



République Algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Larbi Tébessi- Tébessa-

**Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et
de la Vie**



Département : Biologie Appliquée

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de MASTER

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

LE MICROBIOTE INTÉSTINAL, LES PROBIOTIQUES ET LEUR PLACE DANS LES PATHOLOGIES DIGESTIVES

Présenté par :

ATMANIA Wiem

KHELIF Loubna

ZARAI Sahar

Date de soutenance : 09/ 06 / 2021

Membres de jury :

Dr. BOUKOUCHA Mourad

MCA Univ. Tébessa

Président

Dr. BENHADJ Mabrouka

MCA Univ. Tébessa

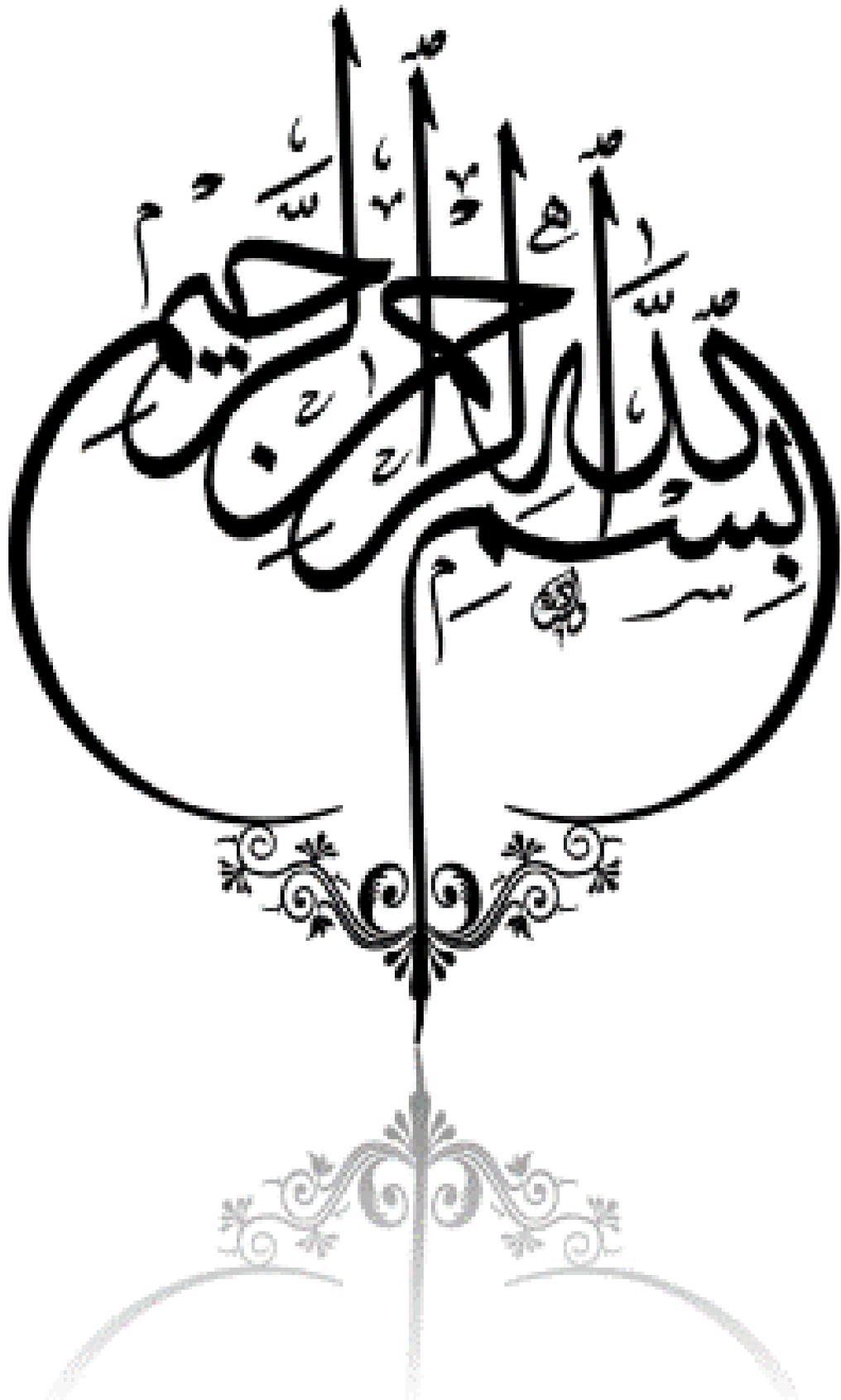
Examinatrice

Dr. MENASRIA Taha

MCB Univ. Tébessa

Rapporteur

Année universitaire : 2020 / 2021



REMERCIEMENT

On remercie, en premier lieu, ALLAH pour nous avoir donnée la force et la résolution pour réaliser ce travail.

Nous avons le grand honneur et le profond respect de remercier sa haute bienveillance notre encadreur Dr. MENASRIA TAHA qui a fait tout son possible pour nous orienter et nous a guidé afin de réaliser ce mémoire avec compétence, pour tous les conseils précieux qu'il nous a prodigué, pour sa confiance et sa compréhension. Veuillez accepter nos vifs remerciements pour la présence et la sympathie dont vous avez fait preuve.

Nos remerciements sont adressés au, Dr BOUKOUCHA MOURAD Pour l'intérêt qu'il avait bien voulu porter à ce travail, pour son aide et pour avoir fait l'honneur de présider ce jury. Ainsi qu'à Dr. BENHADJ MABROUKA, Maître de Conférence à l'Université de Tébessa, d'avoir accepté de juger ce travail.

A Dr. MECHAI ABDELBASSET, Professeur à l'Université de Tébessa, pour l'encouragement et conseil

ملخص

تلعب الجراثيم البشرية و الأمعاء دوراً أساسياً في الحفاظ على الجسم ، وهناك العديد من العوامل التي يمكن أن تجعلها غير متوازنة. يمكن أن تشكل هذه المجموعة مكانة بيئية غنية ومهمة لفحص سلالات حمض اللاكتيك بخصائص جديدة. تم إجراء دراسة لإعطاء نظرة شاملة للتنوع البكتيري المحلي الإجمالي ، والجراثيم المعوية عند الأطفال حديثي الولادة ، وحليب الثدي الأول (اللبأ) في منطقة تبسة (شرق الجزائر) وكذلك لعزل بكتيريا حمض اللاكتيك. مع إمكانات البروبيوتيك. تم تحليل خمسة عشرة عينة وتم الإبلاغ عن ملامح جرثومية متغيرة ($p < 0.0001$) من 3.56 ± 0.57 إلى $4.52 \pm \log \text{CFU}0.73$ لبأ وبراز الأطفال ، على التوالي. تم عزل واختيار ستة وثلاثين (36) بكتيريا حمض اللاكتيك بناء على المعايير المظهرية. كشف الفحص الأولي لنشاط المضاد ضد البكتيريا ذات المؤشر الموجب للجرام وسالب الجرام (*Staphylococcus aureus* و *Listeria sp* و *Bacillus B. subtilis* و *Escherichia coli* و *S. epidermidis* و *Staphylococcus cereus*).

أظهر تعرض اثني عشر سلالة. من العزلات أظهرت نشاطاً واحداً على الأقل كمضاد للبكتيريا) 58.33% ، 21 = العدد (أن محتملة من حمض اللاكتيك لمختلف اختبارات اختيار الكائنات الحية المجهرية مقاومة ملحوظة لظروف المعدة والأمعاء ، بالإضافة إلى الملوحة ودرجة الحموضة. في الواقع ، لوحظت قدرات لاصقة كبيرة (كره الماء ، والتجميع الذاتي والتجميع المشترك) لغالبية السلالات التي تم اختبارها. ومن المثير للاهتمام أن طاف اللاكتيك المعقم أدى إلى تثبيط تكوين الأغشية الحيوية على سطح غير حيوي من الإشريكية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية والبكتيريا العصوية والليستيريا. أشار تقييم ملاءمة التكنولوجيا الحيوية إلى أن جميع السلالات أظهرت قدرة تحمضية وتحلل بروتيني. تدعم هذه النتائج الاستخدام الفعال للبروبيوتيك كمضادات جرثومية بديلة للقضاء على الأغشية الحيوية التي تشكلها مسببات الأمراض والمفهوم - قد يؤدي تعزيز فوائد البروبيوتيك إلى توسيع نطاق التطبيق على صحة الإنسان.

الكلمات المفتاحية. الرضع ، ميكروبيوتا الأمعاء ، مادة البراز ، بكتيريا حمض اللاكتيك ، كارهة للماء ، مضاد حيوي ، بروبيوتيك.

Résumé

Les microbiotes humains et intestinaux jouent un rôle fondamental dans le maintien de l'organisme et de nombreux facteurs peuvent toutefois les déséquilibrer. Cette flore peut constituer une niche écologique riche et importante pour le criblage des souches lactiques avec de nouvelles propriétés. Une étude a été menée afin de donner une vision globale de la charge bactérienne autochtone totale, du microbiote intestinal chez les nouveaux nés, et le premier lait maternel (colostrum) originaire de la région de Tébessa (Est d'Algérie) et aussi d'isoler des bactéries lactiques à potentiel probiotique. Quinze échantillons ont été analysés et des profils microbiens élevés et variable ($p < 0.0001$) ont été signalés de (3.56 ± 0.57 à $4.52 \pm 0.73 \log \text{ UFC/ml}$) et (5.44 ± 2.17 à $6.11 \pm 2.12 \log \text{ UFC/g}$) pour le colostrum et les matières fécales de nouveau né, respectivement. Un total de trente-six (36) isolats lactiques ont été isolés et sélectionnés sur la base des critères phénotypiques. Le screening primaire de l'activité antagoniste vis-à-vis de bactéries indicatrices à Gram positif et à Gram négatif (*Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Listeria* sp., *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* et *Salmonella enterica*) a révélé que ($n=21$, 58,33 %) des isolats ont présenté au moins une activité antibactérienne. L'exposition de douze souches lactiques potentielles aux différents tests de sélection à pouvoir probiotique a montré une résistance remarquable aux conditions gastriques et intestinales simulées, ainsi à la salinité et au pH. En effet, des capacités adhésives considérables (hydrophobicité, auto-agrégation et co-agrégation) ont été notées pour la majorité des souches testées. Fait intéressant, des surnageants lactiques stériles ont entraîné une inhibition de la formation des biofilms sur une surface abiotique d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, et *Listeria*. L'évaluation des aptitudes biotechnologiques ont indiqué que l'ensemble des souches ont présenté un pouvoir acidifiant et protéolytique important. Ces résultats soutiennent l'utilisation efficace des probiotiques comme antimicrobiens alternatives pour éradiquer les biofilms formés par les pathogènes et le concept – potentialiser les bienfaits des probiotiques peut servir à élargir davantage l'application à la santé humaine.

Mots clés. Nourisson, Microbiote intestinale, Colostrum, Matière fécale, Bactérie lactique, Hydrophobicité, Auto-agrégation, Probiotique .

Abstract

The human and intestinal microbiota play a fundamental role in the maintenance of the body and many factors that can throw it off balance. This flora constitute a rich and important ecological niche for the screening of lactic acid strains with new properties. A study was carried out to give a global vision of the total indigenous microbial load, of the intestinal microbiota in newborns, and the first breast milk (colostrum) originating from Tebessa (East of Algeria) and also, to isolate lactic acid bacteria with potential probiotic characteristics. Fifteen samples were analyzed and high and variable microbial profiles ($p < 0.0001$) were reported from (3.56 ± 0.57 to $4.52 \pm 0.73 \log \text{CFU} / \text{ml}$) and (5.44 ± 2.17 to $6.11 \pm 2.12 \log \text{UFC} / \text{g}$) for colostrum and infant feces, respectively. Thirty-six (36) lactic acid bacteria were isolated and selected based on the phenotypic criteria. Primary screening for antagonist activity against Gram-positive and Gram-negative indicator bacteria (*Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Listeria* sp., *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*) revealed that (n=21, 58.33%) of the isolates exhibited at least one antibacterial activity. Exposure of twelve potential lactic acid strains to various probiotic selection tests showed a remarkable resistance to simulated gastric and intestinal conditions, as well as to salinity and pH. Indeed, considerable adhesive capacities (hydrophobicity, auto-aggregation and co-aggregation) were noted for the majority of the strains tested. Interestingly, sterile lactic supernatants resulted in inhibition of biofilm formation on an abiotic surface of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, and *Listeria* sp. The biotechnological suitability assessment indicated that all the strains exhibited significant acidifying and proteolytic power. These findings support the effective use of probiotics as alternative antimicrobials to eradicate biofilms formed by pathogens and the concept - potentiating the benefits of probiotics may serve to broaden the application to human health.

Keywords. Infant, Gut microbiota, Colostrum, Faecal matter, Lactic acid bacteria, hydrophobicity, auto-aggregation, Probiotic.

Liste des Tableaux

Tableau	Titre	Page
01	Principales espèces microbiennes utilisées comme probiotiques	26
02	Les différents critères de sélection des probiotiques	28,29
03	Aspect et caractéristiques des échantillons de colostrum	56
04	Aspect et caractéristiques des échantillons de la matière fécale	57
05	Variation de la charge bactérienne moyenne (LogUFC) du colostrum et la matière fécale en fonction de temps d'incubation et le milieu de culture utilisé	58
06	ANOVAs testant l'effet des variables [Nature de l'échantillon analysé (Colostrum, matière fécale), les milieux de culture utilisés (PCA, MRS, M17) et le temps d'incubation] sur la variation de la charge bactérienne.	60
07	Caractéristiques phénotypique (macro-et microscopiques) des isolats lactiques.	64,65,66,67
08	Résultats de l'analyse des caractères de surface cellulaire des souches lactiques	76
09	Résultat de l'antibiogramme (Test de sensibilité aux antibiotiques) des souches lactiques sélectionnées	82
10	Résultats des activités enzymatiques testées chez les bactéries Lactiques	85

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Diverses méthodes d'identification et d'étude du microbiote	08
02	Variation de la composition du microbiome humain dans le tractus gastro-Intestinal	12
03	Profil d'établissement du microbiote au cours des premiers jours de vie d'un enfant né à terme, par voie basse et allaité	13
04	(A) La localisation et l'organisation spatiale du microbiote intestinal (B) Les facteurs affectant la composition et la fonction de la niche du gros intestin	14
05	Évolution du microbiote intestinal au cours des deux premières années de vie	16
06	Évolution de la flore fécale au cours de la vie humaine	17
07	Modèle du petit écosystème intestinal. Les streptocoques intestinaux sont impliqués dans le métabolisme des glucides (simples) d'origine alimentaire et d'autres populations induisent des réponses immunitaires différentes	19
08	Classification phylogénétiques des bactéries de l'Ordre des <i>Lactobacillales</i>	24
09	Approche pharmacologique des effets des probiotiques dans le tractus digestif	27
10	Méthode d'ensemencement par spots	
11	Variation de la charge bactérienne en fonction du temps d'incubation et les milieux de culture utilisés. A. Colostrum, B. Matière fécale	59
12	Aspects des colonies à différentes dilutions après mise en culture par spots.	61
13	Fréquence d'isolement des bactéries lactique	61
14	Différents aspects phénotypiques des bactéries lactiques après mise en culture sur gélose (MRS et M17) et le résultat des tests de la catalase.	62
15	Quelques aspects microscopiques des bactéries lactiques isolées après coloration de Gram (X1000).	63
16	Activité antibactérienne des bactéries lactiques par la méthode de spot sur milieu BHI semi solide (0.8%).	68
17	Résultat de l'Activité antibactérienne des isolats lactiques (mm±SD) révélée par la méthode de spot sur BHI.	70
18	Halotolérance des isolats lactique sur MRS additionné de 0-10% de NaCl.	71
19	Effet des sels biliaires sur la croissance des bactéries lactiques mesuré par densité optique.	73
20	Effet des pH sur la croissance des bactéries lactiques mesuré par densité optique.	74
21	Résultats de la tolérance à l'acidité stomacale des souches lactique	75
22	Capacité de formation des biofilms des souches lactiques isolé	77
23	Capacité de formation de biofilms chez les pathogènes testés.	78
24	Résultats de l'activité antibiofilm des surnagents de souches lactique isolées à l'égard des souches pathogènes tests sur microplaque en polystyrène	80
25	Exmples de résultats de l'antibiogramme de quelques souches lactiques.	83
26	Résultats de la production de l'acide lactique par les souches isolées et la variation de pH en fonction de temps.	84
27	Activité protéolytique et Gélatinase des isolats lactiques sur milieu MRS.	86

Liste des abréviations

% : Pourcentage

µl : Microlitre

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADNr: Acide désoxy ribonucléique ribosomique

ARNr 16 S: acide ribonucléique ribosomique 16

SC° : degré Celsius

GC°/° : Pourcentage de Guanine Cytosine

NaCl : clore de sodium

NGS: New Generation Sequencing

OMS: Organisation mondiale de la santé

PCR : Réaction de Polymérase en

UFC: Unité formant colonie

Table des Matières

Dédicace

Remerciements

ملخص

Résumé

Abstract

Liste des Tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction 2

Chapitre 1

--Le microbiote Intestinal Humain--

1. Définition du microbiote intestinal	5
2. Méthodes d'étude du microbiote intestinal	5
3. Composition du microbiote intestinale	9
4. Répartition des bactéries tout au long du tube digestif	11
5. Mise en place et évolution du microbiote intestinal	13
6. Fonctions du microbiote intestinal	17

Chapitre 2

--Les probiotiques--

1. Historique	21
2. Définition	21
3. Notion GRAS	22
4. Classification des probiotiques	23
5. Critères de sélection des souches probiotiques destinées à l'Homme	28
6. Mécanismes d'actions des probiotiques	31

Chapitre 3

--Probiotiques et Pathologies digestives infectieuses--

1. Diarrhées	35
2. Infection à <i>Clostridium difficile</i> et diarrhées post-antibiotiques	37
3. Infection à <i>Helicobacter pylori</i>	38
4. Entérocolite nécrosante	39

Matériel et Méthodes

1. Objectifs du travail	42
2. Réactif et produits	42
3. Matériel utilisé	44
4. Méthodes	44
Échantillonnage	44
Énumération de la flore bactérienne autochtone	44
Isolement et purification	45
Pré-identification des isolats lactiques	45
Détermination des caractères biochimiques	46
Étude des aptitudes probiotiques des bactéries lactiques isolées	47

Résultats et Discussion

1. Échantillonnage	54
2. Énumération et dénombrement de la flore autochtone	55
3. Isolement et purification des bactéries lactiques	58
4. Sélection des isolats lactiques	58
5. Étude des aptitudes probiotiques des bactéries lactiques isolées	62
Conclusion	84
Références bibliographiques	86
Annexes	99

Introduction

L'homme vit continuellement avec une population de microorganismes complexe et diversifiée habitant son tractus gastro-intestinal (GI) appelée microbiote (**Eckburg et al. 2005**). Le microbiote intestinal représente une biomasse et un potentiel génétique considérable avec 10^{14} bactéries correspondant à environ 1000 espèces bactériennes, et plus de 5 millions de gènes, ce qui dépasse largement le nombre de cellules et gènes eucaryotes (**Sommer et Bäckhed, 2013**). Les conditions physico-chimiques variant considérablement le long du tube digestif, il existe d'importantes variations qualitatives et quantitatives du microbiote digestif aux différentssites (**Piquepaille, 2013**).

Depuis quelques années, la connaissance de ce microbiote concernait principalement les entéropathogènes, mais il est actuellement considéré comme un véritable organe, cette population bactérienne, dynamique, étant en constants échanges mutualistiques avec l'hôte et apportant ainsi des fonctions physiologiques essentielles (**Competto et al. 2007**).

La formation du microbiote intestinal débute dès la rupture des membranes fœtales, le tube digestif étant rapidement colonisé par les bactéries provenant des microbiotes maternels et de l'environnement (**Competto et al. 2007**). L'immunité se structure progressivement pour prendre le relais de la protection non spécifique apportée initialement par le lait maternel. Il est concevable qu'interviennent des interactions entre microorganismes, les anaérobies facultatifs premiers colonisateurs préparant par exemple l'écosystème pour les anaérobies stricts qui domineront ensuite (**AFFSSA, 2005**).

L'évolution phénoménale des techniques d'analyses du microbiote intestinal tant au point de vue capacité d'analyse en profondeur de l'immense diversité et des fonctions de ce microbiote qu'au point de vue analyse à haut débit a conduit à une explosion de l'intérêt des relations microbiote-santé-pathologies, reliant un nombre de plus en plus important de pathologies à des perturbations de l'écosystème intestinal. Ces relations ont conduit à l'intérêt potentiel d'une approche préventive ou thérapeutique par la modulation du microbiote et/ou de ses fonctions par les pro ou prébiotiques.

Dérivant du mot grec désignant la vie, « bios », le terme de probiotique est né au milieu du siècle dernier de l'observation de l'influence positive de certains microorganismes sur la flore intestinale (**Benreguieg, 2015**). Par ailleurs, toute souche bactérienne isolée, potentiellement probiotique, devrait résister à des conditions très variées telles que l'exposition aux enzymes digestives des cavités buccale et gastrique, au pH acide de l'estomac, à la teneur réduite de l'O₂ dans l'intestin, à une température pas toujours optimale... (**Armuzzi et al. 2001**).

Comment le lait maternel peut-il avoir un impact sur la composition du microbiote intestinal du nouveau-né ? Il est important d'avoir une meilleure compréhension de ce facteur,

nous avons essayé de mettre en évidence dans la présente étude par l'évaluation des premiers colonisateurs microbiens de nourrissons allaités maternellement par une approche de culture microbiologique classique.

Les travaux réalisés dans ce mémoire sont présentés en deux parties :

La première partie abordant une étude bibliographique en trois chapitres avec présentation du contexte du travail.

- Dans le premier chapitre, nous rappellerons quelques notions importantes sur le microbiote intestinal humain. Nous verrons d'abord les méthodes qui permettent d'étudier sa composition et sa répartition, les étapes de sa mise en place et son évolution naturelle de la naissance à l'âge adulte. Nous résumerons enfin les différentes fonctions qui lui sont attribuées et les résultats du son déséquilibre.
- Un second chapitre portera sur les probiotiques en général. Un bref historique amènera à la définition actuelle des probiotiques puis un passage sur la notion GRAS après une classification des différents genres microbiens utilisés comme probiotiques et les critères de sélection. Nous terminerons cette partie en abordant les mécanismes d'action des probiotiques au niveau digestif.
- Nous verrons dans un troisième chapitre quelques pathologies digestives infectieuses comme les gastro-entérites, les diarrhées de voyageur, les infections à *Clostridium difficile* et *Helicobacter pylori*, et le potentiel d'utilisation thérapeutique des probiotiques dans ces infections.

La deuxième partie est celle de la méthodologie, présentant les travaux par un détail méthodologique expliquant les tests et protocoles utilisés pour atteindre l'objectif de notre travail qui consiste à :

- L'isolement et l'identification des bactéries lactiques autochtones à partir du colostrum humain et la matière fécale des nourrissons.
- L'évaluation de l'activité antibactérienne contre des germes pathogènes.
- L'exposition des souches lactiques isolées aux différents tests de sélection à pouvoir probiotiques possible.

Pour finir, une discussion des résultats a été apportés avec une conclusion et perspectives des travaux

Chapitre I

1. Définition du microbiote intestinal

La flore, ou le microbiote, est l'ensemble des micro-organismes non pathogènes dits commensaux, vivant dans un environnement spécifique appelé microbiome, chez un hôte qui peut être animal ou végétal ou une matière pouvant être elle-même d'origine animale ou végétale (**Burcelin et al. 2016**).

Le corps humain renferme plusieurs microbiotes (buccal, vaginal, intestinal, cutané) et la flore intestinale en représente la niche écologique principale. Il est longtemps considéré que 400 espèces composaient le microbiote intestinal, dont 25 à 40 espèces dominantes. À ce jour, près de 60 espèces dominantes chez l'homme ont été noté (**Philippe et al. 2017**). La subsistance de cette flore est assurée par nos résidus alimentaires, nos sécrétions ainsi que par la desquamation des tissus (**Corthier, 2007**). Chaque individu a une flore spécifique qui lui est propre et stable au cours du temps mais il n'est pas le même aux âges extrêmes de la vie (nouveau-né et personnes âgées).

Le microbiote se localise entre la lumière du tube digestif et le mucus présent à la surface de l'épithélium intestinal, il est présent tout au long du tube digestif mais sa concentration est maximale au niveau de l'intestin grêle et du côlon. Il est constitué d'environ 10^{13} à 10^{14} micro-organismes (bactéries, archaea, virus et levures) et considéré aujourd'hui comme un véritable organe métabolique assurant diverses fonctions indispensables à l'hôte, comme la synthèse de vitamines ou la mise en place du système immunitaire (**O'Hara et al. 2006**). Il joue également un rôle majeur dans l'émergence et la dissémination de la résistance aux antibiotiques, et est considéré comme l'épicentre de cette résistance (**Carlet et al. 2012**).

2. Méthodes d'étude du microbiote intestinal

La mise en culture

Parmi les techniques classiquement utilisées à ce jour afin de caractériser l'ensemble du microbiote intestinal, on distingue la mise en culture. Un échantillon du contenu colique ou fèces est utilisé et analysé (**Ducluzeau, 1998**). Il est tout d'abord mis en suspension, puis placé dans des milieux de cultures plus ou moins riches, plus ou moins sélectifs (Figure 1) (**Hindré, 2012**).

