/	Chlore 420 mg/l
B5 1.800 mg/l	Potassium 525 mg/l
B6 93.000 mg/l	Sodium 161 mg/l
B8 4 mg/l	Cuivre 250 µg/l
B9 85 mg/l	Fer 300 µg/l
B12 0,97 mg/l	Iode 110 µg/l
C 40.000 mg/l	Zinc 1.200 µg/l
D 0,55 mg/	Manganèse 6 µg/l
E 2.300 mg/l	Sélénium 20 µg/l
K 2,1 mg/l	

II-1-4-1-7- Les hormones:

Le lait contient des hormones et des précurseurs. Parmi eux, l'hormone de croissance qui a une action sur les muqueuses gastriques et intestinales l'insuline, les prostaglandines, des hormones thyroïdiennes, la somatostatine (**Buts, 1998**) (**Tableau N° 4**).

Tableau N° 4: « Facteurs anti-infectieux » du lait de femme (**Rigourd et al., 2013**).

Facteurs	Rôles
Hormones gastro-intestinales (bombésine, colestyramine ; peptide YY, vasoactive intestinal peptide), ACTH, TRH	Trophicité de l'épithélium intestinal Synthèse des mucines Effet immunomodulateur
Cortisol	Maturation des cellules muqueuses ; modification du profil de glycosylation des microvillosités
Facteurs de croissance	Croissance et différenciation intestinale
Cytokines	Réponse anti-infectieuse
Lactoferrine	Activité bactéricide, inhibe le processus d'adhésion
Nucléotides	Métabolisme du fer Croissance cellulaire
Oligosaccharides	Prébiotiques
Lysozyme	Action bactéricide
Kappa caséine glycosylée	Inhibition de l'adhésion bactérienne aux muqueuses digestives Facteur d'inhibition du développement bactérien
Alpha lactalbumine	Activité antimicrobienne
IgA sécrétoire ; IgM ; IgG	Anticorps antibactérien/viral/fongique
Cellules immunitaires (lymphocytes, polynucléaires)	Destruction des micro-organismes par phagocytose

II-1-4-2- Variation du lait maternel:**II-1-4-2-1- Stade de lactation:****§ Le colostrum:**

Durant les 3 premiers jours de l'allaitement, le LF, dénommé à cette période colostrum, a une composition très différente du lait mature. Moins riche en lipides et en lactose, il a une densité énergétique moindre (45 à 48kcal/100ml contre 65 à 70kcal/100ml); il est en revanche plus riche en composants qui jouent un rôle essentiel, tant sur le plan immunologique que nutritionnel : cellules immunocompétentes (10fois plus), oligosaccharides (2,2 à 2,4g/100ml contre 1,2 à 1,3g/100ml), et protéines (2,2g/100ml). L'augmentation porte sur les protéines solubles comme les immunoglobulines en particulier les IgAS, la lactoferrine, différents facteurs de croissance (G- CSF, EGF, IGF- 1), les différentes cytokines, alors que les caséines sont pratiquement absentes (**Neville et al., 2001**).

§ Le lait de transition:

Lorsque l'allaitement se met en place sereinement et efficacement, la "montée de lait" survient entre le 3ème et le 5ème jour après la naissance. La maman produira désormais en moyenne 750ml de lait par jour. Celui-ci devient moins épais, moins jaune et moins visqueux. Petit à petit, il contiendra plus de sucres pour favoriser la croissance du cerveau, plus de graisses et moins de protéines. Cette évolution de colostrum au lait mature nécessitera une vingtaine de jours (**Le Fournier-Chancerelle, 2009**).

§ Le lait mature:

C'est environ trois semaines après la naissance que le lait est mature. Ce lait est transparent, bleuté, et très liquide, à la saveur légèrement sucrée. Le lait mature contient désormais une grande quantité de lactose utile au développement du cerveau, la quantité de lipides est doublée afin d'apporter une plus grande part d'énergie. La part des protides est diminuée par dix, tandis que celle des sels minéraux a diminué de moitié. Quand aux acides aminés, leur taux a diminué pour augmenter à nouveau ensuite (**Le Fournier-Chancerelle, 2009**).

II-1-4-2-2- Au cours d'une tétée:

En début d'une tétée, le bébé va surtout recevoir de l'eau et des sels minéraux afin de le rassasier et le désaltérer immédiatement. Ensuite, la proportion de glucides directement assimilable par l'organisme augmente (les oligosaccharides suivis du lactose). En milieu de tétée, ce sont les protéines et les lipides qui augmentent en quantité pour favoriser la croissance du bébé. A la fin de la tétée, le lait se concentre en lipides (cinq fois plus qu'au début) qui donneront au bébé un sentiment de satiété et donc le signal de la fin de tétée (**Le Fournier-Chancerelle, 2009**).

II-1-5- Les différents stades de la production de lait:

Le lait est synthétisé par les cellules épithéliales mammaires. Il est sécrété en continu dans la lumière des alvéoles ou il est stocké jusqu'à son expulsion dans les canaux galactophores vers le mamelon au cours de l'éjection (**Neville, 1999**). Le contrôle de la synthèse, de la sécrétion et de l'éjection du lait est complexe et multifactoriel. Il implique 2 niveaux de régulation, celui de la synthèse-sécrétion et celui de l'éjection, et 2 mécanismes de contrôle, l'un central endocrine, l'autre local autocrine, l'ensemble des processus dépendant de l'efficacité du transfert de lait et en particulier de la succion effectuée par l'enfant (**Daly et al., 1993 ; Cregan & Hartmann, 1999; Neville ,1999**).

Le lait est produit en continu dans les cellules des parois des alvéoles. Cette production comprend: (**Thirion, 2010**).

- La filtration de certains éléments transmis depuis le sang de la mère vers l'alvéole: acides aminés, cellules, sels minéraux.

La transformation dans les cellules d'éléments sanguins pour fabriquer sur place le lactose, certains acides gras et protéines spécifiques du lait (**Thirion, 2010**).

Cinq voies permettent le passage des éléments:

- Une première voie (très active) pour le lactose et les protéines du lait emballés avec la plus grande partie de l'eau sous forme de petites vésicules (micelles) ;
- Une deuxième voie qui permet aux graisses de se réunir en larges gouttelettes graisseuses qui montent vers le bord apical. Là, elles s'enveloppent dans la membrane apicale, et l'ensemble se détache dans la lumière alvéolaire ;

Ce double emballage empêche les globules de graisses de s'agglutiner en trop grandes gouttelettes et de se condenser entre eux, à la manière du beurre ;

– Grâce à la troisième voie, quelques petites molécules passent directement à travers la membrane apicale: sodium, potassium, chlore, certains monosaccharides et le bicarbonate, avec une petite quantité d'eau ;

– La quatrième voie permet aux protéines maternelles entières de traverser la cellule et de se déverser intactes dans le lait. Ce sont les immunoglobulines (IgA, IgM, de défense contre les infections) et de nombreuses hormones et facteurs de croissance ;

– Enfin, la dernière voie permet à certains éléments de migrer entre les cellules, dans les deux sens si les jonctions sont ouvertes, uniquement du plasma vers le lait si les jonctions sont fermées (**Thirion, 2010**).

– À partir de la seconde moitié de la grossesse, les lactocytes fabriquent et déversent les éléments du lait (lactogénèse de type 1). Les jonctions sont ouvertes et cela permet de nettoyer le lait sécrété. De nombreuses petites protéines plasmatiques et acides aminés, de très nombreuses immunoglobulines, de multiples cellules immunitaires (lymphocytes et polynucléaires) passent dans le lait. La proportion de sels minéraux se met en équilibre avec ceux du plasma d'où la richesse en sodium, chlore. Le lait est dit colostré (**Thirion, 2010**).

– Pendant la période de lactation active (dite lactogénèse de type 2), les jonctions sont étroitement fermées. Seules les cellules immunitaires (globules blancs) arrivent à se « faufiler », les jonctions se refermant hermétiquement derrière elles. Le lait produit a donc une composition strictement contrôlée par les lactocytes, donc par le code génétique de notre espèce.

– Au moment du sevrage, ou si une infection, une grave stase lactée se produisent pendant l'allaitement, les jonctions s'ouvrent à nouveau. (**Thirion, 2010**) (**Figure N°17**).

Le lait redevient plus colostré. Ainsi la présence de trop de sodium ou de chlore dans le lait, la présence de lactose dans les urines de la mère sont de bons tests biologiques de lactation non démarrée ou d'inflammation du sein (**Thirion, 2010**).

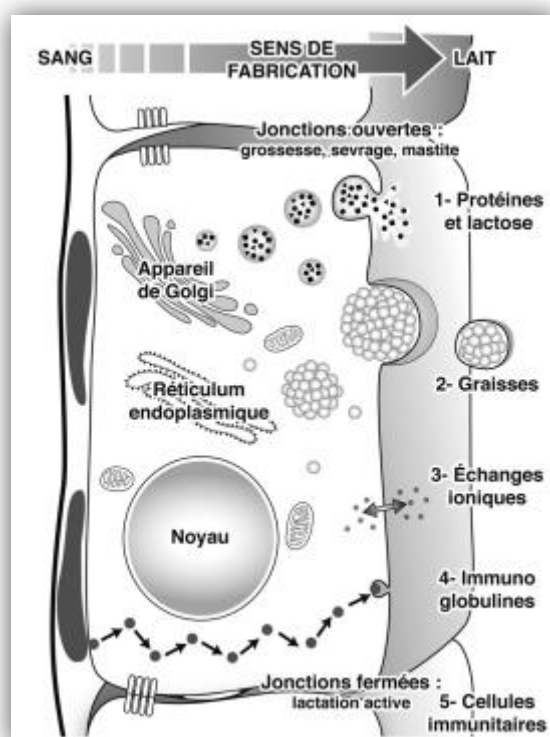


Figure N°17: Les cinq voies de la synthèse du lait dans un lactocyte
(Thirion, 2010).

II-1-6- Influence de l'état nutritionnel de la mère :

II-1-6-1- État nutritionnel de la mère et production de lait:

Dans les conditions normales, la glande mammaire a une surcapacité à produire le lait nécessaire à la croissance de l'enfant. Les mères de jumeaux peuvent avoir une production de lait proche du double de celle observée en cas de grossesse unique. Les femmes qui pour des raisons diverses (malformations) n'allaitent que d'un seul sein ont une production de lait très proche de celles qui allaitent des deux seins. Enfin, il est rare que le lait stocké au niveau du sein soit complètement consommé au cours d'une tétée. La capacité de stockage du sein est elle-même fonction de la demande du nourrisson qui détermine la quantité de lait produite par la mère (Turck, 2013).

II-1-6-2- Besoins énergétiques de la mère au cours de l'allaitement:

La production de lait représente un coût énergétique pour la mère, compensé par une augmentation des apports énergétiques et aussi une mobilisation des graisses stockées au cours de la grossesse. Le coût énergétique de la lactation est déterminé principalement par la quantité de lait produite, qui dépend en grande partie de la demande de l'enfant. Cette quantité décroît dès que des aliments sont donnés en supplément du lait maternel : la production de lait est en moyenne de 710 ml par jour pendant les 2 premiers mois et augmente légèrement par la suite, aux alentours de 800 à 900 ml pour les enfants bénéficiant d'un allaitement exclusif (Turck, 2013).

La valeur énergétique du lait de femme varie en fonction de l'heure de la tétée, d'un sein à l'autre, et même au cours de la tétée. La valeur moyenne de 67 kcal/100 ml est généralement retenue (Prentice *et al.*, 1996). Dans le cas d'une femme produisant 750 ml de lait par jour, la valeur énergétique du lait produit est de l'ordre de 500 kcal ($750 \text{ ml} \times 67 \text{ kcal}/100 \text{ ml}$). Avec un rendement énergétique de la production de lait estimé entre 80 et 85 %, cela correspond à une augmentation des besoins d'environ 630 kcal/jour (WHO, 1985).

II-1-7- Les positions pour allaiter:

Une position adéquate du bébé est nécessaire pour une bonne stimulation de la lactation et constitue le meilleur moyen d'éviter les complications. Pour réussir son mouvement de tétée et déglutir sans gêne, le bébé aura le corps tout contre et face à celui de sa mère, visage face au sein, sans avoir à tourner la tête. Le dos, la nuque et les fesses seront soutenus, la tête sera libre de bouger. A partir de ces règles de base, de très nombreuses positions sont possibles, dans les bras, à califourchon, étendu sur le lit contre la mère, etc. La mère quant à elle, choisira de s'installer confortablement dans une position qui lui convient (assise, allongée...). Des coussins ou d'autres supports seront souvent bien utiles, à la fois pour éviter les contractures du dos, du cou ou des bras et pour amener le bébé à bonne hauteur. (De schepper *et al.*, 2009).



Figure N°18: Les bonnes positions pour allaiter (De schepper *et al.*, 2009).

- ⌘ **La position de la berceuse (ou « de la Madone »):** C'est la position « classique » ;
- ⌘ **La berceuse modifiée (ou « Madone inversée »):** Cette position est bien adaptée pour les premiers jours. Elle vous permet de bien guider la tête de votre bébé et de soutenir sa nuque d'une main ; l'autre main peut soutenir le sein si nécessaire ;
- ⌘ **La position allongée:** Allongée sur le côté, un coussin entre les jambes et dans le dos, vous avez la jambe supérieure repliée pour ne pas basculer en avant. Votre bébé est allongé en face de vous, loin du bord du lit, sa bouche au niveau du mamelon. S'il n'est pas tout à fait à la bonne hauteur, placez sous lui une serviette repliée pour le mettre bien au niveau du sein ;
- ⌘ **La position « ballon de rugby »:** Votre bébé est sur le côté, à la hauteur de votre taille, soutenu par un coussin et maintenu par votre bras. Sa nuque repose dans le creux de votre main, tandis que l'autre main soutient le sein (Rossignol *et al.*, 2009) (Figure N°18).

II-1-8- Les bénéfices de l'allaitement maternel:**II-1-8- 1-Pour le nouveau-né:****II-1-8-1-1-Protection contre les infections:****➤ Infections digestives :**

Malgré ces difficultés d'interprétation, de nombreuses études permettent d'établir une relation entre l'alimentation de l'enfant pendant les premiers mois de vie et la survenue d'épisodes de diarrhée ou de gastroentérite. Il existe un effet protecteur du lait de mère vis-à-vis de l'infection par des bactéries pathogènes : *Escherichia coli*, *Salmonella*, peut-être *Campylobacter* et vis-à-vis des giardiasis. La protection est beaucoup plus difficile à affirmer vis-à-vis des infections à Rotavirus. Quel qu'en soit le germe, il existe un effet protecteur global du lait maternel vis-à-vis des épisodes d'infections digestives. De plus, il y a un effet sur l'intensité des symptômes, l'épisode digestif étant, en règle, moins sévère en cas d'allaitement maternel, surtout si ce dernier est poursuivi (**Dubos et al., 2016**).

Deux mécanismes sont en cause :

- d'une part, l'apport d'une alimentation autre que le lait de mère augmente le risque d'infection par introduction de germes dans le tube digestif de l'enfant en raison d'une hygiène insuffisante ; ce mécanisme est surtout en cause dans les pays en voie de développement ;
- d'autre part, le lait maternel contient des anticorps synthétisés au niveau de l'intestin maternel à la suite d'un contact, même ancien, avec un agent infectieux (**Dubos et al., 2016**).

➤ Infections oto-rhino-laryngologiques (ORL)(rhinites, otites)

Quarante-quatre pour-cent des enfants ont au moins une otite moyenne aiguë dans leur première année. Le risque est multiplié par deux en cas d'allaitement artificiel versus allaitement maternel exclusif de plus de 3 mois (**Ip et al., 2007**).

➤ Infections respiratoires basses (bronchites, bronchiolites):

Un allaitement maternel exclusif de plus de 4 mois réduirait leur incidence d'un facteur 3,6 (**Oddy et al., 2003 ; Krammer et al., 2003**).

II-1-8-1-2-Protection contre l'allergie :

Plusieurs mécanismes sont susceptibles d'expliquer une diminution de survenue des affections allergiques chez les enfants nourris au sein : moindre exposition aux antigènes alimentaires, maturation de la muqueuse intestinale, réduction de l'incidence des infections digestives, propriétés anti- inflammatoires du lait humain qui, par ailleurs, contient des cytokines susceptibles d'interférer avec le développement de phénomènes allergiques. Il est cependant possible que la prévention de la pathologie allergique par le lait humain ne soit effective que chez les enfants de parents eux-mêmes allergiques; il n'est pas exclu que l'absence d'effet protecteur retrouvé ne soit en rapport avec un allaitement trop court ou non exclusif avec introduction précoce de protéines allergisantes ou avec l'absorption, par la mère allaitante, de substances susceptibles de provoquer une réaction allergique chez son enfant. Par ailleurs, il n'est pas sûr que des manifestations respiratoires ne soient améliorées par le lait humain qu'en raison de son effet protecteur vis-à-vis des infections respiratoires et non par un effet directement protecteur vis-à-vis de l'allergie (**Golding et al., 1997; Schmitz , 1993**).

II-1-8-1-3-Prévention de pathologies cancéreuses:

Un rôle protecteur mais discuté a pu être prouvé pour l'enfant allaité exclusivement plus de 6 mois vis-à-vis des leucémies lymphoïdes (facteur 1,3) et myéloïdes (facteur 1,2). L'hypothèse physiopathologique impliquerait certains facteurs immunitaires du lait de femme participant à la prévention d'infections virales impliquées dans la survenue de ces leucémies (**Stuebe & Schwarz, 2010**).

II-1-8-1-4-Prévention du diabète de type 1:

Le risque de développer un diabète de type 1 est diminué d'un facteur 1,2 à 1,4 en cas d'allaitement maternel exclusif supérieur à 3 mois (**Gerstein, 1994**).

II-1-8-1-5-Prévention du risque vasculaire:

Une méta-analyse portant sur 24 études a montré une diminution, en moyenne, de 1,1 mmHg de la tension artérielle systolique (IC 95 % : -1,79 à -0,42 mmHg) chez les sujets (grands enfants, adolescents et adultes) qui ont reçu un allaitement maternel (**Owen et al., 2003**).

II-1-8- 2-Pour la mère:**II-1-8- 2-1-Les suites de couche :**

La perte de poids est plus rapide dans les 6 premiers mois suivant l'accouchement. Les sécrétions hormonales provoquées par la mise au sein diminuent le risque d'infections du post-partum et aident l'utérus à reprendre au plus vite sa taille, sa forme et sa tonicité (Kekus, 2014).

II-1-8-2-2-Prévention des cancers du sein et de l'ovaire:

Chaque année d'allaitement est associée à une diminution de 4,5 % du risque de cancer invasif du sein (Collaborative Group on Hormonal factors in Breast Cancer, 2002). Cancer de l'ovaire : une méta-analyse récente a mis en évidence que le risque de développer un cancer de l'ovaire était multiplié par 1,3 chez les femmes n'ayant pas allaité par rapport à celle ayant allaité 18 mois ou plus (Danforth *et al.*, 2007).

II-1-8-2-3-Prévention des risques cardio-vasculaires:

Si une femme allaite plus de 2 ans, le risque qu'elle développe une complication cardiovasculaire est diminué d'un facteur 1.3. Le risque est, par exemple, augmenté de 28 % dans un groupe de femmes n'ayant pas allaité par rapport à celui de femmes ayant allaité sept à 12 mois (Rigourd *et al.*, 2013).

❖ Hyperlipidémie :

Data women's Health Initiative a démontré qu'un cas d'hyperlipidémie était évité pour 40 femmes allaitantes (Schwarz *et al.*, 2009).

❖ Hypertension artérielle :

Le risque serait réduit de 8 % en cas d'allaitement maternel dans une étude coréenne récente (Lee *et al.*, 2005).

❖ Diabète de type 2 :

Le risque serait réduit de 12% avec un effet dose-réponse en fonction de la durée de l'allaitement maternel exclusif (Villegas *et al.*, 2008).

II-1-9- Contre- indications de l'allaitement:

Les contre- indications de l'allaitement sont exceptionnelles. Il s'agit des affections viscérales graves (cardiaques, respiratoires, hépatiques) incompatibles avec la dépense énergétique supplémentaire inhérente à l'allaitement; d'affections hématologiques, oncologiques, auto- immunes, psychiatriques imposant un traitement médicamenteux incompatible avec l'allaitement; de certaines pathologies infectieuses évolutives de la mère comme une infection à VIH, une tuberculose. L'abcès du sein constitue théoriquement une contre- indication de la tétée au seul sein concerné, mais, en pratique, la douleur, la fièvre, la fatigue, le traitement médical voire chirurgical nécessaire, conduisent souvent à l'interruption de l'allaitement, même s'il n'y a pas de contre- indication stricto sensu. La galactosémie congénitale est une pathologie exceptionnelle (1/40000 naissances) au cours de laquelle tout apport de lactose est contre- indiqué, incluant donc l'allaitement. L'ictère au LF, par contre, autorise parfaitement l'allaitement car il est dépourvu de toute conséquence pathologique. (Turck, 2013).

II-2-L'allaitement Artificiel:

Au cours des dernières décennies, des progrès considérables ont été réalisés pour optimiser la qualité des laits infantiles. Les innovations apportées l'ont été avec le triple objectif de se rapprocher le plus possible de la composition du lait de mère, de lutter contre les petits maux fréquents du nourrisson (régurgitations, coliques, selles molles, constipation), et d'avoir un effet préventif sur l'apparition ultérieure de certaines pathologies (Tounian, 2011).

II-2-1-L'équipement :

L'allaitement artificiel nécessite un équipement complet, en plus du classique biberon, pour qu'il se déroule dans de bonnes conditions (Kekus, 2014).

❖ Les biberons :

Il est conseillé d'avoir six biberons de taille moyenne (260 ml) soit un pour chaque repas mais aussi un ou deux biberons de plus petites tailles (150 ml) pour des biberons d'eau.

Il existe plusieurs sortes de biberons :

- ⊗ En verre qui a l'avantage de se nettoyer facilement mais il se casse plus facilement aussi ;
 - ⊗ En silicone ;
 - ⊗ En polyéthersulfone (PES) résistant aux températures élevées ;
 - ⊗ En polypropylène (PP) quasi incassable mais qui ne peut être stérilisé à chaud.
- (Kekus, 2014).

❖ **Les tétines :**

Tout comme les biberons, il existe plusieurs sortes de tétine. Elles sont soit en silicone soit en caoutchouc. Elles peuvent être à débit variable ou unique. La tétine à débit variable possède une fente à son extrémité qui permet ainsi de choisir entre trois vitesses. La tétine à débit unique est percée en son extrémité de deux ou trois trous plus ou moins larges selon l'âge de l'enfant pour permettre un écoulement de lait progressif. Les tétines à débit lent peuvent convenir davantage aux jeunes bébés. Il faut les changer régulièrement par mesure d'hygiène et au moindre signe d'usure tout comme les biberons (Kekus, 2014).

Toutefois, lorsque la mère ne peut pas, ne veut pas ou plus allaiter, une préparation pour nourrisson de 1^{er} âge sera proposée à son enfant jusqu'à l'âge de 4 à 6 mois. Les préparations pour nourrissons sont destinées à des nourrissons à terme, avec un poids de naissance normal et ne présentant aucune pathologie évolutive ou sévère. La prescription médicale d'une formule artificielle se basera donc sur l'âge du nourrisson, la nature de la source protéique, les protéines du lait de vache devant être privilégiées, ainsi que sur l'effet préventif (allergie) ou fonctionnel recherché. Une grande diversité de formules est proposée pour l'alimentation des nourrissons, certaines avançant des allégations d'effets fonctionnels et de bénéfices pour la santé, rendant la prescription parfois difficile. Malgré les améliorations apportées aux formules artificielles, aucune ne peut revendiquer de supériorité nutritionnelle au lait de femme (Rigo, 2011).

II-2-2- Les laits infantiles :**II-2-2-1- Laits pour nourrissons standard (ou laits premier âge standard):**

Les caractéristiques communes à la majorité de ces préparations sont les suivantes :

- ⊗ Un rapport caséines/protéines solubles proche de 1.
- ⊗ Des glucides comprenant environ 3/4 de lactose et 1/4 de dextrine maltose.
- ⊗ Un enrichissement en vitamine D de 37 à 56 UI/dl (médiane : 41 UI/dl).

Certaines préparations se distinguent par des caractéristiques propres souvent sous-tendues par l'allégation d'une propriété particulière que cette modification est censée lui confère (Sarrio, 2011) ;

II-2-2-2- Laits de suite standard (ou laits deuxième âge standard) :

Les principales différences avec les laits pour nourrissons sont :

- ⊗ Un contenu protéique et glucidique plus élevé et un contenu lipidique réduit.
- ⊗ Un rapport caséines/protéines solubles plus élevé.
- ⊗ Un contenu en minéraux augmenté.
- ⊗ Un contenu vitaminique à peu près identique.

Les caractéristiques communes à la majorité de ces préparations sont les suivantes :

- ⊗ Un rapport caséines/protéines solubles supérieur ou égal à 1.
- ⊗ Des glucides constitués majoritairement de lactose.
- ⊗ Un enrichissement en vitamine D de 40 à 60 UI/dl (médiane : 44 UI/dl). Certaines préparations se distinguent par des caractéristiques propres qui sont parfois identiques à leur équivalent en lait 1er âge (Sarrio, 2011).

II-2-2-3- Laits de croissance (ou laits pour enfants en bas âge):

Leurs caractéristiques sont:

- ⊗ Une présentation sous forme liquide pour la majorité d'entre eux ;
- ⊗ Leur aromatisation fréquente par un dérivé vanillé ;
- ⊗ L'ajout d'un glucide à pouvoir sucrant (saccharose, fructose, glucose) pour certains d'entre eux ;

- ⊗ Un contenu protéique un peu plus élevé ;
- ⊗ Un contenu en minéraux plus élevé (**Sarrio, 2011**).

II-2-2-4-Laits pré-épaissis :

Nous avons défini par ce terme l'ensemble des laits infantiles contenant un agent épaississant. Ce dernier est soit de l'amidon de riz, de maïs, ou de pomme de terre (et ne contient donc pas de gluten). Une fois reconstitués, les laits contenant de l'amidon apparaissent moins épais dans le biberon. L'épaississement du lait a effectivement démontré son efficacité pour réduire les régurgitations chez le nourrisson. On remarque que certains laits pré-épaissis contiennent très peu d'amidon ($\leq 15\%$) et sont donc probablement moins efficaces dans le traitement du reflux gastro-œsophagien. Beaucoup de lait pré-épaissis contiennent également des probiotiques, des prébiotiques ou des ferments lactiques (**Tounian, 2011**).

II-2-2-5-Lait avec probiotiques, prébiotiques ou ferments lactiques:

Certains travaux ont démontré que l'ingestion de lait contenant des probiotiques, des prébiotiques ou des ferments lactiques avait effectivement des effets bénéfiques sur la santé du nourrisson ou du jeune enfant. Parmi les effets observés, on retient la prévention des manifestations allergiques chez les enfants à risque atopique, la prévention des diarrhées virales en collectivité, la réduction de la durée des diarrhées aiguës et l'amélioration du transit des enfants constipés (**Sarrio, 2011**).

II-2-2-6-Lait appauvri en lactose :

Ces laits se distinguent par la présence de lactose à l'état de traces dans leur fraction glucidique. Ils sont indiqués au cours des diarrhées aiguës sévères ou parfois celles survenant sur un terrain fragile dans les maladies cœliaques tant que persiste la diarrhée et dans les rares cas d'intolérance au lactose (**Sarrio, 2011**).

II-2-2-7-Préparations à base de protéines de soja :

Les préparations à base de protéines de soja se distinguent des laits infantiles standard par :

- L'existence exclusive de protéines de soja à la place des protéines du lait de vache ;

-L'absence de lactose, la fraction glucidique étant constituée de maltodextrines, d'amidon et de maltose. La fréquence de l'allergie associée entre protéines du lait de vache et protéines de soja, surtout avant l'âge de 6 mois, rend périlleuse l'utilisation de ces préparations chez les enfants allergiques aux protéines du lait de vache ;

-Leur bonne tolérance apparente en pratique clinique en cas de suspicion d'allergie aux protéines du lait de vache tient principalement au fait que la majorité de ces suspicions ne sont pas fondées et donc l'allergie suspectée inexistante. Il n'est ainsi pas recommandé d'utiliser ces préparations en première intention chez les enfants allergiques aux protéines du lait de vache. Il est toutefois possible de les prescrire chez des nourrissons de plus de 6 mois n'acceptant pas les hydrolysats poussés (probablement en raison du développement de leur goût), à condition d'avoir préalablement vérifié l'absence de sensibilisation aux protéines de soja par des tests cutanés. Enfin, ces préparations étant dépourvues de lactose, elles partagent les mêmes indications que les laits appauvris en lactose précédemment étudiés (**Tounian, 2011**).

II-2-2-8-Lait hypoallergénique ou lait HA :

Sont désignés cette appellation les laits dont les protéines ont subi une hydrolyse enzymatique partielle et parfois un traitement thermique, dans le but de réduire leur caractère allergisant. Cette hydrolyse n'étant que partielle, elle ne permet pas de garantir une totale innocuité en cas d'allergie avérée aux protéines du lait de vache, contrairement aux hydrolysats poussés. Leur composition en glucides, lipides, minéraux et vitamines est par ailleurs comparable à celle des autres laits infantiles, comme l'est également leur contenu énergétique. Seule l'utilisation de laits HA au cours des quatre premiers mois de la vie a démontré son efficacité dans la prévention des manifestations allergiques ultérieures est enfin important de signaler aux parents que les selles des enfants consommant un lait HA sont habituellement plus molles et parfois plus fréquentes (**Sarrio, 2011**).

II-2-2-9-Formules à base de protéines du lait de vache entières :

Elles doivent être utilisées en première intention chez les nouveau-nés sans antécédent allergique familial. De nombreuses améliorations du contenu protéique des laits, tant au niveau qualitatif que quantitatif, ont été réalisées ces dernières années de façon à se rapprocher de la fonctionnalité du lait maternel (**Tounian , 2011**).

Ainsi, le fractionnement des protéines du lactosérum et l'enrichissement en a-lactalbumine, en augmentant la teneur en tryptophane et en améliorant le profil de l'aminogramme, ont permis de réduire la densité protéique des laits, justifiant ainsi la révision de la teneur minimale en protéines des laits de premier âge et de suite jusqu'à 1,8g/100kcal (**Tounian , 2011**).

II-2-2-10-Préparations à effets fonctionnels :

§ Les préparations « à effet de satiété »

Contenant moins de lactose, plus d'amidon, ainsi qu'une prédominance de caséine peuvent être proposées chez des nourrissons affamés afin de réduire la prise alimentaire. Leur prescription repose sur l'analyse de la cinétique de croissance (**Rigo, 2011**).

§ Les préparations « confort » ou « anti-coliques »

Ont une modification de leur teneur en lactose, en amidon, en caséine ou en lipides structurés ou encore une fermentation ou l'adjonction de prébiotiques, de probiotiques ou de nucléotides. Elles ont un effet clinique escompté qui n'est pas scientifiquement prouvé (**Rigo, 2011**).

§ Dans les préparations « transit »

L'accélération du transit intestinal est obtenue par une teneur plus élevée en lactose, une réduction du rapport caséine/protéines du lactosérum, une fermentation lactique ou une adjonction de pro- ou de prébiotiques ; elles peuvent être prescrites chez un nourrisson de moins de 6 mois qui a tendance à la constipation (**Rigo, 2011**).

§ Les préparations anti-reflux ou anti-régurgitations

Sont enrichies avec de l'amidon, et ont en général une teneur en protéines plus élevée avec une prédominance de caséine. Les régurgitations légères à modérées sont la manifestation d'un reflux gastro-œsophagien physiologique et transitoire chez le nourrisson, ne nécessitant aucune exploration ni aucune intervention diététique ou thérapeutique. Chez une petite proportion de nourrissons, les régurgitations sont une des manifestations d'un reflux gastro-œsophagien pathologique, pouvant associer d'autres symptômes tels que douleurs, difficultés d'alimentation, croissance faible ou symptomatologie respiratoire (**Rigo, 2011**).

II-2-3- Durée de l'allaitement artificiel :

Après avoir commencé avec un lait 1^{er} âge, ce dernier doit être remplacé par un lait 2^{ème} âge lorsque l'un des repas a été totalement diversifié. Après la diversification, il est important de conserver au moins trois biberons de lait infantile jusqu'à 10–12 mois afin d'assurer au mieux l'ensemble des besoins nutritionnels du nourrisson. Après l'âge de 1an, le lait 2^{ème} âge peut être poursuivi ou doit être remplacé par un lait de croissance, pour permettre notamment un apport suffisant en fer. Le lait de croissance peut être prolongé sans limite d'âge tant que l'enfant le souhaite. Il est même être utile de le maintenir tant que l'enfant ne consomme pas au moins 100g de viandes–poissons–œufs par jour (**Tounian, 2011**).

II-3-Allaitement mixte :

Il est possible de combiner l'allaitement maternel et l'allaitement au biberon dans certains cas : sécrétion lactée tardive ou insuffisante (mauvaise prise de poids de bébé), allaitement de jumeaux, mise au repos de sein infecté, choix de la mère. Cet allaitement mixte, s'il permet de conserver les avantages du lait maternel (20% de la ratio en lait maternel suffisant) présente des inconvénients certains : il ne dispense pas de préparation de biberons, il ne stimule pas suffisamment la lactation, le nourrisson a des difficultés à adapter sa succion, il préfère vite le goût plus sucré du lait infantile et comprend vite que le lait vient tout de suite (**Bisch et al., 2007**).

On a recourt à l'allaitement mixte dans trois circonstances:

- La mère produit une quantité de lait insuffisante et désire prolonger l'allaitement.
- La mère produit suffisamment de lait mais désire disposer de plus d'autonomie.
- La mère veut ou doit arrêter d'allaiter (baisse de la production de lait, convenances personnelles de la mère, sevrage progressif) (**Dupin et al., 1992**).

III-1-Les probiotiques:

III-1-1-Définition:

Le terme “probiotique”, issu des termes grecs “pros” et “bios”, signifie « pour la vie » (Bernier , 2010).

La notion de probiotique est née et a donné lieu à plusieurs définitions au cours du temps, il semble y avoir aujourd'hui un consensus sur la définition récemment publiée par un comité d'expert réunis par la FAO, l'OMS, et l' ILSI qui précisent que les probiotiques sont " des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte au-delà de l'effet nutritionnel premier" (Luquet &Corrieu , 2005).

Il existe 400 à 600 familles de probiotiques et on très loin de toutes les connaître. Les chercheurs planchent d'arrache-pied pour découvrir leurs secrets. Parmi celles déjà étudiées, toutes les souches de bactéries "amis" n'ont pas les mêmes qualités ni les mêmes propriétés. Certaines soutiennent l'immunité ou calment les douleurs, d'autres facilitent la digestion. Il faut bien choisir "sa" ou "ses" souches en fonction résultat recherché. En effet, tous les probiotiques sont des bactéries, mais toutes les bactéries ne sont pas intéressantes, soit parce qu'elles n'ont pas fait la preuve de leur utilité, soit parce qu'elles ne survivent pas au processus digestif (Festy , 2014).

Les probiotiques incluent différentes espèces bactériennes dont les plus courantes sont des bactéries à Gram positif qui appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Mais d'autres genres bactériens peuvent être utilisés comme des souches appartenant aux streptocoques, entérocoques ou encore des bactéries à Gram négatif comme *Escherichia coli*, de même que des levures comme *Saccharomyces boulardii* (Butel, 2014).

Il existe 4 grands groupes de probiotiques : (Tableau N°5)

A) Les ferments lactiques :

Ils sont capables de produire de l'acide lactique par la fermentation de certains sucres comme le lactose. Ils sont regroupés en 2 catégories, en fonction de leur morphologie :

- Les Lactobacilles (*Lactobacillus bulgaris*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus caséi*).
- Les coques (Entérocoques et Streptocoques) (Robin & Rouchy , 2011).

B) Les bifidobactéries :

D'origine humaine ou animale, elles appartiennent à la flore intestinale normale et possèdent une bonne résistance aux sucs gastriques. La population de bifidobactéries diminue avec l'âge et leurs espèces varient selon l'âge (**Robin & Rouchy, 2011**).

C) Les différentes levures de type *Saccharomyces cerevisiae*:

Elles sont principalement utilisées par l'industrie agroalimentaire mais peuvent aussi être utilisées en tant que complément alimentaire (**Robin & Rouchy, 2011**).

D) Les autres bactéries sporulées, dont *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* (Robin & Rouchy, 2011**).**

Tableau N°5: Principales espèces microbiennes utilisées comme probiotiques (**Bernier, 2010**).

Genre	Espèce
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. reuterii</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. sporogenes</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. adolescentis</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. cremoris</i> <i>L. lactis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. megaterium</i> <i>B. clausii</i> <i>B. laterosporus</i> <i>B. pumilus</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae var boulardii</i>

III-1-2- Découverte:

Il y a un siècle, **Elie Metchnikoff (1907)** (scientifique russe, lauréat du Nobel et professeur à l'Institut Pasteur à Paris) a affirmé que les bactéries de l'acide lactique offraient des bénéfices pour la santé conduisant à une plus grande longévité. Il suggéra que "l'auto intoxication intestinale" et que le vieillissement en résultant pouvait être supprimé en modifiant la flore microbienne de l'intestin et en remplaçant des microbes protéolytiques tels que *Clostridium* qui produit des substances toxiques comme les phénols, les indoles et l'ammonium à partir des protéines de la digestion par des microbes utiles. Il développa un régime alimentaire avec du lait fermenté par une bactérie appelée "Bacille bulgare". En 1917, le Professeur allemand **Alfred Nissle (1917)** isola une souche non pathogène d'*Escherichia coli* à partir des selles d'un soldat de la première Guerre mondiale qui n'avait pas développé d'entérocolite lors d'une épidémie sévère de shigellose. Les troubles du tractus intestinal étaient fréquemment traités par des bactéries vivantes non pathogènes pour modifier ou remplacer la flore microbienne intestinale. La souche d'*Escherichia coli* isolée par **Nissle** en **1917** est un des rares exemples de probiotiques qui ne soit pas une bactérie de l'acide lactique. Une Bifidobactérie a d'abord été isolée par **Henry Tissier (1900)** (de l'Institut Pasteur) à partir d'un enfant nourri au sein, et il l'appela *Bacillus bifidus communis*. **Tissier (1900)** affirma que la bifidobactérie réduirait la bactérie protéolytique qui cause la diarrhée et il recommanda l'administration de bifidobactéries aux enfants souffrant de ce symptôme. Le terme "probiotiques" fut d'abord introduit en **1965** par **Lilly et Stillwell**; par contraste avec les antibiotiques, et les probiotiques furent définis comme facteurs microbiologiquement dérivés stimulant la croissance des autres organismes. En **1991**, **Roy Fuller** a mis l'accent sur la demande de viabilité des probiotiques et introduisit l'idée qu'ils avaient un effet bénéfique sur l'hôte (**WGO, 2008**).

III-1-3- Nomenclature :

Dans la communauté scientifique, il existe une nomenclature reconnue pour les souches probiotiques, elles doivent être classées par genre, espèce, avec une désignation alphanumérique ; par exemple : *Lactobacillus casei* DN-114 001 ou *Lactobacillus rhamnosus* GG. Il n'existe pas de réglementation pour les noms commerciaux et les marques, et les compagnies peuvent appeler leurs « produits » probiotiques comme elles le désirent par exemple : LGG pour *Lactobacillus rhamnosus* GG (**WGO, 2008**) (**Figure N° 19**).

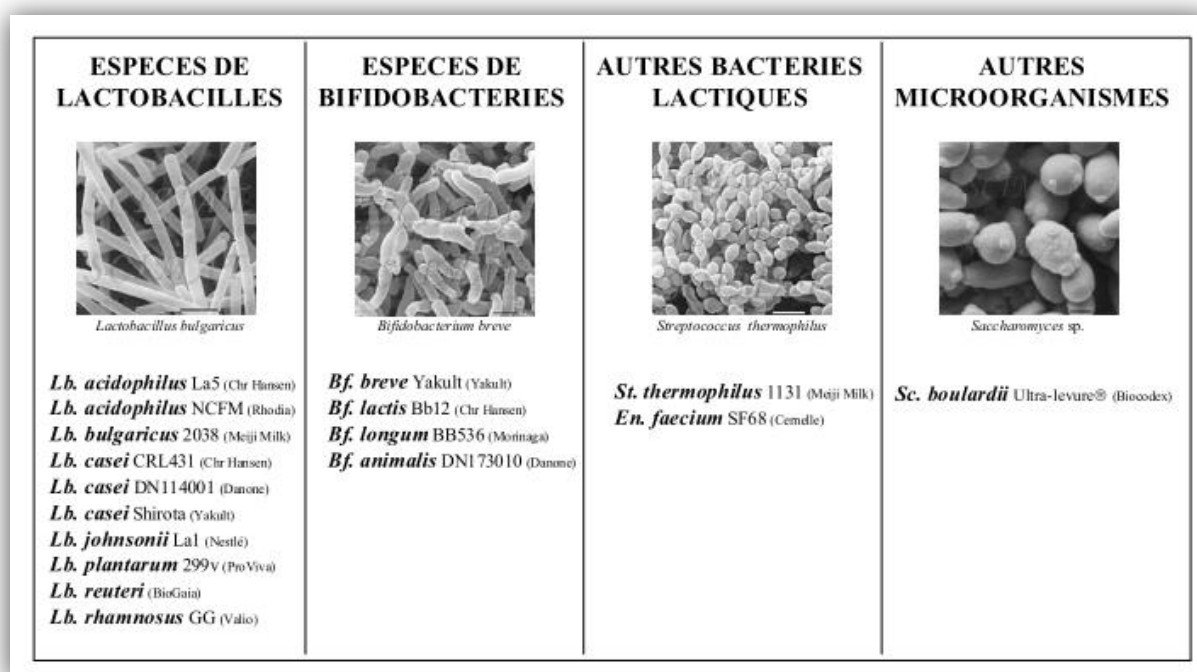


Figure N° 19: Principales souches probiotiques commercialisées
(Mombelli & Gismondo, 2000 ; Playne & Salminen, 2002).

III-1-4- Caractéristiques des souches probiotiques:

Les souches probiotiques doivent avoir certaines caractéristiques pour d'une part, atteindre leur site d'action, en général l'intestin et, d'autre part, agir. Par ailleurs, leur ingestion doit être sans risque pour l'hôte (**FAO & WHO, 2001; FAO & WHO, 2002**).

L'effet probiotique étant dépendant de la souche, la souche doit être parfaitement identifiée (identifications phénotypique et génotypique) et caractérisée. La souche de préférence d'origine humaine doit être stable au cours du procédé de fabrication et de sa conservation avant utilisation. Elle doit résister aux stress physiologiques rencontrés lors de son ingestion (pH acide de l'environnement gastrique, résistance aux sels biliaires), et doit adhérer afin d'assurer un contact maximum avec la muqueuse intestinale. Par ailleurs, les probiotiques doivent être dénués de pathogénicité, ne pas être porteurs ou en mesure d'acquérir facilement des gènes de résistance aux antibiotiques. Enfin, cette souche doit avoir des effets bénéfiques prouvés chez l'hôte. Certains effets bénéfiques des souches probiotiques peuvent être reliés à la modulation du microbiote de l'hôte via différents mécanismes : compétition pour des sites d'attachement, production de métabolites tels que les acides gras à chaîne courte, production de bactériocines permettant la modulation du microbiote (**Figure N° 20**).

Les effets bénéfiques peuvent également être directs par l'apport d'enzymes comme la bêta-galactosidase ou via les structures bactériennes comme l'ADN, le peptidoglycane, le LPS, la flagelline. Ces structures ainsi que les métabolites produits peuvent interagir avec l'épithélium intestinal par exemple en stimulant le système immunitaire intestinal ou en modifiant la perméabilité intestinale, influençant ainsi les fonctions physiologiques. Des effets bénéfiques peuvent également être observés à distance au niveau systémique ou sur d'autres organes. (Butel, 2014).

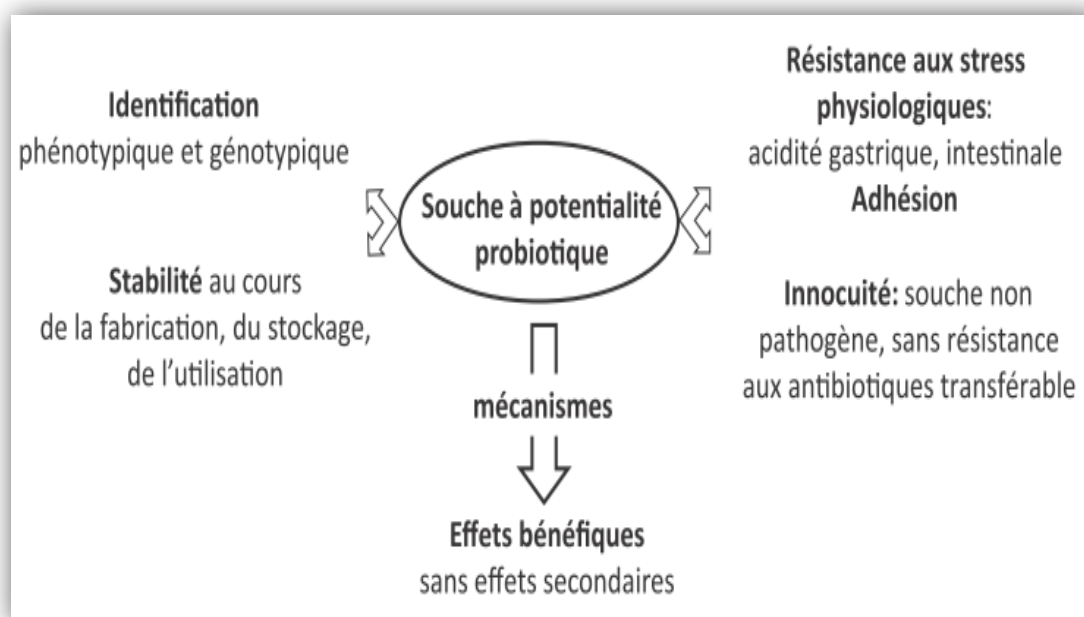


Figure N° 20: Caractéristiques des souches probiotiques (Butel, 2014).

III-1-5- Rôle des probiotiques:

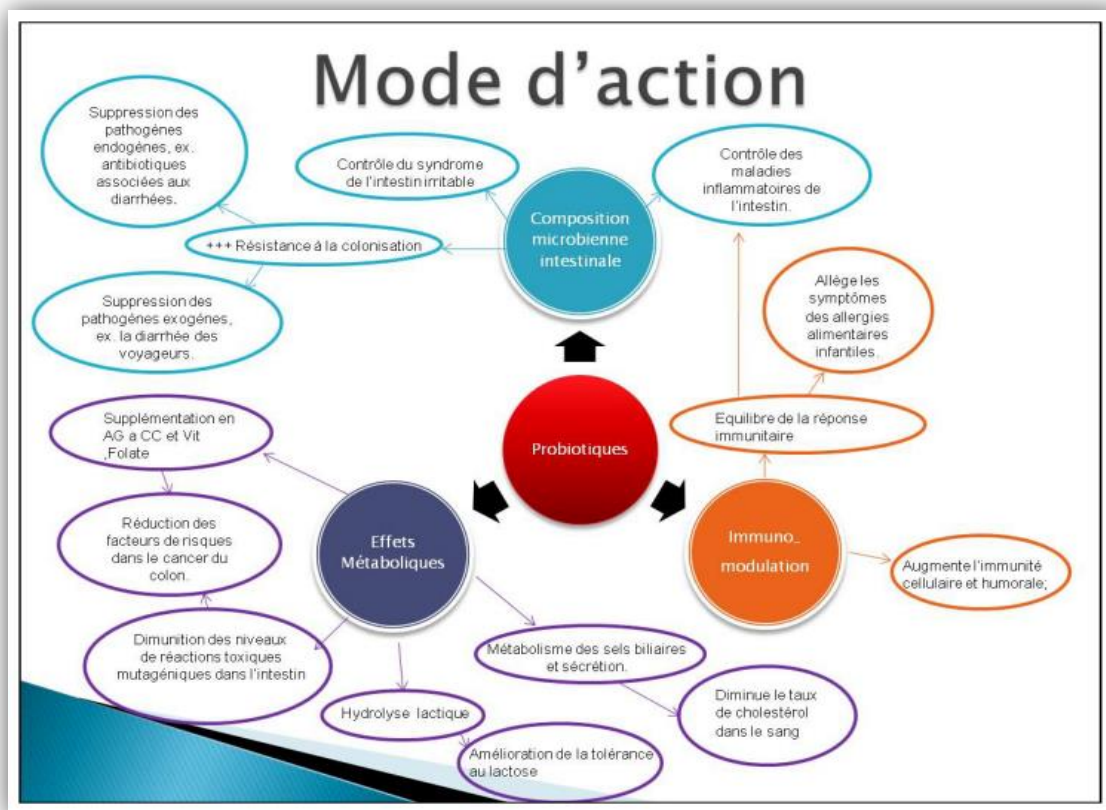


Figure N° 21: Les effets bénéfiques de probiotiques sur la santé (Colarelli, 2010).

Cette figure a pour but de bien visualiser les trois grandes catégories sur lesquelles les probiotiques agissent :

- Au niveau métabolique.
- Sur l'immunomodulation.
- Sur la composition de la flore intestinale.

III-1-5-1-Probiotiques et diarrhées:

Les infections intestinales aiguës ou chroniques sont une des principales cibles des probiotiques. Parmi elles, les diarrhées d'origine infectieuses sont une des premières utilisations des probiotiques par leur effet barrière contre les pathogènes. Plusieurs études démontrent une certaine efficacité dans le traitement des diarrhées à rotavirus avec une diminution significative mais modeste de la durée de la diarrhée d'environ un jour, une diminution des diarrhées durant plus de 4 jours et du nombre de selles, comme le montre la méta-analyse de la Cochrane sur 63 essais cliniques. Cependant, malgré la diversité des études tant au niveau de la ou des souche(s), des doses utilisées que des effets cliniques recherchés, ce qui limite la validité des résultats des méta-analyses, les probiotiques montrent une efficacité essentiellement sur la durée de la diarrhée, sans effet secondaire. L'effet des probiotiques paraît limité en cas de diarrhée persistante (**Butel, 2014**).

III-1-5-2-Diarrhée liée à l'antibiothérapie:

Il s'agit d'une des complications les plus fréquentes de l'antibiothérapie, préférentiellement observée sous antibiothérapie à large spectre, mais qui a été décrite avec de nombreuses molécules. À l'extrême, le déséquilibre de la flore intestinale peut conduire à l'émergence de *Clostridium difficile*, bactérie qui peut être à l'origine d'une colite pseudo-membraneuse. Certains probiotiques, médicamenteux ou alimentaires, peuvent prévenir la diarrhée liée à l'antibiothérapie ainsi que l'infection par *Clostridium difficile*. Ils n'ont pas pour autant d'effet thérapeutique curatif (**Schneider , 2008**).

III-1-5-3-Effets des probiotiques sur la digestion du lactose:

Le lactose des produits laitiers est digéré dans l'intestin grêle de l'homme par une enzyme membranaire, la lactase, à l'âge adulte, la plupart des habitants de la terre ont une malabsorption partielle du lactose ingéré par déficit primaire acquis en lactase ; si les quantités de lactose non absorbées dans l'intestin grêle sont importantes, il peut en résulter des symptômes digestifs. On parle alors d'intolérance au lactose. Chez l'adulte déficient en lactase, le yaourt contenant *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* augmente la digestion du lactose dans l'intestin grêle, par comparaison à un lait standard ou à un produit laitier fermenté et thermisé, le traitement thermique affectant la viabilité des micro-organismes et neutralisant l'activité de la lactase bactérienne (**Flourié & Nancey, 2007**).

Les probiotiques du yaourt réduisent la mal digestion d'une charge en lactose chez des sujets hypolactasiques de 6% à 33 % selon les études. Le yaourt améliore aussi la tolérance clinique au lactose. De nombreux autres probiotiques, tel *L. acidophilus*, ont aussi un effet favorable, bien qu'en général quantitativement moins prononcé (**Flourié & Nancey, 2007**).

III-1-5-4-Cancer colorectal:

À côté de l'hérédité, les facteurs de risque environnementaux au premier rang desquels l'alimentation jouent un rôle majeur dans l'étiologie du cancer colorectal. Bien que la consommation de graisses (saturées) et de fibres ait été la plus étudiée comme facteur de risque/protection, des données épidémiologiques suggèrent une relation inverse entre consommation de laits fermentés et incidence du cancer colorectal. Il existe des données chez l'animal (modèles murins de cancérogenèse) avec des effets divers de l'administration de bactéries lactiques sur la survenue de tumeurs et la survie des animaux. Bien que les mécanismes de prévention de la cancérogenèse colorectale par les probiotiques soient largement inconnus, on sait qu'ils comprennent la stimulation de l'immunité anticancéreuse, l'élimination de bactéries pathogènes, la séquestration de mutagènes, l'interaction avec les colonocytes, la production de composés (tels que les acides gras à chaîne courte) inhibant ces mutagènes ainsi que la réduction du pH luminal. Certaines enzymes bactériennes ont la propriété de transformer des composés luminaux procarcinogéniques (hormones, sels biliaires) en carcinogènes. Plusieurs essais ont montré que des probiotiques étaient capables de diminuer les concentrations fécales de ces enzymes. Ainsi, l'administration de *L. acidophilus* et *L. gasseri* est capable de réduire les activités de la nitroréductase, de l'azoréductase et de la β -glucuronidase au niveau fécal, à hauteur de 50 à 75 % (**Schneider & Giudicelli, 2007**).

III-1-5-5- Éradication d'*Helicobacter pylori*:

L'étendue du problème *Helicobacter pylori* est une bactérie à l'origine de la grande majorité des ulcères gastro-duodénaux, des gastrites chroniques, mais également des adénocarcinomes gastriques et lymphomes B de zones marginales extraganglionnaires de type MALT (« mucosa-associated lymphoid tissue ») de l'estomac (**Schneider, 2007**).

Les probiotiques individuellement efficaces sur l'éradication d'*Hp* étaient *Lactobacillus casei* DN-114 001, *Lactobacillus acidophilus* LB , ainsi qu'un mélange de lactobacilles et bifidobactéries , d'autres souches étant capables de diminuer les effets secondaires digestifs, sans pour autant augmenter le taux d'éradication (Schneider, 2007).

III-1-5-6- Rôle des probiotiques dans la maladie de Crohn:

Concernant la maladie de Crohn, plusieurs essais randomisés contrôlés ont tenté de montrer une efficacité de divers probiotiques soit dans le maintien en rémission, soit en prévention de la récurrence postopératoire. Plusieurs essais randomisés contrôlés ont étudié l'efficacité de *Saccharomyces boulardii* dans le traitement de la maladie de Crohn. Un essai réalisé chez vingt malades qui, après le traitement d'une poussée de la maladie de Crohn associé à *Saccharomyces boulardii* pendant 2 semaines pour tous, recevaient pendant sept semaines *Sacchaomyces boulardii*. Le critère de jugement était le nombre de selles émises par jour. Ce nombre ne différait pas entre les deux groupes au début du traitement mais, au terme de l'étude, il était diminué dans le groupe *Saccharomyces boulardii* (Rofes, 2014).

III-1-5-7- Probiotiques et infections urinaires :

Les infections des voies urinaires sont parmi les infections bactériennes les plus courantes chez les femmes. Elles correspondent à une inflammation associée à une infection de la vessie causée par la prolifération anormale d'agents infectieux dans le système urinaire. Elles concernent surtout les femmes de 20 à 30 ans, ainsi que les femmes ménopausées. Le principal pathogène en cause est *E. coli* uropathogène. Cette bactérie fait partie de la flore fécale, colonise ensuite le vagin et l'urètre distal, puis atteint la vessie. Les réservoirs de bactéries uropathogènes peuvent demeurer dans le tractus gastro-intestinal et dans le vagin de la personne sensible. Les lactobacilles du vagin préviennent la colonisation initiale des bactéries uropathogènes. L'évaluation de l'efficacité et de la sécurité des probiotiques dans la prophylaxie contre les uropathogènes a mis en évidence l'intérêt de la plupart des lactobacilles et en particuliers de certaines souches : *L. rhamnosus* GR-1 et *L. reuteri* RC-14 semblent être les plus efficaces (Faure et al., 2013).

III-1-5-8- Effet des probiotiques dans les phénomènes allergiques :

Chez l'enfant allergique aux protéines du lait de vache, l'utilisation d'une formule lactée hydrolysée supplémentée par *L. rhamnosus* GG a amélioré le score clinique de la dermatite atopique et la fonction de barrière intestinale, par rapport aux enfants nourris par une formule lactée non supplémentée. Une autre étude a aussi démontré que l'administration de *L. rhamnosus* GG aux femmes enceintes atopiques pendant la grossesse, puis aux nouveau-nés et aux mères pendant 6 mois, a conduit à une diminution du développement de la dermatite atopique passant de 23 % chez les couples mère/enfant traités à 46% chez les non-traités . Chez l'adulte allergique, l'ingestion pendant 5 mois de *L. rhamnosus* ATCC 53103 n'a pas eu d'effet chez 18 patients atteints d'allergie au pollen de bouleau et à la pomme (Heyman, 2007).

III-1-5-9- Stimulation de l'immunité innée par les probiotiques:

Les cellules mononucléées périphériques (PBMC) humaines ont été les plus utilisées, bien qu'elles ne reflètent que partiellement les mécanismes d'activation locale au niveau intestinal. Par exemple, après stimulation par *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium ssp* ou *L. helveticus*, ces cellules sécrètent des cytokines pro-inflammatoires . La sécrétion de cytokines peut être dépendante de la viabilité des souches probiotiques et l'intensité de la réponse cytokinique peut aussi être dépendante de la souche et de la dose utilisée . Ces études in vitro, qui permettent un contact direct entre bactérie et cellule immunitaire, sont peu conformes à la configuration in vivo, où les probiotiques ingérés ne sont pas en contact direct avec le système immunitaire, mais en sont séparés par la couche épithéliale intestinale. (Heyman, 2007) (Figure N° 22).

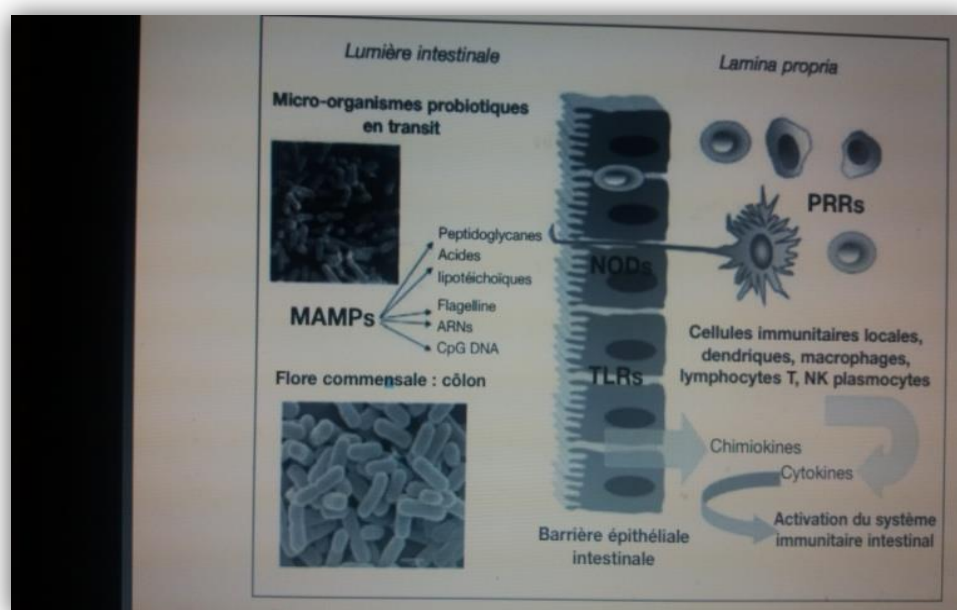


Figure N° 22 : Activation de l'immunité innée par les probiotiques
(Heyman, 2007)

Les micro-organismes en transit dans la lumière intestinale comportent de nombreux composants structuraux appelés MAMPS (microbial associated molecular pattern) capables d'interagir avec les cellules épithéliales bordant la muqueuse intestinale, voire les cellules du système immunitaire local, via des récepteurs spécifiques appelés PRR (pattern recognition receptors) formés essentiellement des TLRs (toll-like receptors) et des molécules NODs (nucleotide binding oligomerization domain).

III-2-Les prébiotiques:

III-2-1- Définition:

Les prébiotiques ont été définis comme des "ingrédients alimentaires non digestibles qui stimulent de manière sélective, au niveau du côlon, la multiplication ou l'activité d'un ou d'un nombre limité de groupes bactériens susceptibles d'améliorer la physiologie de l'hôte". À ce jour, les groupes bactériens concernés sont essentiellement les bifidobactéries (on parle alors d'effet bifidogène) et les autres bactéries lactiques. Le niveau de preuve que ces groupes soient des indicateurs d'une flore bénéfique est discutable, car il repose essentiellement sur l'opinion d'experts. Leurs arguments sont que les bifidobactéries sont dominantes dans la flore du nourrisson nourri au sein (Rambaud *et al.*, 2004).

Les prébiotiques représentent une source d'énergie métabolisable par la microflore intestinale ou probiotique (**Gibson & Roberfroid, 1995; Holzapfel & Schillinger, 2002**).

III-2-2- Composition:

Les prébiotiques les plus connus et déjà utilisés sont les fructanes-fructo-oligosaccharides (FOS), oligofructose, inuline- et d'autres oligosides de galactose et transgalactose (GOS et TOS). De nombreux autres glucides pourraient revendiquer l'appellation de prébiotiques (xylo-oligosaccharides, isomalto- oligosaccharides, gluco- oligosaccharides, etc.). Des sucres alcools pourraient aussi avoir des propriétés prébiotique. Le lactulose est également un prébiotique, certains prébiotiques sont naturellement présents dans des aliments et d'autres ajoutés dans des aliments à visée fonctionnelle ou dans des suppléments alimentaires. **(Rambaud et al., 2004)**.

Actuellement, le plus important des polysaccharides naturels, autre que l'amidon, est l'inuline, qui se trouve dans les racines de chicorée, les artichauts, les asperges, les topinambours, les oignons, l'ail, le poireau, la banane...C'est un fruto-saccharide naturel. La liaison β 1-2 qui unit les radicaux fructosyl entre eux n'est pas hydrolysable par les enzymes digestives de l'homme. Elle l'est, au contraire, par l'enzyme β fructosidase des bifidobactéries **(Dacosta, 2001), (Tableau N°6)**.

Tableau N°6: Structures et sources des prébiotiques (Al-Sheraji *et al.*, 2013 ; Patel et Goyal, 2011)

Type de prébiotiques	Composition	Liaison	Source
Cyclodextrine Fructooligosaccharides	D-Glc (Fru)n-Glc	α -(1,4) β -(2,1) et α -(1,2)	Glucanes hydrosolubles Asperge, betterave à sucre, ail, chicorée, oignon, blé, miel, banane, orge, tomate
Galactooligosaccharides	(Gal)n-Glc	α -(1,4) et β -(1,6)	Le lait humain et le lait de vache
Isomaltulooligosaccharide Isomaltulose (ou palatinose) Lactulose Lactosucrose	(Glc)n (Glc-Fru) Gal-Fru Gal-Glc-Fru	α -(1,6) α -(1,6) β -(1,4)- α -(1,2)- β - Fru	Amidon Saccharose Lactose (Lait) Lactose
Maltooligosaccharides Oligosaccharide de soja	(Glc)n (Gal)n-Glc-Fru	α -(1,4) α -(1,6)- α -(1,2)- β - Fru	Amidon Soja
Xylooligosaccharides	(Xyl)n	β -(1,4)	Fruits, Légumes,

III-2-3- Critères de sélection des prébiotiques:

Tableau N°7: Proposition de critères de sélection des prébiotiques à application intestinale (Franck, 2002; AFSSA, 2003).

Critères de sécurité	-Produits ou organismes à l'origine de l'ingrédient parfaitement caractérisés -Procédé d'obtention parfaitement décrit -Identification et caractérisation des molécules actives -Identification des microorganismes ciblés pour la fermentation -Pas de production excessive de gaz
Critères fonctionnels	-Non digestibilité et non assimilation dans la partie supérieure du système gastro-intestinal -Fermentescible dans le côlon de façon sélective par un nombre limité de bactéries potentiellement favorables -Capacité à altérer la composition de la microflore colique en faveur d'une flore potentiellement plus saine -Induction éventuelle d'effets systématiques qui peuvent être positifs pour la santé de l'hôte
Critères technologiques	-Pas de modification de l'ingrédient au cours des transformations et du stockage des préparations

III-3- Les symbiotiques

Un probiotique peut être associé à un substrat, qui lui est spécifique, appartenant à la classe des prébiotiques. Le mélange ainsi constitué est alors appelé symbiotique : un fructo-oligosaccharide peut être associé de cette manière à une souche de bifidobactéries ou bien du lactitol à un lactobacille (**Gibson & Roberfroid, 1995**). Ce type de préparation devrait permettre une survie plus longue des bactéries dans le supplément alimentaire, avec en conséquence une date limite d'utilisation plus tardive, un nombre accru de bactéries atteignant le côlon sous forme viable, une stimulation dans le côlon de la croissance et de l'implantation des bactéries exogènes et une activation de leur métabolisme (**Bergmark, 1998**).

Un symbiotique a notamment montré son intérêt chez patients atteints de rectocolite hémorragique (RCH). Ce mélange contenait un probiotique, *Bifidobacterium longum* et un prébiotique, l'inuline. L'administration de cette association pendant un mois chez 18 patients de 24 à 67 ans a permis d'accroître de façon importante le taux de bifidobactéries au niveau fécal. Les défensines qui sont exprimées de manière excessive et les cytokines ayant un rôle pro-inflammatoire ont diminué en nombre. L'administration de ce symbiotique aura également un impact positif sur l'histologie des muqueuses. Un autre exemple de symbiotique concerne une association de la souche *Lactobacillus helveticus* M92 avec de l'inuline, ou encore du lactulose et du raffinose à raison de 10g/l. L'administration de ce mélange chez la souris a montré que ce symbiotique avait un effet immuno- modulateur, en particulier lorsque le prébiotique utilisé était l'inuline. Les IgA sécrétoires et totales ont vu leur taux augmenter au niveau sérique, chez les souris recevant ce symbiotique par rapport aux souris témoins (**Frece et al., 2009**).

IV-1- Les acides nucléiques en écologie microbienne :

IV-1-1- L'ARN ribosomique :

Les ARN ribosomiques (ARNr) sont formés de sous unités pouvant se grouper en polysomes. Chez les organismes procaryotes, il existe des ribosomes 70S formés de 2 sous-unités. La petite unité 30S est composée de 21 protéines et d'ARNr 16S (1541 nucléotides chez *E. coli*) (**Moore, 1998**). Lorsque des régions sur sa séquence sont complémentaires (appariement AU et GC), le brin d'ARN se replie sur lui même pour former une structure en "épingle à cheveux". Dans le ribosome les molécules d'ARNr, repliées en une structure secondaire, peuvent être représentées à partir d'études comparatives des séquences primaires (**Woese et al., 1975 ; Noller et Woese, 1981; Noller, 1984; Gutell et al., 1994**). Une modification de la séquence primaire de l'ARNr va influencer directement sa structure secondaire. Pour maintenir la fonctionnalité de la molécule, la structure secondaire de l'ARNr doit être conservée dans l'ensemble du monde vivant par le biais de mutations compensatoires (**Hancock et al., 1988; Wheeler et Honeycutt, 1988; Otsuka et al., 1999**).

IV-1-2-L'ARN 16S :

L'ARNr 16S se compose de 9 régions hypervariables qui sont suffisantes pour différencier diverses espèces bactériennes et de 10 régions conservées. La région 16S du gène bactérien est petite (1,5 Kb de taille) et très conservée (**Peterson et al., 2008**) . Les régions conservées sont la source d'amorces (ou sondes) universelles, tandis que les régions hypervariables permettent de créer des amorces spécifiques d'un groupe précis de bactéries (**Khamisse ,2012**) (**Figure N° 23**).

Les régions actuellement concernées dans l'étude du microbiote intestinal sont les régions variables V2, V4 et V6 (**Hamady& Knight, 2009**).

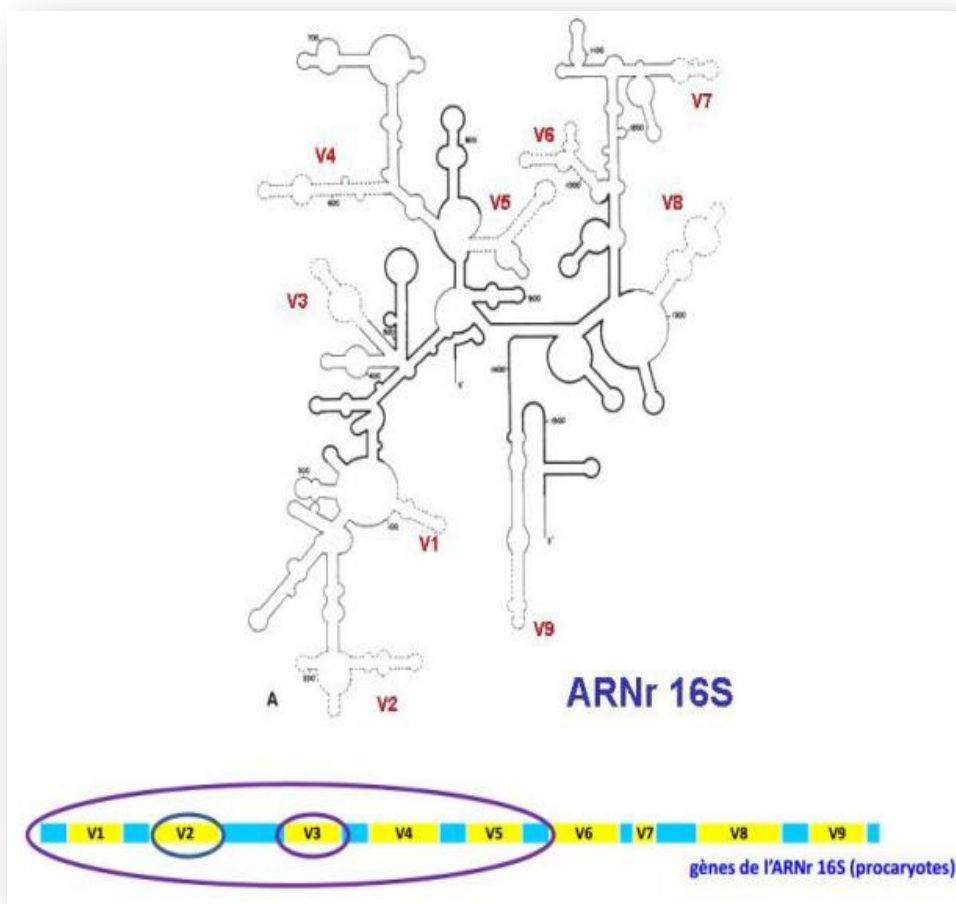


Figure N° 23 : Schéma illustrant l'ARNr 16S (Seksik , 2013).

- Régions V « variables » en pointillés permettant de cibler un groupe phylogénétique.
- Régions en trait noir épais continu « hypervariables » permettant de cibler une espèce bactérienne,
- Les régions restantes sont des régions conservées.
- Pour le schéma simplifié : les régions bleues sont les régions conservées et les régions jaunes sont les régions variables.

IV-1-3-Le choix de l'ARN 16S

Le choix de Woese et de ses collaborateurs s'est porté sur la petite sous-unité de l'ARNr (16S chez les Procaryotes et 18S chez les Eucaryotes) pour plusieurs raisons (**Pace et al., 1985; Ludwig & Schleifer, 1994; Ludwig et al., 1998**) :

- ∂ Sa présence est universelle et il y accomplit le même rôle chez tous les organismes.
- ∂ Sa séquence est une alternance de domaines dont les vitesses d'évolution varient ; permettant de comparer des espèces très proches sur des domaines hypervariables et des espèces très éloignées sur des domaines très conservés ;
- ∂ Évolution lente ;
- ∂ Relativement facile à isoler en raison de son abondance dans les cellules ;
- ∂ Sa séquence est facilement obtenue par des méthodes standard d'extraction et de séquençage. Les techniques d'extraction (**Dorsch & Stackebrandt, 1992**) et de séquençage ont été simplifiées et optimisées au fil des ans par l'introduction du séquençage des ADNr (**Böttger, 1989**) plutôt que des ARNr (**Lane et al., 1985**), et l'utilisation du "cycle-sequencing" à l'aide d'amorces fluorescentes (**Hiraishi, 1992; Ruano et al., 1993**).
- ∂ Préféré au 5S et au 23S en raison de sa taille moyenne et de sa structure secondaire moins marquée. Sa séquence est suffisamment longue pour réaliser des comparaisons statistiquement cohérentes.