Cependant, les scientifiques se sont heurtés à un problème : la plupart des bactéries restent malheureusement difficilement cultivables ; on estime que 80 % du microbiote ne peuvent être exploités en laboratoire (**Eckburg, 2005**). L'étude de la flore intestinale est en effet extrêmement délicate. Dès le recueil, l'échantillon doit être analysé dans les plus brefs délais (2-3 heures). Et une fois que la dilution et la mise en culture de ce dernier sont effectuées, il

faut absolument s'assurer du maintien de l'anaérobiose compte tenu de la sensibilité des bactéries au contact de l'oxygène de l'air. Le système le plus performant à l'heure actuelle est la chambre constituée de dioxyde de carbone, d'azote et d'hydrogène dans laquelle il ne doit pas subsister plus de 5 ppm d'oxygène (**Ducluzeau, 1998**).

Biologie moléculaire

Face aux résultats beaucoup trop lacunaires, les microbiologistes se sont détournés de la culture au profit des études moléculaires ; méthodes intervenant traditionnellement en écologie dans la caractérisation des communautés aquatiques, telluriques (**Sekirov et al. 2010**).

Ainsi, la biologie moléculaire basée sur l'analyse des ADN et ARN16S ribosomiques, a permis d'avoir une approche beaucoup plus précise des bactéries intestinales.

L'étude du génome bactérien a contribué à l'élaboration d'une taxonomie reflétant les liens de parenté entre bactéries (**Rampal et al. 2000**). En effet le gène codant l'ARN 16S ribosomique inclut internes très conservées faisant ressortir les grands groupes phylogénétiques mais également des séquences hypervariables d'où l'existence d'espèces, souches bactériennes. De plus, il est d'une taille suffisamment courte pour être analysé rapidement (**Sekirov et al. 2010**)

Les méthodes de séquençage, d'empreintes, l'hybridation *in-situ* couplée à la cytométrie de flux et la PCR quantitative constituent les principales techniques d'exploration de l'ARNr 16S (**Sekirov et al. 2010**)

Les méthodes de séquençage

a. Le séquençage complet (Méthode de Sanger)

La méthode de Sanger est une méthode enzymatique, qui consiste à séquencer la chaîne nucléotidique de l'ADN synthétisé (clone d'ADN) en différents points. Elle fait intervenir au sein du milieu réactionnel des didésoxyribonucléotides (ddNTP) marqués : en effet, la synthèse du brin d'ADN cesse à partir du moment où un ddNTP se présente à l'ADN polymérase ; aucun nucléotide ne pourra être incorporé par la suite. Les différents fragments obtenus sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (**Mackiewicz, 2003**). Par la suite, les séquences d'ARN16S sont comparées, regroupées dans ce que l'on appelle des Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTU) en fonction des similitudes observées (**Sekirov et al. 2010**).

b. Le pyroséquençage

Contrairement à la méthode de Sanger, les nucléotides sont ici incorporés l'un après l'autre dans le milieu réactionnel et seront détectés par luminescence. Les signaux lumineux obtenus seront représentés par des pics de taille variable sur le pyrogramme en fonction de l'intensité de ces derniers. Les séquences sont alors définies par la hauteur des pics observés (**Lamoril et al. 2008**). Le pyroséquençage est qualifié de technologie à haut débit, ce qui lui confère un avantage indéniable par rapport à la méthode de Sanger : en effet, grâce à cette technique des millions de bases peuvent être séquencées en quelques heures et ceci avec une grande précision (>90%) (**Sekirov et al. 2010**).

c. Les méthodes d'empreintes

Ces méthodes font intervenir en premier lieu la PCR (Polymerase Chain Reaction) afin d'amplifier le gène codant l'ARNr 16S. Les fragments issus de cette amplification sont alors séparés par électrophorèse sur gel dénaturant. Le gradient de dénaturation au sein du gel peut être thermique dans le cas de la TGGE (Température Gradient Gel Electrophoresis) ou chimique (urée et formamide) pour la DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis). Les séquences vont en fonction de leur composition en base G+C migrer sur le gel d'acrylamide. La diversité bactérienne est donc établie en fonction des bandes distinctes observées sur le gel et la pléthore en bandes est un indicateur de l'hétérogénéité bactérienne (**Andriamahery, 2010 ; Sekirov et al. 2010**).

d. Hybridation in situ couplée à la cytométrie en flux

La méthode FISH (Florescence *in situ* hybridization) repose sur la détection des acides nucléiques de brins d'ARNr 16S ciblés (spécifique d'un genre, d'une espèce bactérienne) (**Ducluzeau, 1998**). Elle utilise pour cela des sondes d'oligonucléotides fluorescentes capables de fusionner exclusivement avec la séquence incriminée. Les résultats seront ensuite analysés grâce à la cytométrie en flux correspondant à la caractérisation quantitative et qualitative des éléments isolés par entraînement dans un flux liquide ou gazeux (**Gendron, 2003**).

d. La PCR quantitative (qPCR)

La PCR quantitative est l'une des techniques les plus exploitées pour la détection des molécules d'ADN, ARN. Elle comprend un certain nombre d'étapes dont une de dénaturation de l'ADN, d'hybridation d'amorces spécifiques de la séquence à amplifier ciblant ainsi certains groupes bactériens, et une autre d'élongation par une ADN polymérase. Comme pour la

méthode Fish, des sondes fluorescentes sont également employées pour la détection, et la quantification de séquences cible (Coconnier et al. 1992 ; Poitras et al. 2002).

e. Le méta-génomique du microbiote intestinal

Afin d'appréhender avec plus de précision la relation microbiote-individu, un nouveau répertoire d'outils d'analyse a été élaboré : le métagénomique. Cette méthode constitue une approche globale dans le sens où elle offre des informations sur le génome « collectif » du microbiote sans passer par l'examen méticuleux d'une bactérie à l'autre ; et ceci dans un seul et unique but : identifier les contributions fonctionnelles et le rôle biologique de cette communauté complexe en santé humaine (Sekirov et al. 2010)

La métagénomique ne comprend aucune étape préalable de mise en culture, ni de différenciation d'espèces, et consiste à séquencer la totalité de l'échantillon prélevé. L'objectif n'est pas d'établir une liste précise des métagénomomes révélés au sein de l'échantillon mais d'avoir un aperçu de l'activité de l'écosystème à un moment donné.

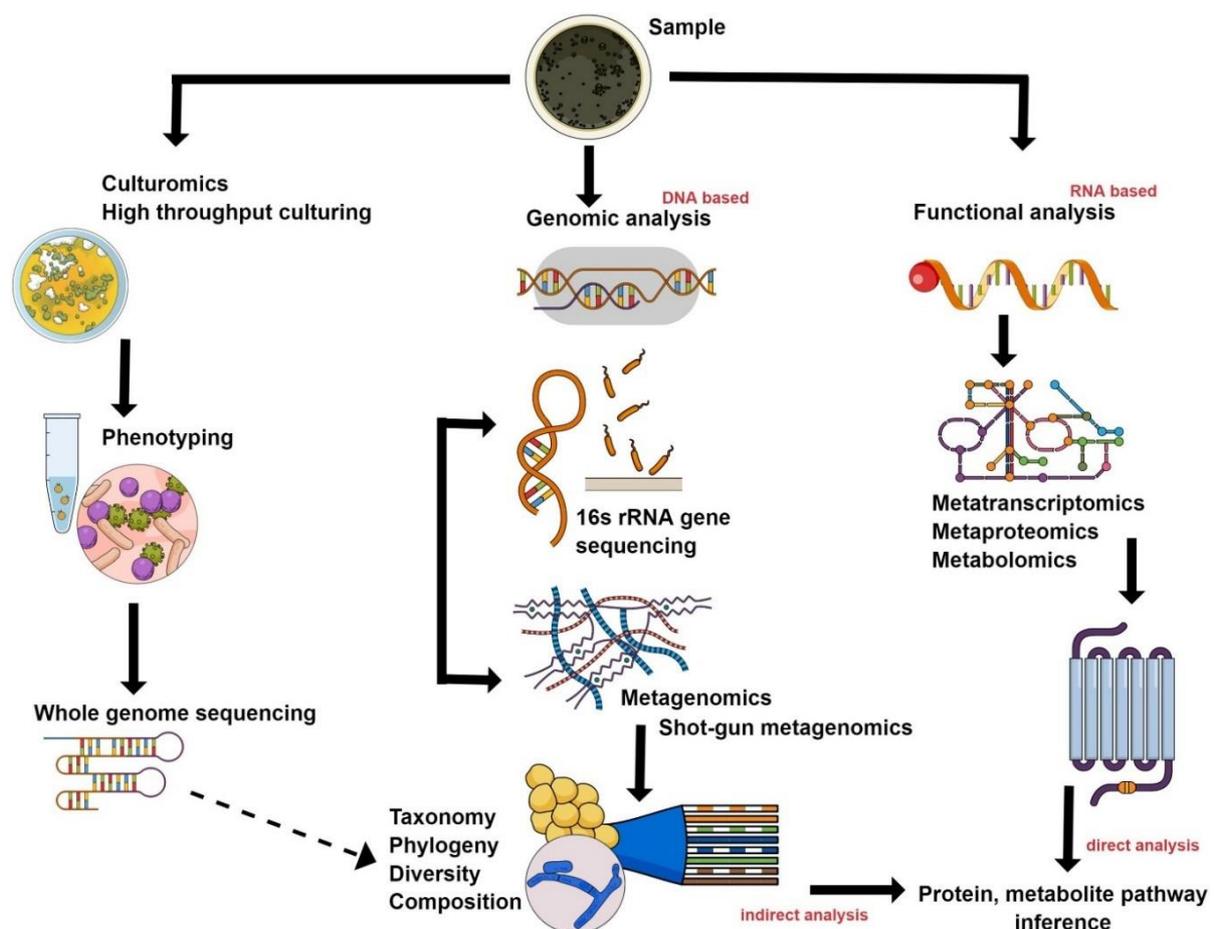


Figure 1. Diverses méthodes d'identification et d'étude du microbiote intestinal (Philips et al. 2020).

3. Composition du microbiote intestinale

Microbiote endogène résident

Le microbiote « normal », dit endogène résident ou autochtone, comprend l'ensemble des espèces microbiennes présentes dans l'écosystème digestif de façon permanente. Ces espèces ont colonisé un site spécifique et sont capables de se multiplier dans cet environnement car elles sont parfaitement adaptées aux conditions du milieu (**Collignon et Butel, 2004**).

Microbiote dominant

Généralement, les bactéries dominantes sont celles qui représentent au moins 1 % des bactéries totales, soit des niveaux de population atteignant au moins 10^8 UFC par gramme de fèces (**Bocle et Thomann, 2005**). Ce sont ces bactéries qui contribuent le plus significativement aux fonctionnalités de l'écosystème digestif. La diversité d'espèces du cortège microbien intestinal dominant est propre à chaque individu, le nombre d'espèces communes à plusieurs individus étant très restreint (voire nul). De plus, la composition du microbiote fécal dominant apparaît très stable au cours du temps pour un individu donné sur des échelles de temps allant de quelques jours à plusieurs années (**Bocle et Thomann, 2005**).

Il semble que le microbiote intestinal dominant puisse conduire à la détermination d'une empreinte fécale spécifique de l'individu et l'analyse de sa composition en taxa (genres bactériens et/ou grands groupes phylogénétiques) fait ressortir l'existence de composantes récurrentes, retrouvées chez tous les individus. Certains de ces taxa sont connus depuis bien longtemps via les méthodes classiques de culture, mais la plupart n'ont été mis en évidence que récemment grâce aux approches moléculaires (**Corthier, 2007**). Actuellement, trois phyla bactériens rassemblent la majorité des bactéries fécales dominantes (**Rigottier-Gois, 2003; Corthier, 2007**). Malgré des caractéristiques très conservées en termes de composition au niveau des phyla et grands groupes phylogénétiques, la présence de nombreuses espèces spécifiques laisse penser qu'il existe, au plan fonctionnel, une interchangeabilité entre espèces et que les niveaux de résolution différents fournissent des informations totalement complémentaires (**Leclerc, 2007**).

- le phylum des *Firmicutes* est toujours fortement représenté et comprend deux groupes:
 - le groupe dit « *Eubacterium* rectale - *Clostridium* coccoides », le plus important (**14 à 31%**) des bactéries totales en moyenne suivant les études), est composé d'espèces bactériennes appartenant aux genres *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus* et *Butyrivibrio* ;
 - le groupe « *Clostridium* leptum », avec notamment les espèces *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus albus* et *R. flavefaciens*, est aussi très souvent dans la dominance (**16 à 22%**) ;

- le phylum des *Bacteroidetes*, toujours présent (9 à 42 %), inclut des bactéries des genres *Bacteroides*, *Prevotella* et *Porphyromonas* ;
- le phylum des *Actinobacteria*, avec les bifidobactéries (0,7 à 10 %) et les bactéries du groupe *Collinsella-Atopobium* (0,3 à 3,7 %) est moins systématiquement détecté en dominance.

Microbiote sous-dominant

La population bactérienne du microbiote sous-dominant est présente à des taux compris entre 10^6 et 10^8 UFC par gramme de contenu colique. Ces bactéries sont aéro-anaérobies facultatives et appartiennent notamment à différentes espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* (surtout *Escherichia coli*) et aux genres *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactobacillus* (**Collignon, 2004**). Le microbiote sous-dominant est beaucoup moins stable au plan qualitatif et sujet à un relais constant d'espèces. De plus, de légères fluctuations de l'alimentation ou de la physiologie de l'hôte peuvent conduire à des niveaux dominants (**Hagiage, 1994**).

Appelé également allochtone ou de passage, correspond aux espèces bactériennes qui, sauf lors de circonstances pathologiques, traversent le tube digestif sans pouvoir le coloniser (**Collignon, 2004**). Il est représenté par des entérobactéries du genre *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* ou *Enterobacter*, mais aussi par des *Pseudomonas*, des staphylocoques et des levures essentiellement du genre *Candida*. Les bactéries de ce microbiote polymorphe sont présentes à des taux inférieurs à 10^6 UFC par gramme de fèces et proviennent surtout de l'alimentation (**Collignon, 2004**). Certains de ces microorganismes sont potentiellement pathogènes mais généralement ils sont réprimés par le microbiote dominant et n'expriment donc pas leur toxicité (**Fonty, 2007**).

Autres

Les Archées

Les Archées ont été découvertes vers la fin des années 70 dans des environnements extrêmes. Elles sont assez similaires en taille et en forme aux bactéries et elles appartiennent aux procaryotes. Cependant, elles possèdent des propriétés métaboliques et génétiques proches des eucaryotes. On peut citer les espèces de *Methanobrevibacter*. Ces procaryotes sont capables de produire du méthane dans des conditions d'anaérobiose. Cette production est importante pour

prévenir l'accumulation d'acides et de produits de fin de réaction dans l'intestin (**Horz et Conrads, 2010**).

Les virus

Après la communauté bactérienne, les virus sont considérés comme l'espèce la plus abondante au niveau intestinal. Pour l'instant, peu d'études ont été réalisées mais on retrouve la présence majoritaire de phages et de prophages. On estime le nombre de phages à 10^{12} à 10^{13} particules par microbiote qui sont répartis dans environ une centaine d'espèces dont le taxon prédominant appartient à la famille des Podoviridés (**Salonen et al. 2014**).

Les eucaryotes

L'étude complète du composant eucaryote dans le microbiote intestinal n'en est qu'à son début, loin derrière l'étude des bactéries. Les premières études ont été réalisées sur les parasites présentant une pathogénicité certaine (*Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*). Chez l'adulte sain, ils représentent environ 0,5% de la flore microbienne intestinale, les champignons ainsi que le genre *Blastocystis* sont les eucaryotes dominants (**Salonen et al. 2014**).

4. Répartition des bactéries tout au long du tube digestif

L'exploration de l'ensemble du tube digestif montre qu'il existe des populations bactériennes très hétérogènes d'un compartiment gastro-intestinal à l'autre. En fait, chacun d'eux offre des conditions physiques et chimiques très différentes qui sont propices au développement de bactéries spécifiques. Par conséquent, le microbiote n'est pas un, mais plusieurs écosystèmes microbiens qui se succèdent dans tout le tube digestif (Figure 2) :

- L'estomac : Se caractérise par sa forte acidité (pH = 1-2) mais aussi par la présence d'oxygène apportée lors de la déglutition. Ainsi face à cette constatation, ce dernier n'offre que très peu de conditions favorables au développement bactérien. Seules les bactéries acidotolérantes telles que les *Streptococcus* ou les *Lactobacillus* résident, persistent à ce niveau du tube digestif (**Tahar, 2005**).
- L'intestin grêle : Le petit intestin abrite très peu de bactéries, si ce n'est des microorganismes anaérobies facultatifs. Les facteurs à l'origine de cette déficience sont nombreux ; les sécrétions digestives (sels biliaires, sécrétions pancréatiques ...) et plus particulièrement le péristaltisme constituent les principaux acteurs de cet effet antibactérien. On y trouve donc des *Streptococcus*, des *Lactobacillus*, des *Enterobacteries* (anaérobies facultatives) mais aussi des *Bacteroides* et Clostridies (anaérobies strictes).

- **Le côlon :** Dans ce dernier compartiment, la diversité bactérienne atteint son maximum 'une recrudescence des bactéries d'un facteur 100'. L'absence d'oxygène, ainsi qu'un transit plus lent favorise la pullulation microbienne. Ainsi, le microbiote intestinal devient à ce niveau d'une extrême complexité. Une flore anaérobie stricte représentée par *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* prédomine dans ce gros intestin, et ceci est d'autant plus marqué que l'on se rapproche du côlon distal. Les bactéries anaérobies facultatives (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, ...) sont quant à elles beaucoup moins représentatives du compartiment colique (environ 25% de la flore dominante). (Ducluzeau, 1998 ; Tahar, 2005 ; Marteau, 2013).

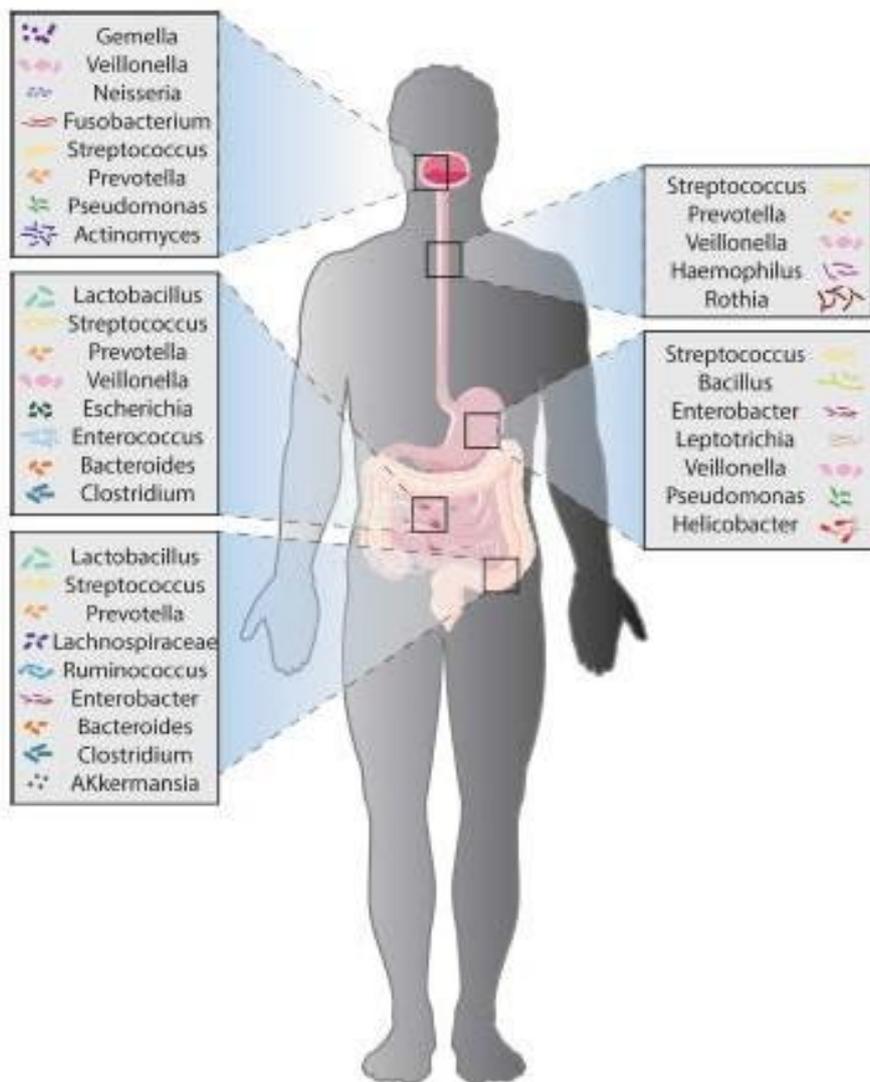


Figure 2. Variation de la composition du microbiome humain dans le tractus gastro-intestinal (Ruan et al. 2020).

5. Mise en place et évolution du microbiote intestinal de la naissance à l'âge adulte

5.1. La naissance

La colonisation débute à la naissance, dès la rupture des membranes fœtales, lorsque le nouveau-né passe d'un environnement stérile *in-utero*, à un univers bactérien riche et varié.

La colonisation s'effectue progressivement, dépendant de plusieurs facteurs

5.1.1 Mode d'accouchement

Un accouchement par voie basse expose l'enfant aux bactéries issues des flores fécale, vaginale et cutanée. Les bactéries anaérobies facultatives des genres *Enterococcus*, *Staphylococcus* et *Streptococcus* vont s'implanter dans un premier temps, tandis que les bactéries anaérobies strictes s'implantent plus tardivement. Les *Bifidobacterium* colonisent la muqueuse intestinale à 1 mois, et les bactéries du genre *Bacteroides* à 6 mois (Doré et al. 2010). Lorsque le nouveau-né est extrait par césarienne, il n'entre pas directement en contact avec les populations microbiennes vaginales et fécales maternelles, d'où une acquisition retardée des groupes bactériens précédemment cités. L'enfant rencontre tout d'abord les bactéries de l'environnement tels que les micro-organismes aéro et manu portés par le personnel soignant et l'entourage : *Staphylococcus* à coagulase négative (*Staphylococcus epidermidis*, *haemolyticus*, ou *hominis*), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp. La colonisation par *Clostridium difficile* est également amplifiée (Figure 3) (Collignon et al. 2004).

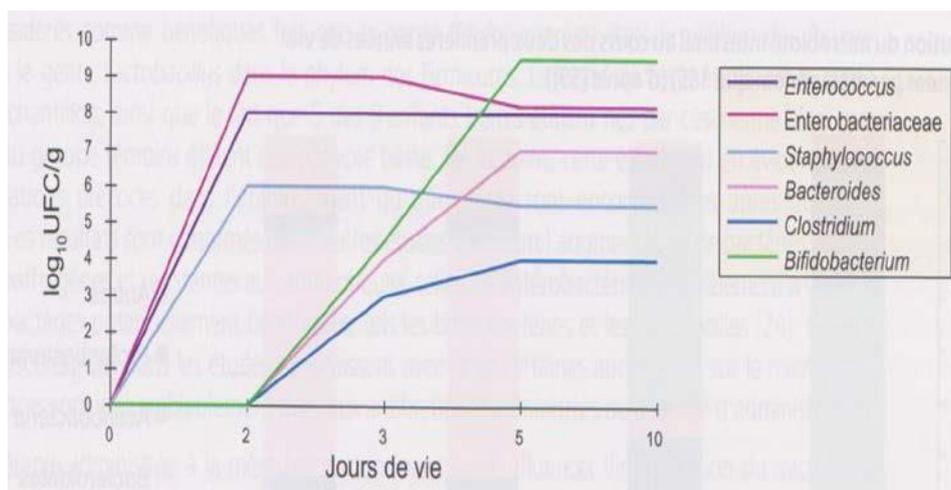


Figure 3. Profil d'établissement du microbiote au cours des premiers jours de vie d'un enfant né à terme, par voie basse et allaité (Philippe et al. 2017).

5.1.2. Terme de naissance

Chez l'enfant né prématurément, on observe un retard de la colonisation intestinale et un nombre d'espèces réduit. Ce retard est d'autant plus important que l'âge gestationnel est faible. Dans de nombreux cas, le prématuré est extrait par césarienne, puis séparé de sa mère pour être placé en environnement hospitalier aseptisé, en unité de néonatalogie. Le contact avec les différentes flores maternelles et environnementales est de fait retardé. De plus, des traitements antibiotiques à large spectre lui sont fréquemment administrés et limitent le développement de la flore digestive (Collignon et al. 2004). En effet, chez le prématuré les bifidobactéries sont moins nombreuses et les entérobactéries sont plus largement représentées que chez le nouveau-né à terme (Figure 4) (Rodriguez et al. 2015).

5.1.3. L'environnement

Dans les pays industrialisés, la plupart des naissances ont lieu en milieu hospitalier. Les conditions d'hygiène y sont bien définies, dans le but de limiter les infections maternelles ou néonatales. En contrepartie, la colonisation intestinale par des bactéries telles que *E. coli* ou les entérocoques est plus tardive, supplantée par une colonisation transitoire de microorganismes cutanés de type *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Corynebacterium*. Des conditions d'hygiène pauvres sont au contraire associées à une primo-colonisation plus intense par les microorganismes fécaux, dont les entérobactéries et les entérocoques (Collignon et al. 2004).

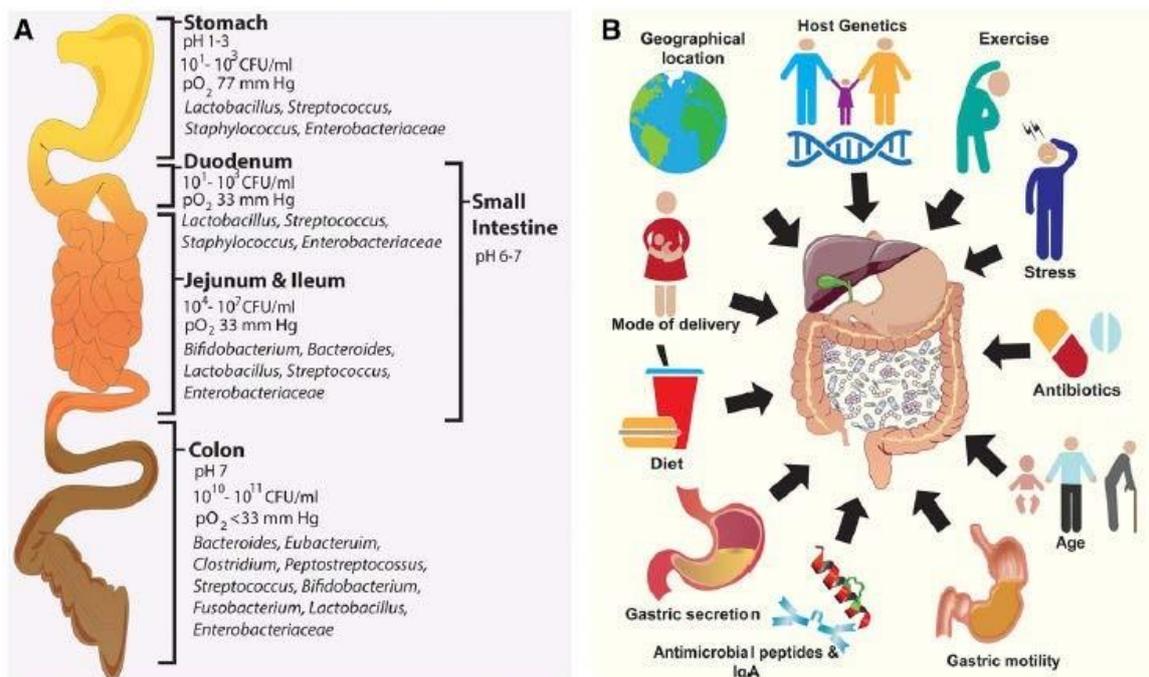


Figure 4. La localisation et l'organisation spatiale du microbiote intestinal (A) et les facteurs affectant la composition et la fonction de la niche du gros intestin (B) (Clarke et al. 2019).

5.2. Le nourrisson

5.2.1. Le mode d'allaitement

En effet, bien que le lait maternel fût longtemps considéré comme stérile, nous savons aujourd'hui qu'il participe activement à l'élaboration de la flore microbienne post-natale grâce à son profil dynamique de nutriments et de composants bioactifs. Il se compose d'une part d'oligosaccharides qui agissent comme prébiotiques, et d'autre part d'un ensemble de bactéries formant une niche écologique qui lui est propre. Celle-ci comprend les *Lactobacillus* spp. et les *Bifidobacterium* spp, qui seraient issues de l'intestin maternel, par le biais d'un cycle entéro-mammaire (Ted et al. 2016).

Lors d'un allaitement artificiel, faisant appel aux formules destinées à l'alimentation des nourrissons, le microbiote est d'emblée plus diversifié, avec une prédominance de *Lactobacillus*. Les différences tendent cependant à s'estomper, car les formules infantiles sont actuellement enrichies en oligosaccharides bifidogènes de type fructo-oligosaccharides (FOS) et galacto-oligosaccharides (GOS) (Vandenplas et al. 2008).

5.2.2. La diversification alimentaire

Après l'âge de six mois, l'OMS recommande que l'allaitement maternel soit complété par une alimentation adaptée à l'âge du nourrisson, semi-solide puis solide, dans le but de couvrir l'ensemble de ses besoins nutritionnels (Arrieta et al. 2014). Les molécules alimentaires qui arrivent progressivement dans le côlon induisent des changements dans les populations bactériennes initialement installées. En effet, une sélection s'opère en faveur des souches capables de les métaboliser. C'est ainsi que les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* diminuent tout au long du sevrage, au même titre que les diverses entérobactéries, laissant une place plus importante aux espèces de *Bacteroides* et à certains représentants des genres *Clostridium* et *Ruminococcus* (Arrieta et al. 2014).

5.2.3. La localisation géographique et le mode de vie

L'alimentation et le mode de vie sont étroitement liés à l'emplacement géographique. Les régimes alimentaires adoptés par les familles diffèrent d'un pays à l'autre, en fonction des coutumes, des croyances et de la disponibilité des ressources. Les habitudes d'hygiène varient également entre les différents groupes de population. Des variations sont également observables sur un même continent. D'après des études, les bifidobactéries sont largement représentées dans la population pédiatrique d'Europe du Nord, tandis qu'au Sud, le microbiote est plus précocement diversifié, avec une abondance particulière de *Bacteroides* (Fallani et al. 2010).

5.2.4. L'antibiothérapie

L'antibiothérapie administrée à la mère *per-partum* peut aussi influencer l'implantation de la flore du nouveau-né. Notamment lors de l'antibioprophylaxie *per-partum* de l'infection néonatale à streptocoque du groupe B (Campeotto et al. 2007).

5.2.5. La génétique

D'après l'étude de Stewart, les jumeaux monozygotes en bas âge possèdent des microbiotes intestinaux de composition plus proche que des jumeaux dizygotes du même âge, ou que d'autres frères et sœurs non jumeaux (Stewart, 2005). Lorsque les jumeaux grandissent, cette différence observée entre monozygotes et dizygotes tend à s'estomper. Il reste cependant vrai que les individus de la même famille présentent des microbiotes intestinaux plus proches que des individus non parents (Turnbaugh et al. 2009). Il est donc difficile de savoir si la composition du microbiote est génétiquement orientée, ou si seuls les facteurs environnementaux ont joué un rôle (Figure 5).

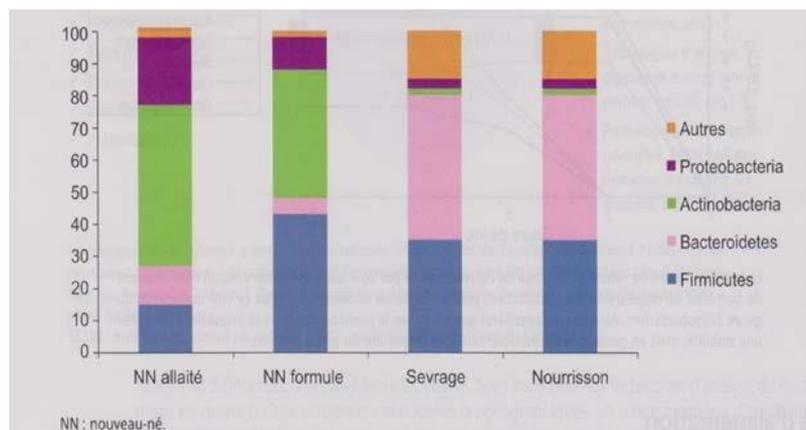


Figure 5. Évolution du microbiote intestinal au cours des deux premières années de vie (Philippe et al. 2017).

5.3. L'adulte

L'enfant dès trois ans acquiert un microbiote intestinal stable (Jaglin, 2013). Il continuera d'évoluer au cours de la vie sous l'influence de facteurs physiologiques et pathologiques. Plusieurs études ont démontré la variabilité du microbiote intestinal au fil du temps, notamment durant les périodes de changements hormonaux importants (Yurkovetskiy et al. 2013). Pendant la puberté, l'évolution du microbiote semble dépendante du taux d'androgènes, car en effet, la castration des mâles montre une stabilité de la flore intestinale semblable à celle des femelles. Au cours de la grossesse, principalement au troisième trimestre, on peut observer une diminution de la proportion de *Firmicutes* et une augmentation de bactéries issues de phyla

minoritaires, *Actinobacteriae* et *Proteobacteriae* (Koren et al. 2012). A la ménopause, l'influence oestrogénique implique une modulation des proportions des *Clostridia* et des *Ruminococcaceae* (Flores et al. 2012).

Chez la personne âgée, de nombreux facteurs modulent la flore intestinale : les changements physiologiques liés à l'âge, la malnutrition, la polymédication avec l'utilisation d'antibiotiques, les hospitalisations. Le rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* diminue, avec une augmentation de *Bacteroides* et une diminution de bifidobactéries dans les fèces (Figure 6) (Claesson et al. 2012). Ces perturbations entraînent des modifications fonctionnelles du microbiote, pouvant amener à l'accumulation de produits génotoxiques comme les phénols ou le sulfure d'hydrogène, qui sont des facteurs de risque de cancer du côlon.

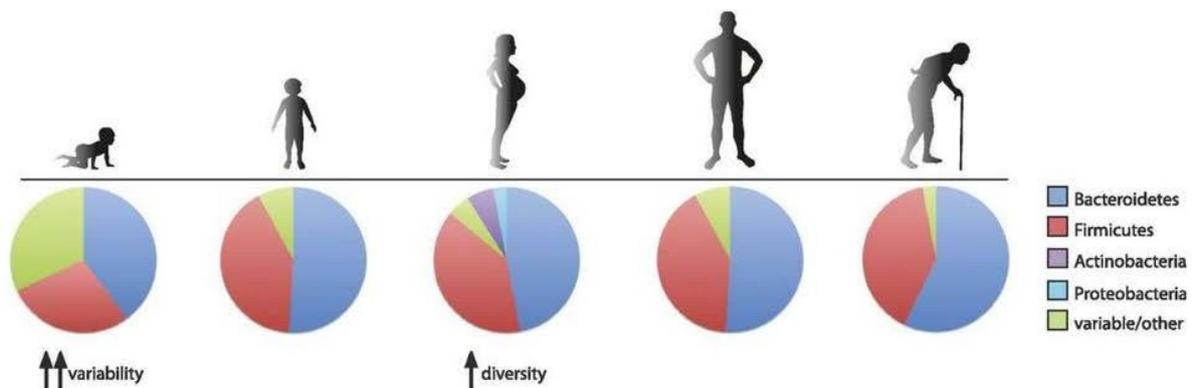


Figure 6. Évolution de la flore fécale au cours de la vie humaine (Goulet, 2009).

6. Fonction du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal exerce de nombreuses fonctions physiologiques dont les répercussions pour l'hôte sont, pour la plupart, bénéfiques. Parmi les grandes fonctions du microbiote, la fermentation des substrats disponibles au niveau du côlon, le rôle de barrière à la colonisation par les micro-organismes pathogènes, le développement et la maturation du système immunitaire intestinal et les interactions avec les cellules épithéliales ont des rôles essentiels pour le maintien de la santé de l'hôte (Gérard et Bernalier-Donadille, 2007).

Les interrelations entre ces différents constituants assurent l'homéostasie de l'écosystème microbien digestif. Toute rupture de l'équilibre entre ces constituants est susceptible de perturber le fonctionnement de l'écosystème et d'être à l'origine de pathologies digestives (fonctionnelles, inflammatoires, infectieuses...) (Gérard et Bernalier-Donadille, 2007).

Effet barrière et fonctions immunitaires

Il existe dans la lumière intestinale une compétition pour les nutriments et les sites d'adhérence épithéliaux entre pathogènes et bactéries commensales. Par ailleurs, le microbiote produit des bactériocines et il est capable de stimuler la production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales. Il induit également la production des IgA sécrétoires et favorise le bon fonctionnement des jonctions serrées entre les cellules épithéliales, ce qui diminue l'invasion par des bactéries pathogènes (**Macpherson et Harris, 2004**). Outre ses propriétés de barrière, le microbiote intestinal joue un rôle fondamental dans le développement et la maturation du système immunitaire (**Landman et Quevrain, 2016**).

Fonctions métaboliques

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 (glucides, protéines et lipides), d'une part qui fait intervenir une grande variété d'hydrolases (polysaccharidase, glycosidases, peptidase etc.), 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 (Figure 7) (**Pryde et al. 2002; Landman et Quevrain, 2016**).

7. Dysbiose et microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est maintenant considéré comme un organe à part entière avec de multiples fonctions. Par conséquent ces fonctions vont participer au maintien de la santé de l'hôte en le protégeant des infections, en aidant à la digestion et en mûrant la muqueuse intestinale. Aujourd'hui de nombreuses études révèlent qu'un déséquilibre du microbiote, c'est-à-dire des anomalies qualitatives du microbiote, peut être un des maillons explicatifs de certaines pathologies comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), le syndrome de l'intestin irritable (SII), mais également l'obésité et certaines maladies neurologiques, etc (**Lagier, 2016 ; Melani et al. 2016 ; Ducrotté, 2017**). Dans ces pathologies, une altération de la composition du microbiote, associée à une réponse inappropriée de l'hôte, est retrouvée et perturbe notamment le système immunitaire et la barrière intestinale (**Camileri, 2012 ; Ducrotté, 2017**). L'altération de la symbiose entre le microbiote et l'hôte, comme décrit précédemment, est appelée « dysbiose » et apparaît aujourd'hui comme un déterminant majeur des pathologies intestinales.

Il semblerait qu'une dysbiose lors de la période périnatale ait un impact sur la santé de l'enfant et de l'adulte. En effet, de nombreux déterminant périnataux influencent l'établissement du microbiote comme l'âge gestationnel, le mode d'accouchement, le type d'alimentation, l'antibiothérapie pré-/per-/postpartum ou encore l'environnement. Des études suggèrent une relation entre une dysbiose lors de l'établissement du microbiote intestinal et la survenue de pathologies à court terme, comme des infections, une entéropathie, ou à long terme l'allergie ou l'obésité (Kalliomäki et al. 2001; Penders et al. 2007 ; Okada et al. 2010). La complémentation de l'alimentation infantile par des probiotiques ou des prébiotiques sont des pistes intéressantes pour favoriser l'établissement d'un microbiote bénéfique pour la santé de l'enfant (Waligora-Dupriet et al. 2017).

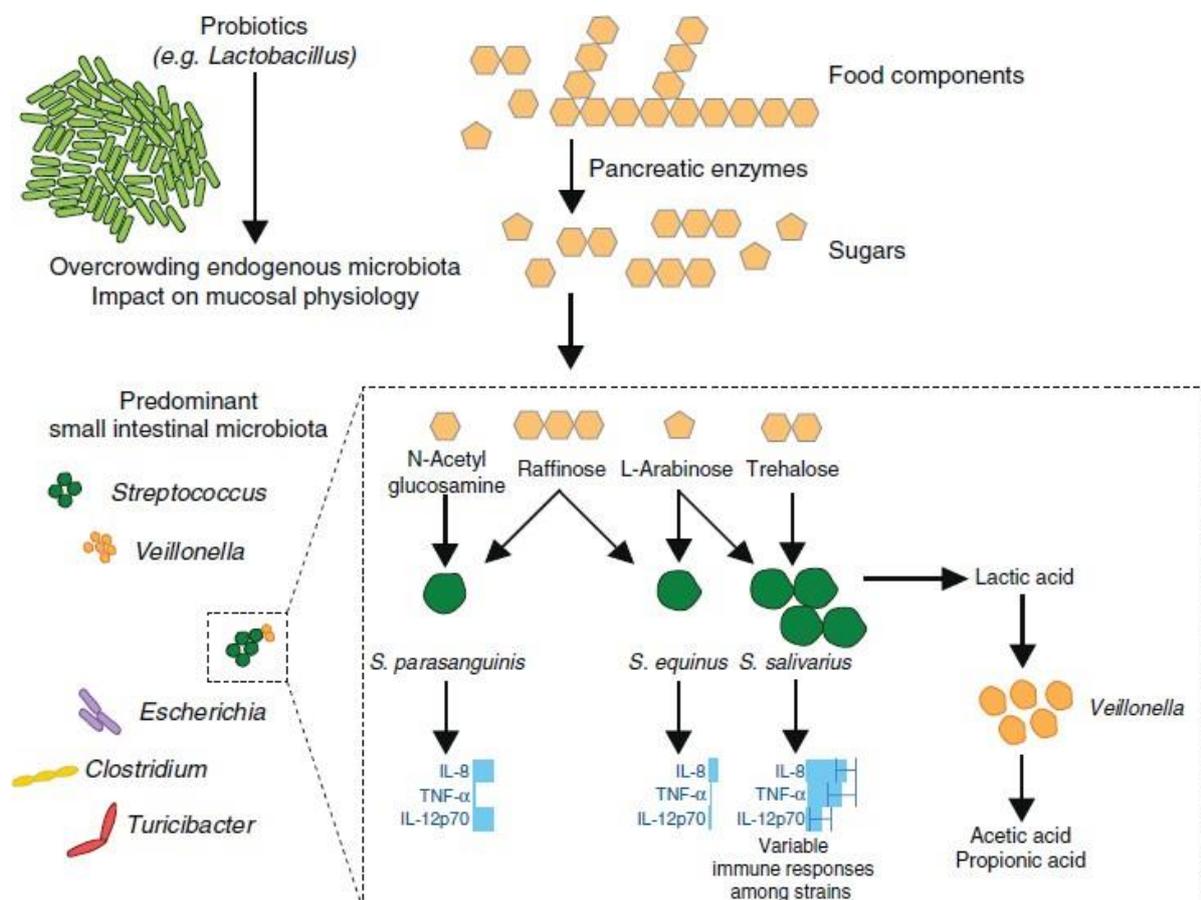


Figure 7. Modèle du petit écosystème intestinal. Les streptocoques intestinaux sont impliqués dans le métabolisme des glucides (simples) d'origine alimentaire et d'autres populations induisent des réponses immunitaires différentes (El Aidy et al. 2015).

Chapitre II

1. Historique

Le concept de **probiotique** a pour la première fois été établi au début du XXe siècle grâce aux recherches d'Elie Metchnikoff (biologiste russe de l'Institut Pasteur de Paris). Il est l'un des premiers scientifiques à s'intéresser aux cultures lactiques : ces observations ont conduit à établir un lien entre la consommation de produits laitiers (cultures lactiques) et la grande longévité et le bon état de santé de paysans bulgares. Il proposa une théorie selon laquelle le mécanisme « d'auto-intoxication » intestinal des bactéries autochtones pouvait être modulé par l'ingestion de bactéries (**Metchnikoff, 1907**). Il établit alors un régime alimentaire à base de lait fermenté afin de modifier la flore du colon humain.

En 1917, une souche non pathogène d'*Escherichia coli* fut découverte par le professeur allemand Alfred Nissle. Elle fut alors isolée des selles d'un soldat de la première guerre mondiale qui échappa à la sévère épidémie de Shigellose qui s'était établie à cette époque. La flore intestinale était alors très souvent modulée et les troubles intestinaux traités grâce aux bactéries non pathogènes isolées (**Nissle, 1917**).

Henry Tissier, chercheur de l'Institut Pasteur isola quant à lui une bactérie qu'il désigna sous le nom de *Bacillus bifidus communis* à partir d'un enfant nourri au sein. Selon lui, cette bifidobactérie pourrait affaiblir la bactérie protéolytique responsable de diarrhées chez les enfants. Ce n'est qu'en 1965 que le terme de probiotiques fut véritablement introduit par Lilly et Stillwell, et ainsi définis comme facteurs microbiologiquement dérivés stimulant la croissance des autres organismes (**Ducluzeau, 2002 ; Guarner et al. 2011**).

2. Définition

Selon les experts rassemblés en 2001 par la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les probiotiques sont actuellement définis comme des « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (**FAO/OMS, 2001**). Cette nouvelle description du terme est due au groupe de recherche de Guarner et Schaafsma qui la publia en 1998 dans l'International Journal of Food Microbiology (**Guarner et Schaafsma, 1998**).

Cette définition reprend les concepts généraux apportés précédemment. En effet, on y retrouve les notions de compléments microbiens vivants et leur impact positif sur la santé de l'individu qui les consomme. De plus, elle fait intervenir la notion nouvelle de dose appropriée qu'il faudra administrer dans le but d'obtenir ces effets.

Il faut aussi différencier les *probiotiques* des composés nommés *prébiotiques*. Ces derniers sont des éléments non dégradés dans le tube digestif. Ils parviennent tels qu'ingérés dans la lumière colique, où certaines bactéries vont les utiliser pour stimuler leur croissance. Ce sont généralement des glucides à chaîne carbonée de longueur variable, tels que les fructooligosaccharides (FOS) ou les fructanes. Leur but consiste notamment à stimuler sélectivement la croissance et l'activité de bactéries bénéfiques du tube digestif (**Vasson, 2008**).

Lorsque prébiotiques et probiotiques sont associés au sein d'un même produit, on parle alors de symbiotique. Ces associations permettent en outre de prolonger la durée de vie des microorganismes probiotiques et d'améliorer leur croissance, grâce à l'apport conjoint des substrats nécessaires à leur développement (**Vasson, 2008**).

3. Notion GRAS

La notion GRAS (Generally Recognized As Safe) est généralement utilisée par l'Aliment et Drug Administration (FDA) pour rationaliser l'utilisation des aliments les suppléments qui ne satisfont pas aux exigences habituelles en matière d'évaluation de la sûreté, mais ont été largement utilisés sans tout dommage démontrable aux consommateurs (**Cabana et al. 2006**).

La terminologie GRAS a été associée aux probiotiques et aux produits probiotiques, car ces produits ont une longue histoire de sécurité utilisation. Les suppléments de probiotiques sont également déclarés être GRAS comme les organismes qui composent ces préparations sont identiques à celles de la flore gastro-intestinale et vaginale de l'humain (**Cabana et al. 2006**).

Les produits et les métabolites secondaires des probiotiques peuvent également être perçu comme bénéfique en raison du statut GRAS pour l'organisme. À titre d'exemple Duc des souches *Bacillus subtilis* ont été utilisé pour produire des endospores qui peuvent agir comme véhicules vaccins (**Duc et al. 2003**). Après s'être assuré que les spores peuvent être utilisé pour la vaccination, les auteurs ont postulé que le statut GRAS attribué à cette espèce bactérienne et son utilisation actuelle en tant que probiotique pourrait permettre d'homologuer les vaccins à base de spores.

Cependant, tous les probiotiques ne devraient pas être traités de la même façon. Les probiotiques dépendent de la souche et devraient être jugés au cas par cas. Selon les directives de la FDA, les probiotiques peuvent être réglementés en tant que suppléments alimentaires, ou des médicaments selon l'utilisation prévue du produit la Loi fédérale sur les aliments, drogues et cosmétiques et le règlement ne devraient pas être fondés uniquement sur le type de souche. Quand les probiotiques sont utilisés comme ingrédients dans les aliments conventionnels,

devrait être décidé si l'ingrédient est généralement reconnu sûr pour son utilisation prévue (<http://www.fda.gov/CBER/gdlms/altmed.pdf>).

Le Rapport du Groupe de travail conjoint FAO/OMS sur l'élaboration de lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques dans la nourriture recommandé (<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2>), il devrait être nécessaire de savoir le genre et l'espèce de la souche probiotique dans un aliment produit, selon les données actuelles qui suggèrent une souche la spécificité des effets probiotiques. Le rapport souligne que l'identité de la souche est importante pour lier une souche à des effets spécifiques sur la santé, ainsi que pour permettre la surveillance et les études épidémiologiques.

Pour assurer la sécurité des souches potentielles, des recommandations internationales ont été normalisées à savoir: (i) la détermination du profil résistance aux antibiotiques, (ii) évaluation des activités métaboliques, (iii) effets secondaires au cours d'études sur les humains, (iv) les incidents épidémiologiques indésirables chez les consommateurs (après la mise en marché), (v) la production de toxines si la souche sous l'évaluation appartient à une espèce qui est un producteur connu de toxine mammifère, et (vi) détermination de l'activité hémolytique si la souche appartient à une espèce hémolytique connue (**Burton et al. 2006**).

4. Classification des probiotiques

Selon la définition, tous les microorganismes administrés vivants et ayant une action positive sur la santé peuvent être considérés comme probiotiques. Seule une petite partie de ces microorganismes a fait l'objet d'études approfondies apportant les preuves de leurs effets bénéfiques comme les bactéries lactiques dont les *Lactobacillus*, le genre *Bifidobacterium*, certaines espèces de *Bacillus* et les levures *Saccharomyces*.

Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des siècles pour la conservation et la fabrication d'aliments, notamment des produits laitiers, bien avant que l'on ne connaisse leur existence en tant que telles. Ubiquitaires, les bactéries lactiques sont largement retrouvées dans l'environnement. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, les viandes, les végétaux et les céréales et font parties de la flore gastro-intestinale et vaginale humaine ou animale. Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (**Stiles et Holzappel, 1997 ; Pfeiler et Klaenhammer, 2007**).