En effet, la nouvelle classification phylogénétique des bactéries se base sur des critères de proximité génétique et non plus sur de simples critères phénotypiques. L'ADNr 16S codant pour l'ARNr 16S correspondant étant la molécule la mieux renseignée dans les bases de données de séquences nucléotidiques, ceci en fait la base de la phylogénie bactérienne (**Khamisse, 2012**).

IV-2- L'analyse du métagénome :

Les outils utilisés diffèrent entre les études et sont soit le séquençage de l'ARNr 16S, soit le séquençage complet du microbiome associé à la quantification du nombre de gènes (**Doré et al., 2017**).

Le séquençage de nouvelle génération a révolutionné et accéléré les découvertes dans le domaine du microbiote : grâce au séquençage haut débit, on a pu analyser la diversité microbienne en ayant accès aux séquences des souches anaérobies, pour lesquelles les protocoles de culture *in vitro* ne sont pas toujours fiables. Environ 85 % des souches ne sont connues que par la séquence de leurs gènes. La métagénomique a bénéficié de protocoles optimisés d'extraction de l'acide désoxyribonucléique (ADN) bactérien ainsi que des performances des séquenceurs de nouvelle génération qui permettent un séquençage en profondeur donnant accès à des séquences d'ADN peu représentées. Ces expériences ont été principalement réalisées à partir d'ADN bactérien extrait des selles, le tractus gastro-intestinal étant le compartiment de l'organisme le plus densément colonisé (**Doré et al., 2017**).

La métagénomique est une approche nouvelle et puissante, qui consiste à analyser les génomes de tous les micro-organismes d'une niche écologique donnée. Techniquement, l'ADN des populations bactériennes est extrait, purifié, cloné et séquencé par les méthodes à haut débit. L'analyse informatique des séquences permet d'obtenir un répertoire génétique complet de micro-organismes dominants, cultivables ou non. Par ailleurs, il est possible de réaliser des tests fonctionnels sur certains clones pour repérer des propriétés biologiques spécifiques (**Barbut & Joly, 2010**).

IV-3- Les techniques moléculaires d'étude de la flore microbienne intestinale :

Les méthodes d'analyses moléculaires ont permis d'estimer à près d'un millier le nombre d'espèces composant le microbiote d'un individu adulte. Le microbiote humain est caractérisé par une extrême spécificité d'hôte : si l'on examine le microbiote de dix personnes différentes, on ne trouvera qu'une seule espèce commune. Près de 80 % des espèces dominantes observées dans le microbiote fécal d'un individu lui sont propres (**Suau et al., 1999**).

IV-3-1-La PCR :

La « Polymerase Chain Reaction » (PCR) est une technique de répllication ciblée *in vitro* qui permet d'obtenir d'un échantillon complexe et peu riche un grand nombre de copies d'une séquence de nucléotides donnée. En quelques heures on obtient plusieurs millions de copies de la séquence. L'amplification est exponentielle puisque d'un cycle de PCR à l'autre le nombre de séquences à répliquer double (**Grosdemange , 2014**).

La **Figure 24** représente le protocole de cette méthode. Il s'agit d'ajouter à l'ADN à amplifier des amorces spécifiques du segment d'ADN voulu, de l'ADN polymérase et un mélange des quatre désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN. Tous sont ajoutés en large excès par rapport à l'ADN. La séquence cible à amplifier est déterminée par le couple d'amorces choisi. Chaque cycle de PCR est composé de 3 étapes successives à 3 températures différentes : La dénaturation des 2 brins, l'hybridation puis l'élongation (**Grosdemange , 2014**).

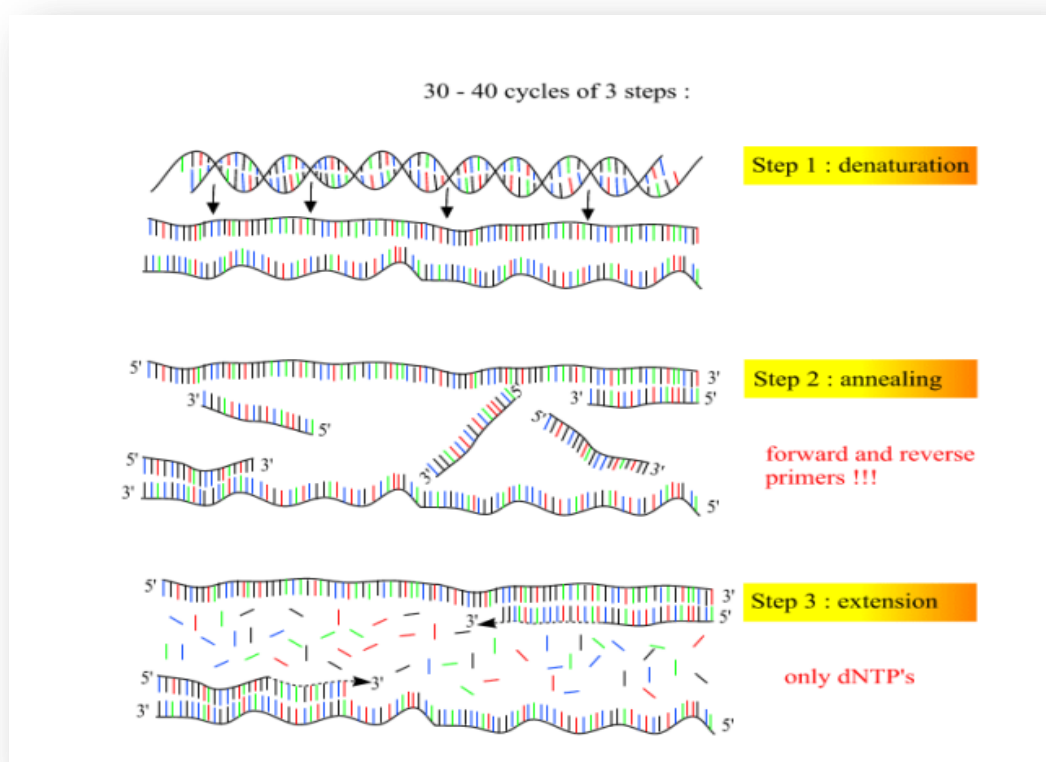


Figure 24 : Étapes de l'amplification PCR (**Andy Vierstraete, 1999**)

IV-3-2- Le pyroséquençage :

Le pyroséquençage est une autre méthode de micro-séquençage qui a fait l'objet d'une automatisation poussée ; elle est illustrée dans la **Figure 25**. Il s'agit d'effectuer en parallèle 96 réactions de micro-séquençage en plaque micro-titration, en utilisant la fluorescence pour détecter l'addition en temps réel de chaque nucléotide sur une amorce; les nucléotides sont ajoutés et enlevés des micro-puits par cycle. Quand les conditions sont bien choisies, la sonde qui contient un mésappariement se liera à sa cible avec une moins bonne efficacité et ne sera donc pas digérée par la Taq polymérase (**Gibson & Muse, 2004**).

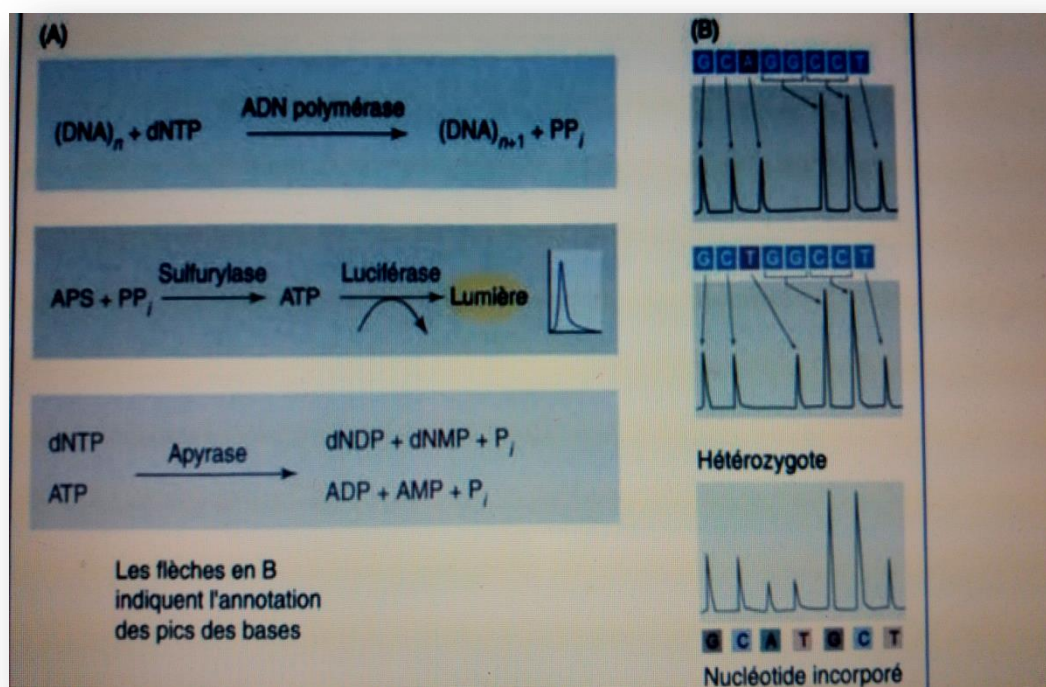


Figure 25 : Le pyroséquençage
(Gibson & Muse, 2004).

A : Le pyroséquençage est basé sur des réactions cycliques ; l'une d'elle génère de l'ATP lors de l'incorporation d'une base spécifique (cadre du haut), la suivante convertit l'ATP en lumière (cadre du centre), la dernière permet d'éliminer les nucléotides qui n'ont pas été incorporés ainsi que l'excès d'ATP avant le cycle suivante (cadre du bas).

B : L'ordre d'addition des nucléotides est connu, et on obtient, en l'espace de quelques secondes, des profils de mini-séquençage appelés pyrogrammes. La hauteur de chaque pic dû à un éclair de lumière est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés.

IV-3-3- L'électrophorèse sur gel dénaturant

Suite à l'amplification par PCR de certains fragments du gène codant pour l'ARNr 16S, l'électrophorèse sur gel dénaturant est une technique qui permet de dissocier des fragments d'ADN double brin de même longueur en ADN simple brin selon le point de fusion (point pour lequel il y a séparation des 2 brins). Le gradient de dénaturation peut être un gradient de température, on parle de Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE), ou un gradient d'urée et de formamide, on parle alors de Denaturant Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). La dénaturation de l'ADN va ralentir sa migration dans le gel. Ces techniques sont de plus en plus utilisées pour étudier l'écosystème intestinal et ne nécessitent pas d'étape d'enrichissement préalable (**Grosdemange, 2014**).

Objectif:

La flore ou microbiote intestinal, principalement des bactéries colonisant le tube digestif humain, a été peu ou superficiellement étudié. Un individu héberge 10^{14} bactéries dans son tractus digestif alors qu'il ne contient que 10^{13} cellules eucaryotes.

L'intérêt pour le microbiote intestinal ou flore intestinale, s'est considérablement multiplié ces dernières années. Depuis dix ans, les scientifiques se penchent sur un « organe » inexploré : les 100 000 milliards de bactéries vivant dans notre intestin. On y distingue différents grands groupes de bactéries aux fonctions multiples. Grâce à l'étude des selles, on peut désormais déterminer la composition de l'intestin. Le lait maternel est sans doute le premier aliment du bébé, ainsi le rôle de la mère dans la constitution du microbiote intestinal est important. Le fait que la colonisation bactérienne et la susceptibilité aux maladies soient différentes chez les nouveau-nés allaités et ceux nourris avec des formules infantiles, suggère que l'allaitement maternel joue un rôle primordial dans le développement du microbiote intestinal. Cependant, l'allaitement encouragé depuis fort longtemps pour ses multiples bienfaits, n'a pas encore révélé tous ses secrets.

Le but de ce travail est d'évaluer l'ensemble bactérien constituant la flore des selles chez le nourrisson et la flore du lait maternel par prélèvements itératifs; mais aussi de déterminer d'une manière qualitative et quantitative les germes viables présents dans la matière fécale du nouveau-né et dans le lait maternel.

L'objectif principal de ce travail est l'étude de l'influence de l'allaitement dans la mise en place de la flore microbienne intestinale du nouveau-né. L'objectif secondaire est d'identifier les souches de bactéries constitutives de la flore intestinale du nourrisson allaité naturellement et artificiellement, afin de maîtriser le comportement des différentes flores microbiennes.

L'intérêt premier est d'éclaircir l'origine du microbiote intestinal du nouveau-né, et si celui-ci a acquis une flore identique de celle de la mère.

En deuxième étape, l'étude microbiologique respective de lait / selles de cinq couples mère / nouveau-né allaités maternellement et par formules infantiles permet d'évaluer le microbiote intestinal.

V-1-Matériels biologiques:

Notre étude a porté sur cinq paires mère / nouveau-né (à terme) accueillis au service Néonatalogie de l'hôpital Ahmed-Medeghri d'Aïn Témouchent durant la période Mai 2014 à Octobre 2015. Cinq femmes, à terme, en bonne santé (âge moyenne 33.2 ± 4.53) ont été inscrites après l'accouchement dans l'établissement Mère-Enfants.

V-1-1- Prélèvement des échantillons de fèces

Les échantillons fécaux sont recueillis individuellement et aseptiquement ; dans des pots à vis stériles, puis transportés au laboratoire dans une glacière. La conservation des échantillons se fait à 4°C, en ne dépassant pas les quatre heures. Les prélèvements de fèces sont réalisés à J1, J7, J30, J90.

Les nourrissons suivis lors de cette étude, 5 allaités maternellement (3 de sexe masculin et 2 de sexe féminin) et 5 nourris au biberon (3 de sexe masculin et 2 de sexe féminin) sont nés à l'Unité de Néonatalogie de l'hôpital Ahmed-Medeghri d'Aïn Témouchent après une grossesse sans complication. Les nourrissons sont nés par voie basse, à un âge gestationnel de 39,2 semaines. Les dix nouveau-nés ne présentent aucune forme de pathologie et les mères n'ont subi aucune antibiothérapie ni pendant la grossesse, ni durant la période d'allaitement.

V-1-2-Prélèvement du lait maternel

Les prélèvements de lait maternel sont réalisés à J1, J7, J30, J90. Le lait mammaire est prélevé aseptiquement, mamelons nettoyés à la chlorhexidine. L'échantillon de lait maternel est recueilli dans un tube stérile. Les premières gouttes sont jetées pour éviter toute contamination de chlorhexidine (**Martin et al., 2005**).

Les échantillons sont stockés à 4°C jusqu'à utilisation.

V-2- Dénombrements microbiens:**V-2-1- Analyses microbiologiques :****V-2-1-1-Préparation des suspensions de dilution:****✓ Les échantillons fécaux:**

Des dilutions décimales des fèces sont effectuées dans l'eau physiologique (NaCl 0.9%). Pour chaque prélèvement, 1g d'échantillon fécal à analyser est ajouté dans un tube à essai à 9 ml du milieu NaCl 0.9% . On obtient ainsi une dilution mère de 10^{-1} à partir de laquelle on réalise des dilutions décimales jusqu'à 10^{-6} .

✓ Le lait maternel:

Des dilutions décimales de lait sont effectuées dans l'eau physiologique (NaCl 0.9%). Elles sont délicatement homogénéisées afin d'éviter la dissolution d'oxygène, puis diluées en série de 10. Chaque dilution est réalisée en double. Pour chaque prélèvement, 1ml d'échantillon de lait maternel à analyser est ajouté dans un tube à essai à 9 ml du milieu NaCl 0.9%. On obtient ainsi une dilution mère de 10^{-1} à partir de laquelle on réalise des dilutions décimales jusqu'à 10^{-6} .

V-2-1-2-Isolement et identification des bactéries lactiques:**V-2-1-2-1-Les bifidobactéries:**

L'isolement des bifidobactéries constitue l'étape la plus critique puisqu'il nécessite des conditions assez spécifiques, qui mettent en jeu des systèmes d'anaérobiose (**Scardovi, 1986**). L'isolement des bifidobactéries est réalisé en profondeur sur MRS cystéiné. Les bifidobactéries sont dénombrés sur milieu MRS supplémenté avec de la L- cystéine (0,5 g / litre) (MRS-Cys), incubées en anaérobiose à 37°C pendant 48 h dans une jarre d'anaérobiose (**Martín et al., 2009**). Après 48h d'incubation, les colonies sont sélectionnées selon leur aspect morphologique (observées grâce à une loupe binoculaire) ainsi que sur la base de leur mobilité, de leur forme, de leur état frais et par coloration de Gram.

À partir des cultures en bouillons MRS-Cys on effectue une série de repiquage, l'opération est renouvelée en prenant à chaque fois une colonie isolée. Ceci conduit à obtenir une culture dont la pureté est estimée par observation microscopique après coloration de Gram.

V-2-1-2-2-Les lactobacilles et les streptocoques :

Les lactobacilles sont dénombrés sur milieu MRS (Man-Rogosa-Sharpe) mis à incuber à 37°C pendant 72 h en anaérobiose. Le dénombrement des streptocoques et entérocoques est réalisé sur milieu M17 mis à incuber à 37°C et 42°C pendant 48 h en aérobiose (**Oxoid, 2007**). Des colonies de couleur blanchâtre ou laiteuse sont récupérées puis soumises à un test préliminaire comprenant la coloration de Gram et la recherche de la catalase. Seules les souches à Gram positif et catalase négative sont prises en considération puis purifiées par ensemencements successifs en stries.

Le nombre de colonie par souches est évalué en UFC (unité formant colonie) par millilitre d'échantillon de lait analysé et par gramme de fèces (UFC/g).

V-2-1-2-3-Purification des isolats de bactéries lactiques:

Après croissance et dénombrement des colonies, de chaque boîte de Pétri 10 colonies sont isolées afin d'effectuer une coloration de Gram et la recherche de catalase. Les bactéries Gram positif, catalase négative et non sporulées sont retenues et repiquées sur bouillon MRS (*Lactobacillus*) et sur bouillon M17 (*Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactococcus*). L'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention d'une culture pure estimée par observation microscopique après coloration de Gram (**Balows et al., 1992; Curk et al., 1996 & Heleni et al., 2006**).

V-2-1-2-4-Conservation des isolats:**⌘ La conservation à court terme:**

La conservation des isolats purifiés est réalisée par ensemencement sur gélose inclinée. Après incubation à 30°C pendant 18 heures, les tubes sont conservés à +4°C, le renouvellement des cultures se fait toutes les trois semaines (**Saidi et al., 2002**).

⌘ La conservation à long terme:

À partir des jeunes cultures (18-48 h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000t/min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute sur le culot, un milieu de culture de conservation contenant du lait écrémé, 0.2%, de l'extrait de levure et du glycérol à 30%. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes Eppendorfs à -20°C.

Les suspensions très concentrées résistent mieux à la congélation. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le lait écrémé à 0.5% d'extrait de levure, avant utilisation (**Saidi et al., 2002**).

V-2-1-3-Tests d'orientation pour l'identification des bactéries lactiques:

Sur chacune des boîtes servant aux dénombrements, nous classons les colonies en catégories selon l'aspect macroscopique. Dans chaque catégorie, nous choisissons aléatoirement une colonie supposée représentative parmi celles, observées pour réaliser les premiers tests d'orientation.

Chaque colonie suspectée être une bactérie lactique est purifiée deux fois par isolement sur le milieu MRS gélosé. Des cultures pures issues de ces isolements sont réalisées pour stocker à -20°C, dans un milieu MRS contenant du glycérol pour des analyses ultérieures. Pour une identification préliminaire des bactéries lactiques, nous nous sommes basés sur des études: microscopiques (les formes caractéristiques des cellules bactériennes, leur arrangement, la présence ou non de spore et la coloration de Gram), sur la mobilité, le test de la catalase et le type fermentaire.

V-2-1-3-1-Examen macroscopique:

Cette étude consiste à noter l'aspect des colonies bactériennes (taille, contour, pigmentation, viscosité).

V-2-1-3-2-Examen microscopique:

L'examen microscopique ($G \times 100$) est révélé par la coloration de Gram. Celle-ci permet de faire la différenciation entre les bactéries Gram positives et Gram négatives et renseigne sur la morphologie cellulaire et le mode d'association.

V-2-1-3-3-Recherche de la catalase:

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage. Le test consiste à prendre une lame porte objet propre, à déposer sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes et à émulsionner un peu la colonie suspecte obtenue sur gélose. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase: test catalase+.

V-2-1-3-4-Recherche de type fermentaire:

Le métabolisme énergétique des bactéries lactiques est exclusivement fermentaire. Ce genre est classiquement divisé selon différentes voies de fermentation :

- ✓ Les lactobacilles homo-fermentaires stricts qui ne fermentent que les hexoses par la voie d'Embden-Meyerhof en produisant presque exclusivement du lactate.
- ✓ Les lactobacilles homo-hétéro fermentaires facultatifs qui fermentent les hexoses, mais aussi les pentoses en lactate et acétate par la voie d'Embden-Meyerhof.
- ✓ Les lactobacilles hétéro-fermentaires stricts qui fermentent les hexoses en lactate, acétate (ou éthanol) et CO₂. Les pentoses aussi sont fermentés en lactate et en acétate.

La souche estensemencée dans le bouillon MRS contenant une cloche de Durham, à partir d'une culture pure et jeune. Après incubation, le type fermentaire de nos souches est déterminé, à savoir homo-fermentaires (pas de production de gaz) ou hétéro fermentaires (production de gaz) (Axelsson, 2004).

Pour les Streptocoques, Enterocoques et les Lactocoques, les souches sontensemencées sur M17 liquide contenant une cloche de Durham. La présence de gaz dans la cloche indique que la souche est hétéro fermentaire et, son absence indique qu'elle est homo-fermentaire

V-2-1-3-5-Test de croissance dans les conditions hostiles :

Pour réaliser ce test, nous avons préparé deux milieux hyper salés en NaCl : 4% et 6,5%. Après ensemencement de ces deux milieux par la souche à tester et incubation à 37°C pour 24 heures, la croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble dans les tubes de culture microbienne (Hariri *et al.*, 2009 ; Guiraud, 2003).

V-2-1-3-6-Test de croissance à différentes températures :

Ce test permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles et les bactéries lactiques thermophiles. Le test est réalisé sur milieux M17 et MRS liquides à différentes températures entre 10°C et 40°C pendant 24 à 48 heures. Au bout de ce délai, la croissance est appréciée par l'examen des milieux, la croissance cellulaire est appréciée par la présence d'un trouble au fond du tube (Hariri *et al.*, 2009).

V-2-1-3-7-Test d'utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron (TSI) :

La fermentation du glucose avec production d'acide, l'oxydation du saccharose et/ou du lactose, la libération d'H₂S et de CO₂ sont appréciées sur le milieu TSI (**Giraud, 2003**).

V-2-1-3-8-Test Mannitol-Mobilité :

La mobilité des souches ainsi que la fermentation du mannitol sont étudiées sur le milieu Mannitol-Mobilité. La fermentation du mannitol est traduite par un virage au jaune du milieu de culture (**Giraud, 2003**).

V-2-1-3-9-Identification des bactéries lactiques par galerie API 20 Strep:

La galerie API 20 Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des streptocoques, entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants.

La galerie API 20 Strep comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres. Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré.

§ Préparation de l'inoculum:

-Ouvrir un tube contenant 2ml d'eau distillée sans additif.

-A l'aide d'un écouvillon, prélever toute la culture préalablement préparée .

-Réaliser une suspension très dense: opacité supérieure à 4 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément

§ Inoculation de la galerie:

Dans la première moitié de la galerie (Tests VP à ADH) répartir la suspension précédente en évitant la formation de bulles:

-Pour les tests VP à LAP : environ 100µl dans chaque cupule.

-Pour le test ADH: remplir uniquement le tube.

Dans la deuxième moitié de la galerie (tests RIB à GLYC):

-Ouvrir une ampoule d'API GP Medium et y transférer le reste de la suspension, soit 0.5 ml au minimum. Bien homogénéiser.

-Répartir cette nouvelle suspension dans les tubes uniquement.

-Remplir les cupules des tests soulignés ADH à GLYG avec de l'huile de paraffine en formant un ménisque convexe

-Incuber à 36°C ±2°C en aérobiose pendant 4h00-4h30 pour une première lecture et 24 heures si nécessaire pour une deuxième lecture

§ Lecture et interprétation:

Après 4 heures d'incubation:

-Ajouter les réactifs: test VP: 1 goutte de VP1 et VP2 , Test HIP: 2 gouttes de NIN ,Tests PYRA, αGAL, βGUR, βGAL, PAL, LAP: 1 goutte de ZYM A et ZYM B

-Attendre 10 minutes, puis lire toutes les réactions en se référant au **Tableau N°8** de Lecture

Tableau N°8 Les tests de API 20 Strep

Tests	Composants actifs	Réactions /Enzymes
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétoïne (Voges Proskauer)
HIP	Acide hippurique	Hydrolyse (acide HIPpurique)
ESC	Esculine citrate de fer	Hydrolyse β -glucosidase (ESCuline)
PYRA	Acide pyroglutamique- β -naphtylamie	PYRrolidonyl Arylamidase
α GAL	6-bromo-2-naphtyl- α D-galactopyranoside	α -GALactosidase
β GUR	Acide naphtyl-ASBI-glucuronique	β -GIUcuRonidase
β GAL	2-naphtyl- β D-galactopyranoside	β -GALactosidase
PAL	2-naphtyl phosphate	Phosphatase Alcaline
LAP	L-leucine- β -naphtylamide	Leucine AminoPeptidase
<u>ADH</u>	L-arginine	Arginine DiHydrolase
<u>RIB</u>	D-ribose	Acidification (RIBose)
<u>ARA</u>	L-arabinose	Acidification (ARABinose)
<u>MAN</u>	D-mannitol	Acidification (MANnitol)
<u>SOR</u>	D-sorbitol	Acidification (SORbitol)
<u>LAC</u>	D-lactose	Acidification (LACtose)
<u>TRE</u>	D-tréhalose	Acidification (TREhalose)
<u>INU</u>	Inuline	Acidification (INUline)
<u>RAF</u>	D-raffinose	Acidification (RAFFinose)
<u>AMD</u>	amidon	Acidification (AMiDon)
<u>GLYG</u>	glycogène	Acidification (GLYcoGène)

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification

V-2-1-3-10-Identification des bactéries lactiques par galerie API 50 CHL :

La galerie API 50 CHL est un système standardisé associant 50 tests biochimiques permettant l'identification des lactobacilles. L'étude du profil fermentaire des sucres des souches isolées a été réalisée par galerie API 50 CH (Biomerieux, France). La galerie est constituée de 50 microtubes permettant la fermentation des hydrates de carbones et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques).

⌘ Préparation des cultures des bactéries lactiques :

Des cultures d'une nuit des bactéries lactiques ont été préparées sur gélose MRS et la pureté de chaque souche est vérifiée. Pour préparer l'inoculum, des colonies sont récoltées par écouvillonnage etensemencées sur le milieu API 50 CHL Medium afin d'obtenir une suspension bactérienne d'une densité de 2 McFarland (McF) standard.

⌘ Ensemencement, incubation et lecture :

Les 50 microtubes de la galerie API 50 CH sont inoculés par la suspension bactérienne de chaque souche avec une pipette stérile en évitant la formation de bulles d'air, une couche de paraffine stérile est ensuite ajoutée. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 48h en anaérobiose. La fermentation se traduit par un changement de couleur dans le microtube, dû à une production d'acides en anaérobiose révélée par l'indicateur du pH du milieu choisi. Le premier tube sans principe actif sert de témoin négatif. La lecture est réalisée après 24h et 48h. Par la suite, les catalogues d'identification sont utilisés pour confirmation ainsi que le logiciel API Web TM.

V-2-1-4-Isolement et identification des staphylocoques:

La gélose Chapman est un milieu de culture ancien, destiné à l'isolement et à la différenciation des staphylocoques. Le chlorure de sodium à concentration élevée (75g/l) inhibe de nombreux germes, sauf les germes halophiles ou halotolérants. La fermentation du mannitol par certaines espèces de staphylocoques, libère des acides qui font virer le rouge de phénol au jaune en milieu acide, les colonies jaunes entourées d'une zone jaune, mannitol+ sont des *Staphylococcus aureus*, *S.saprophyticus*..., les colonies entourées d'une zone rouge ou pourpre, mannitol- sont des *Staphylococcus epidermidis*, *S.hominis* (Delarras, 2007). L'incubation est faite 48 heures à 37°C.

L'isolement est réalisé par repiquage successif sur bouillon nutritif et sur milieu Chapman, incubés 18 à 24 h à 37°C. La pureté des souches est vérifiée par la coloration de Gram pour sélectionner les cocci Gram positif. Toutes les souches sont identifiées grâce aux méthodes bactériologiques classiques (production de catalase et de coagulase), et par les caractères biochimiques à l'aide des galeries API 20 Staph (Bio Mérieux).

V-2-1-4-1-L'activité catalytique :

Permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Elle est mise en évidence en émulsionnant la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester.

V-2-1-4-2-Recherche de la coagulase :

La propriété de *Staphylococcus aureus* à provoquer la coagulation d'un plasma recueilli sur anticoagulant est critère important de son identification. Elle est due à la sécrétion d'une enzyme : la coagulase qui agit en liaison avec la prothrombine, enzyme active sur le fibrinogène (Joffin&Leyral ,2006).

§ Technique

- Réaliser une culture en bouillon.
- Etuver 24h à 37°C.
- Mettre dans un tube à hémolyse 4 gouttes de bouillon agité et 4 gouttes de plasma de lapin oxalaté (plasma humain)
- Placer le tube au bain d'eau à 37°C durant 2 à 24h,
- Observer toutes les heures.
- Une coagulation pourra être observée par une prise en masse du liquide (Joffin &Leyral, 2001)

V-2-1-4-3-Identification par plaque API STAPH (Biomérieux) :**§ Principe :**

Les différents tests de la galerie se présentent sous forme déshydratée. Leur reconstitution se fait lors de l'addition à chaque tube, d'API STAPH medium ensemencé avec la souche à étudier. Celle-ci doit être cultivée au préalable sur un milieu approprié. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Leyral & Joffin ,1998).

V-2-1-5-Isolement et identification des *Escherichia*:

Le dénombrement du genre *Escherichia* se fait sur milieu Hecktoen à 37°C pendant 24 à 48 h. *Escherichia coli* est isolé par repiquages successifs sur milieu Hecktoen (incubation pendant 24h à 37°C), suivi par l'identification, la caractérisation macro et microscopique des colonies (coloration de Gram), la détection de la mobilité, le test d'oxydase, le test d'H₂S ainsi que l'inoculation d'une galerie API 20 E (BioMérieux).

V-2-1-5-1-Test oxydase:

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes. Le test de l'oxydase est fondé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire. En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, cette enzyme oxyde le réactif pour former un composé coloré en violet, l'indophénol (Delarras, 2014). En adoptant la technique des disques, un disque oxydase est introduit dans un tube à essai contenant une suspension bactérienne (trois colonies d'*Escherichia* en bouillon nutritif). L'apparition d'une coloration rose atteste de la présence de l'oxydase (Bourgeois et al., 1995).

V-2-1-5-2-Test Mannitol-Mobilité :

La mobilité de la souche est testée en milieu mannitol mobilité. L'ensemencement se fait à partir d'une colonie sur gélose nutritive par piqûre centrale. Suite à une incubation de 24h à 37°C, le caractère mobile est défini par un trouble envahissant toute la largeur de la gélose de part et d'autre de la piqûre centrale, alors qu'une bactérie immobile ne se développe que le long de la piqûre centrale. Le milieu contient du rouge phénol comme indicateur de pH. Lorsque la souche dégrade le mannitol, l'indicateur vire du rouge au jaune (Denis et al., 2007).

V-2-1-5-3-Test d'utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron (TSI) :

La gélose TSI est un milieu différentiel par la capacité à mettre en évidence les fermentations d'hydrates de carbone (glucose, lactose, saccharose) et la production de sulfure d'hydrogène. Le rouge phénol est l'indicateur colorant virant du rouge au jaune pour un résultat positif. La fermentation du glucose se traduit par l'alcalinisation du culot (jaune), en revanche la fermentation du lactose et/ou du saccharose se traduit par l'alcalinisation de la pente inclinée (jaune). Le noircissement du culot indique la présence de H₂S (**Bonnefoy et al., 2002**).

V-2-1-5-4-Identification de *Escherichia* par galerie API 20 E:

La galerie API20 E est un système d'identification de *E.coli* utilisant des tests standardisés et miniaturisés qui compote 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne (colonies pures isolées sur milieu Hecktoen en eau physiologique) qui reconstitue les milieux. Une anaérobiose est créée dans les tests: ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leurs cupules d'huile de paraffine stérile. La boîte de Pétri est incubée pendant 24h à 37°C. Les réactions produites se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs, la lecture de la galerie est faite en se référant au tableau de lecture conventionnelle (**Joffin et al., 2006**).

V-2-1-6-Isolement et identification des Levures et Moisissures:

Le dénombrement des levures et des moisissures est suivi sur milieu Sabouraud classique. L'incubation se fait pendant 5 jours à 37°C. La présence de trois peptones et du glucose, ainsi que le pH acide du milieu favorisent la croissance des levures et moisissures (**Delarras, 2007**).

La morphologie cellulaire et le mode de reproduction végétative des levures isolées sont observés à l'état frais ou au microscope après coloration.

L'étude microscopique permet de définir la forme, l'arrangement, le mode de divisions des cellules ainsi que leur taille (**Guiraud & Galzy, 1980**).

L'observation au microscope de lames colorées au bleu de méthylène nous a permis de définir les formes : sphériques, ovoïdes, allongées, cylindriques, en forme de citron ou triangulaire (**Larpent, 1991**). La reproduction végétative peut se faire par bourgeonnement ou scissiparité ou quelque fois combinaison des deux (**Bouix & Leveau, 1993**).

L'identification des champignons se fait par étude microscopique appelé, test de chlamydosporulation, qui est l'examen direct au microscope optique sous grossissement x40 d'une colonie à partir de culture de champignon âgée de 5 jours sur milieu Sabouraud. L'observation dans une goutte de bleu de méthylène entre lame et lamelle, permet de déterminer la morphologie du champignon afin de caractériser la moisissure ou la levure en question par la recherche des pseudos mycéliums.

V-2-1-7-Analyses statistiques:

Tous les comptes bactériens sont analysés après log₁₀ transformation. Les niveaux de bactéries dans les échantillons de lait maternel et dans les selles de nouveau-nés allaités par le lait maternel ou par le lait maternisé sont comparés en utilisant le **test t**. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le logiciel SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) et le logiciel Excel 2007. Toutes les déclarations de statistique sont considérées comme significatives lorsque $P < 0,05$.

V-3- Analyse du métagénome par séquençage de l'ARNr 16S :

Les méthodes classiques d'identification bactérienne basées sur la détermination des caractères cultureux, physiologiques et métaboliques ont montré leurs limites, en particulier, pour la détection des micro-organismes non cultivables.

L'application des outils d'écologie moléculaire au microbiote intestinal a conduit à des améliorations très significatives de notre compréhension de cet écosystème, en termes de composition et de dynamique de la diversité des espèces.

La caractérisation de flore par séquençage de l'ADNr 16S est une des méthodes les plus utilisées actuellement. C'est une méthode permettant d'estimer le nombre d'espèces de bactéries et leurs abondances relatives dans un échantillon, ainsi, elle permet de révéler les espèces les plus importantes et combien d'espèces bactériennes sont détectées dans un échantillon.