Les bactéries lactiques appartiennent au Phylum des *Firmicutes*, la Classe des *Bacilli*, et l'Ordre des *Lactobacillales* (Figure 8). Celui-ci compte six familles (*Aerococcaceae*, *Carnobacterium*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae*), qui renferment elles-mêmes trente-cinq genres distincts. Seulement six d'entre eux disposeraient de propriétés probiotiques : *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. Ce sont des bactéries à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, anaérobies ou microaérophiles et ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellagrio et al., 1994 ; González et al., 2000). Le pourcentage en bases guanine et cytosine (%GC) de leur ADN montre une hétérogénéité des espèces constituant ces genres (Claesson et al, 2007 ; Corrieu et Luquet, 2008)

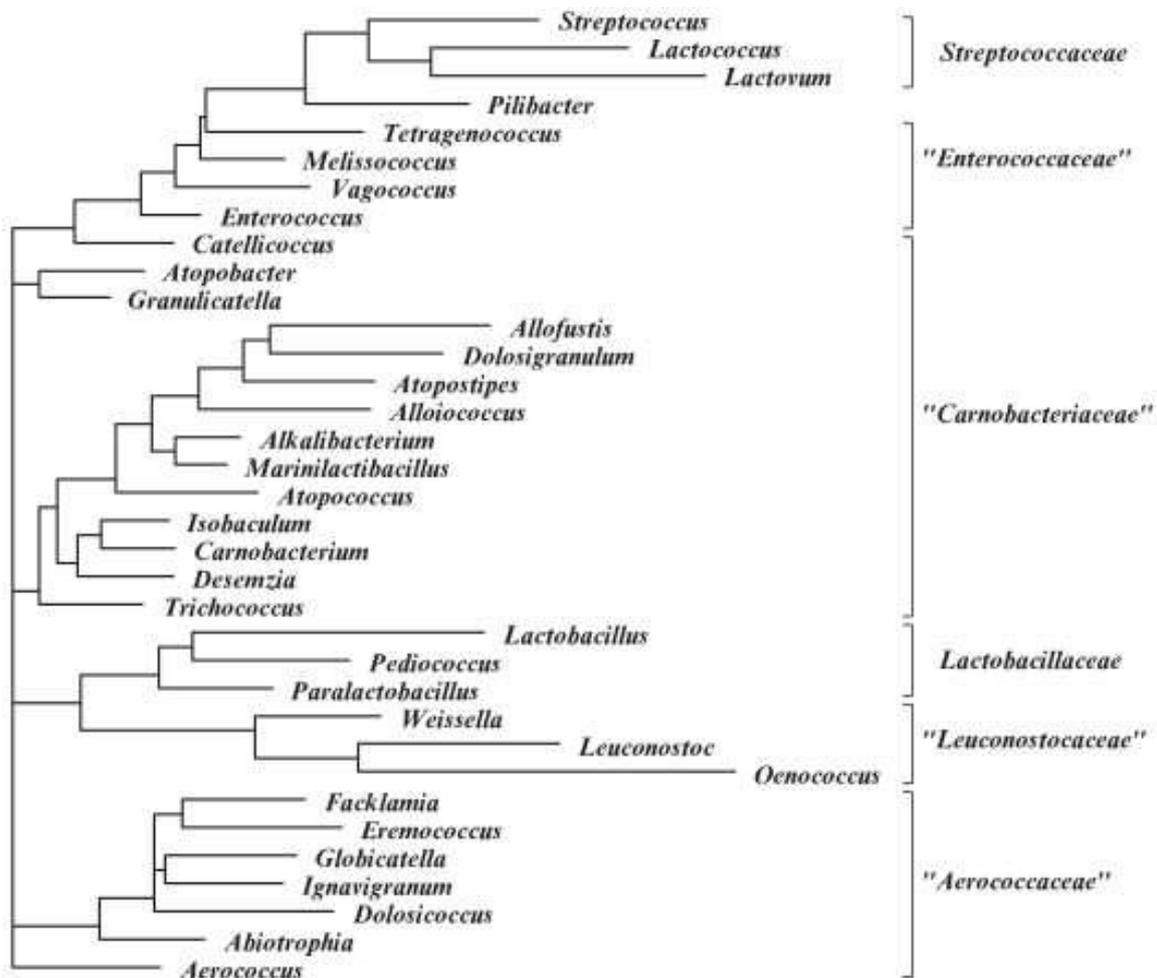


Figure 8. Classification phylogénétique des bactéries de l'Ordre des *Lactobacillales* (Ludwig et al. 2009).

Genre *Lactobacillus*

Les lactobacilles font partie du phylum des *Firmicutes*, de la classe des *Bacilli*, de l'ordre des *Lactobacillales* et de la famille des *Lactobacillaceae*. Ces bactéries ont une forme de bâtonnets qui sont souvent groupés en chaînettes (**Leveau et Bouix, 2007 ; Gálvez et al. 2008**). Les lactobacilles sont les bactéries majoritairement utilisées comme probiotiques, en particulier *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus rhamnosus*, car ces trois espèces offrent une bonne résistance à l'acidité gastrique et présentent une forte capacité d'adhérence aux cellules intestinales (**AFMO, 2007 ; Bernardeau et al. 2008**).

Genre *Streptococcus*

Les cellules de streptocoques sont des coques ou coccobacilles chimioorganotrophes (**Corrieu et Luquet, 2008**). Généralement groupées en paires et surtout en chaînes, de longueur variable. L'espèce thermophile *S. thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers), par son caractère non pathogène et ses propriétés probiotiques et technologiques (**Guiraud et Rosec, 2004 ; Iyer et al. 2010**).

Les bifidobactéries

Longtemps considérées comme des bactéries lactiques, les bifidobactéries sont phylogénétiquement très éloignées de ces dernières. Le genre *Bifidobacterium* appartient au Phylum des *Actinobacteria*, la Classe des *Actinobacteria*, la Sous-Classe des *Actinobacteridae*, l'Ordre des *Bifidobacteriales* et la famille des *Bifidobacteriaceae* (**The Universal Protein Resource. Bifidobacterium. UniProt. [En ligne] <http://www.uniprot.org/taxonomy/1678>**)

Les bifidobactéries sont des bâtonnets de morphologies variables dont la plus caractéristique est une forme en Y. ce sont des bactéries à Gram positif et présentant une organisation spatiale variable. En effet, elles peuvent être isolées ou s'assembler en chaînes ou amas. Immobiles et asporulantes, elles se développent en anaérobies (**Dellaglio et Felis, 2005**).

Les bactéries non lactiques

D'autres bactéries, dont le métabolisme est différent des précédentes, font également preuve d'intérêt en tant que probiotiques. Il s'agit notamment de la souche *Escherichia coli* Nissle 1917 et de bactéries sporulées dont *Bacillus subtilis*.

Le genre *Bacillus* constitue un ensemble très hétérogène de bactéries, tant sur le plan génétique que sur le plan métabolique. Il appartient au Phylum des *Firmicutes* et est retrouvé au sein de la Classe des *Bacilli*, dans l'Ordre des *Bacillales* et la famille des *Bacillaceae* (**The**

Universal Protein Resource. Bacillus. UniProt. [En ligne] <http://www.uniprot.org/taxonomy/1386>). Les bactéries du genre *Bacillus* stricto sensu se présentent sous forme de bâtonnets isolés ou associés par paires ou en chaînettes, voire sous forme de longs filaments. Leur coloration de Gram est variable (De Vos et al. 2009).

Les levures

Les levures sont très répandues dans la nature et plus de 500 espèces sont connues. Le genre *Saccharomyces* appartient au règne des *Fungi* qui rassemble tous les macro- et micromycètes. Ces levures sont des Ascomycètes de la Classe des *Saccharomycotina*, l'Ordre des *Saccharomycetes* et la Famille des *Saccharomycetales* (The Universal Protein Resource. *Saccharomycetaceae. The Universal Protein Resource. [En ligne]* <http://www.uniprot.org/taxonomy/4893>).

Grace à leurs facilités de culture et l'innocuité d'un grand nombre d'espèces de levure en ont fait les microorganismes les plus utilisés par l'Homme depuis des millénaires. La Levure de bière ou levure de boulanger, *Saccharomyces cerevisiae* est l'une des plus anciennes levures utilisées dans la production agroalimentaire (la fermentation alcoolique) et en boulangerie. Il existe une espèce proche, *Saccharomyces boulardii*, qui est, quant à elle, utilisée comme probiotique (Tableau 1) (Bernier, 2010).

Tableau 1. 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>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i>
<i>Bacillus</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>Saccharomyce</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. cerevisiae var boulardi</i>

5. Critères de sélection des souches probiotiques destinées à l'Homme

Le mode d'action des probiotiques est de mieux en mieux compris grâce à une approche pharmacologique (Marteau et Seksik, 2005). Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de véhiculer des principes actifs qu'ils contiennent jusqu'à leurs cibles d'action dans le tractus digestif (Marteau et Rambaud, 1998). Ils peuvent avoir des effets soit directs soit indirects en agissant via des modifications de l'immunité et de la flore. En effet Ils agissent en particulier en inhibant les bactéries indésirables, en neutralisant les produits toxiques, en améliorant la digestibilité de la ration alimentaire et en stimulant l'immunité. Ils sont également une source de vitamines (essentiellement du groupe B), et des sels minéraux assimilables (Robin et Rouchy, 2001).

Leur étude pharmacologique a trois objectifs : identifier les constituants actifs des micro-organismes en transit, décrire leur pharmacocinétique jusqu'aux cibles (survie, capacité d'adhésion et de colonisation, devenir des principes actifs) et démontrer les effets spécifiques bénéfiques ou néfastes (Figure 9) (Marteau et Rambaud, 1998).

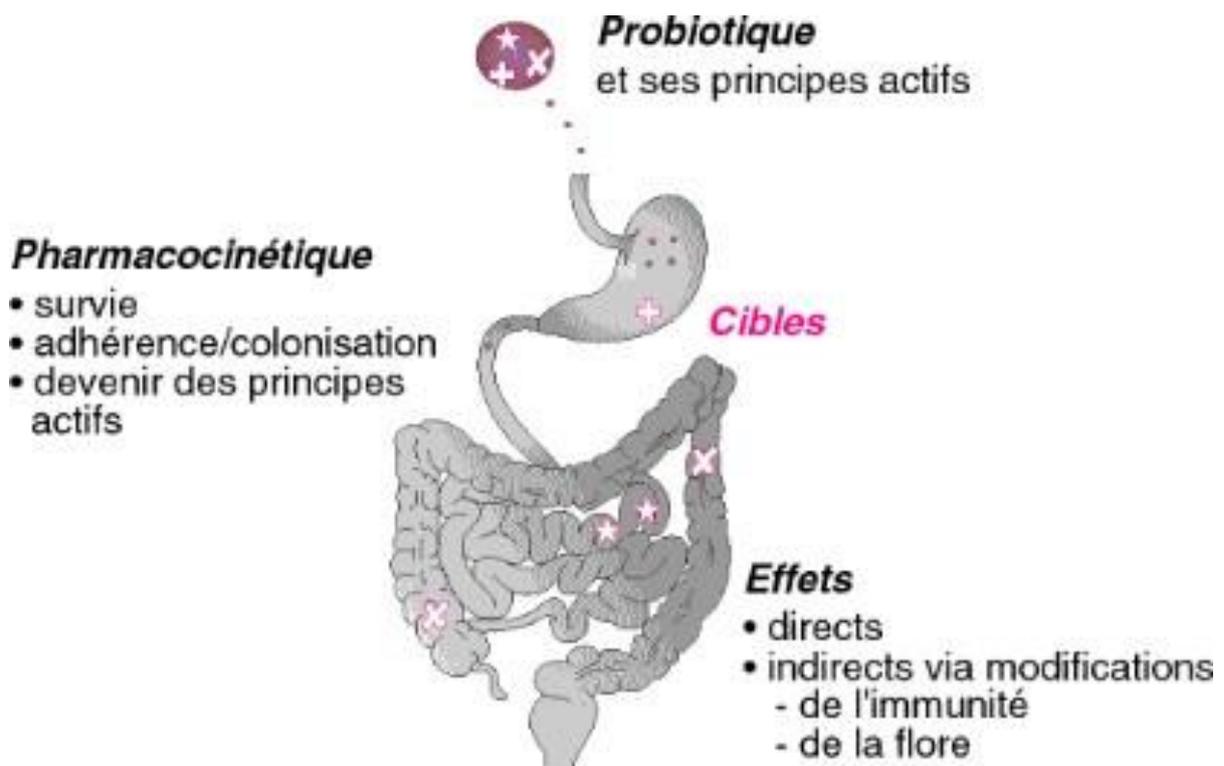


Figure 9. Approche pharmacologique des effets des probiotiques dans le tractus digestif (Marteau et Rambaud, 1998).

Pour être sélectionnées en tant que probiotiques chez l'Homme, les souches microbiennes doivent posséder certaines propriétés fonctionnelles, sécuritaires et technologiques (FAO/

OMS, 2001 ; FAO/OMS, 2002 ; Tannock, 2003 ; WGO, 2008 ; Vasiljevic et Shah, 2008).

Les différents critères de sélection sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2. Les différents critères de sélection des probiotiques

CRITERES FONCTIONNELS	<ul style="list-style-type: none"> - Tolérance à l'acidité et aux enzymes gastriques. - Tolérance à la bile et aux enzymes digestives. - Adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus gastrointestinal. - Production de substances antimicrobiennes et antagonisme vis-à-vis des pathogènes. - Effets sur la santé documentés. - Immunomodulation.
CRITERES DE SECURITE	<ul style="list-style-type: none"> - Souche pour l'usage humain d'origine humaine (isolée du tractus intestinal d'un homme sain) ou alimentaire (utilisée dans les produits fermentés). - Souche déposée dans une collection de cultures reconnue internationalement. - Souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques. - Historique de non pathogénicité. - Pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques
CRITERES TECHNOLOGIQUES	<ul style="list-style-type: none"> - Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini. - Conservation des propriétés probiotiques après production. - Non modification des propriétés organoleptiques du produit fini

Critères de Sécurité

Identification de la souche

Les souches probiotiques doivent être identifiées via des méthodes fiables de détermination du phénotype et génotype. Toutes les souches probiotiques doivent être déposées dans une collection de culture reconnue à l'échelle internationale. La souche bactérienne est alors identifiée par un code alphanumérique et est nommée selon les règles du code international de nomenclature des bactéries (Colarelli, 2010).

Inocuité

Un microorganisme probiotique doit présenter une totale innocuité pour le consommateur, c'est-à-dire être non toxique et exempt de toute pathogénicité (**World Gastroenterology Organisation Global Guidelines, “Probiotics and prebiotics.” 2008**). Pour chaque souche potentiellement probiotique, il faut étudier tout effet indésirable possible comme la résistance aux antibiotiques, les activités métaboliques nocives, la production de toxines, le potentiel infectieux, l'activité hémolytique. Une grande partie des microorganismes sont d'usage courant en agroalimentaire depuis des années. Leur consommation de longue date sans risque établi pour l'Homme est la meilleure preuve de leur sûreté. Il a alors été dressé une liste de souches historiquement sécuritaires : on parle de souches à statut QSP (Qualified Presumption of Safety) en Europe ou GRAS (Generally Recognized As Safe) aux Etats-Unis.

- **Profil d'antibiorésistance** : Il est important de s'assurer que la souche ne soit pas résistante aux antibiotiques et qu'elle ne pourra pas induire de résistance (transfert de gènes de résistance comme les plasmides ou transposons).
- **Substance antimicrobienne** : Les souches produisant des enzymes qui modifient chimiquement la structure des antibiotiques ou qui développent une antibiorésistance par mutation en présence du médicament ou qui produisent des substances antimicrobiennes sont interdites en utilisation probiotique.
- **Potentiel pathogène** : les microorganismes dont l'utilisation est peu répandue et qui n'ont pas de long historique d'utilisation doivent être testés pour évaluer leur potentiel pathogène et il faut démontrer que la souche est exempte de facteurs virulents et de toxinogénèse.
- **Activités métaboliques** : les souches produisant des métabolites (D-lactate, déconjugaison de sels biliaires..) qui peuvent causer des problèmes dans la physiologie humaine ne doivent pas être utilisées.

Origine

Les microorganismes comme n'importe quels autres êtres vivants sont bien adaptés à leur environnement spécifique. De plus la muqueuse intestinale et la microflore partagent des épitopes antigéniques communs sans doute responsable de la tolérance immunologique de l'hôte vis-à-vis de ses bactéries résidentes. Toutes ces raisons parlent en faveur d'une origine humaine comme facteur favorable pour une souche probiotique.

Critères fonctionnels

Survie au cours du transit digestif

Pour pouvoir exercer leur effet biologique, les probiotiques ingérés oralement, doivent atteindre l'intestin grêle et le colon vivants et en quantité suffisante (**Dann et Eckman, 2007**). Cela suppose qu'ils puissent résister à un certain nombre de barrières physiologiques, à la colonisation bactérienne digestive, parmi lesquelles la sécrétion d'acide gastrique, les acides biliaires, les peptides antimicrobiennes du mucus et ceux sécrétés par certaines cellules intestinales (immunoglobulines à sécrétaires, lactoferrine, lysozymes, etc.) (**Wehkamp et al., 2007**).

Adhésion aux cellules intestinales et/ou au mucus

La capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale est l'un des critères de sélection les plus importants. L'adhésion permet d'augmenter le temps de rétention des probiotiques dans l'intestin pour mieux résister aux mouvements péristaltiques intestinaux (**Izquierdo, 2009**). L'effet probiotique aura d'autant plus de chance d'être maximal que le microorganisme vivant séjournera longtemps dans le tube digestif. Selon plusieurs études pharmacocinétiques cliniques, la culture probiotique doit être continuellement ingérée pour qu'un effet probiotique exogène continu soit obtenu (**Marteau et Rambaud, 1998**).

L'adhésion des probiotiques au tractus digestif est spécifique de la souche, certaines présentant de bonnes capacités d'adhésion d'autres moins. Des méthodes *in-vitro* permettent d'évaluer les propriétés d'adhésion des probiotiques (**AFFSSA, 2005**).

Colonisation

Il est démontré que les probiotiques ne s'implantent pas, ils transitent dans le tube digestif jusque dans les selles, parfois sans avoir adhéré ou s'être multipliés (**Robin et Rouchy, 2001**). Les probiotiques colonisent donc temporairement le tractus digestif, leur persistance est plus ou moins longue de 2 à 20 jours selon les souches. Les souches ayant une durée de persistance élevée sont à privilégier. Une consommation régulière de probiotiques semble donc indispensable pour un effet bénéfique persistant (**AFFSSA, 2005 ; Marteau et Seksik, 2005**).

Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé

La plupart des souches faisant l'objet d'études sont sélectionnées en laboratoire pour leurs aptitudes fonctionnelles comme leur activité enzymatique, leur aptitude à moduler le système

immunitaire (AFFSSA, 2005). L'aptitude des probiotiques à produire des effets bénéfiques sur la Santé demeure encore délicate à évaluer *in vivo*. Il existe donc différents degrés de preuves à l'appui de la vérification de ces effets bénéfiques. Dans un premier temps, des études *in-vitro* efficaces doivent être conduites pour déterminer les effets bénéfiques potentiels des probiotiques sur la santé. Si les résultats sont convaincants, ils devront être confirmés par des essais cliniques randomisés chez l'Homme, en double aveugle contre placebo, menés sur des populations cibles en nombre suffisant pour être statistiquement significatifs.

Critères technologiques

Les caractéristiques des souches ne doivent pas être altérées durant les procédés de production du probiotique. Ainsi les souches probiotiques doivent rester stables lors de la conservation du produit et fournies en dosage approprié jusqu'à la date de péremption. Des études doivent donc être menées pour déterminer la date d'utilisation des produits à base de probiotiques sans diminution ou perte de leurs propriétés bénéfiques (AFFSSA, 2005).

6. Mécanismes d'actions des probiotiques

Les probiotiques font actuellement l'objet d'un certain consensus dans la communauté scientifique grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. Plusieurs mécanismes par lesquels certains probiotiques exercent des effets protecteurs ou thérapeutiques ont été proposés. Toutefois, ces modes d'action ne sont pas encore complètement élucidés. Parmi ces principaux mécanismes d'action, on retrouve le renforcement de la barrière intestinale, l'inhibition de l'adhésion des pathogènes à la muqueuse intestinale, la production de substances antimicrobienne et la modulation du système immunitaire.

Inhibition de l'adhésion des pathogènes : phénomène de compétition / exclusion

Les probiotiques exercent une action antimicrobienne directe en s'opposant à l'invasion des microorganismes pathogènes dans le tube digestif tout en empêchant leur adhésion aux parois intestinales (Vanderpool et al. 2008). En effet, il existe une compétition directe entre les souches probiotiques et les germes infectieux pour occuper les sites d'adhésion aux parois de l'intestin. Certains probiotiques ont une capacité d'adhérence au tube digestif et peuvent le coloniser de manière prolongée. Cette propriété pourrait constituer un avantage écologique favorisant leur implantation au niveau des parois intestinales et par conséquent, l'inhibition de la fixation des germes pathogènes.

Ainsi, les probiotiques jouent un rôle de barrière physique contre les microorganismes pathogènes. Ce phénomène a été observé chez certains lactobacilles qui adhèrent aux villosités intestinales et inhibent la fixation d'*Escherichia coli* entéropathogènes (**Roselli, Finamore et al. 2006 ; Collado et al. 2007**).

Production de substances antimicrobiennes

Les probiotiques pourraient également limiter la croissance des pathogènes en exercent une action antimicrobienne indirecte. Cette dernière se réalise grâce à la production de différents composés antimicrobiens.

Les bactériocines

Ce sont des composés protéiques qui ralentissent respectivement les invasions des souches bactériennes (**Klaenhammer, 1993**). Ces substances actives produites par les probiotiques sont dirigées contre des bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice. Elles agissent principalement sur la membrane externe des bactéries cibles en formant des pores qui mènent à la libération du contenu intracellulaire et à la mort de la bactérie affectée. Les lactobacilles et les lactocoques, contrairement aux souches de bifidobactéries, sont le plus souvent associés à la production de bactériocines (**Fooks et Gibson, 2002**). La nisine, qui est produite par la bactérie *Lactococcus lactis*, est la bactériocine la plus documentée.

Les acides organiques

Les bactéries probiotiques ont la capacité de produire des acides organiques qui contribuent à l'inhibition de la croissance des microorganismes entérovirulants (**Servin, 2004**). Il s'agit de l'acide lactique et l'acide acétique, qui sont produits respectivement par les lactobacilles et les bifidobactéries via la fermentation des hexoses. Ces acides organiques, produits à partir de glucides ingérés lors de la prise alimentaire, contribuent à faire baisser le pH intestinal. Leur diffusion passive à travers la membrane bactérienne sous leur forme non dissociée permet, après leur dissociation, d'acidifier le cytoplasme et donc d'inhiber la propagation, la croissance et la survie des agents pathogènes acido-sensibles.

Le peroxyde d'hydrogène

Certaines bactéries lactiques produisent, en milieu humide, du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui inhibe de nombreuses souches bactériennes pathogènes (**Ouwehand et Vesterlund, 2004**). La production du peroxyde d'hydrogène accompagnée par celle d'acide lactique permet l'inhibition du développement de certaines espèces pathogènes comme certains

virus tel que le virus de la fièvre aphteuse, certains champignons comme *Candida albicans*, ou encore certaines bactéries comme *Escherichia coli*, etc.

Stimulation et modulation de l'activité du système immunitaire intestinale

L'interaction des probiotiques avec le système immunitaire permet d'accroître la réponse immune de l'hôte contre les agents entéropathogènes. En effet, les probiotiques interviennent dans la stimulation de l'immunité adaptative, tel que la production des anticorps de type IgA (Shu et Gill 2002), ainsi que l'immunité innée tel que la production des macrophages, des monocytes, etc (Oelschlaeger, 2010). Par conséquent, les probiotiques agissent comme des adjuvants en modulant une réponse rapide de la muqueuse intestinale et renforçant ainsi le système immunitaire intestinale. En colonisant temporairement le tube digestif, les probiotiques sont séparés du système immunitaire intestinal local par la barrière épithéliale. Ils peuvent communiquer avec les cellules de la lamina propria soit indirectement en envoyant des signaux aux entérocytes via des cytokines, soit directement par contact, en cas de translocation vers la lamina propria et les ganglions mésentériques. Les probiotiques peuvent aussi libérer des composés dans la lumière intestinale, qui sont susceptibles d'être absorbés par l'épithélium intestinal et d'agir sur les cellules immunitaires (Bocle et Thomann, 2005).

Renforcement de l'effet barrière de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal joue un rôle indispensable dans la défense et la protection du tube digestif. En effet, il constitue une véritable barrière continue permettant d'empêcher l'invasion de la flore entérique ainsi que les différents constituants du lumen dans l'organisme (Groschwitz et Hogan 2009). Cependant, certains événements endogènes ou exogènes peuvent altérer les fonctions protectrices de cette barrière entraînant le passage des micro-organismes à travers la muqueuse intestinale et ainsi le déclenchement des réactions inflammatoires et des troubles intestinaux (Hooper et al. 2001). Plusieurs études ont démontré que les probiotiques sont impliqués dans le renforcement et le maintien de la barrière intestinale en favorisant une meilleure intégrité de la muqueuse intestinale. La fonction de barrière de la muqueuse intestinale est médiée par l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le fonctionnement des jonctions serrées de l'intestin (Anderson et al. 2010). Les probiotiques augmentent également la fonction de barrière de la muqueuse intestinale en favorisant la production de mucus et de certains anticorps de type IgA (Ohland et MacNaughton, 2010).

Chapitre III

Les maladies du tube digestif peuvent être nombreuses et avoir différentes origines. Des modifications de la composition du microbiote intestinal pourraient être impliquées dans certaines maladies comme des diarrhées mais aussi certains cancers, des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (**Goulet, 2009**). D'autres pathologies comme les ulcères, la cholécystite, les sigmoïdites peuvent résulter de la colonisation par des bactéries pathogènes.

À l'instar des microorganismes composant le microbiote intestinal, les probiotiques sont nombreux et très différents les uns des autres. Leurs constitutions génétique et phénotypique leur confèrent des caractéristiques propres qui influent sur leurs effets *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, chaque genre, chaque espèce et a fortiori chaque souche est responsable d'effets biologiques spécifiques, qu'il n'est pas possible d'extrapoler aux autres souches proches sans les avoir préalablement étudiés.

1. Diarrhées

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la diarrhée est définie comme l'émission d'au moins trois selles molles ou liquides par jour, ou à une fréquence anormale pour l'individu. Selon sa durée, elle est considérée comme aiguë lorsqu'elle dure moins de quatorze jours, persistante entre quatorze et vingt-huit jours et chronique au-delà. La diarrhée aiguë est généralement le symptôme d'une infection gastro-intestinale, qui peut être due à divers microorganismes bactéries, virus ou parasites. Elle peut aussi avoir une origine médicamenteuse et est notamment souvent associée à la prise d'antibiotiques (**Isolauri et al. 1991 ; Allen et al. 2010**).

Gastroentérites aiguë

La diarrhée aiguë d'origine infectieuse, ou gastro-entérite, est une affection très fréquente et constitue un vrai problème de santé publique. L'infection peut être d'origine bactérienne, virale ou parasitaire et se transmet généralement de façon interhumaine par voie manuportée ou par consommation d'eau ou d'aliments contaminés. Des modifications de l'équilibre de la flore commensale colique ont été mises en évidence au cours des diarrhées infectieuses. Une augmentation des taux de bactéries aérobies et une diminution concomitante des taux de bactéries anaérobies (en particulier *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Bacteroides*). Ces modifications globales semblent univoques quel que soit l'agent pathogène incriminé : Elles mettent en cause les bactéries des genres *Salmonella* et *Shigella*, ainsi que *Campylobacter*

Chapitre III. Probiotiques et Pathologies digestives infectieuses

jejuni, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* ou *Escherichia coli*. (Booth et Mcneish, 1993 ; Klotz, 2001).

Diarrhée de voyageur

La diarrhée du voyageur, ou «turista », est classiquement définie par la survenue brutale, au cours du séjour ou dans les sept à dix jours suivant le retour, d'au moins trois selles non moulées par jour, accompagnée de symptômes tels que des douleurs abdominales, des nausées et/ou des vomissements et de la fièvre. Le plus souvent il s'agit d'un évènement bénin, spontanément résolutif en un à trois jours, mais particulièrement inconfortable et désagréable en voyage. Dans les cas de diarrhées du voyageur, plusieurs agents infectieux peuvent être en cause. Toutefois, l'origine est bactérienne dans 50 à 80 % avec des germes incriminés tel qu'*Escherichia coli*. La contamination est de type féco-oral ; les deux principaux vecteurs étant l'alimentation et l'eau de boisson (Buxeraud, 2008).

Utilisation des probiotiques dans les gastro-entérites

Les probiotiques ont une place majeure dans l'accompagnement des traitements contre les gastro-entérites infectieux. Ils vont permettre de restaurer les propriétés de la flore intestinale, d'éviter la colonisation de germes pathogènes grâce à leur effet barrière. L'efficacité de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei* DN-114 001, et *Saccharomyces cerevisiae* a été prouvé dans la réduction de la sévérité et de la durée des diarrhées infectieuses aiguës (Guandalini et al. 2000 ; Marteau et Seksik, 2005 ; WGOGPP, 2011). Seules quelques études ont été réalisées dans le cadre du traitement curatif de la diarrhée du voyageur par des probiotiques et ceux-ci n'ont pas montré d'efficacité notable dans ce cas. En revanche, différents probiotiques ont démontré un réel intérêt en prévention de la diarrhée du voyageur (Nihal et al ,2015)

Le meilleur résultat a été obtenu avec un mélange de probiotiques par l'équipe de Black sur des touristes danois en Egypte. L'administration de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Saccharomyces thermophilus* et de bifidobactéries a permis une réduction des diarrhées significative en passant de 43% contre 71% sans supplémentation (Carre et al .2005). En s'appuyant d'autres études cliniques, l'utilisation prophylactique des probiotiques parvient à la conclusion que des doses quotidiennes de probiotique (*Saccharomyces boulardii* ou d'un mélange de *Lactobacillus rhamnosus* GG et *Bifidobacterium bifidus*), offrent une protection contre la diarrhée de voyageur (Marteau et al.

2001 ; Mimura et al. 2004) en tenant compte les facteurs qui peuvent influencer l'efficacité (Mcfarland, 2007).

2. Infection à *Clostridium difficile* et diarrhées post-antibiotiques

Clostridium difficile est une bactérie anaérobie commensale du tube digestif de l'Homme : environ 5 % des adultes et 50 à 70 % des nourrissons de moins de deux ans sont porteurs sains. Il en existe deux souches différentes : l'une non toxigène et l'autre toxigène, pathogène. Cette dernière produit une entérotoxine A responsable de l'inflammation de l'épithélium intestinal et une cytotoxine B qui augmente la perméabilité de la muqueuse digestive (EL Anbassi et al. 2013).

Les traitements antibiotiques sont fréquemment responsables de modifications du transit intestinal. De nombreuses molécules sont à l'origine de diarrhées, notamment lorsque leur concentration intestinale est élevée et lorsque leur spectre d'action inclut les entérobactéries et les bactéries anaérobies (Carre, 2004). C'est le cas des bêta-lactamines (pénicillines et céphalosporines) et des cyclines. Le microbiote digestif s'en retrouve perturbé (Wenisch et al. 1996). De plus, l'effet barrière n'est plus assuré et le tube digestif devient vulnérable à la colonisation par les pathogènes tels que le *Clostridium difficile* toxigène (Ticinesi et al, 2015).

La susceptibilité à l'infection par *Clostridium difficile* dépend généralement d'une dysbiose très prononcée, avec une réduction du nombre d'espèces du microbiote et de la complexité microbienne et des changements profonds dans la composition globale de celui-ci (Antharam et al. 2013 ; Milani et al. 2016). En outre, la colite à *C. difficile* est associée à une représentation réduite des bactéries capables de métaboliser les acides biliaires, ce qui entraîne une mauvaise régulation du cercle entéro-hépatique de ces substances (Milani et al, 2013). Les altérations du milieu de la lumière gastro-intestinale qui en résultent favorisent l'expansion des populations toxigènes de *C. difficile*. Un rôle supplémentaire pourrait être joué par les médicaments non antibiotiques, tels que les inhibiteurs de la pompe à protons (IPP), qui ont un effet reconnu de modification de la composition du microbiote intestinal et sont liés à un risque accru de colite à *C. difficile* dans certaines études (Corsonello et al. 2018).

C. difficile toxigène cause des diarrhées post-antibiotiques modérées à sévères. La forme modérée est la plus fréquente et se traduit par une diarrhée isolée, apyrétique, cessant en deux à trois jours après arrêt de l'antibiothérapie en cause. La colite pseudo-membraneuse est une forme plus sévère de l'infection qui se manifeste dans les sept jours suivant le début du

traitement antibiotique, par une diarrhée liquide abondante et non sanglante, accompagnée de fièvre et de douleurs abdominales (**EL Anbassi et al. 2013**).

Utilisation des probiotiques dans l'infection à *Clostridium difficile*

L'utilisation de probiotiques dans la prévention des diarrhées associées aux antibiotiques a été étudiée dans de nombreux travaux. La souche la plus documentée est la levure *Saccharomyces boulardii*. Plusieurs essais randomisés en double aveugle contre placebo ont été effectués pour évaluer l'efficacité de cette levure dans la prévention des diarrhées aux antibiotiques avec des dosages variables en probiotiques et des antibiotiques différents (**Szajewska et al. 2005**).

L'intérêt de *S. boulardii* lyophilisé a été confirmé (**Buts et al. 1993 ; Kotowska et al. 2005**) qui ont montré que le traitement simultané d'enfants placés sous antibiotiques permet de prévenir la diarrhée associée à l'antibiothérapie et la négativation de la toxine du *C. difficile*. Des preuves ont été obtenues avec *Lactobacillus rhamnosus* GG, et l'essai randomisé double aveugle (**Arvola et al. 1999 ; Vanderhoof et al. 1999**) portait sur des enfants recevant des antibiotiques pour des infections avaient aussi moins de diarrhée que ceux recevant le placebo.

3. Infection à *Helicobacter pylori*

Reconnue comme agent cancérogène par l'OMS, l'infection par *Helicobacter pylori* est retrouvée dans 80 à 90% des ulcères gastriques et duodénaux. Peut survivre dans le milieu gastrique par ses pouvoirs tampons et activité uréase, son mode de contamination par voie oro-orale ou oro-fécale, spécifique à l'homme (**Emilie, 2018**). Son évolution se fait par des poussées, elle peut être entièrement asymptomatique puisque la moitié des sujets atteints par l'*Helicobacter pylori* n'ont pas (**Bultel, 2017**). Une lésion au niveau de la muqueuse engendrent de la douleur épigastrique (**Bouarioua, 2007**), elle peut s'accompagner d'hémorragie, de perforation ou même de sténose.

Le traitement d'éradication d'*H. pylori* (Trithérapie Classique) est bien établi, mais il n'est efficace que dans environ 80% inclut la prise de plusieurs antibiotiques qui peut entraîner des effets indésirables qui entraînent une mauvaise observance et donc une baisse d'efficacité de type diarrhée, nausées/vomissements ou encore infections à *Clostridium difficile*, notamment en raison des perturbations du microbiote intestinal et de la gorge. (**Wang et al. 2017**).

Utilisation des probiotiques dans l'infection à *Helicobacter pylori*

Plusieurs bactéries lactiques produisent des effets inhibiteurs *in vivo* et *in vitro* sur *Helicobacter pylori*. Cet effet a pu être obtenu avec des bactéries vivantes ou tuées par la chaleur. Cependant, l'éradication n'a jamais été obtenue (**Felley et al. 2001 ; Mercenier et al. 2003**).

En 2009, une étude sur l'efficacité des probiotiques pour aider à guérir cette infection a montré que les bactéries lactiques de laits fermentés (lactobacilles et bifidobactéries), combinées à la trithérapie classique, augmentent de 5 % à 15 % les chances de guérison (**Sachdeva et Nagpal, 2009**). D'autre, a conclu que les lactobacilles améliorent non seulement le taux de réussite du traitement classique, mais qu'ils atténuent aussi ses effets indésirables (**Zou et al. 2009**). Très récemment, une récente étude de Buckley et al (2018) sur l'effet de la supplémentation en *Lactobacillus reuteri* dans l'infection à *Helicobacter pylori* a démontré le potentiel de supprimer l'infection et peut conduire à une amélioration des symptômes gastro-intestinaux associés à *H. pylori*.

4. Entérocolite nécrosante

L'entérocolite nécrosante est une maladie gastro-intestinale qui touche principalement des enfants prématurés et de faible poids. Elle se caractérise par une inflammation intestinale aiguë et chronique qui peut amener à terme à une perforation intestinale ou même à une ischémie avec un risque de décès (**Gregory et al. 2011**)

Les nouveau-nés atteints d'entérocolite nécrosante auront également des troubles cliniques exprimés surtout au niveau intestinal (**Sharma et al. 2013**). Des signes intestinaux sont marquants : Augmentation des résidus gastriques, vomissements, selles sanglantes, Abdomen brillant, voire même présence d'un abdomen bleu en conséquence de la perforation intestinale... Chez les enfants prématurés atteints d'entérocolite nécrosante, un déséquilibre de la flore intestinale, responsable de la physiopathologie a été signalé avec une abondance remarquable des entérobactéries et le *Clostridium* (**Smith et al. 2011 ; Heida et al. 2017**). Il a été prouvé que *Cronobacter sakazakii* est un agent pathogène retrouvé dans les cas d'entérocolite nécrosante, c'est un bacille Gram négatif, anaérobie facultative (**Hunter et al. 2013**). Certaines souches de *Clostridium butyricum* se retrouvent dans l'intestin humain d'hôte sont la cause de pathologies notamment de l'entérocolite nécrosante. En effet des analyses, on met en évidence une lignée clonale de souches de cette bactérie (**Benamar et al. 2017**). Des recherches ont été menées afin de connaître le mécanisme d'action de cette bactérie dans cette pathologie. Ainsi il a été découvert qu'il y aurait une entérotoxine bactérienne qui permettrait

d'augmenter la virulence et la translocation à travers l'intestin. Ainsi la bactérie *Cronobacter* adhère aux cellules épithéliales de l'intestin provoquant la destruction de la barrière intestinale, ce qui déclenche une réponse inflammatoire avec la production de cytokines.

Utilisation des probiotiques dans l'infection d'entérocolite nécrosante

Les probiotiques sont connus depuis longtemps comme efficaces pour réduire la symptomatologie et l'incidence de l'entérocolite nécrosante chez les enfants prématurés en améliorant la flore intestinale (**Pammi et al. 2017**). Il existe de nombreuses espèces de probiotiques, mais dans le cadre de la prévention de l'entérocolite nécrosante, ce seront principalement les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* qui seront utilisés.

Les premières études réalisées pour mettre en évidence une diminution de l'incidence de l'entérocolite nécrosante chez les enfants prématurés par des probiotiques datent d'il y a une vingtaine d'année en Colombie. Celles-ci consistaient à administrer des probiotiques (*Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium infantis*) de manière préventive à des enfants nés en unité de soins intensifs en néonatalogie et de comparer l'évolution clinique de ces enfants à un groupe témoin (**Hoyos et al. 1999**). Les résultats obtenus au bout d'un an ont montré une nette diminution de l'incidence de l'entérocolite et une diminution de la mortalité.

Les scientifiques ont essayé d'autre part de mettre en évidence les souches les plus efficaces de probiotiques et la manière de les utiliser (souche unique ou combinaison de différentes souches). Les résultats ont permis de mettre en évidence qu'une combinaison de souches de (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Saccharomyces*) ont moins de risque de développer une entérocolite nécrosante et il semblerait que *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium infantis* soient les souches les plus efficaces et les plus utilisées dans la prévention de l'entérocolite nécrosante (**Chang et al. 2017**).

Matériel
et
Méthodes

1. Objectifs du travail

L'être humain est un porteur d'un microbiote spécifique composé en partie de bactéries lactiques (BL). Ces dernières sont censées être bénéfiques pour l'hôte. Notre travail sur le microbiote intestinale et l'effet probiotique chez l'homme a été initié pour avoir plus de connaissances afin d'établir de nouvelles voie thérapeutiques des maladies associées aux déséquilibre intestinale. La présente étude vise à isoler et identifier des BL du microbiote humain, ainsi que l'étude de l'exploitation possible de ces bactéries. Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie appliquée de la faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie (université de Tébessa) à fin de :

- Isoler et identifier des bactéries lactiques du lait maternel et de la matière fécale des nouveaux nés.
- L'étude des activités antibactériennes des BL isolées à l'égard des bactéries pathogènes pour déterminer leur potentiel antagoniste.
- Exposition des souches lactiques isolées aux différents tests de sélection des souches à pouvoir probiotiques.

2. Réactif et produits

Milieux de culture

Des milieux ordinaires, enrichies et sélectifs ont été utilisés pour isolement, l'identification des bactéries lactique ainsi que pour les différents tests associés aux cultures sur milieu liquide (**Annexes 1**).

- La gélose **MRS (Man, Rogosa et Sharp)** additionnée à 0.001 % de vert de bromocrésol préconisée pour pour le dénombrement, l'isolement, identification des bactéries lactiques.
- Le bouillon **MRS (Man, Rogosa et Sharp)** a été utilisé pour l'enrichissement et la revivification des souches lactique.
- La gélose **M17** est un autre milieu sélectif destiné à l'isolement et le dénombrement des bactéries lactiques.
- La gélose **PCA (plate count agar)**, est un milieu permettant la culture des bactéries peu exigeantes préconisé pour le dénombrement des germes totaux.
- Le bouillon **BHI (coeur-cervelle / Brain Heart Infusion)** additionné à 10 g/l d'agar, un milieu polyvalent riche a été utilisé pour l'étude du pouvoir antagoniste. Il peut aussi servir aussi pour l'enrichissement et la revivification des souches pathogènes teste.

- Le **bouillon nutritif** est un milieu à usage général utilisé pour la culture d'une grande variété de microorganismes non fastidieux dont les besoins nutritionnels sont inexistantes. Ce milieu a été utilisé pour le repiquage et l'enrichissement des souches pathogènes.
- La gélose de **Mueller-Hinton** est le milieu de référence pour les tests de sensibilité des germes aux antibiotiques. Sa formulation est conforme aux recommandations internationales pour l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques.
- La gélose **Sabouraud** constitue un milieu classique pour la culture, l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes. Ce milieu a été utilisé pour l'étude de l'activité antifongique des bactéries lactique.

Réactifs et autres produits

- Disques d'antibiotiques : Chloramphénicol 30ug, Ciprofloxacine 5ug, Ceftazidime 30ug, Imipenem 10 ug, Amikacine 30ug, rifamycine 30ug, Amoxicilline / acide clavunalic 20/10 ug, Acide fusidique 10 ug, Vancomycine 30ug.
- L'eau oxygénée à 10V, 35V.
- Violet de gentian.
- Lugol.
- Ethanol.
- Fushine.
- Solution NaOH (1N).
- NaCl.
- Solution HCl.
- Sels biliaires.
- La pepsine.
- L'amidon.
- La gélatine.
- Le Crystal violet 1%.
- Phénolphtaléine 1%.
- Lait écrémé
- L'eau physiologique stérile.
- Réactif de Frazier.
- Le xylène.
- La galerie API 20 E.
- Les réactifs VPI et VPIL.
- Réactifs de KOVACS.
- Réactif TDA.

3. Matériel utilisé (Annexe 2)

4. Méthodes

Échantillonnage

Les échantillons ont été prélevés au niveau de l'hôpital Khaldi Abdelaziz (la maternité) wilaya de Tébessa. Un questionnaire structuré des participants ainsi que la nature et l'aspect des prélèvements a été établi (**Annexe 3**).

Les échantillons du colostrum (**8 prélèvements**) à raison de 1 à 4ml ont été recueillis aseptiquement par expression manuelle dans des pots stériles. Le sein de la maman doit être nettoyé à l'eau stérile puis essuyés avec une gaze stérile contenant du gel antiseptique/alcool et les premiers jets sont éliminés.

Les échantillons des matières fécales (**7 prélèvement**) des nouveaux nés âgés de quelques heures, ont été prélevés à l'aide des écouvillons stériles. L'ensemble des prélèvements ont été acheminés immédiatement au laboratoire pour l'analyse microbiologique.

Énumération de la flore bactérienne autochtone

Préparation des dilutions

Dans le but d'énumérer la flore bactérienne présente dans les échantillons, des séries de dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-7} ont été préparé à partir des solutions mères homogénéisées par vortex pour l'ensemble des échantillons à raison de 100µl de colostrum dans 900µl de l'eau physiologique stérile, et 1g de matière fécale introduite dans 9ml de l'eau physiologique stérile, respectivement.

Dénombrement de la flore bactérienne

Le dénombrement de la flore bactérienne avait pour but la mise en évidence de la présence de la flore endogène (lactique et totale) dans les échantillons (**Jiwoua et Millière, 1990**). Le dénombrement de la flore totale des la solution mère et ces dilutions s'effectue sur le milieu de culture PCA (plate count agar). Les boîtes sont incubées en aérobiose à une température de 30°C pendant 48 heures (**Cheriguene et al. 2007 ; Eleftherios et al. 2007**).

Le dénombrement de la flore lactique s'effectue sur les milieux de culture MRS (Man, Rogosa et Sharp) et M17 additionnés du vert de Bromocrésol (0.001%). L'ensemencement a été réalisé par dépôt de 10µl de chaque dilution sur la gélose préalablement coulée et solidifiée. Ensuite, les boites ont été incubées à 37°C en condition d'aérobiose pour la flore totale et en anaérobiose pour la flore lactique pendant 48-72 heures (Figure 10).

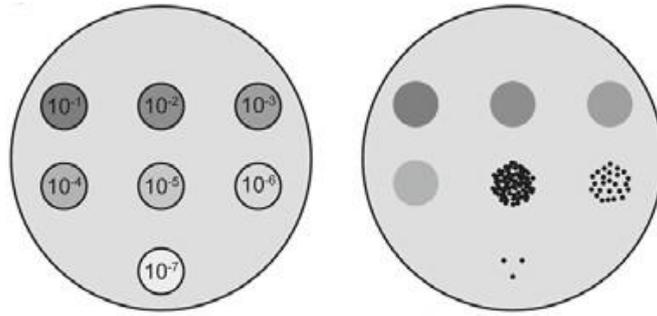


Figure 10. Méthode d'ensemencement par spots

Après incubation les colonies ont été comptées pour chaque dilution pour déterminer le nombre d'UFC/ml pour le colostrum et d'UFC/g pour la matière fécale en utilisant la formule suivante :

$$N = \frac{\sum \text{colonies}}{V_{mL} \times (n_1 + 0,1n_2) \times d_1}$$

- N : nombre d'UFC par gramme ou par ml de produit initial ;
- $\sum \text{colonies}$: sommes des colonies des boîtes interprétables ;
- V_{mL} : volume d'inoculum déposé (10 μ l) ;
- n_1 : nombre de boîtes utilisées à la première dilution retenue ;
- n_2 : nombre de boîtes utilisées à la seconde dilution retenue ;
- d_1 : facteur de la première dilution retenue.

Isolement et purification

Les colonies ont été sélectionnées selon leur aspect morphologique (observation macroscopique) à l'aide d'une loupe binoculaire, puis isolées et repiquées de façon alternée sur milieu solide MRS jusqu'à purification. La pureté des souches doit être impérativement contrôlée et vérifiée par observation macroscopique et microscopique à l'état frais et après coloration de Gram.

Pré-identification des isolats lactiques

Aspect macroscopique

L'observation macroscopique des colonies obtenues sur la gélose MRS nous ont permis de déterminer la morphologie générale (taille, forme, aspect, et couleur) (**Badis et al. 2005**).

Aspect microscopique

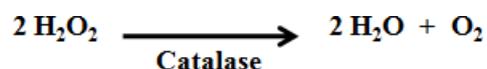
Il est basé sur la coloration de Gram des frottis réalisés à partir des colonies pures, et observation sous microscope optique à immersion avec un grossissement x100. Cette

observation permet de mettre en évidence les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, la forme, et le mode de regroupement (**Mostefaoui et al. 2014**). Les bactéries lactiques fixent le violet de gentiane, elles sont Gram positif et donc donnent une couleur violette.

Détermination des caractères biochimiques

Recherche de la catalase

La présence d'une catalase, enzyme capable de dégrader l'eau oxygénée, se manifeste par l'apparition des bulles d'oxygène abondantes dans l'émulsion (**Stiles et Holzapfel, 1997**). La réaction biochimique réalisée est la suivante :



La recherche de l'enzyme catalase consiste à mettre dans une lame stérile une goutte d'eau oxygénée stérile, dans laquelle sera émulsionnée une colonie d'une souche à tester. Cette dernière est définie comme catalase positive s'il y a l'apparition des bulles d'air. Généralement les bactéries lactiques sont catalase négatives.

Recherche de type fermentaire

Ce test permet de différencier entre les bactéries lactiques homofermentaires et hétérofermentaires (production de CO₂). Chaque souche a été ensemencée dans un tube contenant 10ml de bouillon MRS (Man, Rogosa et Sharp) additionné d'une cloche de Durham. Après incubation en anaérobiose à 37 °C pendant 48h, le CO₂ produit par les souches hétérofermentaires s'accumule dans les cloches de Durham (**Badis et al. 2004**).

Assimilation des sucres

L'étude du profil de fermentation des glucides et les tests enzymatiques, permet l'identification des espèces bactériennes, alors on a utilisé le dispositif commercialisé de la galerie miniaturisée API 20E (BioMérieux). Le système API20 E® BioMérieux (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries. Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la micro-galerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs.

Étude des aptitudes probiotiques des bactéries lactiques isolées

Étude du pouvoir antagoniste des bactéries lactiques

Les différentes méthodes décrites pour la détection des métabolites à activité antimicrobienne des bactéries lactiques sont basées sur le principe que ces substances peuvent diffuser dans un milieu de culture solide ou semi solide qu'on inocule préalablement avec la souche cible. La production de ces substances est détectée par le pouvoir inhibiteur du filtrat de la bactérie lactique testée sur la croissance du germe cible (**Labioui et al. 2005**).

Méthode des spots

La sélection des souches de bactéries lactiques ayant une activité antibactérienne à partir du colostrum et selles des nourrissons a été réalisée par le procédé d'antagonisme différé en utilisant la méthode des spots dite sur tapis cellulaire (**Fernández et al. 2007**). Les boîtes de Petri ont été pré remplies avec la gélose MRS (solidifiée et séchée), 5µl de la suspension bactérienne de chaque souche lactique ont été déposés en spots. Les boîtes sont séchées puis incubées à 37°C pendant 24h. Après la période d'incubation, les boîtes ont été recouvertes de 10 ml de la gélose BHI (Brain Heart Infusion) semi solide en surfusion,ensemencée avec 100µl de la culture jeune de la bactérie pathogène (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Listeria* sp.), puis incubée à 37°C pendant 24h. Au terme de la période d'incubation, la présence ou l'absence de zones d'inhibition autour des spots a été mesurée et notée.

Tests de survie des bactéries lactiques

Pour que les souches probiotiques exercent leur effet bénéfique pour l'hôte, elles doivent être capables de survivre préparation alimentaire et au cours de leur passage dans le tube digestif, spécifiquement la résistance au pH acide de l'estomac et les sels biliaires (**Maragkoudakis et al. 2006**).

Résistance aux différentes concentrations de NaCl

Les souches sélectionnées ont été ensemencées à raison de 50 µl dans des bouillons MRS (1ml) additionnés de 4% et 6.5% et 10% de NaCl. Une série de cultures témoins a été préparée en parallèle contenant le bouillon MRS sans sel inculée de 50µl de chaque souche teste. L'incubation a été faite à 37 °C pendant 48h en anaérobiose (**Badis et al. 2005**). L'aptitude à

croître dans ces différentes concentrations de sel a été évaluée par mesure de l'absorbance à 600 nm après 48h.

Résistance aux sels biliaires et au pepsine

Trois séries d'éppendorfs contenant 1 ml de MRS additionné de 0.3% de sels biliaires et de pepsine à 0.3% pH2 ont étéensemencées par 50µl de la solution bactérienne jeune de chaque souche, la quatrième série de MRS sert comme témoin. La survie des cellules en présence de la bile et la pepsine a été évaluée par la mesure de l'absorbance à 600 nm à T₀ = 0h (première série), T₁ = 4h (deuxième série) et T₂ = 24h (troisième série) d'incubation à 37 °C en anaérobiose.

Résistance aux différents pH

Pour étudier l'influence du pH sur la croissance des souches isolées, deux milieux de MRS bouillon ont été préparés à différents pH (2 et 9), 1ml de ces milieux a étéensemencé par 50µl de la solution bactérienne jeune de chaque souche. Le témoin (MRS PH7) a été préparé en parallèle. La croissance des souches a été suivie par la mesure de la densité optique à 600nm à différents intervalles de temps, T₀ = 0h, T₁ = 4h et T₂ = 24h après incubation à 37°C en anaérobiose.