L'ADNr 16S est une région de l'opéron ribosomique, composée d'environ 1500 nucléotides et constituée de 9 régions variables, flanquées par des régions conservées. Ces régions variables sont utilisées pour évaluer la distance entre les espèces de bactéries. L'ADNr 16S peut-être séquencé par amplification de régions d'intérêts conservées parmi les bactéries, la structure de l'ADNr 16S présente 9 régions variables annotées V1 à V9.

L'analyse microbienne mettant en œuvre le séquençage de l'ARN ribosomique (ARNr) 16S est une méthode couramment appliquée à l'étude phylogénétique et taxonomique des bactéries. Le gène de l'ARNr 16S est le marqueur génétique le plus connu utilisé pour identifier et classer les bactéries, notamment parce qu'il se compose à la fois de régions très bien conservées et de régions hypervariables.

L'objectif de cette étude est d'identifier et de différencier les espèces en présence par le séquençage de la région variable V3-V4 du gène ARNr 16S

V-3-1-Extraction des acides nucléiques :

La première étape consiste à récupérer un échantillon représentatif de l'écosystème étudié. L'ADN total du génome à partir d'échantillons est extrait par la méthode CTAB / SDS. Une concentration d'ADN élevée (environ 5-10 µg/ml) est généralement conseillée pour réduire le nombre de cycle d'amplification de l'ADN, pouvant biaiser les analyses quantitatives du milieu. De plus, l'échantillon doit être conservé dans des conditions optimales afin de réduire la dégradation des cellules et de l'ADN associé.

L'ADN est purifié par élimination des débris cellulaires et des protéines, puis digestion enzymatique des molécules d'ARN par utilisation de RNase. L'ADN purifié est finalement conservé à basse température (-20°C).

Ainsi l'extraction de l'ADN constitue une étape critique dans la caractérisation d'une flore. L'ADN doit ensuite être préparé pour le séquençage. Le séquençage de régions spécifiques de l'ADN 16S s'effectue tout d'abord par l'extraction et la purification de l'ADN des cellules d'un échantillon métagénomique. Ensuite, l'ADN est mis en présence d'amorces PCR spécifiques des régions à amplifier. Après plus de 20 cycles de PCR, l'échantillon d'ADN contient une concentration élevée de fragments d'ADN incluant les régions variables d'intérêt. L'ADN est ensuite préparé et séquencé.

Le séquençage de l'ADNr 16S s'effectue par amplification de la totalité ou d'une partie représentative de la séquence, à l'aide d'amorces universelles. Les fragments contenant les amorces peuvent se lier sur des micro-billes et subissent une amplification monoclonale. Le résultat de l'amplification est déposé sur une lame contenant des micro-puits et des réactifs de polymérisation. Le séquençage s'effectue par polymérisation de nucléotides fluorescents, émettant à chaque incorporation une fluorescence lue par un laser, puis décodée en nucléotides et stockée dans un fichier de séquence. Ces données seront utilisées pour caractériser les espèces présentes dans les échantillons.

-Principes de la méthode au CTAB : lyse, extraction et précipitation :

- 1- Dans un tube eppendorf de 2ml mettre 1000 µl de tampon CTAB (**Annexe N°1**), Ajouter une quantité appropriée d'échantillon et de lysozyme, Incuber dans un mélange d'eau à 65°C. mélanger le lysat.
- 2- Centrifuger et prenez le surnageant, Ajouter de phénol : Chloroforme, isopropanol (25: 24: 1), Centrifuger pendant 10 min sous 12000 tr / min. (RPM)
- 3- Prenez le surnageant, Ajouter Chloroforme, isopropanol (24: 1), Centrifuger pendant 10 min sous 12000 tr / min. (RPM)
- 4- Prendre le surnageant dans un tube à centrifuger de 1,5 ml, Ajouter l'isopropanol, Secouer , Précipitations inférieures à 20 degrés.
- 5- Centrifuger 10 minutes avec 12000 tr / min, Verser le liquide, Veuillez à ne pas tomber des précipitations. Utilisez 1 ml d'éthanol 75% pour laver 2 fois (Pourrait être centrifugé à nouveau pour collecter plus de liquide résiduel avec une lance).
- 6-Sécher à température ambiante sous un banc de travail super propre (Les échantillons d'ADN ne doivent pas être trop secs, Sinon il est difficile de dissoudre).
- 7- Ajouter H₂O pour dissoudre les échantillons d'ADN, Si nécessaire, incuber sous 55-60 °C pendant 10 min.
- 8- Ajouter 1 µl RNase A 1 µl pour digérer l'ARN, conserver à 37 ° C pendant 15 min

La concentration et la pureté de l'ADN ont été surveillées sur des gels d'agarose à 1%. Selon la concentration, l'ADN a été dilué à 1 ng / µl en utilisant de l'eau stérile (**Novogene, 2017**)

VI-1-Influence de l'allaitement maternel dans la mise en place de la flore microbienne du nouveau-né:

VI-1-1-Résultats qualitatifs du lait maternel:

Le lait maternel change de couleur et de consistance, sa composition se modifie au cours d'une même tétée, il est par exemple très dilué en début de tétée (transparent et éventuellement légèrement bleuté) et s'épaissit progressivement (plus épais, blanc ou jaune) .

Les échantillons de lait utilisés pour notre étude révèlent :

- Un liquide de la première lactation maternelle après l'accouchement (du 1^{er} au 5^{ème} jour), épais et jaunâtre, il s'agit du colostrum ;
- Un lait de transition, produit en abondance du 6^{ème} au 14^{ème} jour, qui devient progressivement blanc et moins dense ;
- Au bout de la 2^{ème} semaine, la sécrétion de lait donne le lait mature, de couleur «blanc-bleuté».

VI-1-2-Établissement de la première flore chez le nourrisson allaité maternellement:

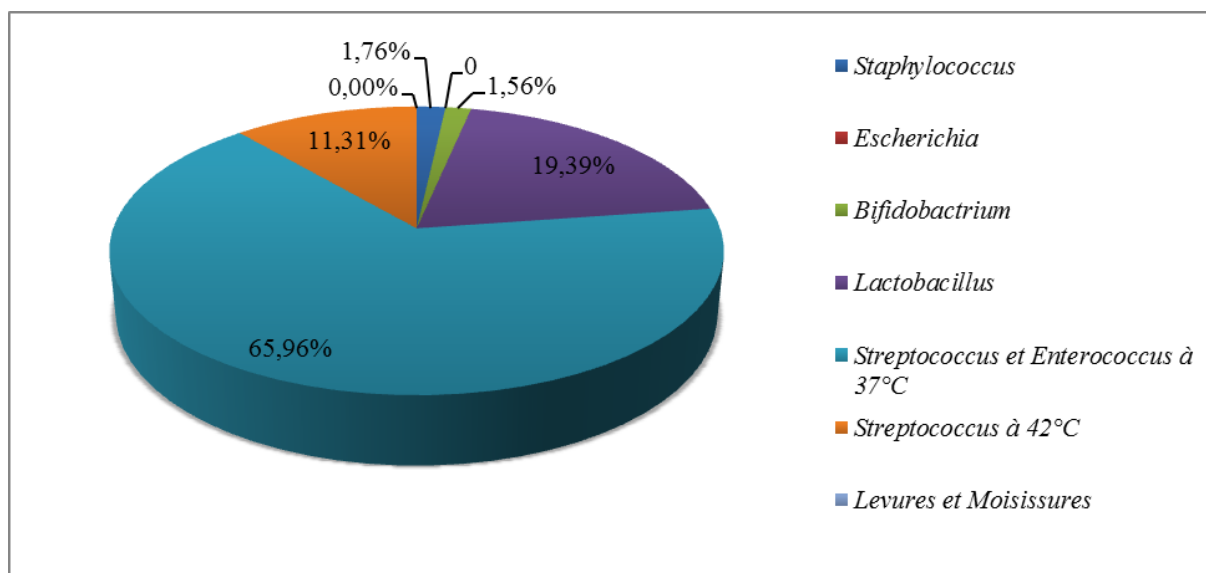
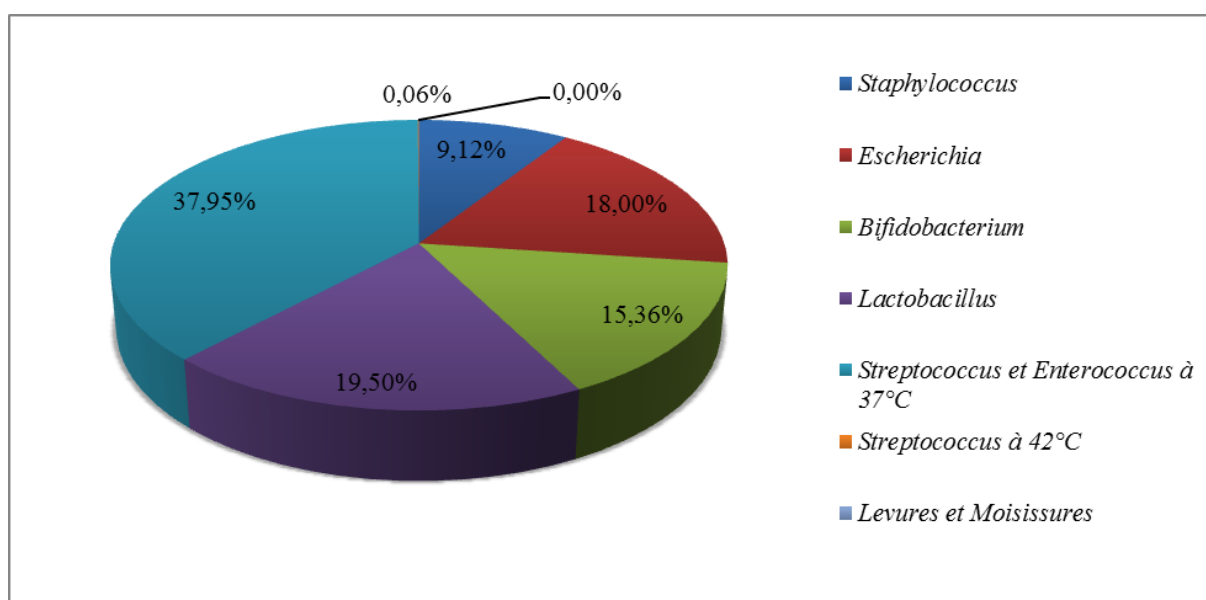
Les toutes premières selles appelées méconium, de couleur verte très foncée tirant vers le noir, sont très compactes, épaisses, collantes et souvent inodores. Elles sont expulsées par le nourrisson généralement dans les 12 premières heures de vie.

Au fur et à mesure que le nouveau-né est allaité, les selles changent de couleur. À la naissance, l'intestin humain est considéré comme stérile; cependant rapidement colonisé après l'accouchement. Les sources naturelles des bactéries intestinales du nouveau-né sont représentées par le microbiote vaginal et fécal de la mère, ainsi que d'autres microbes environnementaux. Dans les 48 premières heures, le tractus gastro-intestinal est colonisé par des bactéries aéro-anaérobies facultatives ($10^4 - 10^6$ UFC/g).

Selon **Goldsmith et al.(2015)**, la composition et le développement du microbiote intestinal de nourrisson sont influencés par l'indice de masse corporelle, le poids, et le gain de poids gestationnel de la mère. Une autre hypothèse émise par **Penders et al.(2006b)** révèle que le régime alimentaire maternel peut-être un facteur déterminant du microbiote de la mère ainsi que de la composition de la microflore intestinale du nourrisson. En réalité, le développement de la flore microbienne semble être dicté par des interactions complexes entre la mère, l'enfant et leur environnement.

VI-1-3- Résultats quantitatifs:

VI-1-3-1- Dénombrement bactérien des différents échantillons étudiés ; fèces des nouveau-nés et lait maternel :

Figure N°26 : Distribution des différents genres bactériens dans le lait maternel (1^{er} Jour)Figure N°27: Distribution des différents genres bactériens dans les fèces des nouveau-nés (1^{er} Jour)

Les résultats de l'étude quantitative et qualitative de la flore microbienne du lait maternel des cinq mères bien portantes témoignent de l'abondance de bactéries lactiques tels que *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, (**Figure N°26**).

Les premiers jours après l'accouchement, on constate une diversification microbienne dans le lait, l'analyse microbiologique révèle la présence de *Streptococcus* et *Enterococcus* à 37°C et à 42°C à un pourcentage de 65.96% (à valeur de 3 log UFC/g jusqu'à 3.57 log UFC/g) et 11.31% respectivement. Le pourcentage de *Streptococcus* à 37°C dans les échantillons fécaux est de 37.95%, on observe un résultat non significatif ($P = 0.83$), (**Figure N°27**).

Le taux de *Bifidobacterium* dans le lait à un pourcentage de 1.56% (varie entre 1.55 log UFC/g jusqu'à 2 log UFC/g) et dans les fèces de 15.36% , contrairement le taux de *Lactobacillus* est plus élevé que le *Bifidobacterium* dans le lait maternel qui est 19.39% et 0 à 3,74 log UFC/g dans les fèces infantiles, avec un pourcentage de 19,47% .Il n'y a pas de différence significative ($P > 0.05$) concernant les bifidobactéries et les *Lactobacillus*.

Concernant les bactéries pathogènes, on observe une absence d'*Escherichia* dans le lait et un pourcentage de 18% dans les fèces, un résultat statistiquement significatif ($P = 0.009$) . La présence de *Staphylococcus* à un pourcentage de 1.76% (une valeur de 1.86 à 2.17 log UFC/g) dans le lait et 9,12% dans les fèces, (**Tableau N°9**).

Tableau N°9: Taux de bactéries dans les échantillons de lait maternel et de fèces de nouveau-nés (1^{er} Jour). (Annexe N°3)

Microorganismes	Échantillons	Moyenne $\pm$ écart type (log UFC/g)	Valeur <i>P</i>
<i>Staphylocoques</i>	Lait	1,55 $\pm$ 0,89	0,92
	Fèces	1,47 $\pm$ 1,48	
<i>Escherichia</i>	Lait	0	0,009
	Fèces	2,15 $\pm$ 1,4	
<i>Bifidobacterium</i>	Lait	1,80 $\pm$ 0,17	0,98
	Fèces	1,82 $\pm$ 1,70	
<i>Lactobacillus</i>	Lait	1,67 $\pm$ 1,65	0,55
	Fèces	2,26 $\pm$ 1,38	
<i>Streptococcus et Enterococcus</i>	Lait	3,29 $\pm$ 0,25	0,83
	Fèces	3,24 $\pm$ 0,42	
<i>Streptococcus à 42°C</i>	Lait	2,5 $\pm$ 1,49	0,35
	Fèces	0,46 $\pm$ 1,03	

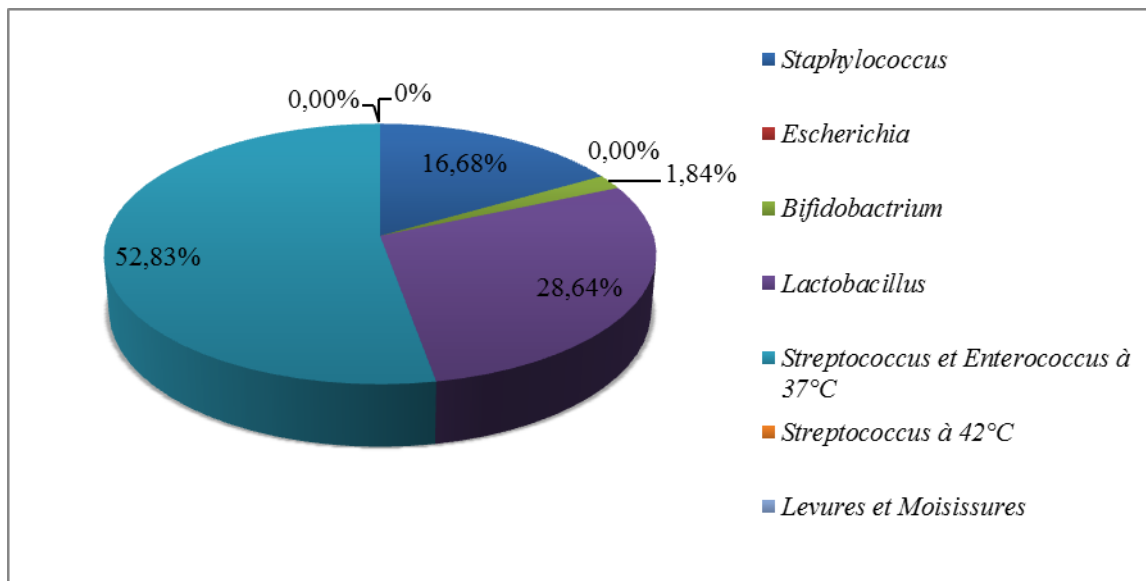


Figure N°28: Distribution des différents genres bactériens dans le lait maternel (7^{ème} Jour)

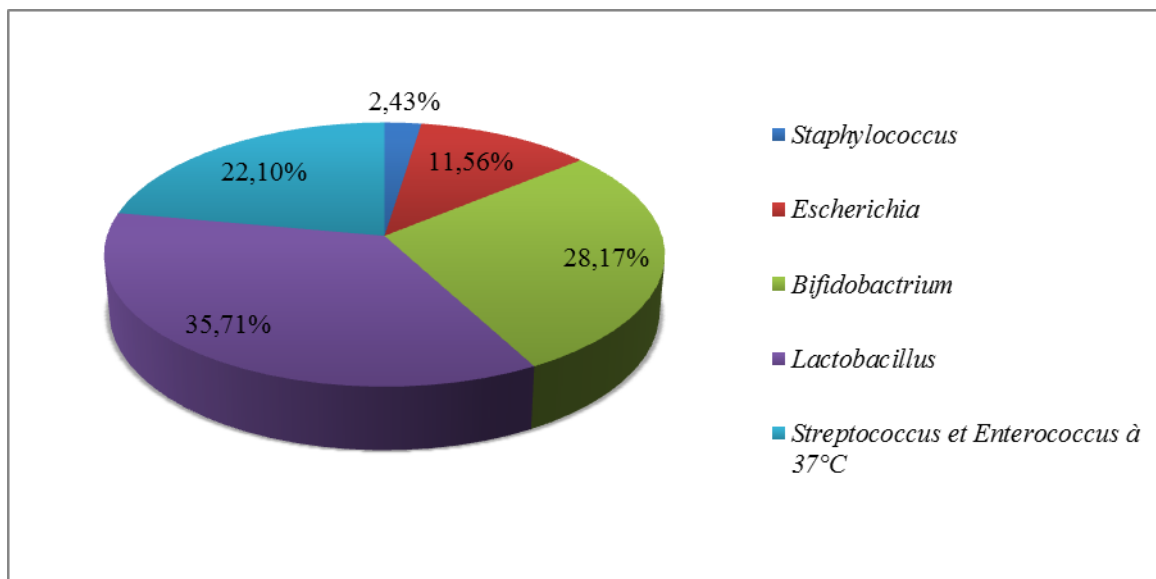


Figure N°29: Distribution des différents genres bactériens dans les fèces de nouveau-nés (7^{ème} Jour)

Au septième jour on remarque une augmentation dans le taux de *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* de 28,17% et 35,71 % respectivement dans les fèces infantiles, la différence est statistiquement significative, (**Figure N°29**).

Tableau N°10: Taux de bactéries dans les échantillons de lait maternel et de fèces de nouveau-nés (7^{ème} jour). (Annexe N°3)

Microorganismes	Échantillons	Moyenne $\pm$ écart type (log UFC/g)	Valeur <i>P</i>
<i>Staphylocoques</i>	Lait	2,07 $\pm$ 0,82	0,169
	Fèces	2,76 $\pm$ 0,60	
<i>Escherichia</i>	Lait	0	0,00
	Fèces	3,60 $\pm$ 0,23	
<i>Bifidobacterium</i>	Lait	1,70 $\pm$ 0,36	0
	Fèces	3,85 $\pm$ 0,47	
<i>Lactobacillus</i>	Lait	2,95 $\pm$ 0,25	0,001
	Fèces	4,02 $\pm$ 0,40	
<i>Streptococcus et Enterococcus</i>	Lait	3,06 $\pm$ 0,55	0,43
	Fèces	3,79 $\pm$ 0,39	

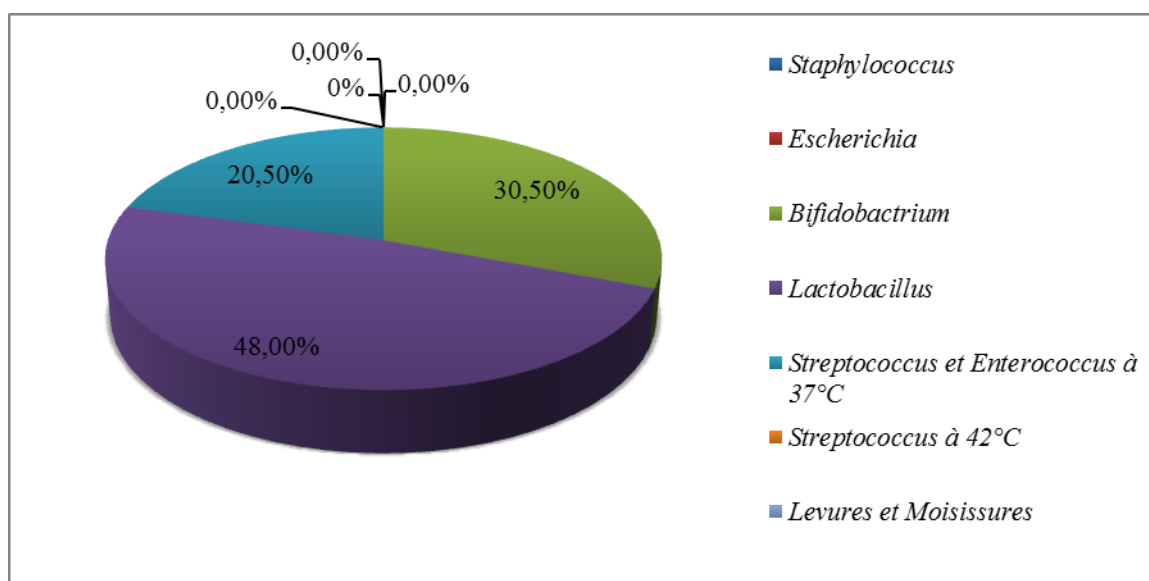


Figure N°30 : Distribution des différents genres bactériens dans le lait maternel (30^{ème} Jour)

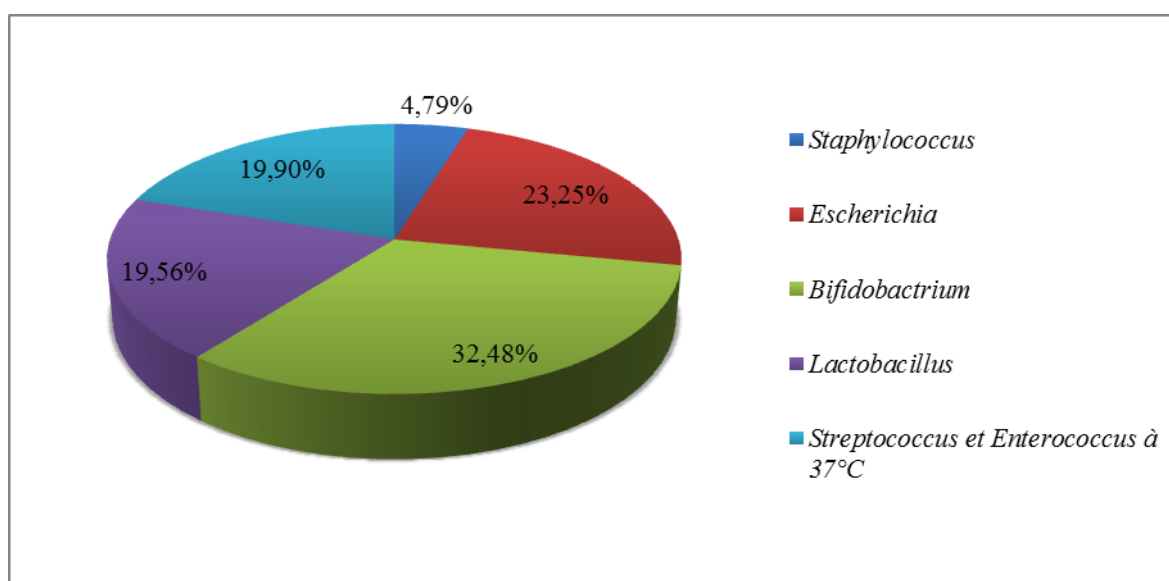


Figure N°31: Distribution des différents genres bactériens dans les fèces de nouveau-nés (30^{ème} Jour)

Au 30^{ème} jour on observe une diminution dans le taux de *Streptococcus* dans le lait et les fèces avec un pourcentage de 20.50% ,19.90% respectivement, (**Fig.N°30**)..Une augmentation d'*Escherichia* est visible dans les fèces (23.25%), (**Fig.N°31**). Le résultat est donc jugé statistiquement significatif ($P=0,009$), (**Tableau N°11**).

Tableau N°11: Taux de bactéries dans les échantillons de lait maternel et de fèces de nouveau-nés (30^{ème} jour) (Annexe N°3)

Microorganismes	Échantillons	Moyenne $\pm$ écart type (log UFC/g)	Valeur <i>P</i>
<i>Staphylocoques</i>	Lait	1,74 $\pm$ 0,24	0,006
	Fèces	2,98 $\pm$ 0,71	
<i>Escherichia</i>	Lait	0	0
	Fèces	3,86 $\pm$ 0,30	
<i>Bifidobacterium</i>	Lait	2,71 $\pm$ 1,52	0,146
	Fèces	3,87 $\pm$ 0,52	
<i>Lactobacillus</i>	Lait	2,87 $\pm$ 1,60	0,262
	Fèces	3,75 $\pm$ 0,33	
<i>Streptococcus et Enterococcus</i>	Lait	3,02 $\pm$ 0,36	0,009
	Fèces	3,78 $\pm$ 0,32	

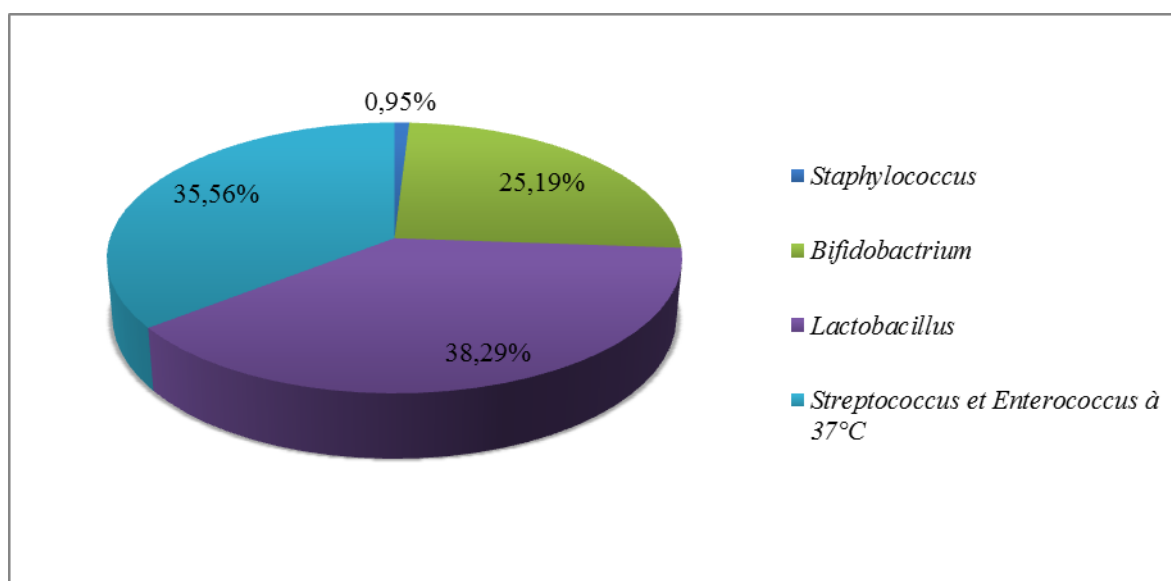


Figure N°32: Distribution des différents genres bactériens dans le lait maternel (90^{ème} Jour)

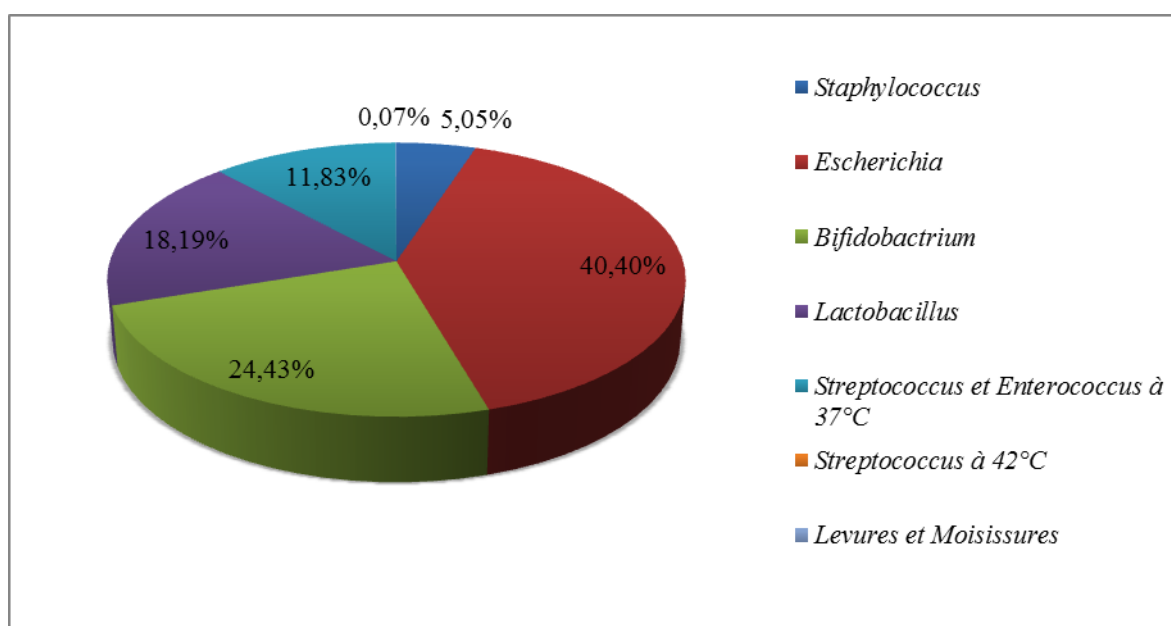


Figure N°33: Distribution des différents genres bactériens dans les fèces des nouveau-nés. (90^{ème} Jour)

Au 90^{ème} jour on observe une absence des levures et moisissures dans le lait maternel (**Fig.N°32**); par contre présentes dans les fèces (**Fig.N°33**), ($P < 0.05$). Le résultat des bactéries pathogènes est significatif vu que la valeur $P < 0.05$, (**Tableau N°12**).

TABLEAU N°12: Taux de bactéries dans les échantillons de lait maternel et de fèces de nouveau-nés (90^{ème} jour). (Annexe N°3)

Microorganismes	Échantillons	Moyenne $\pm$ écart type (log UFC/g)	Valeur <i>P</i>
<i>Staphylocoques</i>	Lait	1,37 $\pm$ 0,55	0
	Fèces	3,34 $\pm$ 0,35	
<i>Escherichia</i>	Lait	0	0
	Fèces	4,25 $\pm$ 0,36	
<i>Bifidobacterium</i>	Lait	2,51 $\pm$ 1,41	0,43
	Fèces	4,07 $\pm$ 0,27	
<i>Lactobacillus</i>	Lait	2,05 $\pm$ 1,88	0,92
	Fèces	3,91 $\pm$ 0,33	
<i>Streptococcus et Enterococcus</i>	Lait	3,08 $\pm$ 0,48	0,010
	Fèces	3,82 $\pm$ 0,10	
<i>Levures et Moisissures</i>	Lait	0	0.019
	Fèces	1,33 $\pm$ 0,78	

La flore microbienne naturelle de la glande mammaire est composée de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, de bactéries lactiques, de bactéries Gram-positives et de bifidobactéries, tel rapporté par **Fernandez et al.(2012)**. Le lait maternel n'est donc pas stérile, une proportion de microorganismes provient de la peau du mamelon ; l'autre proportion proviendrait d'une voie reliant les intestins de la mère à la glande mammaire pendant la période de lactation. Des cellules dendritiques et des cellules mononucléaires servent au sein de cette voie, de transporteurs de bactéries intestinales vivantes **Fernandez, Léonides et al.(2013)**.

La composition et les propriétés du lait maternel (faible teneur en protéines, grande variété d'oligosaccharides, nombreux médiateurs humoraux et cellulaires...) peuvent améliorer le développement d'une microflore intestinale du nourrisson dominée par les bifidobactéries et les lactobacillus ; nos travaux sont en accord avec les résultats de **Mitsou et al.(2008)**.

VI-2-Évaluation de la flore intestinale de nouveau-nés allaités maternellement ou par des laits maternisés:

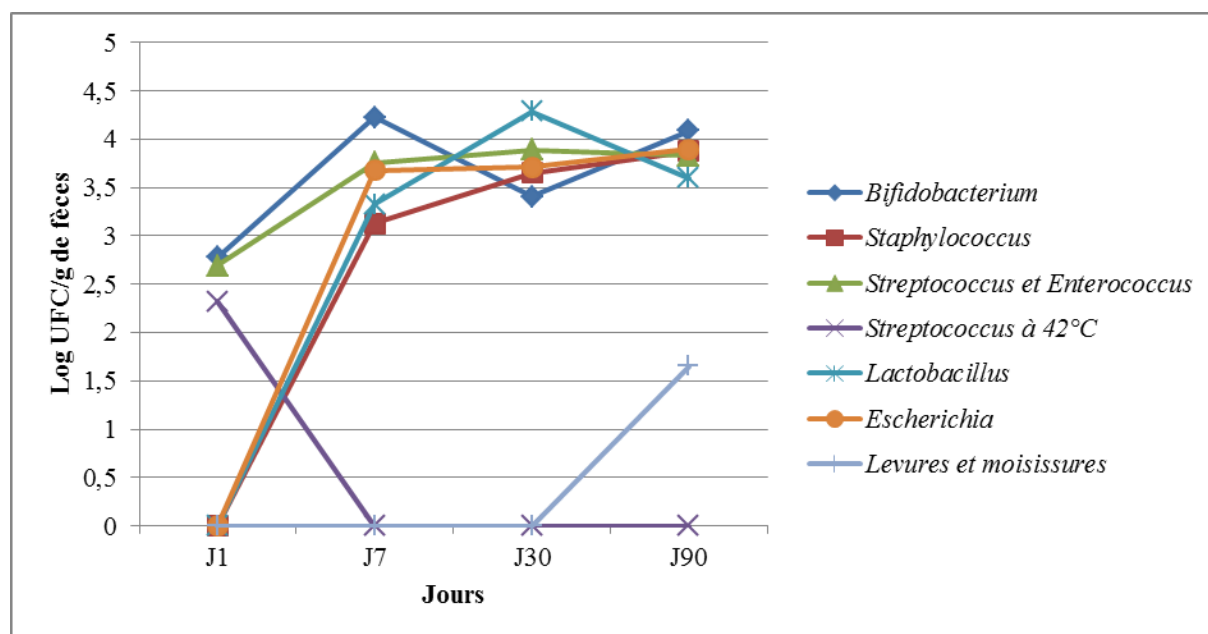


Figure N°34: Évolution de la flore fécale du 1^{er} nouveau-né allaité maternellement.

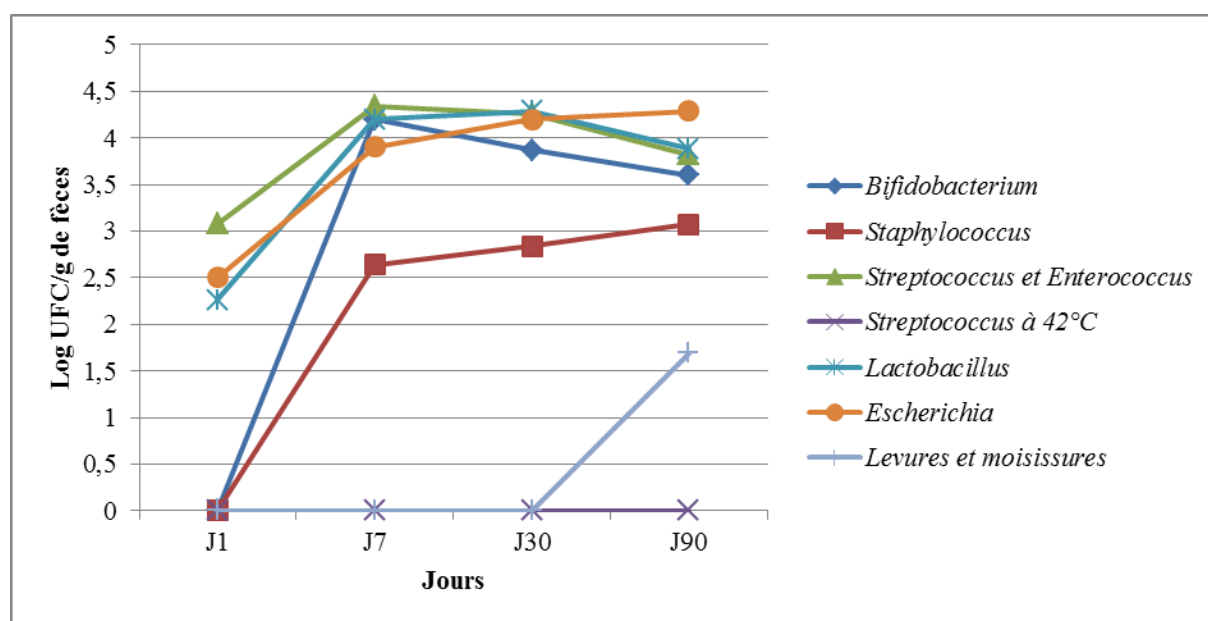


Figure N°35: Évolution de la flore fécale du 2^{ème} nouveau-né allaité maternellement.

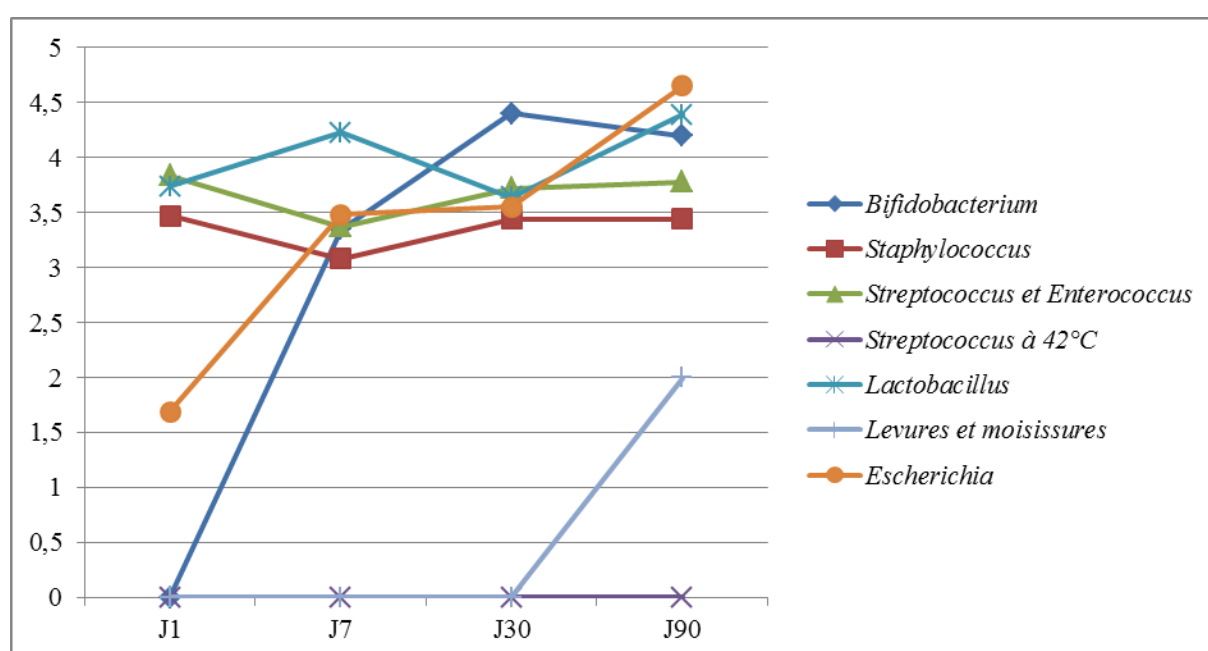


Figure N°36: Évolution de la flore fécale du 3^{ème} nouveau-né allaité maternellement.

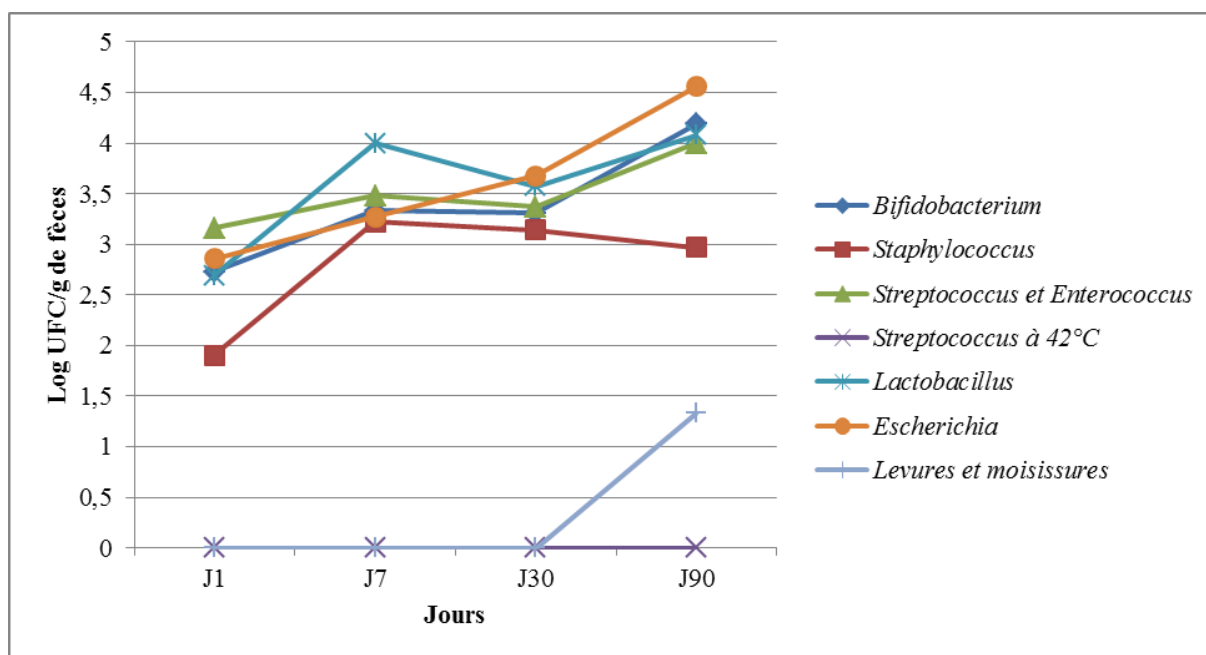


Figure N°37: Évolution de la flore fécale du 4^{ème} nouveau-né allaité maternellement.

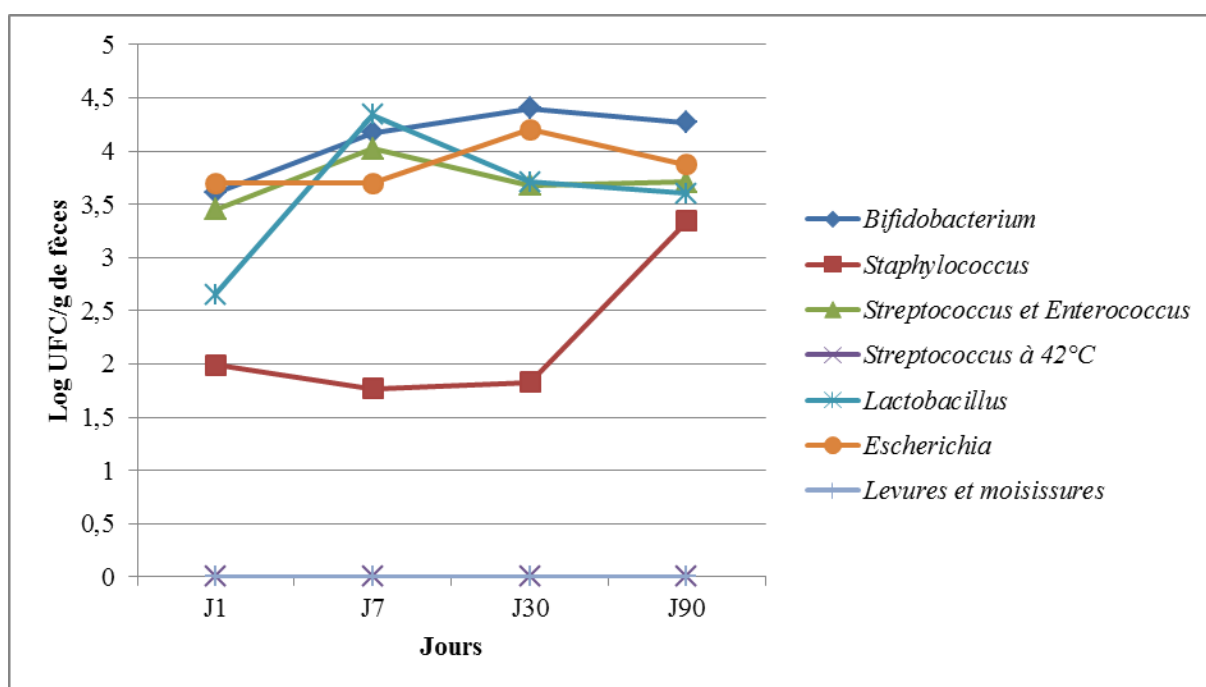


Figure N°38 : Évolution de la flore fécale du 5^{ème} nouveau-né allaité maternellement.

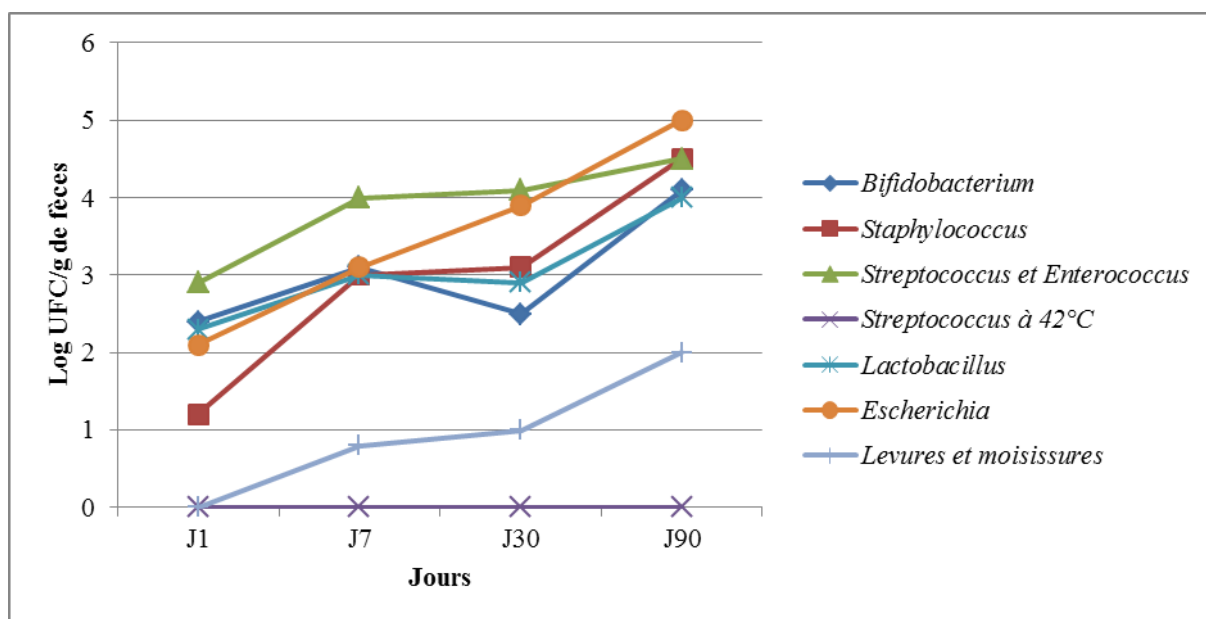


Figure N°39 : Évolution de la flore fécale du 1^{er} nouveau-né allaité artificiellement.

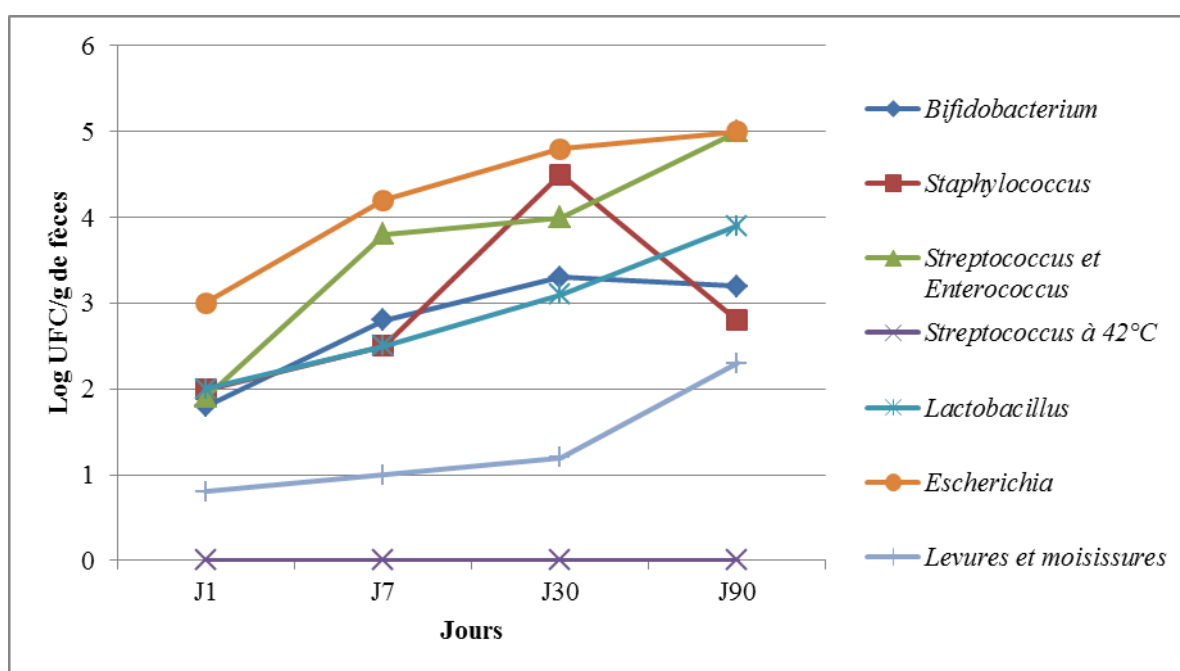


Figure N°40 : Évolution de la flore fécale du 2^{ème} nouveau-né allaité artificiellement.

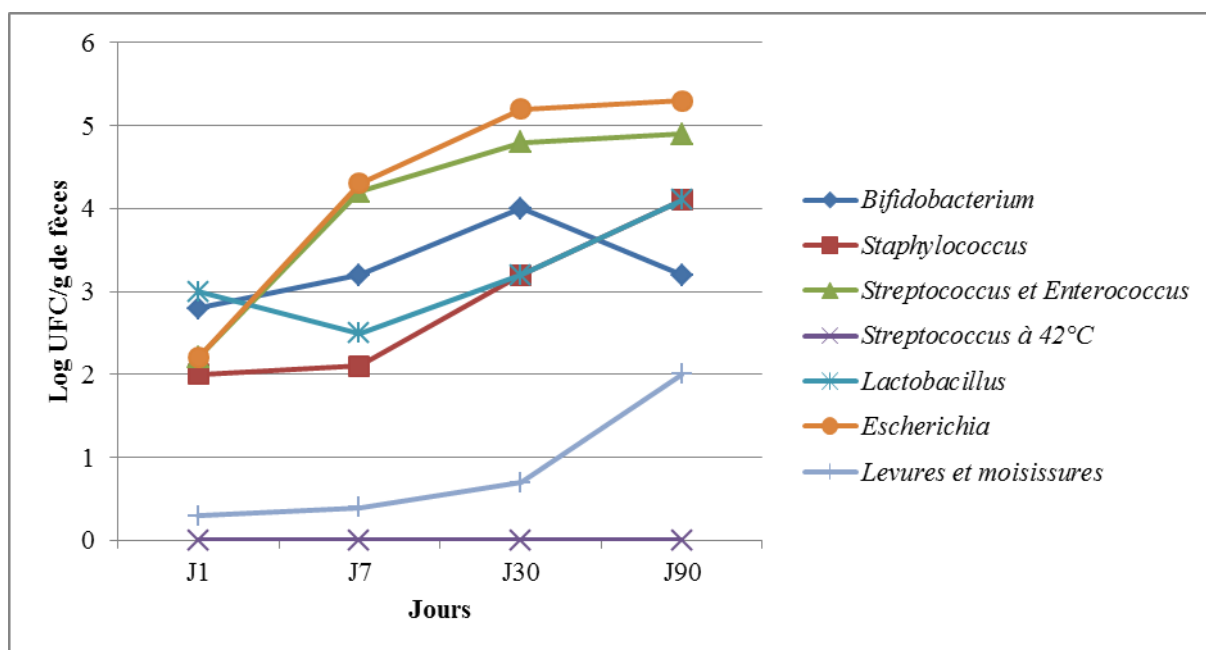


Figure N°41 : Évolution de la flore fécale du 3^{ème} nouveau-né allaité artificiellement.

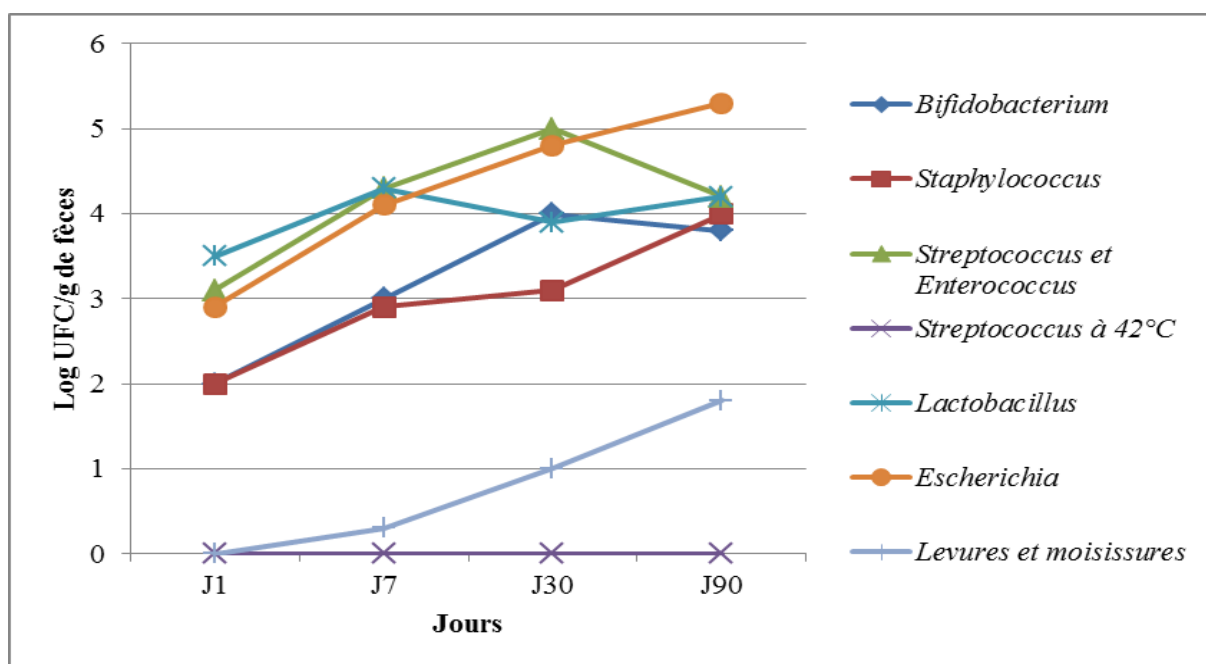


Figure N°42 : Évolution de la flore fécale du 4^{ème} nouveau-né allaité artificiellement.

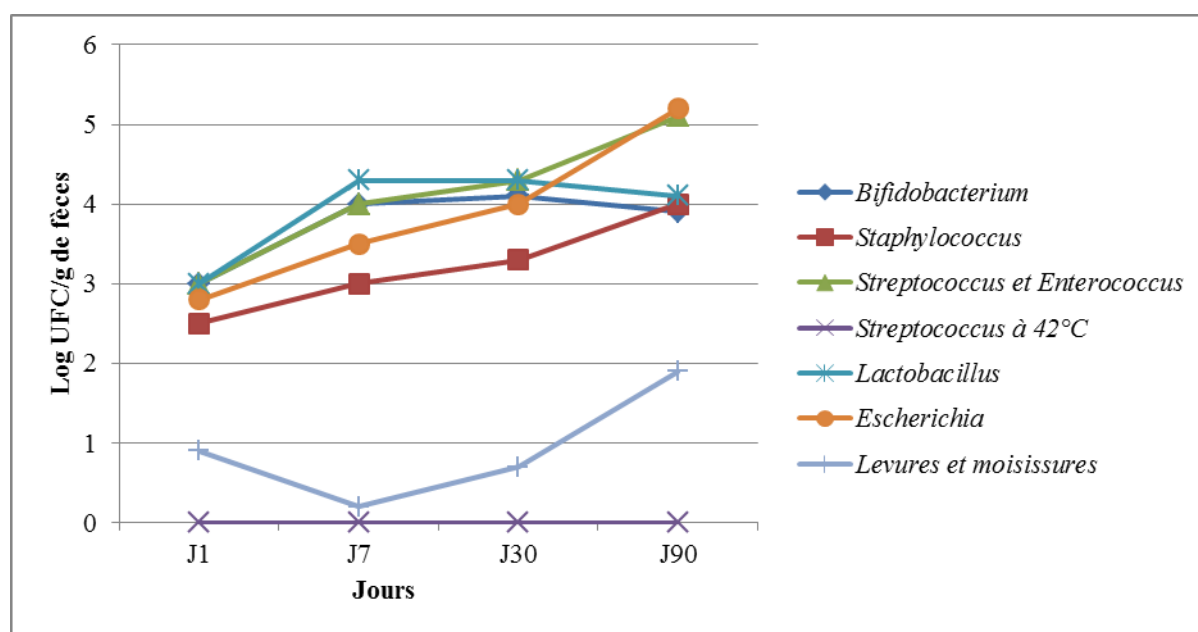


Figure N°43: Évolution de la flore fécale du 5^{ème} nouveau-né allaité artificiellement.

D'après les résultats obtenus, il en découle que le type de lait donné aux nouveau-nés influence grandement les propriétés physiques et microbiologiques de leurs excréments.

L'étude de la flore microbienne à partir des échantillons fécaux de nourrissons allaités maternellement et artificiellement atteste d'une grande diversité bactérienne avec une certaine similitude entre les dix nourrissons. Les premiers colonisateurs semblent préparer l'intestin du nourrisson en réduisant le pH de l'environnement pour faire place à des anaérobies strictes comme *Bifidobacterium spp* comme le rapporte Sela et Mills (2014).

§ Le premier jour:

Chez les nourrissons allaités maternellement, les bifidobactéries sont présentes à des taux bas de 0 log UFC/g jusqu'à log 2,78 UFC/g et chez les nourrissons recevant du lait maternisé, les bifidobactéries se trouvent à des taux variant entre 1,8 log UFC/g à 3 log UFC/g. Un résultat non significatif ($P=0.5$) (NNM: $1,82 \pm 1,70$ log UFC/g); (NNA : $2,4 \pm 0,50$ log UFC/g).

Les souches du genre *Lactobacillus* des nourrissons allaités maternellement est de l'ordre de 0 jusqu'à 3.74 log UFC/g par contre, chez les nouveau-nés allaités au biberon ce genre bactérien est relativement stable autour de 3 log UFC/g.

La présence de *Lactobacillus* dans les matières fécales des nourrissons nourris au sein, $2,26 \pm 1,38$ log UFC/g n'est pas significativement différente de celle des nouveau-nés allaités au biberon, qui est de l'ordre $2.76 \pm 0,6$ log UFC/g.

On note que le genre *Streptococcus* chez les nourrissons allaités maternellement est présent à des taux élevés avec des valeurs avoisinantes $3,84$ log UFC/g par contre chez le 2^{ème} groupe la valeur se situe entre $1,9$ Log UFC/g et $3,1$ log UFC/g. Ce résultat est donc jugé statistiquement non significatif ($P=0.07$).

Néanmoins, le genre bactérien *Escherichia* se trouve dans la matière fécale de nourrisson à des taux presque identiques autour de 3 log UFC/g donc il n'y pas une différence significative ($P=0,5$) (NNM : $2,15 \pm 1,4$ log UFC/g ; NNA : $2,6 \pm 0,41$ log UFC/g).

De faibles quantités du genre *Staphylococcus* sont enregistrées le premier jour de vie chez tous les nourrissons allaités maternellement sauf chez le 3^{ème} nourrisson le taux est élevé de l'ordre de $3,47$ Log UFC/g. En revanche, les staphylocoques varient entre $1,2$ log UFC/g et 2.5 log UFC/g chez les nouveau-nés nourris par du lait maternisé (NNM : $1,47 \pm 1,48$ log UFC/g ; NNA : $1,93 \pm 0,46$ log UFC/g). Il n'y a pas de relation significative détectée entre les deux groupes, ($P=0.5$).

La présence de levures et de moisissures est de l'ordre 0.9 log UFC/g dans les matières fécales de nourrissons allaités artificiellement, et totalement inexistante chez les nourrissons recevant du lait maternel.

§ Le 7^{ème} jour :

Une augmentation dans le taux de *Bifidobacterium* par rapport au premier jour dans les fèces de nourrissons recevant le lait maternel qui est de l'ordre de 4.23 log UFC/g apparaissant chez le premier cas, le résultat est statistiquement non significatif entre les deux groupes ($P=0.06$). Le 7^{ème} jour, on remarque une graduation dans le taux des germes recherchés, il n'y a pas de différence significative sauf dans le taux des levures et moisissures ($P=0.008$).

§ Le 30^{ème} jour

Au bout du 30^{ème} jour, la présence des germes pathogènes tel *Escherichia* dans la matière fécale des nourrissons recevant le lait maternisé est plus importante que dans le premier groupe ($P= 0.04$) .

Dans les échantillons de nourrissons allaités artificiellement la présence de *Streptococcus* est remarquée ($4.40 \pm 0.3 \log \text{ UFC/g}$) comparé aux nouveau-nés nourris au sein ($3.78 \pm 0.32 \log \text{ UFC/g}$). Le résultat est donc jugé statistiquement significatif ($P=0.02$).

§ Le 90^{ème} jour

Au 90^{ème} jour, les fèces infantiles des nourrissons recevant les formules infantiles sont très riches en *Escherichia* et *Streptococcus* ($5.16 \pm 0.15 \log \text{ UFC/g}$; $4.74 \pm 0.37 \log \text{ UFC/g}$ respectivement) par rapport au nouveau-né allaité maternellement.

VI-3-Identification des bactéries lactiques :

VI-3-1-Les bifidobactéries:

En anaérobiose, les colonies obtenues sur une gélose MRS cystéine sont blanches, circulaires à contour régulier et leur diamètre est d'environ 1 mm. Après coloration de Gram, les bactéries apparaissent sous l'objectif du microscope tels des bacilles Gram positif de forme irrégulière se présentant de manière isolée (**Figure N°44**), les souches sont immobiles et dépourvues de catalase, Glucose (+), Lactose(+), Saccharose (-) sur milieu TSI.



Figure N°44 : Aspect des Colonies de la souche *Bifidobacterium* sur gélose MRS cystéine

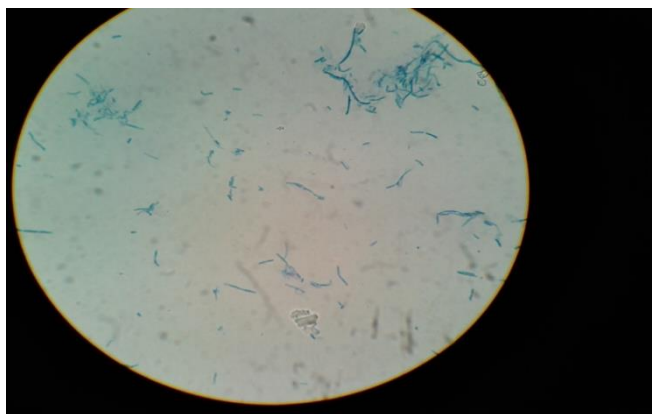


Figure N°45: Aspect microscopique de la souche SC1 après coloration de Gram (Gr.x 100).

VI-3-2-1- Les Lactobacilles :

Après les séries de purification sur milieu solide(MRS), les colonies des souches présentent les caractéristiques suivantes: petites d'environ 1mm de diamètre, blanchâtres ou laiteuses, lisses, de surface convexe à pourtour circulaire régulier. La croissance en milieu liquide est caractérisée par l'apparition d'un trouble au fond du tube (**Figure N°46** , **Figure N°47**).

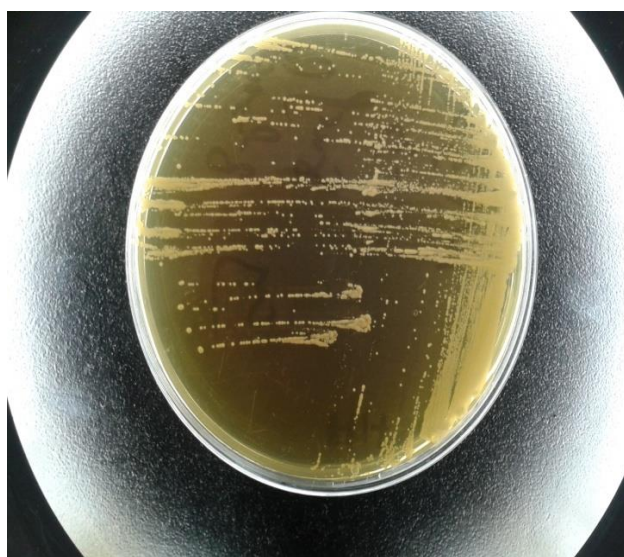


Figure N°46 : Aspect des colonies sur MRS solide



Figure N°47 : Culture dans milieu MRS liquide

Les souches représentatives ont fait l'objet d'une étude microscopique, les résultats obtenus suite à la coloration de Gram et au test de catalase, montrent que les souches sont des bâtonnets Gram positif et catalase négative.

Toutes les souches présentent une forme cellulaire en bâtonnet, le mode d'association varie d'une souche à l'autre, ces observations permettent de classer initialement les isolats selon le Gram, leur morphologie cellulaire et le mode d'association. Au microscope, les bacilles étaient isolés, ou regroupés en paire ou en chaînette (**Figure N° 48**).

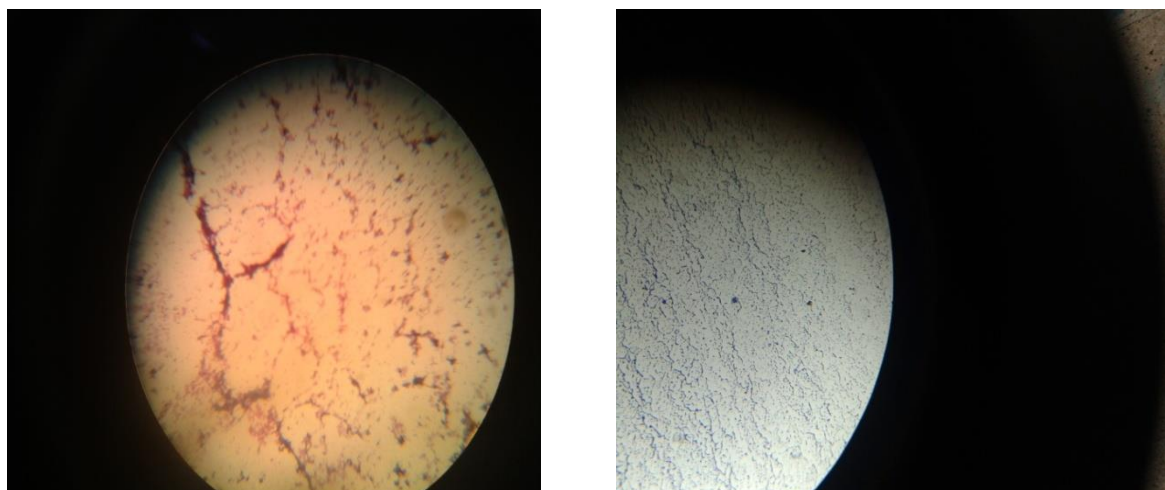


Figure N°48 : Aspect microscopique du genre *Lactobacillus* (Grossissement x 100)

➤ **Le type fermentaire:**

Ce test nous a permis de différencier entre les souches homofermentaires et les souches hétérofermentaires dans les bouillons MRS et M17.

Tableau d'identificatin API 50 CHL : (Annexe N°01)

Tableau N°13: Utilisation des hydrates de carbone par les souches dans une galerie API 50 CHL

Hydrates de carbone	SN1	SN2	SN3	SN4	SN5	SN6	SN7	SN8	SN9	SN10
Témoin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycérol	-	+	-	+	-	+/-	+	+/-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L-Arabinose	+/-	-	-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-
D-Ribose	+/-	+	-	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	-
D-Xylose	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-	+/-	-
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
D-Glucose	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
D-Fructose	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
D-Mannose	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	--	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	-	+	-	+	-	-	+	-	--	-
D-Sorbitol	-	+	-	+	-	-	+	-	-	--
MDM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NAG	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
Amygdaline	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Arbutine	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
Esculine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Salicine	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
D-Celiobiose	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
D-Maltose	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
D-Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Saccharose	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
D-Trehalose	-	+	++	+	-	-	+	-	-	+
Inuline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mélézitose	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	+/-	-	+/-	-	-

Glycogène	-	-	-	-	-	+/-	-	+/-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentibiose	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
D-Turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GNT	-	+/-		+/-	-	-	+/-	-	-	-
2KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Figure N°49: Test biochimique de fermentation des hydrates de carbone sur galerie API 50 CHL pour l'identification de la souche SN4 (*Lactobacillus paracasei ssp paracasei*).

Tous ces tests par la galerie API 50 CHL permettent l'affirmation de la souche étudiée.

VI-3-2-2- Les Streptocoques :

Sur milieu M17, les colonies apparaissent rondes ou lenticulaires, bombées de couleur blanchâtre (**Figure N°50**), Gram positif, catalase négative, groupées par paires ou en chaînes.