Analyse des caractères de surface cellulaire

a. Hydrophobicité de la surface cellulaire

La capacité de la surface cellulaire de BL à adhérer à des composés hydrophobes a été évaluée selon la méthode rapportée par **Todorov et Dicks (2008)**. Les souches de BL de 24heures ont été centrifugées (6000rpm pendant 6 minutes), lavées deux fois avec de l'eau physiologique stérile et mises en suspension dans la même solution. La DO₀ des suspensions a été mesurée à 600nm. Une suspension cellulaire de BL (1,5 mL) a été ajoutée à 1,5 mL de Xylène et agitée au vortex pendant 2 minutes. Les phases aqueuse et organique ont été laissées se séparer à température ambiante pendant 30 minutes. Ensuite, une quantité de 1 mL de la phase aqueuse a été prélevée pour déterminer la DO₃₀ à 600nm.

Le pourcentage d'hydrophobicité a été déterminé par l'équation suivante :

$$\% \text{ d'hydrophobie} = [(DO_0 - DO_{30}) / DO_0] \times 100,$$

- DO₀ : la DO initiale
- DO₃₀ : désigne la valeur de la DO mesurée après 30 minutes.

b. Test de l'auto agrégation

Ce test a été réalisé selon **Todorov et al. (2011)**. Après centrifugation à 6000 rpm pendant 10 minutes des cultures jeunes de 24h des souches lactiques isolées, les cellules ont été récoltées, puis lavées deux fois, et resuspensionnées dans de l'eau physiologique stérile à 0.9%. La densité optique des suspensions cellulaires a été mesurée à une longueur d'onde de 600nm, puis incubés en anaérobiose à 37 °C pendant t=1h (60min). Cette température a été choisie pour évaluer le comportement des souches à la température du corps (37°C). L'auto-agrégation a été déterminée à l'aide de l'équation suivante :

$$\% \text{ d'auto-agrégation} = [(DO_0 - DO_{60}) / DO_0] \times 100,$$

- DO_0 : la DO initiale
- DO_{60} : désigne la valeur de la DO mesurée après 1h.

c. Test de la co-agrégation

Le protocole expérimental pour l'étude de la co-agrégation était similaire à celui utilisé pour l'auto-agrégation (**Todorov et al. 2011**). Les souches lactiques cultivées sur MRS bouillon, et les souches pathogènes (*Listeria* sp., *E. coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*) sur BHI à 37°C pendant 24h. Les cellules ont été récoltées par centrifugation (6000 rpm pendant 10 minutes) et lavées deux fois, et re-suspensionnées dans de l'eau physiologique stérile à 0.9%. La densité optique des suspensions cellulaires (BL et pathogènes) ont été mesurées à une longueur d'onde de 600 nm. Le degré de la co-agrégation a été déterminé par des lectures d'absorbance à 600nm de cultures combinées (500µL de cellules BL avec 500 µL de cellules pathogènes) incubées à 37°C pendant t=1h. La co-agrégation a été déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Co-agrégation \%} = ((DO_{BL} + DO_{Path}) / 2 - DO_{BL+Path}) / ((DO_{BL} + DO_{Path}) / 2) \times 100,$$

- DO_{BL} : la DO initiale des bactéries lactiques.
- DO_{Path} : la DO initiale des microorganismes pathogènes.
- $DO_{BL+Path}$: la DO de la culture combinée BL+ pathogènes.

Résistance aux antibiotiques

Ce test a été réalisé par la méthode de l'antibiogramme en milieu solide. Chaque inoculum bactérien a été standardisé (0.5Mc Farland) et ensemencée en surface par des stries serrées sur

la gélose MRS, déjà coulée et solidifiée. Chaque souche de bactérie lactique a été ensemencée sur 2 boîtes et reçoit neuf (7) disques d'antibiotiques à savoir : Chloramphénicol (C30), Ciprofloxacine (CIP5), Ceftazidime (CAZ30), Imepiném (IMI10), Amikacin (AK30), Rifamicine (RA30), Amoxicilline/acide clavulanic (AMC30), Fucidic acid (FA10), Vancomycine (VA30). Après incubation à 37°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (Riebiro et al. 2013).

Détection de la formation des biofilms

Cette technique permet une évaluation semi-quantitative de la formation du biofilm des bactéries lactiques (Ait-Meddour, 2015). À partir de cultures jeunes de 24h, des suspensions bactériennes de souches lactiques sur MRS (0.5 Macfarland) ont été préparées. 200µl de chaque suspension sont utilisés (avec répétitions) pour inoculer les puits d'une microplaque à fond plat de 96 puits. Du bouillon MRS stérile a été inclus en tant que témoin négatif, les microplaques sont incubées à 37°C pendant 48h en anaérobiose. Par la suite, un rinçage trois fois avec de l'eau distillée stérile est effectué pour éliminer les cellules non adhérentes (plonctoniques). Les biofilms sont colorés par l'ajout de 200µl d'une solution de cristal violet à 0,1% (m/v), et les microplaques ont été laissées pendant 30 min à température ambiante et le colorant non lié a été éliminé par la suite à l'aide de trois rinçages successifs avec de l'eau distillée stérile. Le cristal violet a été solubilisé par l'addition de 200µl d'éthanol à 95% sous agitation et le contenu de chaque puits a été dosé par spectroscopie à 600 nm pour déterminer le taux de formation des biofilms.

Test anti-biofilm des bactéries lactiques

Pour déterminer l'effet de surnageant des BL actives sur la formation des biofilms, des cultures jeunes de 24h des BL et pathogènes ont été préparées avec une densité optique de 0.5. Trois séries de test ont été sélectionnées :

- La première série à inoculer est composée de 100µl de chaque suspension de BL avec 100µl de chaque suspension de pathogènes.
- La deuxième série, chaque puits est inoculé par 10µl de la suspension de pathogènes avec 90µl de BHI bouillon stérile et 100µl de surnageant stérile de la BL.
- La troisième série considérée comme témoin, chaque puits contient 10µl de la suspension pathogène avec 90µl de BHI bouillon et 100µl de MRS bouillon stérile.

Après 48h d'incubation à 37°C, les microplaques sont traitées comme auparavant, et l'absorbance a été mesurée à 600nm.

Étude de quelques aptitudes technologiques des bactéries lactiques isolées

Pouvoir acidifiant

Le pouvoir acidifiant et la production des acides organiques sont déterminés sur lait écrémé à un pH 6.5. 1% de la culture jeune de 24h des bactéries lactique a été utilisée pour inoculer 10% du milieu au lait écrémé et incubé à 37°C pendant 24h à 48h. Le pH a été mesuré après 24h et 48h à l'aide d'un pH mètre.

Détermination de l'acidité titrable

Le dosage de l'acidité au cours de la croissance des bactéries lactiques dans le lait écrémé a été effectué en utilisant une solution de NAOH (N/9) en présence de l'indicateur Phénolphtaleine (Accolas et al. 1977). Le titrage s'effectue à l'aide d'une burette remplis avec de la soude Dornic (NaOH N/9) sous agitation en présence de 5gouttes de Phénolphtaleine à la culture de lait incubées pendant 48h. On considère que le virage est atteint, quand la couleur blanche du lait vire en rose pâle et persiste une dizaine de secondes. Les résultats sont exprimés en degré Dornic selon la formule suivante (Hadadji et al. 2006) :

Le degré Dornic = la quantité de soude versée en ml X 10.

1 degré Dornic= 1°D = 0.1 g d'acide lactique / litre de lait.

L'activité protéolytique sur lait

L'activité protéolytique des isolats lactiques a été déterminée sur milieu au lait écrémé (MRS semi concentré 10% additionné à 15% de lait écrémé). L'ensemencement s'effectue par piqure suivi d'une incubation de 24h à 37°C. L'activité est visualisée par l'apparition d'une zone claire autour des colonies (Ribeiro et al. 2013).

1. L'hydrolyse de l'amidon

La capacité des souches isolées à hydrolyser l'amidon a été recherché sur le milieu MRS gélose ordinaire additionnée de 1 % d'amidon soluble. L'ensemencement s'effectue par piqure, l'incubation à 37 °C pendant 24h. La révélation de l'hydrolyse est effectuée par l'ajout du lugol à toute la surface de la boîte et l'apparition de zone claire autour des colonies (Menasria et al. 2018).

2. La recherche de la gélatinase

La présence de la gélatinase chez les isolats lactiques a été déterminée sur milieu à base de gélatine (BHI additionné de 1% de gélatine). L'ensemencement s'effectue par piqure

suivie d'une incubation de 24h à 37°C. L'activité a été visualisée par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie après l'ajout du réactif de Frazier (**Ribeiro et al. 2013**).

Résultats et Discussion

1. Échantillonnage

Les tableaux (3 et 4) résument l’origine, nombre, nature et aspect des échantillons prélevés et analysés. Deux types de prélèvements ont été choisis pour réaliser le dénombrement et l’isolement de leurs flores microbiennes lactique : le colostrum (premier lait cru maternel humain) et des échantillons de selles des nouveau-nés allaités au lait maternel. Comme indiqué, les échantillons ont été collectés à partir d’un groupe d’origine algérienne (Wilaya de Tébessa) de 8 jeune femmes (Age moyen 34 ± 3.5 ans) et 7 nourrissons, allaités exclusivement au lait maternel. Six de ces nourrissons sont nés par voie basse, tandis qu’un seul a été accouché par césarienne. Ainsi que quatre sont de sexe féminin et 3 masculins. Six de sept nourrissons sont nés à terme, et n’ont pas été sous antibiothérapie à l’exception d’un qui a présenté problème prénatal. Toutes les mamans sont en bonne santé sauf une souffert d'un problème rénal sous antibiothérapie avant l'accouchement.

Tableau 3. Aspect et caractéristiques des échantillons de colostrum

Codification	EC1	EC2	EC3	EC4	EC5	EC6	EC7	EC8
Date de prélèvement	15/02	15/02	16/02	16 /02	28/02	07 /03	07 /03	07/03
Age	32 ans	37 ans	33 ans	41 ans	35 ans	27 ans	30 ans	37 ans
Lieu de naissance	Tébessa	Békaria	Tébessa	Gourai	Tébessa	Békaria	Tébessa ville	Batna
Durée de la grossesse	9 mois	9 mois	9 mois	9 mois	9 mois	9 mois	9 mois	9 mois
Voie d'accouchement	Basse	Basse	Basse	Basse	Basse	Basse	Basse	Basse
N. accouchement	3ème	5ème	3ème	4ème	3ème	3ème	3ème	6ème
État de santé	Saine	Saine	Saine	Problème rénale	Saine	Saine	Saine	Saine
Prise d'antibiotique	Avant	Avant	/	/	/	/	/	/
Aspect	épais de couleur jaune-orangé	fluide de couleur jaune claire	fluide de couleur jaune claire	épais de couleur jaune-orangé	fluide de couleur jaune-orangé			

Tableau 4. Aspect et caractéristiques des échantillons de la matière fécale

Codification	EF1	EF2	EF3	EF4	EF5	EF6	EF7
Date de prélèvement	15 /03	15 /03	15 /03	16 /02	16/02	28/02	15 /03
Sexe	M	M	F	M	F	F	F
Lieu de naissance	Mazraa	Tébessa	Tébessa	Gourai	Békaria	Tébessa	Tébessa
L'âge de la maman	30 ans	ND	35 ans	41 ans	>30 ans	37 ans	28 ans
Voie d'accouchement	Basse	Haute	Basse	Basse	Basse	Basse	Basse
État de santé (Maman)	Saine	Infertilité de 3 ans	Cardiopathie	Problème rénale	Saine	Saine	Saine
État de santé (Nouveau-née)	Sain	Malade	Sain	Gros bébé	Sain	Sain	Sain
Prise d'antibiotique	Non	Oui	Non	Non	Non	Non	Non
N. accouchement	3 ^{ème}	1 ^{ère}	2 ^{ème}	4 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}	2 ^{ème}
Aspect	épais de couleur marron claire	épais de couleur verte	épais de couleur noir	épais de couleur marron	épais de couleur vert foncé	épais de couleur vert foncé	épais de couleur vert foncé

M. Masculin, F. Féminin, ND. Non Déterminé.

2. Énumération et dénombrement de la flore autochtone

Les résultats de dénombrement de la charge bactérienne autochtone des échantillons sont présentés dans le tableau (5) et les figures (11, 12). Les moyennes observées ont présenté une différence pour l'ensemble des colostrums analysés avec une variation très hautement significatives ($p < 0.0001$) signalée entre ces deux type d'échantillonnage et les milieux utilisés pour le dénombrement de (3.56 ± 0.57 à $4.52 \pm 0.73 \log$ UFC/ml) et les selles (5.44 ± 2.17 à $6.11 \pm 2.12 \log$ UFC/g) (Tableau 5)

Pour le cas de la matière fécale, une charge bactérienne élevée a été notée sur milieu MRS de l'ordre de (6.11 ± 2.12 UFC/g) après 48h d'incubation par rapport aux deux autres milieux PCA et M17 utilisés. En revanche, les échantillons de colostrum ont été présentés les mêmes variations de la charge en fonction des milieux utilisés même si elle est un peu plus faible par rapport à la matière fécales, allant de (3.56 ± 0.61 à $4.52 \pm 0.73 \log$ UFC/ml) après 48h d'incubation.

Tableau 5. Variation de la charge bactérienne moyenne (LogUFC) du colostrum et la matière fécale en fonction de temps d'incubation et le milieu de culture utilisé

Milieu	Temps	Fécale (Log UFC/g)	Colostrum (Log UFC/ml)
PCA	24	5.53±2.32	4.49±0.74
PCA	48	5.74±2.18	4.52±0.73
MRS	24	5.97±2.26	4.20±0.87
MRS	48	6.11±2.12	4.25±0.85
M17	24	5.44±2.17	3.90±0.61
M17	48	5.50±2.12	3.56±0.57

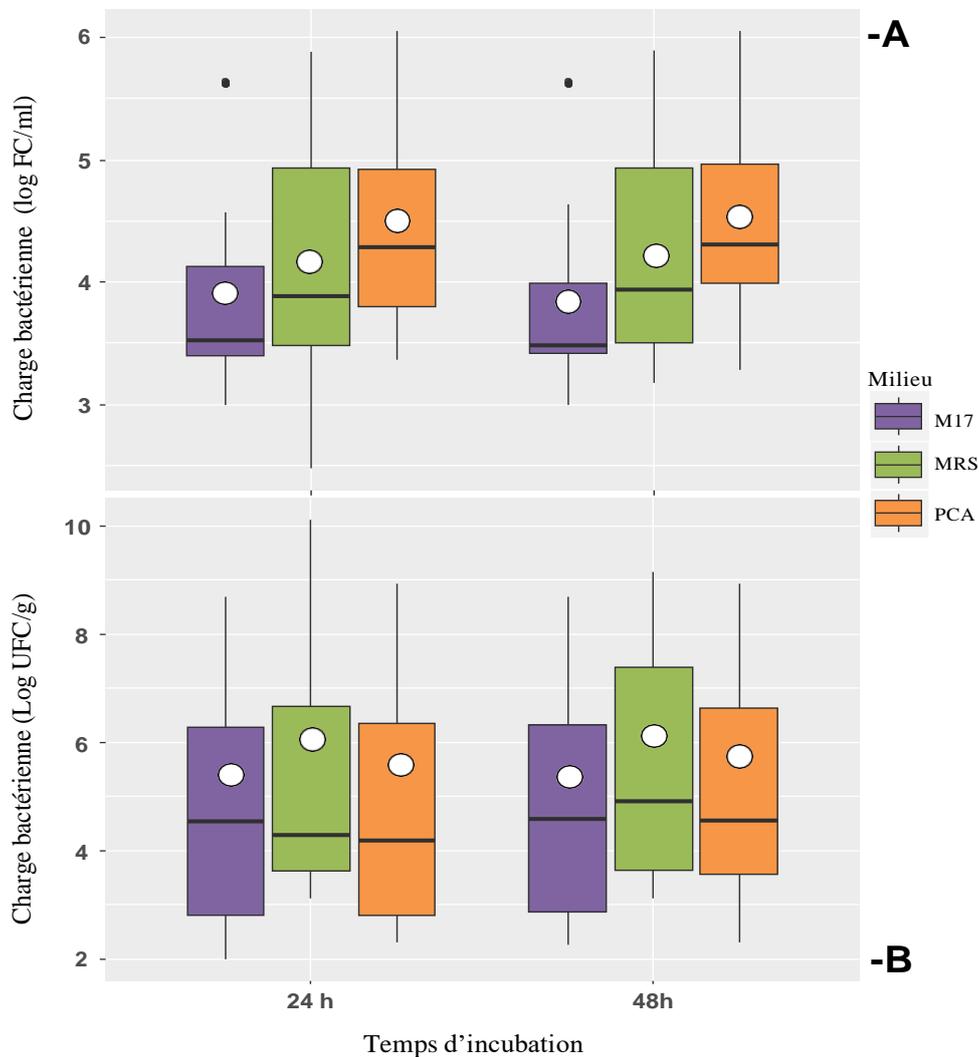


Figure 11. Variation de la charge bactérienne en fonction du temps d'incubation et les milieux de culture utilisés. **A.** Colostrum, **B.** Matière fécale

Boîtes à moustaches (box plots) résumant des indicateurs de position du caractère étudié (moyenne, médiane, quartiles, minimum, maximum).

D'après les résultats d'analyse des variances (Tableau 6), les deux variables sélectionnées (Échantillons et Milieux de cultures utilisés) ont influencé d'une manière hautement significative ($p < 0.0001$) la variation de la charge bactérienne quant à la variable temps elle et les interactions n'ont aucun effet.

Tableau 6. ANOVAs testant l'effet des variables [Nature de l'échantillon analysé (Colostrum, matière fécale), les milieux de culture utilisés (PCA, MRS, M17) et le temps d'incubation] sur la variation de la charge bactérienne.

Type	Source	DDL	SC	MC	F	P
Total	Nature	1	84.095	84.095	533.656	< 0.0001 (***)
	Échantillon	11	414.850	37.714	239.327	< 0.0001 (***)
	Temps	1	0.136	0.136	0.860	0.355 (NS)
	Milieu utilisés	2	6.738	3.369	21.379	< 0.0001 (***)
Colostrum	Échantillon	7	65.832	9.405	93.632	< 0.0001 (***)
	Temps	1	0.002	0.002	0.021	0.886 (NS)
	Milieu utilisés	2	6.303	3.152	31.379	< 0.0001 (***)
	Éch * Temps	7	0.609	0.087	0.866	0.540 (NS)
	Éch * Milieu	14	5.695	0.407	4.050	0.000 (***)
	Temps * Milieu	2	0.037	0.018	0.183	0.833 (NS)
	Ech * Milieu * Temps	14	1.061	0.076	0.754	0.710 (NS)
Matière fécale	Échantillon	4	349.018	87.255	653.668	< 0.0001 (****)
	Temps	1	0.287	0.287	2.151	0.153 (NS)
	Milieu de culture	2	3.442	1.721	12.892	< 0.0001 (***)
	Éch * Temps	4	0.802	0.200	1.502	0.227 (NS)
	Éch * Milieu	8	0.954	0.119	0.893	0.534 (NS)
	Temps * Milieu	2	0.060	0.030	0.224	0.800 (NS)
	Ech * Milieu * Temps	8	0.858	0.107	0.803	0.605 (NS)

F. Statistiques de Fisher, P. Probabilité, DDL. Degré de liberté, SC. Somme des carrés, MC Moyenne des carrés. Les comparaisons multiples des moyennes ont été considérées au niveau de probabilité $p = 0,05$.***. Très hautement significative .NS. Non significative

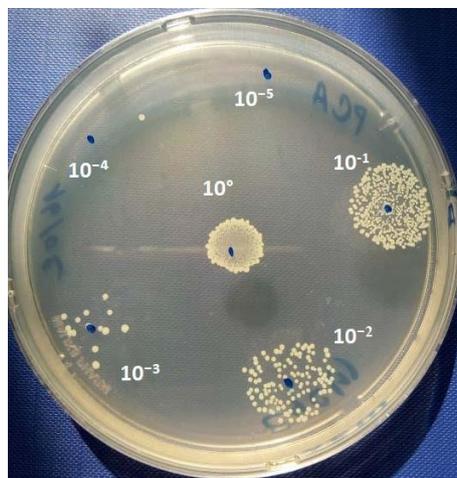


Figure 12. Aspects des colonies à différentes dilutions après mise en culture par spots.

3. Isolement et purification des bactéries lactiques

Les échantillons de colostrum et la matière fécale ont été servis comme matrice pour l'isolement des bactéries lactiques sur deux milieux de cultures sélectif (MRS et M17). Au terme de 48 à 72h d'incubation à 37°C en anaérobiose, deux à trois colonies par échantillons et par milieu ont été sélectionnées. Comme il est difficile de différencier les colonies, plusieurs isolats (représentatives de la variabilité morphologique) ont été choisies afin de maximiser les différences phénotypiques entre elles pour chacun des milieux. L'ensemble des colonies ont été purifiées par repiquage au moins deux fois sur MRS. Le choix de milieux d'isolement est justifié par le fait que la totalité des bactéries isolées ont présenté une croissance optimale sur MRS. Une collection de 36 isolats a été retenue au premier isolement et après purification avec plus de 80% de la totalité des souches ont été récupérées des échantillons du colostrum avec seulement 6 isolats fécaux (Figure 13).

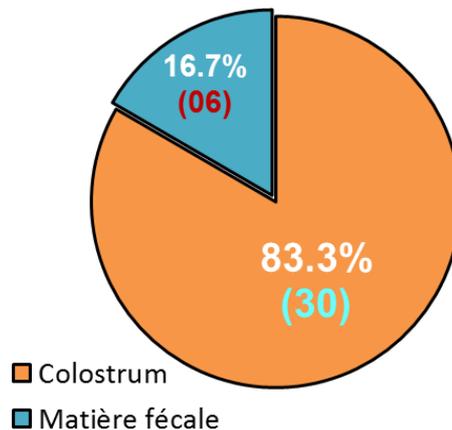


Figure 13. Fréquence d'isolement des bactéries lactique

4. Sélection des isolats lactiques

Aspect macroscopique et microscopique

Une très grande variabilité morphologique a été notée en fonction des échantillons prélevés et de milieu de culture utilisée. Les colonies produites chez les isolats suspectés lactiques sont généralement rondes d'un diamètre d'environ 1 à 2 mm dans l'ensemble après 72h d'incubation à 37 °C sur le milieu MRS additionné de 0.0001% de bromocresol (Figure 14). Elles sont toutes pigmentées en vert d'eau ou vert clair, centre claire ou foncé, avec une surface lisse et un pourtour régulier. Un autre aspect a été noté sur milieu M17 dont les colonies sont de taille moyenne parfois grande, crémeuses ou blanchâtres, avec une surface lisse et un pourtour régulier.

La coloration de Gram a donné un résultat positif pour l'ensemble de ces isolats, avec des formes cellulaires variables allant des formes sphériques regroupées (en amas ou en chaînette) aux bâtonnets réguliers, même des cellules isolées. D'autres formes coccoïdales et coccobacillaires ont été aussi observées (Figure 15). En effet, tous les isolats retenus ont révélé une réaction négative à la catalase (Figure 14).

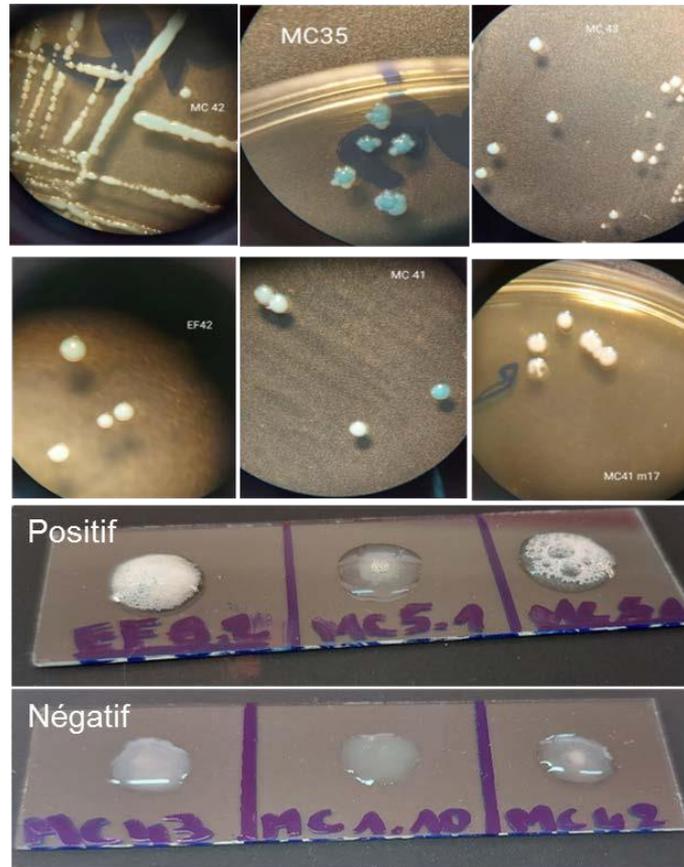


Figure 14. Différents aspects phénotypiques des bactéries lactiques après mise en culture sur gélose (MRS et M17) et le résultat des tests de la catalase.