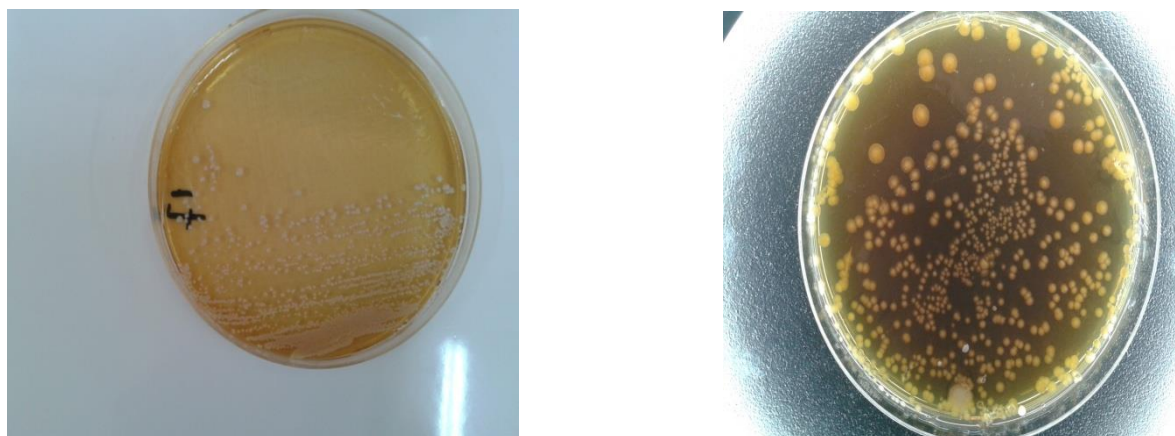


Figure N°50: Aspect des colonies sur M17solide

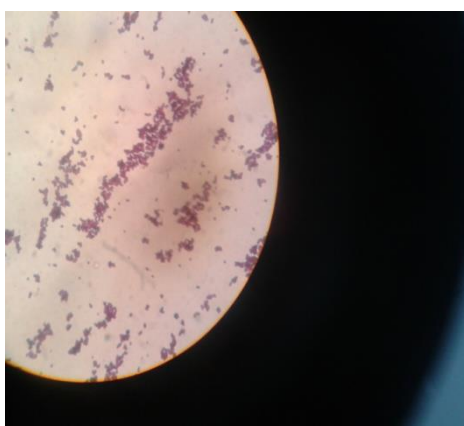


Figure N°51: Aspect microscopique du genre *Streptococcus* (Grossissement $\times 100$)

Tableau N °14 : Description de l'aspect microscopique des différentes souches lactiques purifiées à partir de lait maternel et de fèces infantiles

Souche	Gram	Forme des cellules	Association des cellules
SN1	Positif	Bâtonnets	Disposées en courtes chaînettes
SN2	Positif	Bâtonnets	Diplobacilles
SN3	Positif	Bâtonnets	isolées, en paires ou en courtes chaînes
SN4	Positif	Bâtonnets	Diplobacilles
SN5	Positif	Bâtonnets	Disposées en courtes chaînettes
SN6	Positif	Coques ovoïdes et courts bâtonnets (coccobacilles à extrémités arrondies).	Isolées ou en paires formant aussi de petites chaînettes.
SN7	Positif	Bâtonnets	Diplobacilles
SN8	Positif	Coques ovoïdes et courts bâtonnets (coccobacilles à extrémités arrondies).	Isolées en paires formant de petites chaînettes.
SN9	Positif	Bâtonnets	Disposées en courtes chaînettes
SN10	Positif	Bâtonnets	Isolées, en paires ou en courtes chaînes
SA1	Positif	Cocci	Associées en paires ou en courtes chaînettes
SA2	Positif	Cocci	Amas, tétrades
SA3	Positif	Cocci	Paires ou par chaînes

SA4	Positif	Cocci	Paires ou par chaînes
SA5	Positif	Cocci	Amas, tétrades
SA6	Positif	Cocci	Présentes habituellement sous forme de chaînettes
SA7	Positif	Cocci	Amas, tétrades
SA8	Positif	Sphériques	Associées en paires ou en courtes chaînettes
SA9	Positif	Sphériques	Associées en paires ou en courtes chaînettes
SA10	Positif	Cocci ovoïde	Paires ou par chaînes
SA11	Positif	Sphériques	Associées en paires ou en courtes chaînettes
SA12	Positif	Sphériques	Associées en paires ou en courtes chaînettes
SA13	Positif	Sphériques	Associées en paires ou en courtes chaînettes
SA14	Positif	Cocci ovoïde	Paires ou par chaînes
SA15	Positif	Cocci	Paires ou des chaînes
SA16	positif	Cocci ovoïde	Paires ou par chaînes
SA17	Positif	Cocci	Associées en paires ou en courtes chaînettes

SA18	Positif	Cocci	Associées en paires ou en courtes chaînes
SA19	Positif	Cocci	Associées en paires ou en courtes chaînes
SA20	Positif	Sphériques ou ovoïde	Disposés en paires ou en chaînes
SA21	Positif	Sphériques	Associées en paires ou en courtes chaînes
SA22	Positif	Sphériques	Associées en paires ou en courtes chaînes
SA23	Positif	Cocci	Présentes habituellement sous forme de chaînes
SA24	Positif	Cocci	Associées en courtes chaînes
SA25	Positif	Cocci ovoïde	Paires ou par chaînes
SA26	Positif	Cocci	Chaînes courtes
SA27	Positif	Cocci	Chaînes courtes

Tableau N°15 : Profil fermentaire des souches sur galerie API 20 Strep

Tests	V P	H IP	E S C	P Y R A	α G A L	β G U R	β G A L	P A L	L A P	<u>A</u> <u>D</u> <u>H</u>	<u>R</u> <u>I</u> <u>B</u>	<u>A</u> <u>R</u> <u>A</u>	<u>M</u> <u>A</u> <u>N</u>	<u>S</u> <u>O</u> <u>R</u>	<u>L</u> <u>A</u> <u>C</u>	<u>T</u> <u>R</u> <u>E</u>	<u>I</u> <u>N</u> <u>U</u>	<u>R</u> <u>A</u> <u>F</u>	<u>A</u> <u>M</u> <u>D</u>	<u>G</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>G</u>
SA1	+	-	+	-	+/	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
SA2	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
SA3	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-

SA4	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
SA5	+	+	-	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+/-	-
SA6	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
SA7	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
SA8	+	-	+	+	+/-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
SA9	+	-	+	+	+/-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	-	+	+	--	-	+	-
SA10	+	+/-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
SA11	+	-	+	+	+/-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
SA12	+	-	+	+	+/-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
SA13	+	-	+	+	+/-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
SA14	+	+/-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
SA15	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+/-	-
SA16	+	+/-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
SA17	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
SA18	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
SA19	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
SA20	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
SA21	+	-	+	+	+/-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
SA22	+	-	+	+	+/-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
SA23	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
SA24	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	--	-	-	-
SA25	+	+/-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

		-																		
SA26	-	+/-	-	-	+/-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	--	-
SA27	-	+/-	-	-	+/-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

(+) Croissance positive ; (-) Croissance négative

Tableau N°16: Caractéristiques Physiologiques des différentes souches lactiques purifiées à partir de lait maternel et de fèces de nouveau-nés.

Souches	Catalase	Oxydase	Croissance 10°C	Croissance 40°C	NaCl 4%	NaCl 6.5%	Type fermentaire
SN1	-	-	-	+	-	-	Homo
SN2	-	-	+	-	+	+	Homo
SN3	-	-	+	-	+	-	Homo
SN4	-	-	+	-	+	+	Homo
SN5	-	-	-	+	-	-	Homo
SN6	-	-	+	-	-	-	Hétéro
SN7	-	-	+	-	+	+	Homo
SN8	-	-	+	-	-	-	Hétéro
SN9	-	-	-	+	-	-	Homo
SN10	-	-	+	-	+	-	Homo
SA1	-	-	+	-	+	-	Homo
SA2	-	-	-	-	+	+	Homo
SA3	-	-	D	D	-	-	Homo
SA4	-	-	D	D	-	-	Homo
SA5	-	-	-	-	+	+	Homo
SA6	-	-	+	+	+	+	Homo

SA7	-	-	-	-	+	+	Homo
SA8	-	-	+	+	+	+	Homo
SA9	-	-	+	+	+	+	Homo
SA10	-	-	+	-	-	-	Hétéro
SA11	-	-	+	+	+	+	Homo
SA12	-	-	+	+	+	+	Homo
SA13	-	-	+	+	+	+	Homo
SA14	-	-	+	-	-	-	Hétéro
SA15	-	-	+	+	+	+	Homo
SA16	-	-	+	-	-	-	Hétéro
SA17	-	-	-	-	-	-	Homo
SA18	-	-	-	-	-	-	Homo
SA19	-	-	-	-	-	-	Homo
SA20	-	-	-		-	-	Homo
SA21	-	-	+	+	+	+	Homo
SA22	-	-	+	+	+	+	Homo
SA23	-	-	+	+	+	+	Homo
SA24	-	-	D	D	-	-	Homo
SA25	-	-	+	-	-	-	Hétéro
SA26	-	-	-	-	-	-	Homo
SA27	-	-	-	-	-	-	Homo

Homo : Homofermentaire ; Hétéro : Hétérofermentaire, ; (+) : réaction positive ; (-) : réaction négative ; d : réaction lente.

Tableau N°17 : Résultat de l'identification des espèces.

Code de la souche	Genre et espèce
SN1	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>
SN2	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>
SN3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
SN4	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>
SN5	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>
SN6	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris</i>
SN7	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>
SN8	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris</i>
SN9	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>
SN10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
SA1	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
SA2	<i>Aerococcus viridans</i>
SA3	<i>Streptococcus anginosus</i>
SA4	<i>Streptococcus anginosus</i>
SA5	<i>Aerococcus viridans 1</i>
SA6	<i>Enterococcus Faecalis</i>
SA7	<i>Aerococcus viridans 1</i>
SA8	<i>Enterococcus Faecium</i>
SA9	<i>Enterococcus Faecium</i>
SA10	<i>Leuconostoc spp</i>
SA11	<i>Enterococcus Faecium</i>
SA12	<i>Enterococcus Faecium</i>
SA13	<i>Enterococcus Faecium</i>

SA14	<i>Leuconostoc spp</i>
SA15	<i>Enterococcus Avium</i>
SA16	<i>Leuconostoc spp</i>
SA17	<i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i>
SA18	<i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i>
SA19	<i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i>
SA20	<i>Streptococcus salivarius</i>
SA21	<i>Enterococcus Faecium</i>
SA22	<i>Enterococcus Faecium</i>
SA23	<i>Enterococcus Faecalis</i>
SA24	<i>Streptococcus constellatus</i>
SA25	<i>Leuconostoc spp</i>
SA26	<i>Streptococcus acidomonimus</i>
SA27	<i>Streptococcus acidomonimus</i>
SC1	<i>Bifidobacterium spp</i>
SC2	<i>Bifidobacterium spp</i>
SC3	<i>Bifidobacterium spp</i>
SC4	<i>Bifidobacterium spp</i>

VI-3-3-Identification de Staphylococcus:

Les caractères principaux des staphylocoques:

Des colonies lisses, bombées et brillantes, de couleur doré faisant virer le milieu Chapman vers le jaune (dégradation du mannitol), catalase et coagulase positive : *Staphylococcus aureus* (Figure N°52).

Les colonies petites, généralement 1-2 mm de diamètre après une incubation de 24 heures à 37°C, et de couleur blanche, catalase positive, coagulase négative : *Staphylococcus hominis* (Figure N°54).

À l'examen microscopique, les Staphylocoques se présentent sous l'aspect de coques en petits amas, en diplocoques ou en très courtes chaînettes de 3 à 5 éléments positivement colorés au Gram. Le mode de groupement dit en « grappe » ou en « amas » est plus caractéristique après culture sur milieu gélose. La disposition en amas s'explique par la division cellulaire des Staphylocoques en trois plans successifs et perpendiculaires les uns aux autres, et par le fait que les cellules filles ne se séparent pas complètement de la cellule mère dont elles sont issues. Sur le plan individuel, ce sont des Cocci immobiles mesurant 0,7 à 1,2 μm (**Figure N°53**).

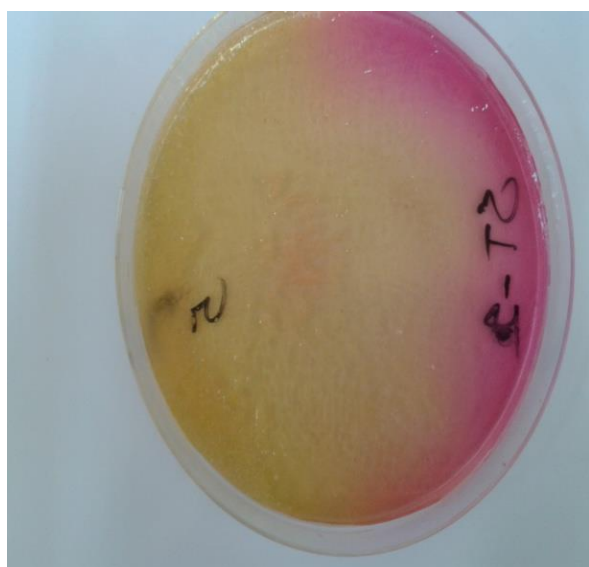


Figure N°52: Aspect des colonies de *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman



Figure N°53 : Aspect microscopique de la souche *Staphylococcus*, après coloration de Gram (**Grossissement $\times 100$**).



Figure N°54 : Aspect des colonies de *Staphylococcus hominis* sur milieu Chapman.



Figure N°55 : Résultat des tests biochimiques de la galerie API STAPH pour l'identification de la souche *Staphylococcus hominis*.

VI-3-4-Identification d'*Escherichia*:

La caractérisation macroscopique, permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu solide Hektoen après 24h d'incubation à 37°C et de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité)

Les colonies de la souche, bombées, brillantes d'une couleur orange saumon (caractéristique des colonies d'entérobactérie sur ce milieu), ayant un contour régulier et un diamètre d'environ 3 mm (**Figure N°56**), révèlent au microscope après coloration de Gram, des coccobacilles Gram négatif (**Figure N°57**). Sur la base du profil biochimique, la souche est dépourvue de cytochrome oxydase du fait de l'absence de la couleur violette suite au test d'oxydase.

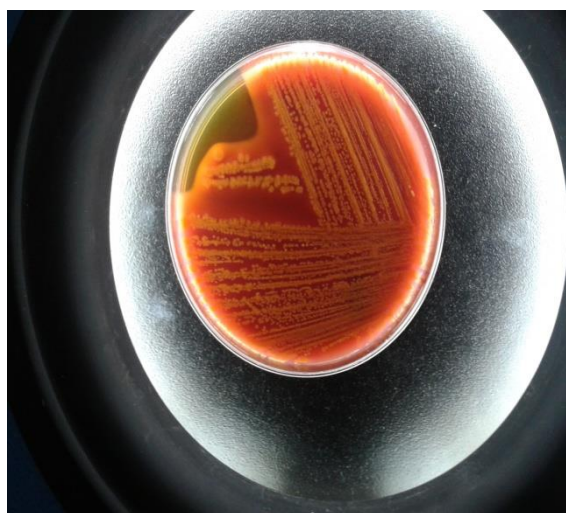


Figure N°56 : Aspect macroscopique de la souche *Escherichia coli* sur milieu Hecktoen.

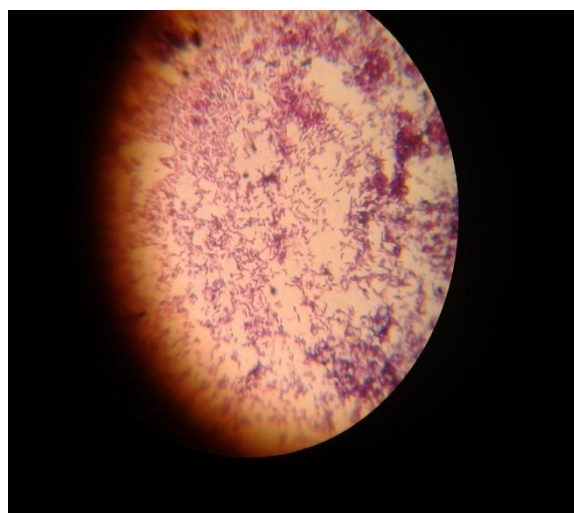


Figure N°57 : Aspect microscopique de la souche *Escherichia coli* (Grossissement ×100) après coloration de Gram.



Figure N°58 : Résultat des tests biochimiques sur galerie API20E pour l'identification de la souche *Escherichia coli*.

VI-3-5-Identification des levures et moisissures :

Les colonies sont caractérisées par un aspect bombé, lisse, brillant, d'une couleur blanche et crémeuse. Les cellules de la souche isolée sont de forme ovale à ronde, le mode de reproduction végétative se fait par bourgeonnement. Après l'étude microscopique, il s'agit de *Candida sp* (**Figure N°59**).



Figure N°59: Aspect macroscopique des colonies de *Candida sp* sur milieu de Sabouraud.

La connaissance du microbiote intestinal pourrait-être utile pour mieux comprendre le rôle des souches microbiennes dans la promotion de la santé des nourrissons. D'autre part la composition complexe du lait maternel fournit à la fois une nutrition optimale pour le nouveau-né et une protection des éléments nutritifs qui contribuent au développement des défenses de la muqueuse.

Le lait maternel est une source potentielle de microorganismes, dont les bonnes bactéries aux effets protecteurs contre un certain nombre de troubles. Ces types de bactéries peuvent être considérées comme des probiotiques exerçant des effets anti-infectieux, anti-inflammatoires et métaboliques chez le nourrisson selon **Fernández, Leónides et al. (2013)**.

La période de l'allaitement maternel exclusif constitue une occasion rare pour manipuler le microbiote intestinal en faveur de la santé du nourrisson. Dans les 48 premières heures, le tractus gastro-intestinal est colonisé par des bactéries aérobies/anaérobies facultatives (environ 10^4 - 10^6 UFC/g (Unité Formant Colonie/g) : Streptocoques, Entérocoques, Staphylocoques (bacilles Gram +, phylum Firmicutes). En consommant l'oxygène, ces bactéries permettent la colonisation par des bactéries anaérobies strictes : essentiellement des *Bifidobacterium* (bacilles Gram + phylum Actinobacteria) et moins de *Lactobacillus* (bacilles Gram + phylum Firmicutes), provenant de la muqueuse vaginale et du lait maternel **Guaraldi et Salvatori (2012) et Belkaid (2014)**.

Selon **Kolopp-Sardaa (2016)**, leur métabolisme strict entraîne la formation d'acide lactique et acétique, ce qui maintient un pH acide, favorisant leur propre développement aux dépends des germes anaérobies facultatifs potentiellement pathogènes. Selon **WHO (2001)**, ces bactéries intestinales maternelles décrivent ainsi une voie entéro-mammaire interne qui influence la colonisation intestinale néonatale et la maturation du système immunitaire.

D'après **Dominguez-Bello et al.(2010)** ; **Urbaniak et al.(2014)**, les genres les plus abondamment trouvés (*Streptococcus* et *Staphylococcus*) ont également été découvert dans la cavité buccale; la peau et le tissu mammaire, respectivement.

L'analyse microbiologique de lait maternel en niveau de *Streptococcus* révèle la présence des taux élevés, en accord avec **Solis et al.(2010)** dont le pourcentage de *Streptococcus* est 65% au premier jour et 50% à 90^{ème} jours.

Schultz et al.(2004) rapportent que la transmission de souches de probiotiques de mère à enfant lors de l'accouchement ; bien que faible persiste pour la plupart des enfants jusqu'à l'âge de 6 mois.

La colonisation suit néanmoins un schéma relativement organisé, sous la dépendance de facteurs exogènes et endogènes. Les facteurs exogènes incluent l'exposition aux micro-organismes d'origine maternelle (fécale, vaginale et cutanée) et environnementale, mais aussi l'alimentation et parfois l'antibiothérapie, qui peut avoir des effets perturbateurs majeurs. Quelques études indiquent que le lait maternel pourrait être le vecteur de micro-organismes de la mère vers l'enfant. Ainsi, même collecté aseptiquement le lait de femme n'est pas stérile. Les facteurs endogènes incluent un ensemble de sécrétions du tube digestif mais aussi de produits des premiers micro-organismes colonisateurs qui globalement conditionnent la physicochimie du biotope.

Les bactéries anaérobies qui dominent le microbiote intestinal de l'adulte font partie des premiers microorganismes rencontrés lors d'une naissance par voie basse. Selon **Bjursell et al.(2006)**,elles ne se développeront en dominance dans l'intestin que lorsque les anaérobies facultatifs auront consommé l'oxygène présent.

Certaines fréquences de la numération bactérienne diffèrent durant la période de lactation. En particulier, *S. aureus*, *S.hominis* et *S.parasanguinis* étaient plus fréquents chez les nourrissons âgés de 14 jours (première période de lactation) que chez les nourrissons plus âgés, mettant en évidence les caractéristiques spécifiques de la composition du lait maternel dans les premières semaines de l'allaitement maternel, fait intéressant en rapport avec les travaux de **Gonzalez et al.(2013)**.

Dans la présente étude les espèces de *Staphylococcus* isolés sont *S. aureus*, *S.hominis*. **Martin et al.(2003)** ont montré que les mêmes souches de bactéries lactiques sont présentes dans le lait maternel et dans les matières fécales du nourrisson. Cette étude confirme nos résultats qui révèlent que les souches lactiques *Bifidobacterium spp*, *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1, *Lactobacillus acidophilus* 1, *Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris* sont présentes dans le lait maternel et les fèces infantiles.

Une étude sur des nourrissons suédois **Ahrne et al.(2005)** présente *L. delbrueckii* et *L. reuteri* comme les bactéries les plus fréquentes dans les fèces. Ceci dû à l'alimentation et au climat spécifiques de cette population »

De Leoz et al. (2015) constatent un taux de *Bifidobactérium* remarqué au bout de la 13^{ème} semaine de vie des nourrissons, ce qui confirme l'absence de *Bifidobactérium* de chez certains nourrissons dans cette étude. En effet la colonisation de l'intestin du nourrisson par les bifidobactéries est favorisée par le lactose et d'autres polysaccharides présents dans le lait maternel, mais aussi par un transfert direct du lait maternel vers le nouveau-né **Newburg (2009) Gueimonde et al.(2007)**.

Cependant, certains chercheurs ont signalé l'absence de *Bifidobacterium* dans les selles de nouveau-nés **Lundequist et al.(1985), Bruck (2004)** en raison du potentiel d'oxydoréduction positif dans l'intestin pendant les premiers jours de la vie.

Aslim et Killic (2006) ont rapporté la présence de *Lactobacillus acidophillus* dans les frottis vaginaux, cette étude est en accord avec nos résultats qui révèlent la présence de *Lactobacillus acidophillus* dans les fèces infantiles. Lorsqu'un enfant naît par voie basse, il bénéficie lors de son passage d'une colonisation par la flore vaginale.

Il faut signaler que les *Lactobacillus* sont utilisés comme probiotiques en nutrition.

D'autres chercheurs ont rapporté l'absence de *Bifidobacterium* dans les selles de nouveau-nés, cette étude est en corrélation avec nos résultats qui remarque l'absence de *Bifidobacterium* chez quelques nouveau-nés, **Lundequist et al.(1985), Bezirtzoglou et al.(1989)**.

Le lait maternel joue un rôle important dans l'établissement du microbiote intestinal **Penders et al.(2006b)**. Le principal facteur impliqué dans la modification de la composition du microbiote est le changement de régime alimentaire, **Bäckhed et al.(2004), Koenig et al. (2011)**.

Les nourrissons allaités au sein ont un plus grand thymus ce qui suggère le rôle de l'allaitement dans le développement des cellules T et donc l'activation et la stimulation du système immunitaire adaptatif, **Hasselbalch et al.(1999)**.

D'autre part les nourrissons qui reçoivent des préparations à base de lait de vache, contenant naturellement de faibles taux d'oligosaccharides, ont souvent des concentrations plus élevées de bactéries potentiellement pathogènes tels que les entérobactéries, dans leur microbiote intestinal, **Harmsen et al.(2000)**.

Une différence importante est la capacité tampon relative dans les deux types d'alimentations. Le lait maternel a une faible capacité tampon, comparé avec le lait maternisé, cela conduit à des différences marquées dans le pH du côlon des nourrissons nourris au sein et au biberon (5.1 et 6.5), respectivement. Le faible pH favorise la croissance des bifidobactéries et des lactobacilles, mais inhibe de nombreuses autres bactéries, **Tham et al.(2011)**.

Il est bien connu que la supplémentation en oligosaccharides augmente le nombre de bactéries productrices d'acide lactique tel rapporté par **Moro et al.(2003)**; **Rinne et al.(2005)**. **Penders et al.(2006b)** confirment que les nourrissons nourris exclusivement avec une formule complétée par un mélange de galactooligosaccharides et fructooligosaccharides avaient un nombre plus élevé de bifidobactéries et de lactobacilles dans leurs selles par rapport aux bébés nourris avec une formule sans additifs.

Par conséquent, les préparations complémentées avec des polyamines peuvent assurer une meilleure nutrition pour les nourrissons, imitant les effets de l'allaitement maternel et veillant à l'inclusion de facteurs bioactifs présents dans le lait maternel **Gómez-Gallego et al.(2012)**.

Enterococcus faecalis est la deuxième espèce bactérienne prédominante dans les fèces des nourrissons allaités, présente également chez ceux nourris au biberon **Jiménez et al.(2008)**. Nos résultats confirment cette étude qui révèle une abondance d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium* dans les échantillons fécaux des deux groupes.

En outre, les résultats montrent l'abondance de bactéries potentiellement pathogènes comme *Escherichia* et *Staphylococcus* dans les matières fécales de nourrissons allaités artificiellement par comparaison aux allaités maternellement, et qui bénéficient de la richesse du lait maternel et des facteurs spécifiques qui favorisent la croissance de bactéries potentiellement bénéfiques et inhibent celle des germes potentiellement pathogènes.

De même, les travaux de **Bezirtzoglou et Stavropoulou (2010)** montrent que les nourrissons allaités maternellement présentent un environnement acide dans leur lumière intestinale « tampon d'acétate » suggérant que cet acide exerce un effet bactériostatique sur les germes potentiellement pathogènes spécialement contre les bactéries Gram négatif.

Il a été rapporté que les nourrissons allaités font moins d'allergies et d'infections gastro-intestinales que les nourrissons alimentés au biberon **Kalliomaki et al.(2001)**.

Par conséquent, le microbiote des enfants nourris au sein peut-être considéré dans les normes d'un microbiote intestinal sain et a besoin d'être évalué qualitativement et quantitativement.

Remarque, les bactéries lactiques et les bifidobactéries sont souvent considérées comme membre d'une microflore saine. **Favier et al.(2002)**.

L'absence de similitude dans la composition microbiologique du lait humain et des préparations pour nourrissons est probablement le principal facteur responsable des différences observées entre le microbiote intestinal des nourrissons alimentés maternellement ou artificiellement **Mackie et al.(1999)**, **Harmsen et al.(2000)**, **Favier et al.(2002)**.

Ces bactéries restent prédominantes pendant les premiers jours de la vie, parmi eux *Staphylococcus spp.*, *Enterobacteriaceae*, et *Streptococcus spp* sont le plus souvent isolés à partir des fèces nées après la naissance. Les bactéries anaérobies facultatives sont suivies par des anaérobies stricts tels que les bifidobactéries, *Bacteroides* et *Clostridium* genres **Di Gioia et al.(2014)**.

Jara et al.(2010) attestent que le lait maternel humain constitue une source intéressante de nouvelles souches probiotiques spécifiques à partir de la flore intestinale de nouveau-nés allaités au sein, visant à aider à un développement d'une bonne microflore intestinale chez les nourrissons qui, pour différentes raisons, ne peuvent pas être nourris au sein.

Le microbiote intestinal de la mère pourrait-être modulé par des probiotiques afin d'améliorer le microbiote de la glande mammaire et augmenter ainsi la qualité du lait maternel. Cela aurait à un effet direct sur la santé de l'enfant **Fernández et al.(2013)**.

Compte tenu de leur abondance élevée dans le tractus gastro-intestinal, leur capacité à coloniser l'intestin, et leur longue histoire d'utilisation en toute sécurité, les bifidobactéries sont largement utilisées comme probiotiques à des fins préventives et thérapeutiques chez les nourrissons **Sanders et al.(2010)**.

L'utilisation de bactéries probiotiques lors de maladies diarrhéiques aiguës donne de bons résultats **Wiegering et al.(2011)**. Les probiotiques sont capables de stabiliser la barrière muqueuse en augmentant la synthèse de mucine, en réduisant l'excès de croissance de certaines colonies bactériennes, en stimulant l'immunité de la barrière muqueuse gastrique et en synthétisant des antioxydants **Fond et al.(2016)**.

Les bactéries lactiques jouent donc un rôle important dans le maintien de l'équilibre de la microflore intestinale et dans le bon fonctionnement de l'organisme ; c'est la raison pour laquelle elles sont isolées, identifiées et sélectionnées pour être intégrées dans divers aliments et plus particulièrement dans les laits fermentés à caractère thérapeutique.

Conclusion :

À l'heure où les chercheurs de l'Union Européenne ont réussi à séquencer le génome de la flore intestinale ; à séquencer l'ADN issu de fèces de différents sujets : Les résultats révèlent que nous hébergeons deux types de flore : une essentielle à tous et commune à tous, fabricant nos vitamines, acides aminés, aidant à la digestion de glucides complexes, et une autre qui est propre à chacun.

Le but de cette thèse est d'amener le lecteur, d'un concept flore intestinale vers ses preuves d'efficacité dans les domaines métabolique, immunologique et digestif de l'hôte, et prouver que le maintien de la flore digestive se fait par l'aide d'une hygiène de vie et d'une alimentation saine.

Cette étude va pouvoir permettre de corréler cette flore avec l'allaitement maternel.

Le microbiote intestinal humain contient, entre autres microorganismes, environ 10^{14} bactéries et représente un écosystème extrêmement complexe. Plus de 90 % des espèces du microbiote intestinal ne sont pas cultivables en laboratoire et il a fallu attendre l'avènement de méthodes indépendantes de la culture pour définir précisément la structure à l'échelle des phylum et des grands groupes phylogénétiques et mieux caractériser la diversité du microbiote intestinal (**Landmana & Quévrain, 2015**).

La microflore d'un individu est extraordinairement stable dans le temps faisant du microbiote une entité structurée et fonctionnelle comme un véritable « organe caché » (**Quévrain & Seksik, 2013**).

Le développement de l'écosystème intestinal infantile est un processus hautement coordonné avec de profondes implications pour la santé à court et à long terme. La période pré-sevrage, à savoir, les premiers 3 à 4 mois de la vie, est une période critique dans le développement du microbiome intestinal (**Goldsmith et al., 2015**).

Hinde et Zachery (2015) exposent dans leur article qu'il existe, dans le lait maternel humain, des composés qui ne sont pas directement destinés à nourrir le bébé, mais bien ces bactéries intestinales ! Ces glycanes, formés d'une chaîne plus ou moins longue de molécules de sucres, constituent même la plus grande part des composés carbonés présents dans le lait.

L'application des outils d'écologie moléculaire au microbiote intestinal a conduit à des améliorations très significatives de notre compréhension de cet écosystème, en termes de composition et de dynamique de la diversité des espèces.

L'approche à un seul gène, basée sur l'ARN ribosomique en tant que marqueur phylogénétique universel, avait néanmoins négligé les fonctions exercées par les microorganismes dans leur environnement. Il est devenu possible de séquencer des génomes combinés de communautés microbiennes complexes et d'accéder ainsi à leurs activités potentielles.

Les résultats de l'étude quantitative et qualitative de la flore microbienne du lait maternel témoignent de l'abondance de bactéries lactiques tels que *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*.

Les résultats de l'étude comparative montrent que les matières fécales de nourrissons allaités maternellement sont plus riches en probiotiques et moins riche en bactéries pathogènes que celles des nourrissons recevant le lait maternisé.

Le lait maternel est globalement de meilleure qualité que le lait dit artificiel pour la santé du bébé, notamment parce qu'il confère des bactéries de la flore intestinale et des anticorps adaptés.

D'après les résultats obtenus de séquençage de la région V3-V4 de l'ARNr 16S :

Le lait maternel n'est pas stérile, les bactéries trouvées correspondent aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Staphylocoque*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Erwina*, *Leuconostoc*, *Stenotrophomonas*.

Staphylococcus, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Escherichia* sont les genres constatés dans la flore microbienne des échantillons fécaux de nouveaux-nés nourris exclusivement au sein.

Staphylococcus epidermidis est l'espèce prédominante dans le lait et les excréments de nourrissons allaités naturellement.

Les résultats du séquençage sont plus précis en raison des relations phylogénétiques disponibles.

Le microbiote de chacun commence à s'installer lors de l'accouchement et de l'allaitement. Le lait maternel est, en général, le premier liquide nutritionnel ingéré par les nouveau-nés. Lors de la naissance, le nouveau-né hérite du microbiote du lait maternel. Sa composition a une influence directe sur le développement du microbiote intestinal des nourrissons.

Cette étude a montré que certaines paires mère-nourrissons partageaient des souches bactériennes appartenant à différents genres bactériens, ce qui suggère que le lait maternel peut être inclus parmi les sources potentielles de bactéries dans l'intestin du nourrisson.

Les microorganismes isolés dans cette étude peuvent constituer des souches prometteuses pour les inclure dans des préparations pour nourrissons.

Lorsque l'allaitement maternel est impossible ou non souhaité, l'ajout de prébiotiques dans le lait artificiel pourrait favoriser le développement des bifidobactéries.

Le premier contact avec les bactéries pendant et immédiatement après la naissance a un rôle important dans le développement de la flore intestinale du nouveau-né (**Baldassarre *et al.*, 2014**).

Les micro-organismes du lait et du sein maternels «influencent et sélectionnent les bactéries qui s'installent ensuite chez l'enfant, laissant une empreinte qui peut être détectée, même à l'âge adulte». L'analyse des divers micro-organismes transmis par la mère pourrait d'ailleurs expliquer certains des bienfaits à long terme associés à l'allaitement au sein.

Une limitation de cette étude est la sélection et le nombre d'échantillon couvrant une faible étendue de la population. D'autres recherches dans des populations plus importantes, y compris des échantillons de matières fécales maternelles, sont prévues pour confirmer ces résultats et étendre les connaissances sur le microbiote intestinal du nouveau-né.

Le principal facteur impliqué dans la modification de la composition du microbiote est le changement de régime alimentaire.

Actuellement, la microflore intestinale est très étudiée dans certaines maladies telles que la diarrhée post antibiotique, l'obésité ou les maladies inflammatoires intestinales ouvrant des pistes nouvelles dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques.

Le microbiote est devenu un sujet d'actualité dans la communauté scientifique ainsi que dans les médias grand public. L'essor des nouvelles technologies de séquençage de l'ADN a, depuis une décennie, bouleversé les méthodologies et ouvert de nouvelles perspectives de recherche dans de nombreux domaines. Selon les experts du domaine, la métagénomique devrait être complétée par la métaphysique, la protéomique, la métabolomique et les métadonnées, comme les informations cliniques et alimentaires, qui expliquent la structure et la fonction du microbiome.

Les probiotiques sont donc amenés à être de plus en plus sollicités par les thérapeutes, une ouverture d'esprit vers la « Thérapie bactérienne ».

L'objectif des probiotiques étant d'apporter, à un moment donné, un soutien immunitaire, une barrière de défense contre des agents pathogènes, et une aide pour la flore intestinale locale en vue de se repeupler. Une fois l'équilibre intestinal rétabli, le relais doit être pris par les prébiotiques, fibres alimentaires non-digestibles, aliment bactérien. Ces prébiotiques assurent le bon équilibre et le maintien de la thérapeutique probiotique. Ce phénomène de symbiose montre qu'il est bien difficile de maintenir la flore intestinale en bon état sans une alimentation correcte et une hygiène de vie saine, à moins de consommer un complément alimentaire prébiotique adéquat.

Ce phénomène permet ainsi de mieux comprendre comment nos bactéries hôtes agissent sur notre santé, aidées par certaines conditions et aliments ; ceci donne la possibilité à la microbiologie de faire progresser la lutte contre ces maladies encore mal cernées que sont le Diabète, l'Obésité, les Inflammations chroniques de l'intestin, l'Autisme...

Il est reconnu que le microbiote intestinal des nourrissons a des répercussions à long terme sur leur santé et leur immunité. La composition de la flore intestinale différente entre les enfants allaités et ceux non allaités, se maintient de la petite enfance jusqu'à l'âge adulte.

Les résultats de cette étude indiquent que les bactéries présentes dans le lait maternel nourrissent l'intestin du nourrisson, ce qui souligne l'importance et la pertinence de l'allaitement dans le développement du microbiome intestinal du nourrisson.

Ainsi, le microbiote est un nouvel allié pour une croissance optimale et une nouvelle piste pour lutter contre les effets délétères de la sous-nutrition chronique infantile

Dans notre étude, deux problématiques différentes ont été abordées. Concernant le projet d'analyse de la flore intestinale, la plupart des espèces étaient (et sont encore) difficilement cultivables.

Un séquençage massif d'échantillons fécaux humains devrait être créé pour pallier au problème. L'objectif est de proposer une méthode de reconstruction basée sur l'abondance des gènes au sein de plusieurs échantillons et de trouver une méthode permettant de structurer un catalogue d'espèces microbiennes autochtones.

Les génomes reconstruits permettent de renseigner sur la présence et l'abondance de ces espèces par métagénomique quantitative dans les différents échantillons.

Il serait possible de faciliter l'isolement d'espèces nouvelles, en indiquant les échantillons contenant ces espèces en forte concentration.

Un rôle clé du microbiote intestinal ou du moins de certaines familles de bactéries dans la réponse à différentes thérapies. Si ce type de recherche sur le microbiome en est à ses balbutiements et si la compréhension profonde de la fonction microbienne est encore loin, cette première carte du paysage microbien de l'intestin, réalisée grâce à la combinaison de technologies d'imagerie et de chimie constituerait une étape importante. Ces travaux commencent à décrypter l'organisation spatiale des communautés microbiennes de l'intestin ou du microbiome intestinal, et révèlent un degré surprenant de mélange entre les différents types de bactéries.

En perspective, il serait intéressant d'utiliser des probiotiques en prévention et en thérapeutique, de pouvoir développer de nouveaux traitements microbiens, et non anti-microbiens, au cours de cette « nouvelle ère » de recherche sur le microbiome

Références bibliographiques

AFSSA. Alimentation infantile et modification de la flore intestinale. Rapport du groupe de travail. **2003**.

Agrawal A., Whorwell PJ. Irritable bowel syndrome: diagnosis and management. *Bmj* **2006** ; 332 (7536) : 280-283.

Ahrne S., Lonnermark E., Wold AE., Aberg N., Hesselmar B., Saalman R., Strannegard IL., Molin G., Adlerberth I. Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microbes Infect* **2005** ; 7(11–12): 1256–1262.

Albesharat R., Ehrmann MA., Korakli M., Yazaji S., Vogel RF. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Syst Appl Microbiol* **2011** ; 34 : 148–155.

Almeida M. Caractérisation de flores microbiennes intestinale humaine et fromagère par méthode de métagénomique quantitative. Thèse de doctorat, **2013** .p13.

Al-Sheraji SH. Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods* **2013** ; 5(4): 1542–1553 .

American Academy of Pediatrics Work group on breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* **1997** ; 100 : 1035-1039

Anaes . Service recommandations et référence professionnelles. Allaitement maternel : mise en œuvre et poursuite dans les six premiers mois de vie de l'enfant. Recommandations. *Gynecol Obstet Fertil* **2003** ; 31 : 481-90 .

Andy Vierstraete.1999.

Annalisa N., Alessio T., Claudette TD., Erald V., de Antonino L., Nicola DD. Gut microbioma population: An indicator really sensible to any change in age, diet, metabolic syndrome, and life-style. *Mediators of Inflammation* **2014**; 901308.

Arulampalam V., Korecka A. The gut microbiome: scourge, sentinel or spectator? *J Oral Microbiol* **2012** ; 4: 10.

Aslim B., & Kilic E. Some probiotic properties of vaginal *Lactobacilli* isolated from healthy women. *J. Infect Dis* **2006** ; 59 : 249-253.

Association Française de Médecine Orthomoléculaire, équipe scientifique de Nutergia. L'écosystème intestinal de la naissance à l'âge adulte: évolution, équilibre et perturbations. (2010).

Axelsson L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen S, von Wright A, Ouwehand AC, editors. *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*. 3rd Edition. Marcel Dekker New York **2004** : 1-66.

Bach JF. The effect of infections on susceptibility to auto-immune and allergic diseases. *N. Engl. J. Med* **2002**; 347: 911–920.

Bachrach VR., Scharz E., Bachrach LR. Breast-feeding and the risk of hospitalization for respiratory disease in infancy: a meta-analysis. *Arch Pediatr Adolesc Med* **2003** ; 157: 237-43.

Bäckhed F., Ding H., Wang T., Hooper LV., Koh GY., Nagy A., Semenkovich CF., Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* **2004** ;101: 15718 –15723.

Backhed F., Ley RE., Sonnenburg JL., Peterson DA., Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **2005**; 307: 1915-20.

Baldassarre ME., Bellantuono L., Mastromarino P., Miccheli A., Fanelli M., Laforgia Curr N. Gut and Breast Milk Microbiota and Their Role in the Development of the Immune Function. *Pediatr Rep* **2014** ; 2 : 218–226 .

Ballard O., Morrow AL. (2013). Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin N Am* **2013**; 60(1): 49 – 74.

Balows A., Truper HG., Dworkin M., Harder W., Schleifer KH. The prokaryotes. Springer Verlage **1992**; 11.

Barbut F., Joly F. Le microbiote intestinal : équilibre et dysbiose. *Hepato-Gastro et Oncologie digestive* 2010 ;17(6) : 511-520.

Basset C. Api5 : un nouveau co-facteur du récepteur aux œstrogènes ER α impliqué dans la progression tumorale des carcinomes mammaire. Thèse de doctorat, **2014**.p18-19.

Belkaid Y., Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* **2014**;157(1): 121-41.

Benno Y., Sawada K., Mitsuoka T. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol Immunol* **1984** ; 28: 975–986.

Bergmarke S. Ecological control of the gastrointestinal tract : the role of probiotic flora. *Gut* 1998; 42 : 2-7.

Bernard D. Biodiversité : microbiome et microbiote. **2016**.

Bernier L. Les probiotiques: une revue de la littérature. Thèse Pharm : Université d'Angers, **2010**.p 166.

Bessesen DH. Update on obesity .*The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2008**; 93 (6) : 2027-2034.

Bezirtzoglou E., Stavropoulou E. Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora. *Clinical Microbiology* **2010** ; 17: 369-374.

Biasucci G., Rubini M., Riboni S., Morelli L., Bessi E., Retetangos, C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev* **2010** ; 86 (1) :13-5.

Bisch P., Dusautier Y., Gaurois MF., Harroue C., Re Rollo P. Auxiliaire de puériculture : soin de nourrisson, éd. Masson **2007**.

Bjorksten B., Naaber P. et al. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy* **1999** ; 29(3):342-6.

Bjursell MK., Martens EC., Gordon, JI. Functional genomic and metabolic studies of the adaptations of a prominent adult human gut symbiont, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to the suckling period. *J Biol Chem* **2006**; 281(47):36269-79.

Bocci V. The neglected organ: bacterial flora has a crucial immune stimulatory role. *Perspect Biol Med* **1992** ; 35 : 251–60.

Bocle JC., Thomann C. Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte. Nancy : AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) **2005**.

Bouhnik Y., Pochart P., Marteau P., Arlet G., Goderel I., Rambaud JC. Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium sp* ingested in fermented milk. *Gastroenterology* **1992** ; 102 : 875–878.

Bonnefoy C., Guillet F., Leyral G., Verne-Bourdaïs É. Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires, éd. Doin **2002** : 181–183.

Böttger EC. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiol. Lett* **1989** ; 65 :171- 176.

Bourgeois CM., Mescle JF., Zucca J. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments, éd. Tec & Doc **1995**; 138-141: 196- 199.

Brandtzaeg P. (2003). Mucosal integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine* **2003** ; 21(24) : 3382-8.

Breban M. Microbiote intestinal et rhumatismes inflammatoires. *Revue du rhumatisme monographies* **2016**.

Brown CT., Austin GRD., Giongo A., Kelsey AG., Crabb DB., Mukherjee N., Casellan G., et al. Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. *PloS One* **2011**; 6(10).

Bruck MW. Functional foods in infant formulae. *Food Sci Technol bulletin: Funct Foods* 2004 ; 1(9):1-14.

Brugman S., Klatter FA., Visser JTJ., Wildeboer-Veloo ACM., Harmsen HJM., Rozin J., Bos NA. Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? *Diabetologia* **2006** ; 49 (9) : 2105-2108.

Burcelin R., Amar J. Flore intestinale et maladies métaboliques. *Médecine des maladies Métaboliques* **2009** ; 3 : 159-164.

Buts J. Bioactive factors in milk, *Arch Pediatr* **1998**; 5(3): 298-306.

Butel MJ., Suau A., Campeotto F., Magne F., Aires J., Ferraris L., Kalach N., Leroux B., Dupont C. Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2007** ; 44(5) : 577-82.

Butel MJ. Les probiotiques et leur place en médecine humaine. *Journal des Anti-infectieux* **2014** ; 16 : 33-43.

Cabrera-Rubio R., Collado MC., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E., Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr* **2012**; 96(3): 544–551 .

Campeotto F., Waligora-Dupriet A., Doucet-Populaire F., Kalach N., Dupont C., Butel MJ. Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né. *Gastroentérologie clinique et biologique* 2007 ; 31 : 533-542.

Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr* **1999**; 69: 1046–51.

Cephas KD., Kim J., Mathai RA., Barry KA., Dowd SE., Meline BS., et al. Comparative analysis of salivary bacterial microbiome diversity in edentulous infants and their mothers or primary care givers using pyrosequencing. *PLoS One* **2011**; 6(8): e23503.

Chassard C., Wouters T., Lacroix C. Probiotics tailored to the infant: a window of opportunity. *Current Opinion in Biotechnology* **2014**; 26: 141–147.

Christl SU., Murgatroyd PR., Gibson GR., Cummings JH . Production, metabolism, and excretion of hydrogen in the large intestine. *Gastroenterology* **1992** ; 102 : 1269-77.

Cinquin C. Développement et validation d'un nouveau modèle de fermentation colique in vitro avec cellules immobilisées. Québec : Thèse de Doctorat, **2005**.

Clément K. Le microbiote intestinal : un nouvel acteur de la nutrition. *Cahiers de nutrition et diététique* **2015** ; 50 : 22-29.

Clemente JC., Ursell LK., Parfery LW., Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* **2012** ; 148(6): 1258–1270.

Goldsmith F., O ' Sullivan A., Smilowitz JT., Freeman SL. Lactation and Intestinal Microbiota: How Early Diet Shapes the Infant Gut. *Mammary Gland Biol Neoplasia* **2015**; 20: 149 – 158.

Collaborative Group on Hormonal factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. *Lancet* **2002** ; 360:187-95.

Collado MC., Delgado S., Maldonado A., Rodriguez JM. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* **2009** ; 48 : 523–8.

Colarelli M Les probiotiques, du conseil officinal à la prise en charge micronutritionnelle. Thèse de doctorat en pharmacie, 2010. p99.

Coudeyras S., Forestier C. Microbiote et probiotiques: impact en santé humaine. *Can. J. Microbiol* **2010**; 56(8): 611–650.

Cox DB., Owens RA., Hartmann PE. Blood and milk prolactin and the rate of milk synthesis in women. *Exp Physiol* **1996** ; 81: 1007–20.

Cramer DW., Titus-Ernstoff L., McKolanis JR., Welch WR., Vitonis AF., Berkowitz, RS. Conditions associated with antibodies against the tumor-associated antigen MUC1 and their relationship to risk for ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005 ; 14: 1125-31.

Cregan MD., Hartmann PE. Computerized breast measurement from conception to weaning: clinical implications. *J Hum Lact* **1999**, 15, 89–96.

Curk D., MacPhail A. Précision des mesures de vitesse de croissance des streptocoques lactiques dans le lait basées sur la méthode de dénombrement microbien par formation de colonies. Etude de référence avec *Lactococcus lactis*. *Lait* 1996 ; 69 : 433-447.

Cummings JH., Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon . *The Journal of Applied Bacteriology* **1991** ; 70(6) : 443-45.

Dacosta Y. Probiotiques et prébiotiques en alimentation humaine. Lavoisier, **2001**, Paris.

Daly SE., Owens RA., Hartmann PE. The short-term synthesis and infant-regulated removal of milk in lactating women. *Exp Physiol* **1993** ;78 : 209–20.

Danforth KN., Tworoger SS., Hecht JL., Rosner BA., Colditz GA., Hankinson SE. Breastfeeding and risk of ovarian cancer in two prospective cohorts. *Cancer Causes Control* **2007** ; 18: 517-23.

Darfeuille-Michaud A., Neut C., Barnich N., et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **1998** ; 115 : 1405-13.

Delarras C. Microbiologie pratique pour le laboratoire, d'analyse ou de contrôle sanitaire. Lavoisier, **2007**, p 323-367.

Delarras C. Pratique en microbiologie de laboratoire : Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Lavoisier, **2014**, p 111-113.

De Leoz MLA., Kalanetra KM., Bokulich NA., Strum JS., Underwood MA., German JB., Mills, DA., Lebrilla CB. Human Milk Glycomics and Gut Microbial Genomics in Infant Feces Show a Correlation between Human Milk Oligosaccharides and Gut Microbiota: A Proof-of-Concept Study. *J. Proteome Res* **2015**; 14: 491-502.

Denis F., Ploy M., Martin C., Bingen E., Quentin R . Bactériologie médicale: techniques usuelles. Éd. Masson, **2007**, p 21-29.

Deplancke B., Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr* **2001**; 73: 1131-1141.

De Schepper C., Dickstein M., Jouret C., Leurquin MM., Pirard Gilbert L., Schaner L., Van Hees JF. Allaitement, Guide à l'usage des professionnels de la santé .Une initiative du Centre d'Education du patient.**2009**.

Devaraj S., Hemarajata P., Versalovic J. The human gut microbiome and body metabolism: implications for obesity and diabetes. *Clinical Chemistry* **2013**; 59: 617–28.

Di Gioia D., Aloisio I., Mazzola G., Biavati B. Bifidobacteria: their impact on gut microbiota composition and their applications as probiotics in infants. *Appl Microbiol Biotechnol* **2014** ; 98: 563 – 577.

Dominguez-Bello MG., Costello EK., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Fierer N., et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA* **2010** ; 107(26) :11971-5.

Doré J., Corthier G. Le microbiote intestinal humain. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* **2010** ; 34 : 7-16.

Doré D., Multon MC., Béhier JM., Affagard H., Andreumont A., Barthélémy P., Batista P., Bonneville M., Bonny G., Boyaval G., Chamaillard M. Microbiote intestinal : qu'en attendre au plan physiologique et thérapeutique ? *Thérapie* **2017** ;72 :1-19.

Dorsch M., Stackebrandt E. Some modification in the procedure of direct sequencing of PCR amplified 16S rDNA. *J. Microbiol. Methods* **1992**; 16: 271-279.

Dubos JP., Depoortere MH., Djavadzadeh AM., Codaccioni X. Avantages de l'allaitement maternel. *Encyclopédie medico-chirurgicales* **2016** ; 5 : 108.

Dupin H., Cuq JL., Malewiak MI., Leynaud-Rouaud C., Berthier AM. Alimentation et nutrition humaines. Éd. ESF, **1992**, p 454.

Eckburg PB., Bik EM., Bernstein CN., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill SR., Nelson KE., Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **2005** ; 308 (5728) :1635–1638.

Europe europa. L'allaitement maternel . **2010**.

Faith JJ., Guruge JL., Charbonneau M., Subramanian S., Seedorf H., Goodman AL., et al. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science* **2013** ; 341: 1237-439.

FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food inclusion powder milk with live lactic acid bacteria **2001** ; 30 : 23-33 .

FAO/WHO Working group. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. **2002**.

Favier CF., Vaughan EE., De Vos W., Akkermans A. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* **2002** ; 68: 219-226.

Favier CF., De Vos WM., Akkermans ADL. Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe* **2003** ; 9 : 219–229.

Faure S., Pubert C., Rabiller J., Taillez J., Yvain AN. Intérêt des probiotiques en préventif au niveau des différentes flores de l'organisme. Les probiotiques, que l'intérêt en prévention ? *Actualités pharmaceutiques* **2013** ; 22.

Fernandez R.D., Hoeflinger J.L., Bringe N.A., Cox S.B., Dowd S.E., Miller M.J., Gonzalez E. Consumption of different soymilk formulations differentially affects the gut microbiomes of overweight and obese men. *Gut Microbes* **2012** ; 3 : 490-500.

Fernandez L., Langa S., Martín V., Maldonado A., Jiménez E., Martín R., Rodríguez, J.M. The human milk microbiota : Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research* **2013**; 69 (1): 1– 10.

Festy D. Le grand livre des probiotiques et des prébiotiques. Quotidien malin edition **2014**.

Finegold S.M., Molitoris D., Song Y., Liu C., Vaisanen M.L., Bolte E., McTeague M., et al. Gastrointestinal microflora studies in late onset autism ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* **2002**, 35(1), 6-1.

Filleron A., Jumas-Bilak E. Implantation du microbiote chez l'enfant : ontogénèse d'une niche écologique. *Rev Fr Lab* **2015** ; 469 : 27-35.

Flourié B., Nancey S. Propriétés fonctionnelles des probiotiques : Probiotiques et intestin. *Cah. Nutr. Diét* **2007** ; 42 : 2.

Frank A., Prébiotiques. In *Aliments fonctionnels*, Roberfroid M (coordonnateur) Editions Tec& Doc, Collection Sciences & Techniques Agroalimentaires, Lavoisier, Paris **2002** ; 105-123.

Franks A.H., Harmsen H.J., Raangs G.C., Jansen G.J., Schut F., Welling G.W. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* **1998** ; 64 :3336-45.

Frece J., Kos B., Kresimir I.S., et al. Synbiotic effect of *Lactobacillus Helvetius* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice. *The Journal of Dairy Research* **2009**; 76: 98-104.

Frydman, R. Attendre bébé. Edition Caroline Rolland, **2011**, p378.

Fouhy F., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Stanton C., Cotter P.D. Composition of the early intestinal microbiota: knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps. *Gut Microbes* **2012** ; 3 : 203–20.

Fond G., Chevalier G., Eberl G., Leboyer M. Le rôle potentiel du microbiote intestinal dans les troubles psychiatriques majeurs : mécanismes, données fondamentales, comorbidités gastro-intestinales et options thérapeutiques. *Psychiatrie* **2016**; 45(81): 7–19.

Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* **1991**; 32(4): 439-442.

Gerstein HC. Cow's milk exposure and type I diabetes mellitus; a critical overview of the clinical literature. *Diabetes Care* **1994**; 17:3-9.

Gerstein HC. Cow's milk exposure and type I diabetes mellitus; a critical overview of the clinical literature. *Diabetes Care* **1997** ; 17 : 13-9.

Gérarda P. Les relations entre microbiote intestinal et lipides. *Cahiers de nutrition et de diététique* **2014** ; 49 : 213-217.

Ghosh AR. Appraisal of microbial evolution to commensalism and pathogenicity in humans. *Clin Med Insights Gastroenterol* **2013** ; 6 : 1–12.

Gibson GR., Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota : introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr* **1995**; 125 : 1401-12.

Gibson GR., Rastall A. When we eat, which bacteria should we be feeding? *ASM News* **2004** ; 70 : 224-31.

Gibson G., Muse S. Précis de génomique. Paris **2004** ; 287-288.

Gold F., Lionnet C., Blond MH. Pédiatrie en maternité - Réanimation en salle de naissance. Masson 1997;107-113.

Golding J., Emmett PM., Rogers IS. Eczema, asthma and allergy. *Early Hum Dev* **1997**; 49 : 121-130.

Gómez-Gallego C., Collado M.C., Ilo T., Jaakkola UM., Bernal MJ., Periago MJ., Salminen S., Ros G., Frias R. Infant formula supplemented with polyamines alters the intestinal microbiota in neonatal BALB/cOlaHsd mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* **2012**; 23:1508–1513.

González R., Mandomando I., Fumado V., Saco C., Macete P., Alonso Pl., Menendez C. Breast Milk and Gut Microbiota in African Mothers and Infants from an Area of High HIV Prevalence. *PLOS ONE* **2013**; 80299.

Goossens D., Jonkers D., Russel M., Stobberingh E., Van Den Bogaard A., Stockbrugger R. The effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on the bacterial composition and metabolic activity in faeces of healthy volunteers: a placebo-controlled study on the onset and duration of effects. *Aliment Pharmacol Ther* **2003**; 18: 495–505.

Gothefors L. Symbiosis between host and microorganisms: neonatal colonization. *Scand J Infect Dis Suppl* **1980** ; 24 : 68-73.

Goulet O. La flore intestinale : un monde vivant à préserver. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture* 2009 ; 22 : 102-106.

Grice EA., Kong HH., Conlan S., Deming CB., Davis J., Young AC., et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* **2009**;324 (5931): 1190 – 2.

Gronlund MM., Lehtonen OP., Eerola E., et al. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery : Permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **1999**; 28: 19-25.

Grosdemange, A. Impact du microbiote intestinal sur le système immunitaire de l'enfant. Thèse de doctorat , **2014**, p8-14

Groussin-Weyland M. Physiologie de la lactation. Sortie de maternité et retour à domicile du nouveau-né **2010**.

Guaraldi F., Salvatori G. Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. *Front Cell Infect Microbiol* **2012** ; 2: 94.

Guarner F., Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* **2003** ; 361 :512–519.

Gueimonde M., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology* **2007** ; 92 : 64–6.

Guiraud JP., Galzy P. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Eds. Usine nouvelle Paris, **1980**, p 239.

Guiraud JP. Microbiologie alimentaire. Technique et ingénierie, Dunod, série Agro-alimentaire ,**2003**, Paris, 652 p.

Gutell RR., Larsen N., Woese CR. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Rev* **1994**; 58: 10-26.

Hamady M., Knight R. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. Colorado : Genome Research **2009**; 19(7):1141-52.

Hamosh M. Bioactive factors in human milk. *Pediatr Clin North Am* **2001** ;48:69- 86.

Hancock JM., Tautz D., Dover GA. Evolution of the secondary structures and compensatory mutations of the ribosomal RNAs of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol* **1988** ; 5 : 393-414.

Hariri A., Ouis N., Sahnouni F., Djilali B. Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn* **2009**; 37-55.

Harmsen HJM., Wildeboer-Veloo ACM., Raangs GC., Wagendorp AA., Klein N., Bondels JG., Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2000**; 30: 61-67.

Harmsen HJM., Wildeboer-Veloo ACM., Raangs GC., Wagendorp AA., Klein N., Bondels JG., Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2002** ; 30: 61-67.

Hasselbalch H., Engelmann MD., Ersboll AK., Jeppesen DL., Fleischer-Michaelsen K. Breast-feeding influences thymic size in late infancy. *Eur J Pediatr* **1999** ;158 : 964–7.

Hayashi H., Sakamoto M., Benno Y. Fecal microbial diversity in a strict vegetarian as determined by molecular analysis and cultivation. *Microbiol Immunol* **2002**; 46: 819-31.

Heikkilä MP., Saris, PEJ. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology* **2003**; 95: 471–478.

Heird WC. The role of polyunsaturated fatty acids in term and preterm infants and breastfeeding mothers. *Pediatr Clin North Am* **2001** ; 48: 173- 88.

Heleni S., Lefki P., Nikolaos T., Evanthia LT. Populations, types and biochemical activities of aerobic bacteria and lactic acid bacteria from the air of cheese factories. *INT.J.Dairy Technol* 2006 ; 59(3) : 200-208.

Heyman M. Effets des probiotiques sur le système immunitaire : Mécanisme d'action potentiels. Probiotiques et immunité. Cah. Nutr. Diét 2007 ; 42 : 2.

Hill MJ., Marsh PD. Human microbial ecology. Scientific Dairy Journal **1990**; 52 .

Hill, M.J. (1997). Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. Eur. J. Cancer Prev , 6 , 43-45.

Hinde K., Zachery T. Mother's littlest helpers: Breast milk nourishes the microbes colonizing the neonatal intestinal tract. Science **2015**; 348:1427-1428.

Hiraishi, A. Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. Lett. Appl. Microbiol **1992**; 15 : 210-213.

Hoeksma A., Winkler KC. The normal flora of the nose in twins. Acta Leiden **1963**; 32: 123-33.

Holzapfel WH., Schillinger U. Introduction to pre-and probiotics. Food Res. Int **2002**; 35: 109-16.

Hopper LV. Bacterial contributions to mammalian gut development. Trends Microbiol **2004**; 12: 129-34.

Hsiao EY., McBride SW., Hsien S., Sharon G., Hyde ER., McCue T., et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. Cell **2013** ;155 : 1451-63.

Huffnagle GB. The microbiota and allergies/asthma. PLoS Pathog **2010**; 6.

Hunt KM., Foster JA., Forney LJ., Schutte UM., Beck, DL., Abdo Z., et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. PLoS One **2010**, 6(6), 213-13.

Hugerth LW., Wefe, HA., Lundin S., Jakobsson HE., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson AF . DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies. Appl Environ Microbiol **2014** ;80(16):5116–5123.

Huurre A., Kalliomäki M., Rautava S., Rinne M., Salminen S., Isolauri E. Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology* **2008**; 93: 236-40..

Ip S., Chung M., Raman G., Chew P., Magula N., DeVine D. Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries. *Evid Rep Technol Assess (Summ)* **2007** ;153:1-86.

Jara S., Sánchez M., Vera R., Cofré J., Castro E .The inhibitory activity of *Lactobacillus spp.* isolated from breast milk on gastrointestinal pathogenic bacteria of nosocomial origin. *Clinical Microbiology* **2010** ;17: 474-477.

Jiménez E., Delgado S., Maldonado A., Arroyo R., Albújar M., García N., Jarrod M., Fernández L., Gómez A., Rodríguez JM. *Staphylococcus epidermidis*: A differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiology* **2008**; 8-143 .

Joffin, J.N., & Leyral, G. Microbiologie technique : 1 ‘Dictionnaire des techniques’. 3^{ème} Edition, Bordeaux : CRDP d’Aquitaine, **2001**, p 320 .

Joffin JN., Leyrol G. Microbiologie technique. Tome1. Dictionnaire des techniques. 4^{ème} edition, Bordeaux : CRDP d’aquitaine, **2006**, ISBN : 2-86617-515-8, p 363 .

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.

Kekus K. Les raisons du refus de l’allaitement maternel : recueil du point de vue de femmes primipares par une étude qualitative. Thèse pour le doctorat en médecine, **2014**.p29.

Khamisse E. Etude du microbiote susceptible de persister sur les surfaces d’un atelier de la filière viande bovine , **2012**, Paris .

King T., Elia M., Hunter J. Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome. *Lancet* **1998**; 352: 1187-9.

Kleessen B., Bezirtzoglou E., Matto J. Culture-based knowledge on biodiversity, development and stability of human gastrointestinal microflora . *Microbial Ecology in Health and Disease* **2003**; 12 (2) : 53-63.

Koenig JE., Spor A., Scalfone N., Fricker AD., Stombaugh J., Knight R., Angenent, LT., Ley RE. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* **2011** ;108 :4578 – 4585.

Kolopp-Sarda M. Système immunitaire muqueux et microbiote intestinal : histoire d'une symbiose. *Revue francophone des laboratoires* **2016** ; 484.

Kramer MS., Guo T., Platt RW., Sevkovskaya Z., Dzikovich I., Collet JP. Infant growth and health outcomes associated with 3 to 6 months of exclusive breastfeeding. *Am J Clin Nutr* **2003** ;78:291-5.

Labook MH., Clark D., Goldman AS. Breastfeeding: maintaining an irreplaceable immunological resource. *Nat Rev Immunol* **2004**; 4(7): 565-72.

Lane DJ., Pace B., Olsen GJ., Stahl DA., Sogin ML., Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad* **1985**.

Landman C., Quévraing E. Le microbiote intestinal: description, rôle et implication physiopathologique. *La Revue de médecine interne* **2015**.

Langhendries P. Colonisation bactérienne de l'intestin dans l'enfance : pourquoi y accorder autant d'importance ? *Archives de pédiatrie* **2006** ; 13 : 1526 – 1534

Larpen JP. Biotechnologie des levures. Ed. Masson. Paris **1991**, p 426.

Lay C., Sutren M., Rochet V., Saunier K., Doré J., Rigottier-Gois L. Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota. *Environ Microbiol* **2005** ;7: 933-46.

Lee SY., Kim MT., Jee SH., Yang HP. Does long-term lactation protect premenopausal women against hypertension risk? A Korean Women's Cohort Study. *Prev Med* **2005** ; 41: 433-8.

Le Fournier-Chancerelle AC. L'allaitement maternel : Niveau de connaissances des mères et place du pharmacien d'officine dans sa poursuite en sortie de maternité. Thèse de doctorat en pharmacie, **2009**, P22.

Leyral G., Joffin JN. Microbiologie technique : 2 'Documentation technique'. 2ème Edition, Bordeaux : CRDP d'Aquitaine **1998** ; p 299.

Lécuyer E. Impact du microbiote sur la maturation du système immunitaire de l'hôte: analyse des fortes propriétés immunostimulantes de la bactérie segmentée filamenteuse . Thèse de doctorat , **2012**.p38.

Lilly DM., Stillwell, RH. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms." Science 1965; 147(3659): 747-748.

Lu L., Walker WA. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. American journal of clinical nutrition **2001**; 73: 1124–30.

Luckey TD. Introduction to intestinal microecology. Am J Clin Nutr **1972**; 25: 1292-4.

Ludwig W., Schleifer KH. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. FEMS Microbiol. Rev **1994**; 15: 155-173.

Ludwig W., Strunk O., Klugbauer S., Klugbauer N., Weizenegger M., Neumaier J., Bachleitner M., Schleifer KH. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. Electrophoresis **1998** ; 19: 554-568.

Lundequist B., Nord EC., Winberg J. The composition of the fecal microflora in breast-fed and bottle-fed infants from birth to eight weeks. Acta Paediatr Scand **1985** ; 74 : 45-51.

Luquet FM., Corrieu G. Bactéries lactiques et probiotiques .ed : techniques et documentations . Lavoisier Paris **2005**.

Macpherson AJ., Harris NL. Interaction between commensal intestinal bacteria and the immune system. Nat Rev Immunol 2004; 4 :478-85.

Macfarlane GT., Blackett KL., Nakayama T., Steed H., Macfarlane S. The gut microbiota in inflammatory bowel disease. Curr Pharm Des **2009** ; 15: 1528-1536.

Mackie RI., Sghir A., Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr **1999** ; 69:1035-1045.

Makino H., Kushiro A., Ishikawa E., Muylaert D., Kubota H., et al. Transmission of intestinal *Bifidobacterium longum subsp. longum* strains from mother to infant, determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism. Appl Environ Microbiol **2011** ; 77: 6788–6793.

Mai V., Draganov PV. Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. *World Journal of Gastroenterology* **2009**; 15: 81–5.

Mandar R., Mikelsaar M. Transmission of mother's microflora to the newborn at birth. *Biol Neonate* **1996** ; 69: 30-35.

Marchesi, JR., Dutilh, BE., Peters, WHM., Roelofs R., et al. Towards the human colorectal cancer microbiome. *PLoS One* **2011** ; 6.

Marieb, E. *Biologie humaine: principes d'anatomie et de physiologie.* Paris : Pearson Education 2006 ; 631 .

Marteau P. *Microbiote intestinal.* EMC Gastro-entérologie **2013**.

Marteau P., Pochart P., Bouhnik Y., Rambaud JC. The fate and effects of transiting, nonpathogenic microorganisms in the human intestine. *World Review of Nutrition and Dietetics, Intestinal Flora, Immunity, Nutrition and Health*, ed AP, **1993**; 1-21.

Martin R., Langa S., Reviriego C., Marañón ML., Fernández L., Xaus J., Rodríguez, J. M . Transferencia de bacterias lácticas del intestino de la madre al intestino del lactante a través de la leche materna. In *Actas del II Congreso Español de Lactancia Materna* **2002**, Sevilla.

Martin R., Langa S., Reviriego C., Jimenez E., Marin, ML., Xaus J., Fernandez L., Rodriguez JM. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr* **2003** ; 143(6) : 754–758.

Martin R., Olivares M., Marin ML., Fernandez L., Xaus J., et al. Probiotic potential of 3 Lactobacilli strains isolated from breast milk. *Jo[^] Hum Lact* **2005** ; 21:8–17.

Martin, R., et al. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res Microbiol* **2007** ; 158: 31–37 .

Martín R., Jiménez E., Heilig H., Fernandez L., Marin ML., Zoetendal EG., et al. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-DGGE and qRTi-PCR. *Appl Environ Microbiol* **2009** ; 75: 965-9.

Marques TM., Cryan JF., Shanahan F., Fitzgerald GF., Ross RP., Dinan TG., Stanton C. Gut microbiota modulation and implications for host health: Dietary strategies to influence the gut–brain axis. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2014** ; 239–247.

Marques TM., Wall R., Ross RP., Fitzgerald GF., Ryan CA., Stanton C. Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. *Curr Opin Biotechnol* **2010** ; 21 : 149–56.

Matamoros S., Gras-Leguen C., Le Vacon F., Potel, G., de La Cochetiere MF .Développement du microbiote intestinal chez le nourrisson et impact sur la santé.*Trends in Microbiology* **2013** ; 21(4) :167-173.

Mazmanian SK., Liu CH., Tzianabos AO., Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* **2005** ;122:107 – 18.

McLoughlin RM., Mills KH. Influence of gastrointestinal commensal bacteria on the immune responses that mediate allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* **2011**; 127: 1097-107.

Metchnikoff, E. The prolongation of life, William Heinemann, London, UK **1907**.

Michels KB., Willett WC., Rosner BA., Manson JE., Hunter DJ., Colditz GA. Prospective assessment of breastfeeding and breast cancer incidence among 89 887 women. *Lancet* **1996**; 347: 431-6.

Mitsou EK., Ekaterini K., Ioannis O., George L., Adamantini K. Fecal microflora of Greek healthy neonates. *Ecology/environmental microbiology* **2008**; 14: 94-101.

Mombelli B., Gismondo M. The use of probiotics in medical practice. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2000** ; 16(4): 531-536.

Moore WEC., Holdeman LV. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol* **1974** ; 27(5): 961-79.

Moore PB. The three-dimensional structure of the ribosome and its components. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct* **1998**; 27: 35-58.

Moro GE., Mosca F., Miniello V., et al. Effects of a new mixture of prebiotics on faecal flora and stools in term infants. *Acta Paediatr Suppl* **2003**; 91: 77–79.

Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* **2003**; 3 : 331 – 41.

Nakayama J., Kobayashi T., Tanaka S., Korenori Y., Tateyama A., Sakamoto N., Kiyohara C., Shirakawa T., Sonomoto K. Aberrant structures of fecal bacterial community in allergic infants profiled by 16S rRNA gene pyrosequencing. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011; 63: 397-406.

Neville MC. Anatomy and physiology of lactation. *Pediatr Clin North Am* **2001** ; 48:13-3 4.

Neville MC., Morton J., Umemora S. Lactogenesis. The transition from pregnancy to lactation. *Pediatr Clin North Am* **2001**; 48: 35- 52.

Neville MC. Physiology of human lactation. *Clin Perinatol* **1999** ; 26: 251–79.

Newburg DS . Neonatal protection by an innate immune system of human milk consisting of oligosaccharides and glycans. *J. Anim. Sci* **2009** ; 87 : 26–34.

Nicolas S. Impact du microbiote intestinal sur le développement des allergies. *Revue française d'allergologie* **2016**; 56 :133–134.

Noller HF., Woese CR. Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science* **1981**; 212:403-411.

Noller HF. Structure of ribosomal RNA. *Annu. Rev. Biochem* **1984**; 53:119-162.

Nougayrede JP., Homburg S., Taieb F., Boury M., Brzuszkiewicz E., Gottschalk G., et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* **2006** ; 313: 848-51.

Novogene. Genome Sequencing Company **2017**.

Oddy WH., Sly PD., De Klerk NH., Landau LI., Kendall GE., Holt PG., et al. Breastfeeding and respiratory morbidity in infancy on birth cohort study. *Arch Dis Child* **2003**; 88: 224-8.

O'Hara AM., Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* **2006**;7: 688–93.

Omenetti S., Pizarro TT. The Treg/Th17 axis: a dynamic balance regulated by the gut microbiome. *Front Immunol* **2015**; 6-639.

Ondov Brian D., Nicholas H., Bergman M. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC bioinformatics* **2011** ; 12(1) : 385.

Otsuka J., Terai G., Kakano T.Phylogeny of organisms investigated by base-pair changes in the stem regions of small and large ribosomal subunit RNAs. *J. Mol. Evol* **1999** ; 48:218-235.

Ottman N., Smidt H., de Vos WM., et al. The function of our microbiota : who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol* **2012**; 2:104.

Owen CG., Whincup PG., Gilg JA., Cook DG. Effect of breast feeding in infancy on blood pressure in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ* **2003**; 327:1189-92.

Oxoid 2007. www.oxoid.com

Pace NR., Stahl DA., Lane DJ., Olsen, GJ. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Am. Soc. Microbiol. News* **1985** ; 51: 4-12.

Palmer C., Bik EM., DiGiulio DB., Relman DA., Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota.*PLoS Biol* **2007**; 5(7) :177.