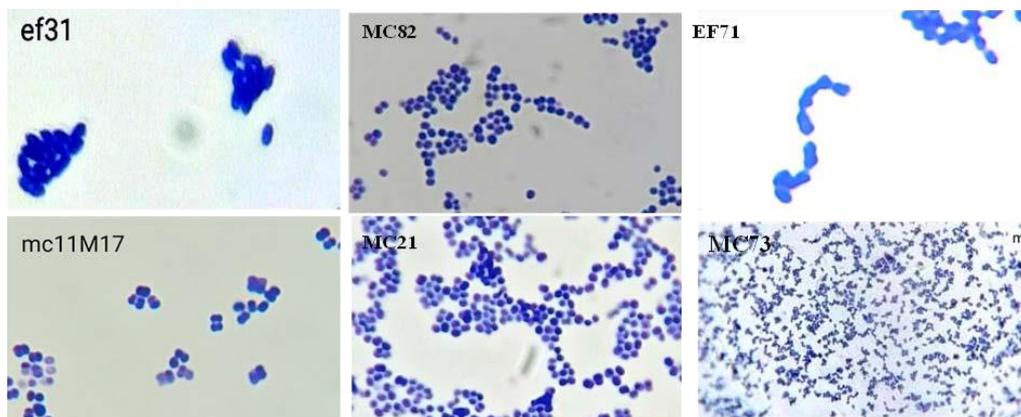


Figure 15. Quelques aspects microscopiques des bactéries lactiques isolées après coloration de Gram (X1000).

Tableau 7. Caractéristiques phénotypique (macro-et microscopiques) des isolats lactiques.

Isolat	Aspect macroscopique						Aspect microscopique	Coloration de Gram	Catalase
	Taille	Pigment	Surface	Consistance	Pourtour	Relief			
MC33	Petite 1mm	Vert claire	Lisse	Crémeuse	Régulier	Bombé	cocci, isolés diplocoque	Positif	Négatif
MC22	Grande entre 1 et 2mm	Centre foncé (Givré) Pourtour claire	Lisse	Crémeuse	Régulier	Bombé	Cocci, isolés, diplocoque en petite chainette	Positif	Négatif
MC31	Petite 1mm	Transparente (la plus claire)	Lisse	Crémeuse	Régulier	Bombé	Cocci	Positif	Négatif
MC32	Petite 1à 2mm	Vert claire	Lisse	Crémeuse	Régulier	Bombé	Cocci en amas /diplocoque	Positif	Négatif
MC17	Petite ≤1 mm	Bleu canard	Lisse	Crémeuse	Régulier	Bombé	Cocci diplocoque, isolé/en chainette	Positif	Négatif
MC41	Sur M17 Moyenne	Crème	Lisse	Crémeuse	Régulier	Bombé	cocci, isolés/ en amas	Positif	Négatif
	Sur MRS Moyenne	Vert clair	Lisse	Crémeuse	Régulier	Bombé			
MC16	Petite ≤0.5 mm	vert d'eau	Lisse	Crémeuse	Régulier	Bombé	Cocci, isole et en chainette	Positif	Négatif
MC21	Moyenne 1 mm	Verdâtre	Lisse	Crémeuse	Irrégulier	Bombé	Cocci en amas	Positif	Négatif
MC41	Moyenne	Givré	Lisse	Crémeuse	Régulier	Bombé	cocci, en amas/ en chainette	Positif	Négatif
MC22	Sur M17 : Grande	Crème	Lisse	Crémeuse	Régulier	Plate	Cocci diplocoque/ en amas	Positif	Négatif
	Sur MRS: Petite <1mm	Uniforme	Lisse	Crémeuse	Régulier	Bombé			
EF42	Moyenne	Opaline	Lisse	Crémeuse	Régulier	Bombé	Cocci en amas	Positif	Négatif
EF41	Moyenne >1mm	vert clair	Lisse	Crémeuse	Régulier	Bombé	Cocci en chainette	Positif	Négatif

Résultats

MC14	Moyenne >1mm	vert d'eau	Lisse	Crémeuse	Irrégulier	Bombé	Cocci en amas	Positif	Négatif
MC12	Grande > 2 mm	blanchâtre	Lisse	crémeuse	régulier	Bombé	Cocci en amas	Positif	Négatif
MC51	Moyenne	Crème	Lisse	Crémeuse	Régulier	Bombé	Cocci isole et en amas	Positif	Positif
MC52	Petite	crème	lisse	crémeuse	régulier	Bombé	Cocci en amas	Positif	Positif
MC52	Petite	givré	lisse	crémeuse	régulier	Bombé	Cocci	Positif	Positif
EF62	Moyenne	Opaline	Lisse	Crémeuse	Irrégulier	Bombé	Bacille	Positif	Négatif
EF61	Petite	Turquoise	Lisse	Sèche	Régulier	Plate	Cocci en amas et en chaînette	Positif	Négatif
EF61	Petite	Vert d'eau	Lisse	Sèche	Régulier	Plate	Cocci en amas	Positif	Négatif
MC53	Grande	Vert d'eau	Lisse	Crémeuse	Régulier	Bombé	Bacille	Positif	Négatif
MC61	Petite	Vert d'eau	Lisse	Crémeuse	Irrégulier	Bombé	Cocci isole	Positif	Positif
(25) MC62	petite	Turquoise	Lisse	Crémeuse	Régulier	Bombé	Bacille	Positif	Négatif
MC63	petite	Vert d'eau	Lisse	Crémeuse	Régulier	Bombé	Cocci en amas et en chaînette	Positif	Positif
MC65	Moyenne	Vert d'eau	Lisse	Crémeuse	Régulier	Bombé	Cocci en chaînette	Positif	Négatif

5. Étude des aptitudes probiotiques des bactéries lactiques isolées

5.1. Étude du pouvoir antagoniste des bactéries lactiques

L'activité antibactérienne des isolats sélectionnés a été évaluée par la méthode de spot (Figure 16) afin de mettre en évidence un éventuel pouvoir antagoniste vis-à-vis des souches testées à Gram positif et à Gram négatif à savoir: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Listeria* sp. *Salmonella enterica* et *Escherichia coli*. Le screening primaire de l'activité a révélé que (21/36, 58,33 %) des isolats ont présenté au moins une activité antibactérienne contre (15 souches) qui ont été négatives pour ce test. En effet, une forte activité antibactérienne a été signalée contre les bactéries à Gram positif par rapport au Gram négatif. Ces résultats indiquent que les isolats lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne.



Figure 16. Activité antibactérienne des bactéries lactiques par la méthode de spot sur milieu BHI semi solide (0.8%).

Après avoir sélectionné 12 souches potentielles parmi l'ensemble des isolats, une variation d'activité inhibitrice a été signalée selon le pathogène testé. Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré que la majorité de ces souches ont présenté une activité inhibitrice contre les pathogènes à Gram – et à Gram + respectivement, alors que l'ensemble des souches ne présentent pas le même spectre d'action contre ces bactéries pathogènes.

Une forte activité antibactérienne de deux souches lactiques (35 et 36) a été notée allant de (11.6 à 21.5mm) avec un spectre plus au moins large contre l'ensemble des bactéries testées et une variabilité selon le pathogène (Figure 17). Il faut noter que les trois isolats lactiques 01, 04, 05 ont présenté une activité antibactérienne remarquable étroite contre le seul pathogène testé (*Listeria* sp.) par rapport aux autres avec une forte activité notée avec la souche 04 et une activité plus moins forte avec les souches 01 et 05.

En résumé :

- La souche 34 a présenté une faible activité de (18.56 et 15.49 mm) contre *Bacillus subtilus* et *Salmonella enterica*, respectivement.
- La souche 23 a présenté une activité plus ou moins faible contre tous les pathogènes, tandis que la souche 22 dévoilé une forte activité contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilus* avec plus de (24 mm) de diamètre.
- La souche 19 a montré une forte activité envers *Staphulococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilus*, *Escherichia coli*, et une moyenne activité contre *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica*, et *Listeria* sp.
- La souche 13 a exercé une forte activité anti- *Salmonella*. Alors que, la souche 10 a révélé une forte activité contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilus*, et une ativité moyenne contre *Listeria* sp., *Staphulococcus aureus* et *Bacillus cereus* .
- La souche 08 a présenté une activité moyenne contre *Listeria* sp. avec une faible activité inhibitrice vis-à-vis *Staphylococcus epidermidis*.

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques. En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes classés en deux catégories : Composés à petite masse moléculaire (LMM= Low mass molecular compound) tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, diacétyl, le dioxyde de carbone, et des composées à grande masse moléculaire (HMM=high mass molecular compound) comme les bactériocines (**Ammor et al. 2006**).

Les bactériocines sont des protéines, ou complexes protéique, avec une activité bactéricide contre les espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre et mode d'action (**Juncioni de Arauz et al. 2009 ; Klaenhammer, 1993**). Ces inhibiteurs protéiques ont attiré l'intérêt des recherches intensives au cours des trois dernières décennies, aboutissant à la découverte et la caractérisation de nombreux types des bactériocines de bactéries lactiques. Compte tenu de leur utilisation actuelle en bioconservation (**Ross et al. 2002**).

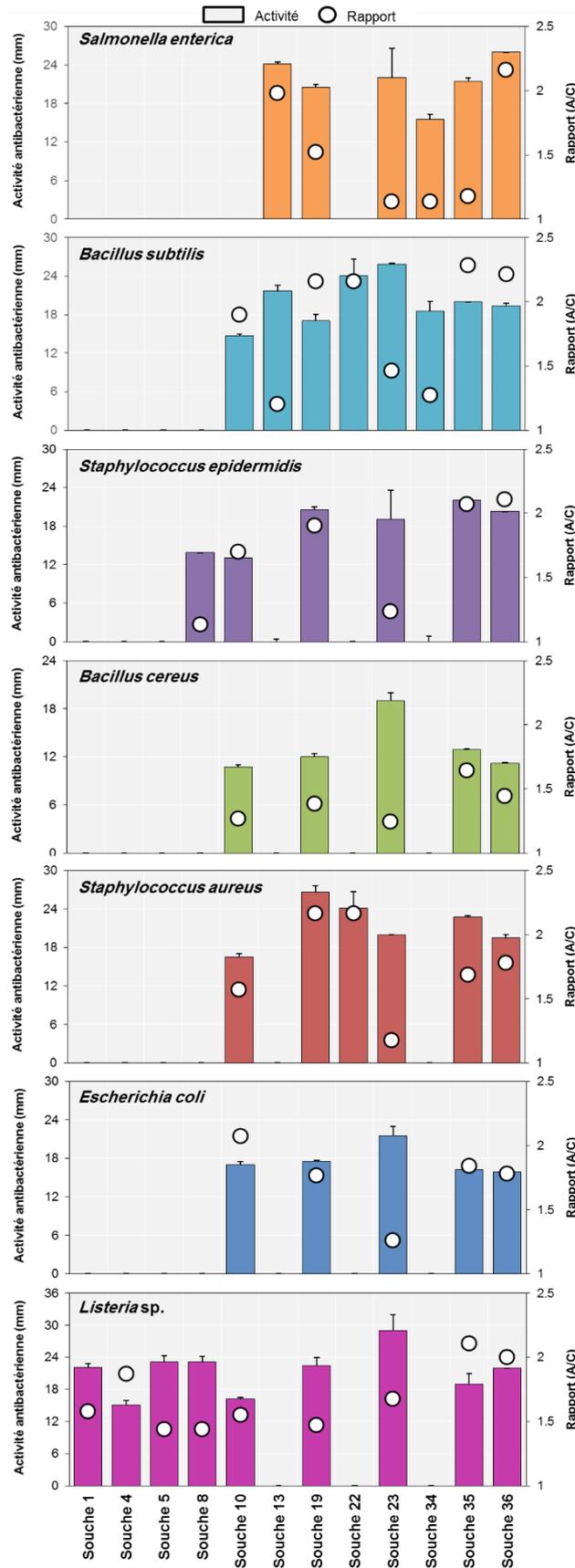


Figure 17. Résultat de l'Activité antibactérienne des isolats lactiques (mm±SD) révélée par la méthode de spot sur BHI.

5.2. Tests de survie des bactéries lactiques

5.2.1 Résistance/Tolérance aux différentes concentrations de NaCl

La figure 18 illustre le taux de survie des souches lactiques par rapport aux différentes concentrations de (NaCl) par mesure de densité optique sur bouillon MRS additionné à différente concentration de NaCl (0, 4, 6.5 et 10%) après incubation à 37°C en anaérobiose.

D’après les résultats, une forte tolérance aux différentes concentrations de salinité a été signalée chez la plupart des souches testées classées comme halotolérantes (0 à 10%). Les autres présentent une tolérance plus ou moins importante (moyenne ou faible). La tendance générale des souches ou le taux de croissance est inversement proportionnelle aux différentes concentrations de NaCl (augmentation de NaCl induit une diminution de la densité optique mesurée).

D’après les résultats indiqués dans la figure, les isolats lactiques ont été classés en :

- **Groupe A** : souches (08,13 ,23) à tolérance élevée.
- **Groupe B** : souches (04,10, 13, 35, 36) à tolérance modérée.
- **Groupe C** : (01, 05, 07, 34) à faible tolérance.

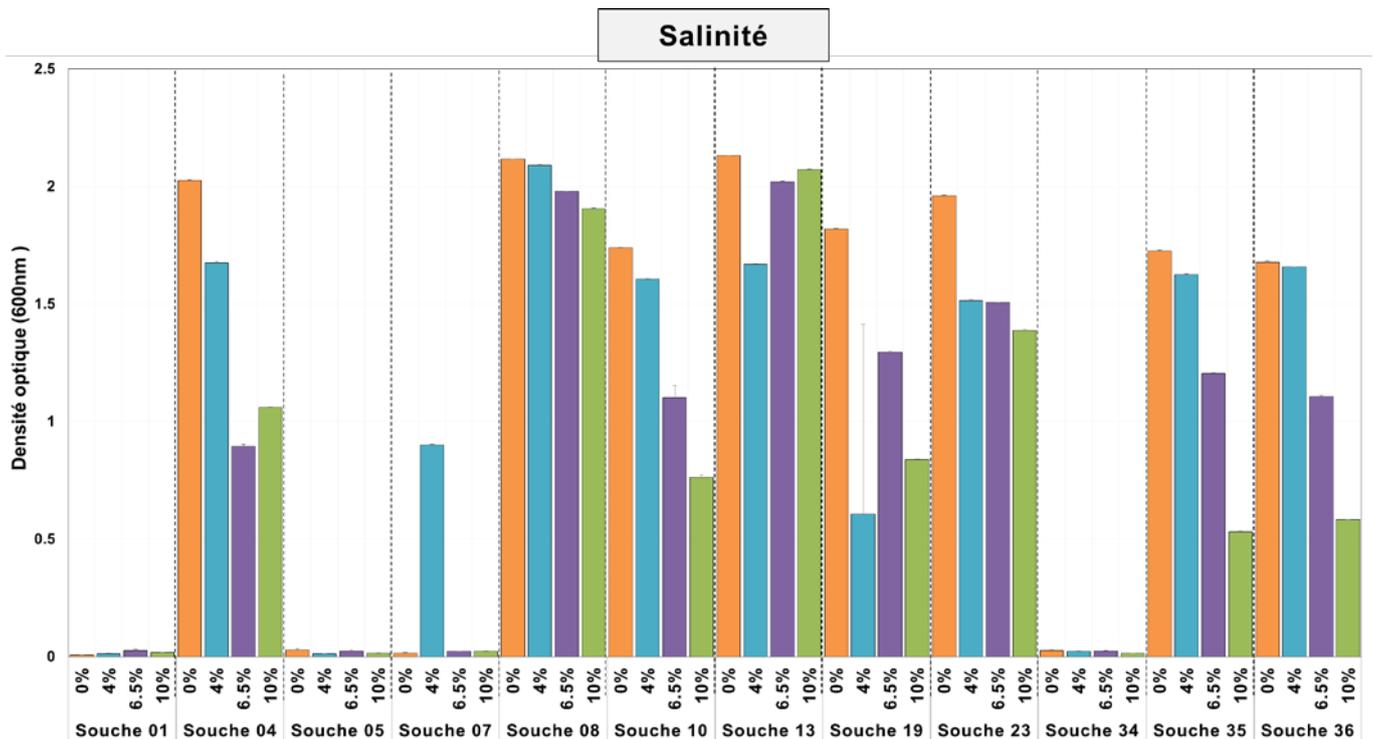


Figure 18. Halotolérance des isolats lactique sur MRS additionné de 0-10% de NaCl.

5.2.2. Résistance aux sels biliaires

Le flux biliaire assure un rôle physiologique très important puisque facilitant la digestion des composés lipophiles provenant de l'alimentation. C'est également un agent antimicrobien influençant l'établissement du microbiote intestinal. Lors du passage dans le tractus, les bactéries résistant au stress biliaire peuvent coloniser l'intestin (**Begley et al, 2005**). La bile affecte principalement la composition lipidique et protéique de la membrane, perturbant ainsi sa fonctionnalité, mais génère également un stress oxydant au niveau de l'ADN et impacte le métabolisme des sucres.).

La tolérance à la bile est un critère de sélection *in vitro* des bactéries probiotiques et est généralement considérée comme nécessaire pour évaluer leur aptitude à résister aux effets des acides biliaires (fonction physiologique et son activité antimicrobienne) qui conditionnent leur aptitude à survivre aux conditions du tractus et à coloniser l'environnement intestinal. Les résultats de l'effet des sels biliaires sur la croissance des souches lactiques ont montré une variation qualitative entre les souches (**Figure 19**). Les souches 07, 08, 13, 23 et 35 ont pu tolérer les sels biliaires. Cette tolérance se traduit par des concentrations cellulaires élevées quel que soit le temps de contact (1-5h) (les souches 13 et 35 sont fortement résistantes aux sels biliaires), tandis que les souches 04, 10, 19, 34 et 36 ont présenté une tolérance modérée. Toutefois, les souches 01 et 05 sont révélées sensibles à l'action des sels biliaires après 5h d'incubation.

Une fois dans l'intestin, la bile assure sa principale fonction physiologique, à savoir d'émulsifier les substances liposolubles (lipides, nutriments et vitamines) pour faciliter leur absorption (**Kristiansen et al. 2004**). La bile est un mélange complexe de composés organiques et inorganiques produits dans le foie. Les constituants organiques de la bile incluent sels biliaires, cholestérol, phospholipides et protéines. De nombreuses substances endogènes (vitamines, stéroïdes, trace de métaux essentiels) et exogènes (antibiotiques, médicaments) peuvent également être détectées (**Kristiansen et al. 2004**). Sous l'action des bactéries intestinales, les acides biliaires sont déconjugués en acide désoxycholique et acide lithocholique. Cette déconjugaison est assurée par la BSH (Bile Salt Hydrolase) qui a été retrouvée chez de nombreuses bactéries lactiques du microbiote, dont *Bifidobacterium*, et *Lactobacillus* mais absente chez les bactéries isolées d'environnements dans lesquels la bile est absente (**Begley et al. 2006**). En effet, l'exposition aux sels biliaires module l'expression de protéines membranaires chez des espèces de *Lactobacillus* (**Bron et al, 2006**). Cela affecte également la composition en acides gras et en phospholipides ainsi que la fonctionnalité de la membrane chez *Bifidobacterium* (**Gomez-Zavaglia et al. 2002; Ruiz et al. 2007**).

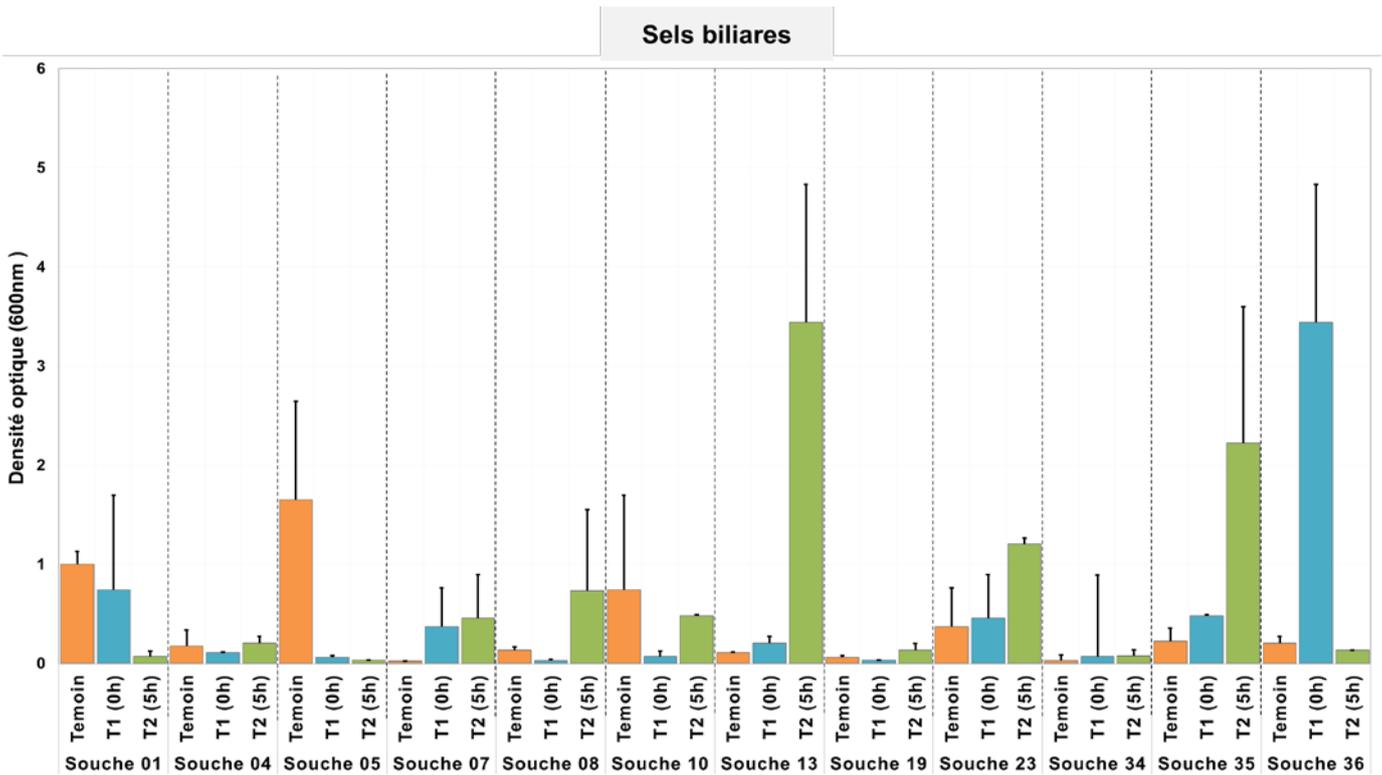


Figure 19. Effet des sels biliars sur la croissance des bactéries lactiques mesuré par densité optique.

5.2.3. Résistance aux différents pH

Le pH est défini comme la valeur du logarithme décimal de la concentration en ions hydrogènes (protons). C'est l'unité standard mesurant le degré d'acidité ou d'alcalinité d'une solution aqueuse. On considère une solution comme acide si son pH est inférieur à 7.

La résistance à des pH acides est l'un des critères de sélection des souches probiotiques, les résultats de ce test sont présentés dans la figure 20. Les taux de croissance calculés montrent qu'ils sont plus importants dans le milieu MRS à pH=6.2 à 9, l'optimum de croissance de la totalité des isolats lactiques. Le résultat a montré que la croissance des souches a été affaiblie à pH=2 (Acido-résistante), où une relation proportionnelle entre le pH et le taux de survie a été noté. En revanche, les souches 01, 05, 07 et 34 ont présenté un taux de croissance minimal dans les trois différents pH testés.

En l'absence de mécanisme de protection, les acides non dissociés peuvent diffuser de façon passive à travers les membranes cytoplasmiques et acidifient le cytoplasme, entraînant ainsi une perturbation dans le métabolisme cellulaire pouvant conduire à la mort cellulaire. C'est pourquoi l'existence de mécanismes moléculaires permettant de maintenir le cytoplasme

à des valeurs de pH physiologiques est essentielle pour la survie des bactéries dans des environnements acides.

En raison de leur catabolisme, les bactéries lactiques acidifient leur environnement à travers la fermentation des sucres (Vernazza et al. 2006). Leur activité métabolique implique donc un stress acide (Jayamanne and Adams, 2006). La sélection de souches possédant une grande tolérance à l'acidité est donc très intéressante pour la santé et l'industrie agro-alimentaire. En effet, l'acquisition de la résistance aux environnements acides peut induire des changements dans les propriétés de surface des bactéries. Ainsi, des souches résistantes au pH acide présentent une meilleure capacité à adhérer à la mucine humaine, et d'autres montrent une plus grande habilité à inhiber l'adhésion de certains pathogènes, ou à prendre la place de pathogènes déjà adhérents (Collado et al. 2006).