Patel S., Goyal A. Functional oligosaccharides : production, properties and applications. *World J Microbiol Biotechnol* **2011**; 27: 1119-1128.

Payre B. Identification de nouvelles cibles du Tamoxifène impliquées dans son activité pharmacologique. Thèse de doctorat, **2008**.p2.

Penders J, Stobberingh EE., Thijs C., Adams H., Vink C., van Ree R., van den Brandt PA. Molecular fingerprinting of the intestinal microbiota of infants in whom atopic eczema was or was not developing. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 36(**2006a**); 12: 1602-1608.

Penders J., Thijs C., Vink C., Stelma FF., Snijders B., Kummeling I., et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* (**2006b**) ;118: 511–21.

Perdigón G., Fuller R., Raya R. Lactic Acid Bacteria and their Effect on the Immune System. *Microbiol* **2001**; 2(1): 27-42.

Peterson DA., Frank DN., Pace NR., Gordon JI. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe* **2008**; 3: 417-427.

Petschow BW., Talbott RD., Batema RP. Ability of lactoferrin to promote the growth of *Bifidobacterium spp.* In vitro is independent of receptor binding capacity and iron saturation level. *J. Med. Microbiol* **1999**; 48: 541-549.

Picciano F. Representative values for constituents of human milk, *Pediatr clin north* **2001**; 48(1): 263.

Playne M., Salminen S. Health benefits of probiotics :human studies and clinical trials. *Nutrafoods* 2002 ; 1(1): 5-11.

Poroyko V., Morowitz M., Bell T., Ulanov A., Wang M., Donovan N., Bao S., Gu L., Hong JC., Alverdy J., Liu, DC. Diet creates metabolic niches in the "immature gut" that shape microbial communities. *Nutr Hosp* **2011**; 26:1283-95.

Prentice AM., Spaaij CJ., Goldberg GR., Poppitt SD., Van Raaij, JM., Totton M., et al. Energy requirements of pregnant and lactating women. *Eur J Clin Nutr* **1996** ; 50:82 – 110.

Qin J., Li R., Raes J., et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **2010** ; 464 : 59-65.

Quévrain E., Seksik P. Microbiote intestinal: de la diarrhée post-antibiotiques aux maladies inflammatoires intestinales. *Presse Med* **2013**; 42: 45–51.

Quigley EM. Prebiotics and probiotics: modifying and mining the microbiota. *Pharmacological Research* **2010** ; 61: 213–8.

Rajilic-Stojanovic M., Smidt H., De Vos WM. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ Microbiol* **2007** ; 9(9) : 2125–2136.

Rajilić-Stojanović M., Heilig HG., Tims S., Zoetendal EG., de Vos, WM. Longterm monitoring of the human intestinal microbiota composition. *Environ Microbiol* **2013** ;15 : 1146–1159.

Rambaud JC., Buts JP., Corthier G., Flourié B . Flore microbienne intestinale: physiologie et pathologie digestives. éd. John Libbey **2004** ; 21-46.

Rao AV., Bested AC., Beaulne TM., Katzman MA., Iorio, C., Berardi JM., et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of a probiotics in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. *Gut Pathog* **2009**; 1.

Reid G., Younes J., Van der Mei HC., Gloor GB., Knight R., Busscher HJ. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol* **2011** ; 9 : 27-38.

Ricour C., Ghisolfi J., Putet G., Goulet O. Le lait de femme. Eds. Traité de nutrition pédiatrique **1993**, Paris : Maloine , p 373.

Rigo J. Allaitement artificiel. Sortie de maternité et retour à domicile du nouveau-né **2011** ; 103-109.

Rigottier-Gois L., Meylheuc T. Microbiote intestinal , nouvel organe au potentiel extraordinaire. *INRA* **2013**.

Rigottier-Gois L., Bourhis AG., Gramet G., Rochet V., Doré J. Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *FEMS Microbiol Ecol* **2003** ;43:237-45.

Rigourda V., Aubrya S., Tasseaub A., Gobalakichenane P., Kieffer P., Assaf Z., Nicloux M., Magny J. Allaitement maternel: bénéfices pour la santé de l'enfant et de sa mère. *Journal de pédiatrie et de puériculture* **2013** ; 26 : 90-99.

Rigourd V., Aubry S., Tasseau A., Gobalakichenane P., Kieffer F., Assaf Z., Nicloux M., Magny JF. Allaitement maternel : bénéfices pour la santé de l'enfant et de sa mère. *Pédiatrie* **2011**.

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.

Romano-Bertranda S., Licznar-Fajardoa P., Parera S., Jumas-Bilaka, E. Impact de l'environnement sur les microbiotes : focus sur l'hospitalisation et les microbiotes cutanés et chirurgicaux. *Revue francophone des laboratoires* **2015** ; 469 .

Rossigno C., Marques-Diers F., Levy-Fortier A., Didierjean-Jouveau C., Turck D. Le guide de l'allaitement maternel (guide allaitement) **2009**.

Robin J., Rouchy A. Les probiotiques. Centre d'étude et de développement de la nutrithérapie **2011**.

Rofes C. Intérêts du microbiote intestinal et probiotiques. Thèse pour le diplôme d'état en docteur en pharmacie, **2014**, P20.

Rogers IS., Golding J., Emmett PM. The effects of lactation on the mother. *Early Hum Dev* **1997** ; 49 :191-203.

Ruemmele FM., Goulet O. Probiotiques et pathologies digestives de l'enfant. *Cah. Nutr. Diet* **2007**; 42:45–50.

Ruano G., Lewis ME., Kouri RE. Cycled primer extension: a method for DNA amplification and labelling from templates of unknown sequence. *Annal. Biochem* **1993**, 212,1-6.

Russo J. Development of the human breast. *Maturitas* 2004 ; 49: 2-15.

Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni DE., Prevost H., Kihal M.Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des regions arides.*J.Alg.Reg. Arides* 2002 ; 1 : 1-11.

Sanders ME., Akkermans LM., Haller D., Hammerman C., Heimbach J., Hörmannspurger G., Huys G., Levy DD., Lutgendorff F., Mack D., Phothirath P., Solano-Aguilar G., Vaughan E. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* **2010**; 1: 164 – 185.

Scardovi V., Sanders ME., Akkermans LM., Haller D., Hammerman C., Heimbach J., Hörmannspurger G., Huys G., Levy DD., Lutgendorff F., Mack D., Phothirath P. Genus *Bifidobacterium* Orla Jensen, 472 .In:*Bergey's Manuel of systematic Bacteriology*, IXe Edition.Williams and Wilkins **1996**.Baltimore.

Sarrio F. Alimentation De L'enfant De 0 à 3 Ans (2^{ème} édition). **2011**.

Schmitz J. Mesures diététiques de prévention de l'allergie alimentaire. In : Navarro J, Schmitz J eds. Allergies alimentaires. Paris : Doin **1993** ; 237-249.

Schneider MS. Probiotiques Dossier thématique Les aliments fonctionnels. Médecine des maladies Métaboliques **2008** ; 2 : 4.

Schneider M., Giudicelli S. Probiotiques et autres pathologies digestives : perspectives. Cah. Nutr. Diét **2007** ; 42 : 2.

Schumann A., Nutton S., Donnicola D., Comelli EM., Mansourian R., Cherbut C., Corthesy-Theulaz I., Garcia-Rodenas C . Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome. Physiol Genomics **2005**; 23: 235-45.

Schultz M., Gottl C., Young RJ., Iwen P., Vanderhoof JA. Administration of oral probiotic bacteria to pregnant women causes temporary infantile colonization. J .Pediatr Gastroenterol. Nutr **2004**; 38: 293–297.

Schwarz, E.B., Ray, R.M., Stuebe, A.M., Allison, M.A., Ness, R.B., Freiberg, M.S. (2009). Duration of lactation and risk factors for maternal cardiovascular disease. Obstet Gynecol , 113, 974-82.

Seirafi M., Cunningham, S., Hadengue A. Le microbiote dans les maladies du foie et du tube digestif : la révolution annoncée. Rev Med Suisse **2011** ; 7 : 1696-700.

Sekirov I., Russell SL., Caetano L., Antunes M., Finlay, BB. Gut microbiota in health and disease ». Physiological Reviews **2010**; 90 (3): 859-904.

Seksik P., Rigottier-Gois L., Gramet G., Sutren M., Pochart P., Marteau P., et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. Gut **2003** ; 52 : 237-42.

Seksik P. Le microbiote intestinal **2013**.

Sela DA., Mills DA. The marriage of nutrigenomics with the microbiome: the case of infant-associated bifidobacteria and milk. Am.J.Clin.Nutr **2014**; 99 (3): 697–703.

Sghir A., Gramet G., Suau A., Rochet V., Pochart P., Dore J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol* **2000**; 66: 2263-6.

Shanahan, F. The host–microbe interface within the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **2002** ;16: 915–31.

Sokol H., Seksik P., Furet JP., et al . Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* **2009** ; 15:1183-9.

Solano-Aguilar G., Vaughan E. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* **2010** ; 1 : 164 – 185.

Solís G., de los Reyes-Gavilan CG., Fernández N., Margolles A., Gueimonde M. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe* **2010** ;16: 307-310 .

Sommer F., Backhed F. The gut microbiota masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* **2013**; 11: 227-38.

Srikanth CV., McCormick BA. Interactions of the intestinal epithelium with the pathogen and the indigenous microbiota: a three-way crosstalk. *Interdiscip Perspect Infect Dis* **2008**; 626- 827.

Stark LP., Lee A. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J Med Microbiol* **1982** ; 15:189-203.

Stewart JA., Chadwick VS., Murray, A. Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria in the faecal microflora of children. *J Med Microbiol*, **2005** ; 54 : 1239-42.

Stéphane M., Schneider SG. Probiotiques et autres pathologies digestives : Perspectives. *Cah. Nutr. Diét* **2007** ; 42: 2.

Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* **1989**; 299: 1259-1260.

Stuebe AM., Rich-Edwards JW. The reset hypothesis: lactation and maternal metabolism. *Am J Perinatol* **2009** ; 26: 81-8.

Stuebe AM., Schwarz EB. The risks and benefits in infant feeding practices for women and their children. *J Perinatol* **2010** ; 30 :155-62.

Suau A., Bonnet R., Sutren M., et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* **1999** ; 65 : 4799-807.

Tackoen M. Le lait maternel : composition nutritionnelle et propriétés fonctionnelles. *Rev Med Brux* **2012** ; 33 : 309-17.

Tannock GW., Fuller R., Smith SL., Hall MA. Plasmid profiling of members of the family Enterobacteriaceae, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *Journal of Clinical Microbiology* **1990**; 28(6): 1225-1228.

Tham CSC., Peh KK., Bhat R., Liong MT. Probiotic properties of bifidobacteria and lactobacilli isolated from local dairy products. *Ann Microbiol* **2011** ; 62 : 1079 – 1087.

Thirion M. La physiologie de l'allaitement. 14_II_Chap, **2010** ; 1090.

Thompson-Chagoyan OC., Vieites JM., Maldonado J., Edwards C., Gil A. Changes in faecal microbiota of infants with cow's milk protein allergy--a Spanish prospective case-control 6-month follow-up study. *Pediatr Allergy Immunol* **2010**; 21: 394-400.

Thum C., Cookson AL., Otter DE., McNabb WC., Hodgkinson AJ., Dyer J., Roy NC. Can nutritional modulation of maternalintestinal microbiota influence the development of the infant gastrointestinal tract?. *J Nutr* **2012** ;142 :1921–8.

Tissier, H. Recherchers sur la Flor Intestinale Normale et Pathologique du Nourisson, Thèse, **1900**, University of Paris.

Tortora G., Derrickson, B. Principes d'anatomie et de physiologie. Edition du Renouveau Pédagogique , **2007**, Paris : De Boeck, XXX-1246 p.

Tounian P. Allaitement artificiel. Alimentation de l'enfant de 0 à 3 ans. **2011**.

Touraine P., Goffin V. Physiologie de la prolactine. *EMC-Endocrinologie* **2005** ; 2 :50–76.

Turcka D., Vidailhetb M., Bocquetc A., Bressond JL., Briende JP., Chouraquif D., Darmaung C., Dupontd ML., Freluth, JP., Girardeth, O., Gouletd, R., Hankardi ,

D., Rieu J., U. Allaitement maternel : les bénéfices pour la santé de l'enfant et de sa mère. Archives de Pédiatrie **2013** ; 20 : 29-48.

Turck D. Allaitement maternel, les bénéfices pour la santé de l'enfant et de sa mère. Arch Pediatr **2005** ; 12 : 145-165.

Turnbaugh PJ., Ley RE., Mahowald MA., Magrini V., Mardis ER., Gordon JI. An obesity associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature **2006**; 444:1027-31.

Urbaniak C., Cummins J., Brackstone M., Macklaim JM., Gloor GB., Baban CK., et al. Microbiota of human breast tissue. Appl Environ Microbiol **2014**; 80(10):3007 – 14.

Uyeno Y., Sekiguchi Y., Kamagata, Y. Impact of consumption of probiotic *Lactobacilli*-containing yogurt on microbial composition in human feces. Int J Food Microbiol **2008** ;122:16–22.

Vael C., Nelen V., Verhulst SL., Goossens H., Desager KN. Early intestinal *Bacteroides fragilis* colonisation and development of asthma. BMC Pulm Med **2008**; 8: 19.

Vael C., Desager K. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. Curr Opin Pediatr **2009**; 21:794–800.

Van de Merwe JP., Stegeman JH. Hazenberg MP. The resident faecal flora is determined by genetic characteristics of the host. Implications for Crohn's disease? Antonie Van Leeuwenhoek **1983**; 49: 119-24.

Wang L., Christophersen CT., Sorich MJ., Gerber JP., Angley MT., Conlon MA. Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium spp.* In feces of children with autism. Appl Environ Micro **2011** ;77: 6718-21.

Watanabe S., Narisawa Y., Arase S., Okamatsu H., Ikenaga T., Tajiri Y., Kumemura M. Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. J Allergy Clin Immunol **2003**;111: 587-91.

Weissenbach J., Gyapay G., Dib C., Vignal A., Morissette J., Millasseau P., Vaysseix G., Lathrop M. A second-generation linkage map of the human genome. Nature **1992** ;359: 794-801.

West PA., Hewitt JH., Murphy OM. The influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. *J. Appl. Bacteriol* **1979**; 46: 269–277.

Wheeler WC., Honeycutt RL. Paired sequence difference in ribosomal RNAs: evolutionary and phylogenetic implications. *Molecular Biology and Evolution* **1988**; 8: 90-96.

WHO. Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Geneva: WHO Technical Report Series **1985**; 724.

WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria a joint FAO/WHO expert consultation. **2001**.

WHO. Infant and young child feeding: model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals. World Health Organization Library **2009**.

Villegas R., Gao YT., Yang G., Li HL., Elasy T., Zheng W. Duration of breast-feeding and the incidence of type 2 diabetes mellitus in the Shanghai Women's Health Study. *Diabetologia* **2008** ; 51: 258-66.

Wiegering V., Kaiser J., Tappe D., Weissbrich B., Morbach H., Girschick HJ. Gastroenteritis in childhood: a retrospective study of 650 hospitalized pediatric patients. *Int .J.Infect. Dis* **2011**; 15: 401 – 407.

Williams BL., Horing M., Parekh T., Lipkin WI. 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* **2012**; 3.

Woese CR., Fox GH., Zablen L., Uchida T., Bonen L., Pechman K., Lewis BJ., Stah D. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature* **1975**; 254: 83-86.

Wolff J., McLean Heitkemper M. Troubles d'ingestion, de digestion, d'absorption et d'élimination. *Système gastro-intestinal* **2011** ; 53 : 253-287.

World Gastroenterology Organisation. Probiotiques et prébiotiques. **2008**.

Xu J., Mahowald MA., Ley RE., et al. Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS Biol* **2007** ; 5: 156.

Zhang MM., Cheng JQ., Xia L., Lu YR., Wu XT. Monitoring intestinal microbiota profile: a promising method for the ultra early detection of colorectal cancer. *Medical Hypotheses* **2011**;76(5) : 670-672.

Zoetendal EG., Akkermans AD., De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* **1998** ; 64 : 3854–3859.

Zoetendal EG., Akkermans ADL., Vliet WMA., Visser JAGM., Vos WM. The Host Genotype Affects The Bacterial Community in the Human Gastrointestinal Tract. *Microbial Ecology in Health and Disease* **2001**; 13:129-134.

Tableau d'identification :(API 50 CHL)

[illegible]

Tableau d'identification :(API 20 STREP)

API 20 STREP V6.0	VP	HIP	ESC	PYRA	AGAL	BGUR	BGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG	HEM
<i>Aerococcus viridans 1</i>	13	50	96	54	33	16	37	1	5	1	83	33	85	70	83	99	33	41	70	33	1
<i>Aerococcus viridans 2</i>	15	70	50	76	10	20	25	1	5	5	25	1	35	2	70	89	1	5	24	1	5
<i>Aerococcus viridans 3</i>	22	88	99	40	85	48	14	14	1	1	8	2	82	5	91	99	37	99	14	1	1
<i>Alloiococcus otitis</i>	0	25	0	100	0	3	100	1	90	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus avium</i>	99	60	99	94	15	0	24	1	99	0	99	40	100	95	95	99	1	40	15	0	1
<i>Enterococcus durans</i>	100	43	100	97	32	2	76	0	91	100	99	15	2	0	84	76	0	0	56	0	18
<i>Enterococcus faecalis</i>	99	46	99	97	1	0	21	4	99	94	98	0	98	92	92	100	0	0	96	2	1
<i>Enterococcus faecium</i>	94	43	99	95	42	1	90	3	97	93	85	70	78	18	84	98	26	9	73	3	1
<i>Enterococcus gallinarum</i>	99	99	100	100	95	45	99	0	99	99	99	100	99	1	100	100	99	99	83	20	0
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0	95	0	0	0	1	53	0	99	0	46	6	1	0	1	0	0	0	73	53	0
<i>Gemella haemolysans</i>	25	0	0	70	0	0	1	84	40	1	1	0	20	10	5	2	0	0	10	5	1
<i>Gemella morbillorum</i>	3	0	0	35	0	0	10	35	86	4	5	0	1	0	1	11	3	1	16	5	0
<i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i>	98	15	41	1	13	0	41	4	89	0	27	0	17	0	96	30	0	20	25	0	0
<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	90	40	99	35	3	0	35	3	96	95	95	15	45	1	72	87	4	5	90	3	1
<i>Leuconostoc spp</i>	91	1	60	5	55	0	65	2	70	10	37	35	29	4	35	65	0	42	11	0	0
<i>Listeria spp</i>	97	79	98	0	0	0	0	0	85	0	6	0	0	0	49	92	1	1	72	0	26
<i>Abiotrophia adiacens</i>	0	0	10	80	0	25	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Abiotrophia defectiva</i>	25	0	15	99	100	0	100	0	92	0	0	0	0	0	99	100	5	93	99	0	0
<i>Streptococcus acidominimus</i>	1	95	4	13	1	66	30	60	96	18	17	0	42	10	70	65	0	0	10	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	100	99	1	1	4	79	1	96	99	99	98	0	1	1	50	87	0	1	35	4	75
<i>Streptococcus anginosus</i>	100	0	100	0	44	0	1	99	100	100	0	0	33	0	99	88	0	44	97	0	37
<i>Streptococcus bovis I</i>	97	2	100	2	71	4	14	0	97	0	2	13	86	0	100	90	63	90	100	90	0
<i>Streptococcus bovis II 1</i>	95	4	97	1	86	1	17	0	100	1	0	14	0	0	93	30	61	99	73	65	0
<i>Streptococcus bovis II 2</i>	86	4	100	13	85	88	94	0	100	13	0	1	0	0	99	99	13	72	40	13	0
<i>Streptococcus canis</i>	0	1	25	4	95	1	80	100	100	100	100	0	0	0	99	1	0	1	99	0	100
<i>Streptococcus constellatus</i>	100	1	27	0	0	0	5	99	100	100	0	0	0	0	10	72	0	0	12	0	61
<i>Streptococcus dys.ssp dysgalactiae</i>	0	0	1	1	1	99	0	100	99	100	99	0	1	50	86	100	0	1	99	30	2
<i>Streptococcus dys.ssp equisimilis</i>	0	1	25	1	1	99	1	99	100	97	97	1	1	1	45	99	0	1	98	40	94
<i>Streptococcus equi ssp equi</i>	1	0	1	0	0	100	0	100	100	100	0	0	0	0	0	1	0	0	100	100	100
<i>Streptococcus equi ssp zooepidemicus</i>	0	1	15	0	0	100	1	99	100	99	85	0	0	99	100	0	0	0	99	99	99
<i>Streptococcus equinus</i>	100	0	95	0	28	0	1	1	100	0	0	0	30	0	25	7	25	15	17	10	0
<i>Streptococcus group L</i>	0	75	1	0	0	100	1	100	100	100	100	0	0	0	75	100	0	0	100	98	94
<i>Streptococcus intermedius</i>	100	0	87	0	0	0	44	99	100	100	0	0	0	0	99	99	3	3	99	0	40
<i>Streptococcus mitis 1</i>	1	0	3	1	21	0	25	35	99	19	14	1	0	1	94	7	3	26	67	5	0
<i>Streptococcus mitis 2</i>	0	0	3	0	31	0	35	50	100	99	1	0	1	0	100	1	1	31	84	0	0
<i>Streptococcus mutans</i>	99	0	99	1	64	0	1	1	100	18	0	0	99	90	90	100	81	81	1	0	1
<i>Streptococcus oralis</i>	0	0	1	1	50	0	46	72	100	5	1	0	1	0	99	32	1	72	96	0	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0	0	39	60	70	3	79	3	100	57	3	0	0	0	99	98	64	87	84	10	1
<i>Streptococcus porcinus</i>	100	5	99	1	19	99	1	97	97	100	98	0	88	88	83	99	0	0	50	0	100
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	1	5	98	0	15	0	100	100	99	0	0	8	1	99	98	0	1	61	22	98
<i>Streptococcus salivarius ssp salivarius</i>	85	0	98	1	8	0	70	20	100	0	0	0	5	1	86	67	34	88	74	1	1
<i>Streptococcus sanguis</i>	0	1	42	0	63	0	1	5	100	90	0	0	1	48	83	98	33	55	67	0	0
<i>Streptococcus suis I</i>	0	1	82	53	80	94	76	1	100	91	0	0	7	0	94	100	75	0	100	89	0
<i>Streptococcus suis II</i>	0	1	70	41	91	91	52	3	100	95	0	0	3	1	99	98	63	93	99	96	2
<i>Streptococcus uberis</i>	99	98	100	35	10	86	5	30	100	98	99	0	99	98	99	100	89	10	50	20	0

Tableau d'identification :(API STAPH)

API STAPH V4.0	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	100	100	95	96	88	91	80	0	0	83	97	78	1	0	97	2	90	80	80	0
<i>Staphylococcus auricularis</i>	0	100	99	36	72	10	90	9	0	0	81	0	1	0	0	40	0	15	90	1	0
<i>Staphylococcus capitis</i>	0	100	99	80	43	22	2	36	0	0	86	23	90	0	0	50	0	1	85	35	0
<i>Staphylococcus caprae</i>	0	100	99	70	10	75	74	10	0	0	99	95	99	0	0	0	0	1	99	60	0
<i>Staphylococcus carnosus</i>	0	100	100	99	0	99	99	99	0	0	99	83	83	0	0	0	0	100	100	0	0
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	0	100	100	99	79	100	100	13	0	0	96	96	1	0	1	100	0	31	89	95	0
<i>Staphylococcus cohnii ssp cohnii</i>	0	100	99	66	99	2	97	88	33	0	21	66	94	0	0	2	0	9	2	1	0
<i>Staph. cohnii ssp urealyticum</i>	0	100	100	99	98	98	100	94	64	0	1	94	87	0	0	0	0	98	0	99	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	100	99	70	99	81	2	0	0	1	80	84	68	1	0	97	4	18	73	88	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	99	75	5	99	80	91	60	0	1	78	3	57	0	0	98	13	83	85	1	0
<i>Staphylococcus hominis</i>	0	98	94	41	97	50	86	28	0	1	82	27	70	1	0	97	4	50	43	84	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>	0	100	99	99	0	87	99	0	0	0	90	90	15	0	0	99	2	93	100	68	0
<i>Staphylococcus lentus</i>	0	100	100	100	100	100	100	100	7	99	92	21	57	100	100	100	28	100	0	1	0
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	100	89	88	99	66	99	0	0	0	99	16	99	0	0	100	0	90	1	50	0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0	100	99	2	97	90	99	88	22	0	35	14	79	1	0	96	1	70	30	65	0
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	0	100	80	100	0	1	71	0	0	0	99	97	99	0	0	0	0	94	99	0	0
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0	99	99	99	99	70	93	98	0	0	83	67	30	0	16	95	7	68	0	0	0
<i>Staphylococcus simulans</i>	0	100	100	57	11	95	92	73	4	0	83	27	38	0	4	97	2	90	97	84	0
<i>Staphylococcus warneri</i>	0	99	99	50	98	19	96	70	0	0	23	16	90	0	0	99	0	6	77	97	0
<i>Staphylococcus xylosum</i>	0	100	100	92	81	85	95	90	30	9	82	75	67	11	82	87	10	80	5	90	0
<i>Kocuria kristinae</i>	0	99	96	99	90	9	84	3	0	0	6	3	93	0	0	90	12	0	0	0	97
<i>Kocuria varians/rosea</i>	0	91	92	8	1	1	8	1	0	0	75	4	8	4	8	4	0	1	1	29	95
<i>Micrococcus spp</i>	0	2	4	0	1	0	1	0	0	0	8	15	1	0	0	1	0	1	11	11	91

Tampon au CTAB

CTAB

1,4 M NaCl

0,1 M Tris-HCl

20 mM Na₂EDTA 1

Ajoutez 100 ml d'eau déionisée.

- Ajustez le pH à 8,0 en ajoutant 1M NaOH.
- Complétez pour obtenir 200 ml et stérilisez.
- Conservez le tampon à 4°C pendant maximum 6 mois.

ANNEXE N°2

Taux de bactéries dans les échantillons de lait maternel et de fèces de nouveau-nés (1^{er} Jour)

Statistiques de groupe

Échantillons	N	Moyenne	Ecart-type	Erreur standard moyenne
<i>Staphylocoques</i> lait	5	1,5520	,89077	,39836
	5	1,4720	1,48131	,66246
<i>Escherichia</i> lait	5	,0000	,00000	,00000
	5	2,1500	1,40207	,62702
<i>Bifidobacterium</i> lait	5	1,8080	,17712	,07921
	5	1,8240	1,70136	,76087
<i>Lactobacillus</i> lait	5	1,6720	1,65891	,74189
	5	2,2680	1,38155	,61785
<i>Streptococcus et Enterococcus</i> lait	5	3,2920	,25936	,11599
	5	3,2440	,42969	,19216
<i>Streptococcus à 42°C</i> lait	5	2,5200	1,49474	,66847
	5	,4640	1,03754	,46400

Test d'échantillons

		Test de Levene sur l'égalité des variances		Test-t pour égalité des moyennes						
		F	Sig.	t	ddl	Sig. (bilatérale)	Différence moyenne	Différence écart-type	Intervalle de confiance 95% de la différence	
									Inférieure	Supérieure
<i>Staphylocoques</i>	Hypothèse de variances égales	2,006	,194	,103	8	,920	,08000	,77301	-1,70257	1,86257
	Hypothèse de variances inégales			,103	6,558	,921	,08000	,77301	-1,77314	1,93314
<i>Escherichia</i>	Hypothèse de variances égales	9,032	,017	-3,429	8	,009	-2,15000	,62702	-3,59592	-,70408
	Hypothèse de variances inégales			-3,429	4,000	,027	-2,15000	,62702	-3,89090	-,40910
<i>Bifidobacterium</i>	Hypothèse de variances égales	36,307	,000	-,021	8	,984	-,01600	,76498	-1,78006	1,74806
	Hypothèse de variances inégales			-,021	4,087	,984	-,01600	,76498	-2,12228	2,09028
<i>Lactobacillus</i>	Hypothèse de variances égales	,657	,441	-,617	8	,554	-,59600	,96547	-2,82237	1,63037
	Hypothèse de variances inégales			-,617	7,746	,555	-,59600	,96547	-2,83512	1,64312
<i>Streptococcus et Enterococcus</i>	Hypothèse de variances égales	,824	,391	,214	8	,836	,04800	,22445	-,46959	,56559
	Hypothèse de variances inégales			,214	6,573	,837	,04800	,22445	-,48982	,58582
<i>Streptococcus à 42°C</i>	Hypothèse de variances égales	,361	,565	2,527	8	,035	2,05600	,81372	,17955	3,93245
	Hypothèse de variances inégales			2,527	7,128	,039	2,05600	,81372	,13885	3,97315

Taux de bactéries dans les échantillons de lait maternel et de fèces de nouveau-nés (7^{ème} jour)

Statistiques de groupe

Échantillons	N	Moyenne	Ecart-type	Erreur standard moyenne
<i>Staphylocoques</i>	lait	5	2,0780	,82454
	selle	5	2,7680	,60106
<i>Escherichia</i>	lait	5	,0000	,00000
	selle	5	3,6060	,23954
<i>Bifidobacterium</i>	lait	5	1,7060	,36774
	selle	5	3,8560	,47157
<i>Lactobacillus</i>	lait	5	2,9560	,25609
	selle	5	4,0200	,40478
<i>Streptococcus et Enterococcus</i>	lait	5	3,0600	,55412
	selle	5	3,7940	,39646

Test d'échantillons

	Test de Levene sur l'égalité des variances		Test-t pour égalité des moyennes						
	F	Sig.	t	ddl	Sig. (bilatérale)	Différence moyenne	Différence écart-type	Intervalle de confiance 95% de la différence	
								Inférieure	Supérieure
<i>Staphylocoques</i>	1,058	,334	-1,512	8	,169	-,69000	,45632	-1,74228	,36228
			-1,512	7,315	,172	-,69000	,45632	-1,75968	,37968
<i>Escherichia</i>	11,623	,009	-33,661	8	,000	-3,60600	,10713	-3,85303	-3,35897
			-33,661	4,000	,000	-3,60600	,10713	-3,90343	-3,30857
<i>Bifidobacterium</i>	2,000	,195	-8,039	8	,000	-2,15000	,26744	-2,76671	-1,53329
			-8,039	7,552	,000	-2,15000	,26744	-2,77314	-1,52686
<i>Lactobacillus</i>	,306	,595	-4,967	8	,001	-1,06400	,21421	-1,55797	-,57003
			-4,967	6,760	,002	-1,06400	,21421	-1,57420	-,55380
<i>Streptococcus et Enterococcus</i>	1,144	,316	-2,409	8	,043	-,73400	,30471	-1,43665	-,03135
			-2,409	7,245	,046	-,73400	,30471	-1,44961	-,01839

Taux de bactéries dans les échantillons de lait maternel et de fèces de nouveau-nés (30^{ème} jour)

Statistiques de groupe

Échantillons	N	Moyenne	Ecart-type	Erreur standard moyenne
<i>Streptococcus et Enterococcus</i> lait	5	3,0240	,36706	,16415
<i>Streptococcus et Enterococcus</i> selle	5	3,7840	,32562	,14562
<i>Lactobacillus</i> lait	5	2,8700	1,60515	,71784
<i>Lactobacillus</i> selle	5	3,7540	,33291	,14888
<i>Bifidobacterium</i> lait	5	2,7180	1,52438	,68172
<i>Bifidobacterium</i> selle	5	3,8780	,52122	,23310
<i>Staphylocoques</i> lait	5	1,7400	,24829	,11104
<i>Staphylocoques</i> selle	5	2,9800	,71207	,31845
<i>Escherichia</i> lait	5	,0000	,00000	,00000
<i>Escherichia</i> selle	5	3,8680	,30898	,13818

Test d'échantillons

		Test de Levene sur l'égalité des variances		Test-t pour égalité des moyennes						
		F	Sig.	t	ddl	Sig. (bilatérale)	Différence moyenne	Différence écart-type	Intervalle de confiance 95% de la différence	
									Inférieure	Supérieure
<i>Streptococcus et Enterococcus</i>	Hypothèse de variances égales	,254	,628	-3,463	8	,009	-,76000	,21944	-1,26602	-,25398
	Hypothèse de variances inégales			-3,463	7,888	,009	-,76000	,21944	-1,26727	-,25273
<i>Lactobacillus</i>	Hypothèse de variances égales	4,436	,068	-1,206	8	,262	-,88400	,73312	-2,57458	,80658
	Hypothèse de variances inégales			-1,206	4,343	,289	-,88400	,73312	-2,85753	1,08953
<i>Bifidobacterium</i>	Hypothèse de variances égales	2,491	,153	-1,610	8	,146	-1,16000	,72047	-2,82141	,50141
	Hypothèse de variances inégales			-1,610	4,923	,169	-1,16000	,72047	-3,02081	,70081
<i>Staphylocoques</i>	Hypothèse de variances égales	3,063	,118	-3,677	8	,006	-1,24000	,33725	-2,01771	-,46229
	Hypothèse de variances inégales			-3,677	4,959	,015	-1,24000	,33725	-2,10912	-,37088
<i>Escherichia</i>	Hypothèse de variances égales	48,378	,000	-27,992	8	,000	-3,86800	,13818	-4,18665	-3,54935
	Hypothèse de variances inégales			-27,992	4,000	,000	-3,86800	,13818	-4,25165	-3,48435

Taux de bactéries dans les échantillons de lait maternel et de fèces de nouveau-nés (90^{ème} jour).

Statistiques de groupe

Échantillons		N	Moyenne	Ecart-type	Erreur standard moyenne
<i>Escherichia</i>	lait	5	,0000	,00000	,00000
	selle	5	4,2540	,36212	,16194
<i>Staphylocoques</i>	lait	5	1,3760	,55976	,25033
	selle	5	3,3400	,35756	,15991
<i>Streptococcus et Enterococcus</i>	lait	5	3,0840	,48675	,21768
	selle	5	3,8280	,10710	,04790
<i>Lactobacillus</i>	lait	5	2,0580	1,88229	,84179
	selle	5	3,9100	,33630	,15040
<i>Bifidobacterium</i>	lait	5	2,5160	1,41687	,63365
	selle	5	4,0700	,27046	,12095
<i>Levures et Moisissures</i>	lait	5	,0000	,00000	,00000
	selle	5	1,3340	,78258	,34998

Test d'échantillons

		Test de Levene sur l'égalité des variances		Test-t pour égalité des moyennes						
		F	Sig.	t	ddl	Sig. (bilatérale)	Différence moyenne	Différence écart-type	Intervalle de confiance 95% de la différence	
									Inférieure	Supérieure
<i>Escherichia</i>	Hypothèse de variances égales	19,626	,002	-26,268	8	,000	-4,25400	,16194	-4,62744	-3,88056
	Hypothèse de variances inégales			-26,268	4,000	,000	-4,25400	,16194	-4,70363	-3,80437
<i>Staphylocoques</i>	Hypothèse de variances égales	1,066	,332	-6,612	8	,000	-1,96400	,29705	-2,64899	-1,27901
	Hypothèse de variances inégales			-6,612	6,798	,000	-1,96400	,29705	-2,67065	-1,25735
<i>Streptococcus et Enterococcus</i>	Hypothèse de variances égales	3,376	,103	-3,338	8	,010	-,74400	,22289	-1,25799	-,23001
	Hypothèse de variances inégales			-3,338	4,386	,025	-,74400	,22289	-1,34193	-,14607
<i>Lactobacillus</i>	Hypothèse de variances égales	52,422	,000	-2,166	8	,062	-1,85200	,85512	-3,82390	,11990
	Hypothèse de variances inégales			-2,166	4,255	,092	-1,85200	,85512	-4,17109	,46709
<i>Bifidobacterium</i>	Hypothèse de variances égales	4,347	,071	-2,409	8	,043	-1,55400	,64509	-3,04157	-,06643
	Hypothèse de variances inégales			-2,409	4,291	,069	-1,55400	,64509	-3,29813	,19013
<i>Levures et Moisissures</i>	Hypothèse de variances égales	5,630	,045	-3,812	8	,005	-1,33400	,34998	-2,14106	-,52694
	Hypothèse de variances inégales			-3,812	4,000	,019	-1,33400	,34998	-2,30570	-,36230