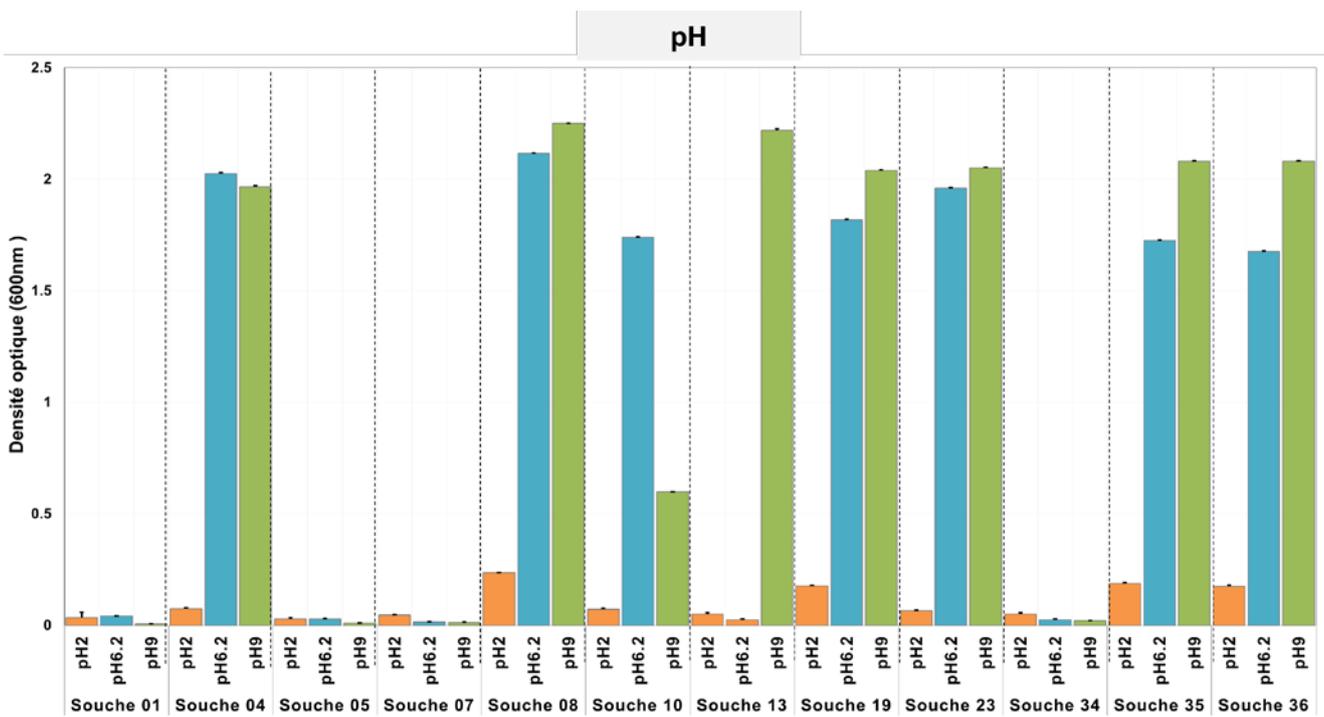


Figure 20. Effet des sels biliaires sur la croissance des bactéries lactiques mesuré par densité optique.

5.2.4. Résistance à la pepsine

Pour ce test de résistance, les souches lactiques ont été inoculées pendant cinq heures dans une solution isotonique (MRS) à pH 2 avec 3g/L de pepsine à 37 °C (Masco et al. 2007). Les résultats de la Figure 21 ont montré une tolérance souche-spécifique à l'acidité stomacale.

Ce test est très discriminant et permet de sélectionner les souches les plus résistantes des souches fragiles. Les souches présentant le meilleur taux de survie sont (01, 04, 05, 08, 19, 35 et 36). En effet, après le traitement, ces souches perdent moins de viabilité. D'autres souches présentent également une bonne vitalité après le stress acide. Au contraire, les souches (07 et 34) sont les moins résistantes et présentant la moins bonne vitalité après le stress. La survie des bactéries lactiques dans le suc gastrique dépend de leur capacité à tolérer les bas pH en présence des enzymes lytiques. Le temps de passage gastrique peut être d'une heure à plusieurs heures selon l'individu et son régime. Par conséquent des chercheurs ont proposé que les souches à potentiel probiotiques doivent résister à un pH 2.5 dans un milieu de culture pendant plusieurs heures (exp 4h) (Ammor et Mayo, 2007).

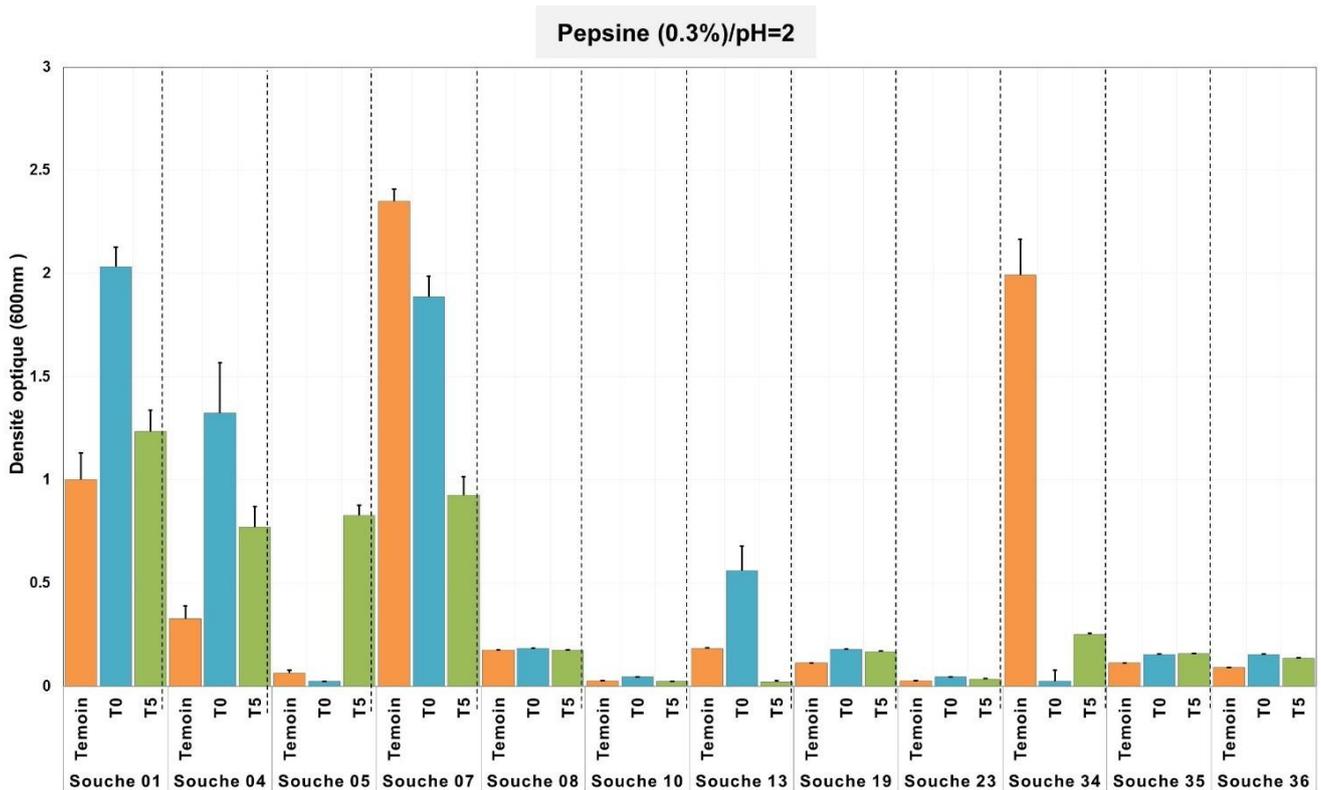


Figure 21. Résultats de la tolérance à l'acidité stomacale des souches lactiques

5.3. Analyse des caractères de surface cellulaire

Les résultats de l’analyse des caractères de surface cellulaire ont été résumés dans le tableau (8) Les souches lactiques ont présenté de valeurs d’hydrophobicité souche-spécifique et variable allant de 7% pour la souche 34 à plus de 72% pour la souche 10.

Les résultats d’Auto agrégation obtenus ont montré que les valeurs des isolats étaient comprises entre 20% et 35%, bien que certains d’entre eux aient des valeurs inférieures à 10% La souche 4 a montré le plus haut niveau d’auto-agrégation 35% tandis que la souche 35 a montré un niveau auto-agrégations bas de 1%.

En général, les souches lactiques ont présenté une variabilité de Co-agrégation aux pathogènes sélectionnés (*Listeria* sp. et *E. coli*). Les souches 4, 10, 13 et 23 ont exhibées les niveaux les plus élevés de co-agrégation avec *Listeria* et *E. Coli* respectivement tandis que la coagrégation des autres souches variait entre 4% et 29% (Tableau 8).

Tableau 8. Résultats de l’analyse des caractères de surface cellulaire des souches lactiques

Souches	Co-agrégation (%)			Hydrophobicité (%)
	Auto-agrégation (%)	<i>Listeria</i> sp.	<i>E. coli</i>	
Souche 01	05,09 ± 0,13	11,99 ± 0,19	22,77 ± 0,08	39,76 ± 0,66
Souche 04	35,97 ± 0,07	21,15 ± 0,10	22,54 ± 0,75	24,26 ± 0,00
Souche 05	23,70 ± 0,14	13,65 ± 0,06	24,44 ± 1,43	17,28 ± 0,91
Souche 08	21,17 ± 0,09	09,94 ± 0,34	17,05 ± 1,64	11,52 ± 0,26
Souche 10	22,34 ± 0,32	31,35 ± 0,45	32,73 ± 0,45	72,41 ± 2,16
Souche 13	24,49 ± 0,01	31,16 ± 0,08	21,45 ± 0,34	14,53 ± 1,26
Souche 19	04,20 ± 0,53	04,67 ± 3,90	15,32 ± 0,43	08,77 ± 0,06
Souche 23	30,55 ± 0,36	29,61 ± 0,20	30,10 ± 0,79	19,79 ± 2,94
Souche 34	06,13 ± 0,04	04,93 ± 0,07	20,67 ± 0,21	07,00 ± 0,15
Souche 35	01,24 ± 0,09	16,11 ± 0,04	24,36 ± 0,22	18,51 ± 0,20
Souche 36	31,00 ± 0,13	17,87 ± 0,28	22,32 ± 0,15	22,54 ± 0,83

L’adhésion aux tissus épithéliaux est une étape primordiale lors de la colonisation de l’hôte pour la plupart des pathogènes notamment au sein de l’écosystème intestinal et urogénital. Les BL probiotiques présentent un réel intérêt dans leur propriété à réduire l’adhésion de microorganismes aux muqueuses intestinales et vaginales (Spurbeck et Arvidson, 2008). Elles peuvent agir sur les muqueuses en stimulant la production de mucus, entrer en compétition pour les sites d’adhésion des pathogènes ou agir directement sur le pathogène lui-même en bloquant son interaction avec l’épithélium, notamment par leur capacité d’auto- et de coagrégation.

5.4 Détection de la formation des biofilms

a. Biofilm des bactéries lactique /pathogènes

Selon les données de la capacité de formation des biofilm chez l'ensemble de bactéries lactiques et les pathogènes testés, toutes les bactéries se sont révélées formatrices de biofilm sur plaques avec une variation souche dépendante entre un groupe des bactéries fortement formatrice (Souche 35, 36 et *Bacillus subtilis*) et d'autre moins (souche 19 et *Staphylococcus epidermidis*).

Les biofilms sont des communautés microbiennes bien structurées adhérentes qui sont attachées à un surface inerte ou vivante et enrobées par une matrice extracellulaire (Lebeaux et al. 2014 ; Banerjee et al.2020). Les biofilms peuvent être composé d'une seule espèce, bactérienne, mais plus fréquemment, ils sont formés par une communauté complexe et diversifiée de micro-organismes (Balcázar et al. 2015). La formation d'un biofilm commence lorsque des micro-organismes flottants se fixent à un surface et/ou liées les uns aux autres. Ce processus démarre avec la première bactérie, qui adhère à la surface initialement par faible, adhésion réversible. Au cours de la colonisation de surface, les cellules bactériennes sont capables de communiquer en utilisant signaux de détection de quorum-sensing (QS) tels que la N-acylhomosérine lactone (AHL) (Srivastava et al. 2019). Différents facteurs conditionnent le processus d'attachement microbienne aux surface telles que, les espèces bactériens, la composition de la surface des cellules, la nature des surfaces, la disponibilité des éléments nutritifs, les conditions hydrodynamiques et la communication du quorum sensing (Donlan, 2002).

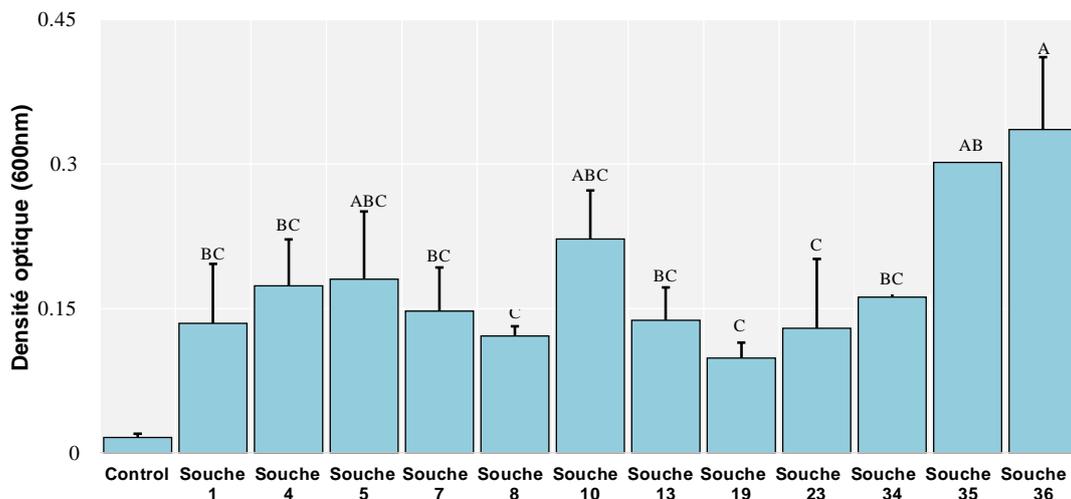


Figure 22. Capacité de formation de biofilms chez souches lactiques isolées.

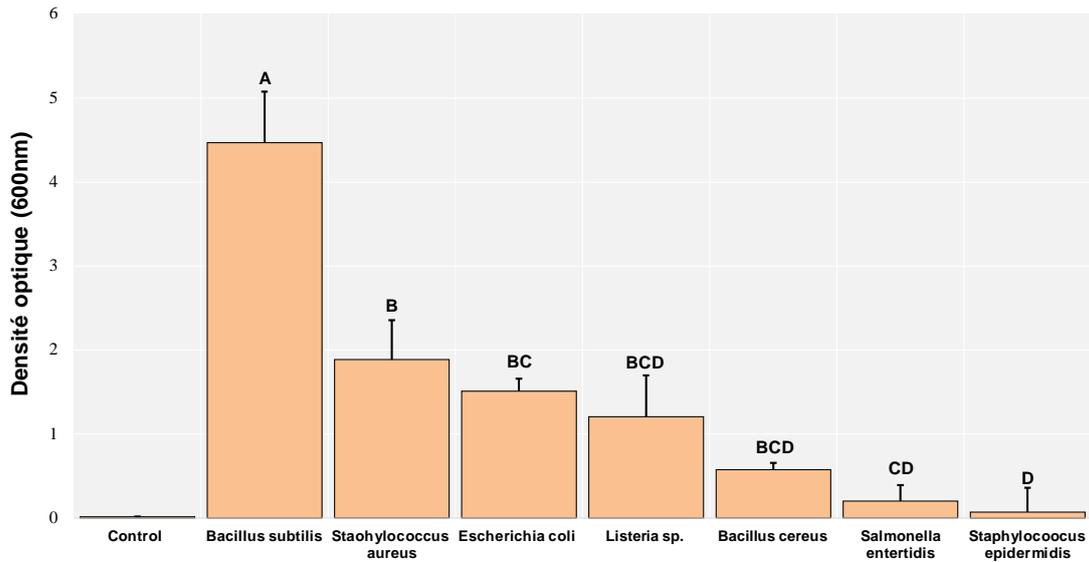


Figure 23. Capacité de formation de biofilms chez les pathogènes testés.

b. Test anti-biofilm

Les taux de formation des biofilms marqués par les souches pathogènes tests en présence des surnageant des souches lactiques isolées, sont présentés sur la figure 24 . D’après le résultat, une variation d’activité anti biofilm a été notée.

➤ *Salmonella enteritidis*

On observe que les surnageants de 5 souches isolées 7, 8, 13, 35 et 36 ont un effet antibiofilm, marquant que le surnageant de la souche 8 avait le plus fort effet.

➤ *Bacillus subtilis*

D’après les résultats, on déduit que les surnageant de toutes les souches lactiques avaient une activité anti biofilm vis-à-vis *B. subtilis*, surtout la souche 36.

➤ *Listeria sp.*

Tous les surnageants des souches lactiques avaient un effet sur la formation de biofilm par *Listeria sp.*, à l’exception de la souche 19 qui en présence de son surnageant le taux de formation de biofilm est supérieur à celui marqué par le témoin (Effet stimulant) .

➤ *Staphylococcus aureus*

La majorité des surnageants avaient une activité antibiofilm sur cette souche pathogène, l’effet des souches 1, 8, 10, 13 et 19 été faible par rapport au souches 7, 23, 34, 35, 36 et 5 qui a montré la plus forte activité.

➤ *Escherichia coli*

Les surnageants des souches 4, 5, 13 et 34 n'avaient aucune activité antibiofilm, car les taux de formation des biofilms en présence de ces surnageant été similaire à celui de témoin.

➤ *Bacillus cereus*

Les surnageants de 7 souches lactiques n'ont montré aucune activité antibiofilm, seuls 4 souches qui sont 10, 19, 23 et 35 avaient un effet.

En raison des dommages causés par les biofilms dans les environnements médicaux et industriels, il a un impact économique majeur et est en augmentation à l'heure actuelle. La plupart des outils de diagnostic et des traitements disponibles ont été développés pour leur efficacité sur des bactéries en phase de croissance planctonique. Il s'agit généralement de mesures préventives. La lutte contre les biofilms peut se définir selon deux axes principaux : empêcher la formation de biofilms, et les détruire lorsqu'ils sont déjà présents (**Lebeaux et Ghigo, 2012 ; Olivares, 2017**).

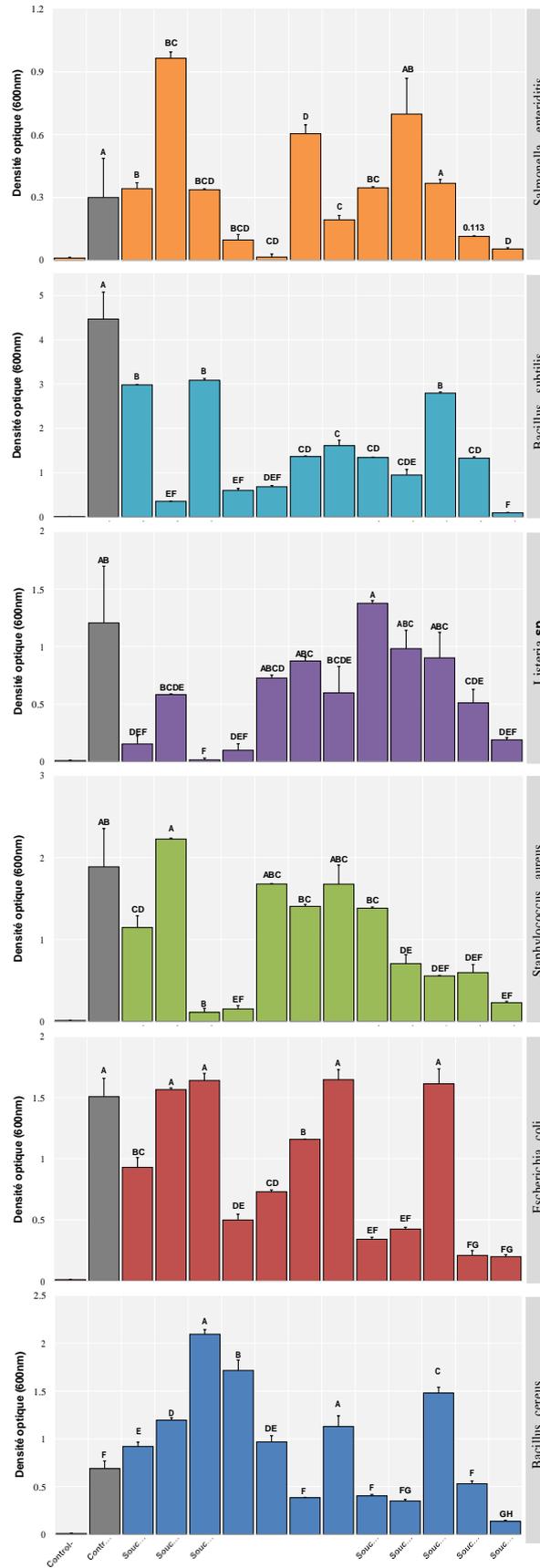


Figure 24. Résultats de l'activité antibiofilm des surnagants de souches lactique isolées à l'égard des souches pathogènes tests sur microplaque en polystyrène.

Il est en effet prouvé que les espèces de *Lactobacillus* comme *L. acidophilus* peuvent inhiber l'adhésion de souches d' *E. coli* uropathogènes à diverses surfaces (**Velraeds et al. 1998**). Ils peuvent même, comme montré pour une souche de *L. rhamnosus*, déplacer un biofilm d' *E. coli* uropathogène (**McMillan et al. 2011**). Dans une autre étude, des espèces de *Lactobacillus* réduisent l'adhérence gonococcique de près de 50 % lorsque les cellules épithéliales sont pre-colonisées par les lactobacilles. En outre, les lactobacilles ont pu déplacer l'agent pathogène adhérent aux cellules épithéliales, suggérant que ces bactéries lactiques sont efficaces comme solution prophylactique et thérapeutique (**Spurbeck et Arvidson, 2008**). La co-agrégation entre les bactéries lactiques et agents pathogènes est un mécanisme qui peut aussi expliquer une telle inhibition de l'adhésion

Au niveau de l'écosystème intestinal, les bactéries lactiques ont aussi démontré leur potentiel à entrer en compétition avec les agents pathogènes pour l'adhésion et la colonisation des muqueuses de l'hôte (**Gueimonde et al. 2006**). Plusieurs études in vitro rapportent une inhibition par adhésion compétitive entre des bactéries entéro-pathogènes et des bactéries lactiques probiotiques. Ces études ont été réalisées sur des cultures cellulaires (lignées cellulaires intestinales) et ou de mucus intestinal d'origine humaine. Il a été montré que des souches *L. gasseri* peuvent concurrencer de manière significative l'adhésion au mucus d' *Enterococcus* sp. et de *Clostridium difficile* (**Ferreira et al. 2011**). Cette inhibition implique probablement des propriétés de surface des bactéries, comme l'hydrophobicité, l'autoagrégation et la capacité de coagrégation qui sont communes aux souches lactiques testées. Le phénomène est toutefois dépendant de l'état des bactéries (concentration, phase de croissance de la culture) et des conditions de co-incubation (**Ren et al. 2012**).

5.5 Résistance aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme des isolats lactiques retenus sont représentés dans le tableau 9 et la figure 25. Ce test montre que la majorité des souches ont une sensibilité significative à la plupart des antibiotiques testés (Ciprofloxacine, Chloramphénicol, Rifampicine, Acide fusidique et l'Amikacine. Les résultats intermédiaires indiquent qu'à cette dose les souches sont faiblement sensibles à résistante à cet antibiotique.

Plusieurs études ont montré la résistance naturelle d'une gamme importante de bactéries lactiques aux antibiotiques (**Botes et al. 2008**). La résistance de souches de *Leuconostoc* sp. à la Vanomycine, Gentamicine et la Chloramphénicol a été bien élucidée (**Ogier et al. 2008**). De même que pour des espèces de *Lactococcus lactis* qui ont présenté une résistance à l'Ampicilline et la Vanomycine (**Donohue, 2004**). La résistance des probiotiques aux antibiotiques peut poser

un problème si elle peut être transmise à des pathogènes chez lesquels la résistance thérapeutique pourrait avoir des conséquences néfastes. L'utilisation de différentes souches lactiques en tant que probiotiques doit faire l'objet de travaux extrêmement attentifs (Mareau et al. 2004).

Tableau 9. Résultat de l'antibiogramme (Test de sensibilité aux antibiotiques) des souches lactiques sélectionnées

Souches	Ciprofloxacine (5 µg)	Chloramphenicol (30 µg)	Rifampicine (30 µg)	Acide fusidique (10 µg)	Amoxicilline + acide clavulanique (30 µg)	Amikacine (30 µg)	Vancomycine (30 µg)
Souche 01	30,0± 0 (S)	32,0±0 (S)	36,75±0,25 (S)	30,0 ± 0(S)	12,0± 0 (I)	19,5± 0 (S)	ND
Souche 04	34,0± 0 (S)	34,0± 0 (S)	38,0± 0 (S)	30,0± 0 (S)	10,0± 0 (R)	19,0± 0(S)	ND
Souche 05	22,0± 0 (S)	30,0± 0 (S)	35,0± 0 (S)	20,0 ± (S)	9,0 ± 0(R)	17,5± 0 (S)	ND
Souche 08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Souche 10	30,0 ± 0 (S)	29,0 ± 0 (S)	17,5± 0,50 (S)	36,0± 1,0 (S)	14,0± 0 (I)	12,0 ± 0 (I)	ND
Souche 13	26,75± 0 (S)	14,9± 0 (I)	32,0± 0 (S)	32,0 ± 0 (S)	17,5± 0 (S)	21,0± 0 (S)	16,0± 0 (S)
Souche 19	21,0 ± 0 (S)	26,0± 0 (S)	17,0 ± 0,07 (S)	18,04 ± 0,07(S)	11,0 ± 1,0 (I)	0 (R)	14,0± 0 (I)
Souche 23	41,50± 0,5 (S)	40,0± 0 (S)	34,0± 0(S)	34,25±2,25 (S)	11,25 ± 0,75 (I)	21,50 ± 0,5 (S)	21,5 ± 0,5 (S)
Souche 34	35,0 ± 0 (S)	35,50 ± 0(S)	37,5 ± 0,50 (S)	/	12,0± 0 (I)	21,50± 0,5	17,0± 0 (S)
Souche 35	23,0± 0 (S)	32,25± 7,25 (S)	22,0± 0(S)	17,50± 0,50 (S)	11,0±1,0 (I)	0 (R)	14,5± 0,5 (I)
Souche 36	21,0± 0 (S)	26,0± 1,0 (S)	24,0± 0(S)	/	11,0± 0 (I)	0 (R)	15,0± 0 (I)

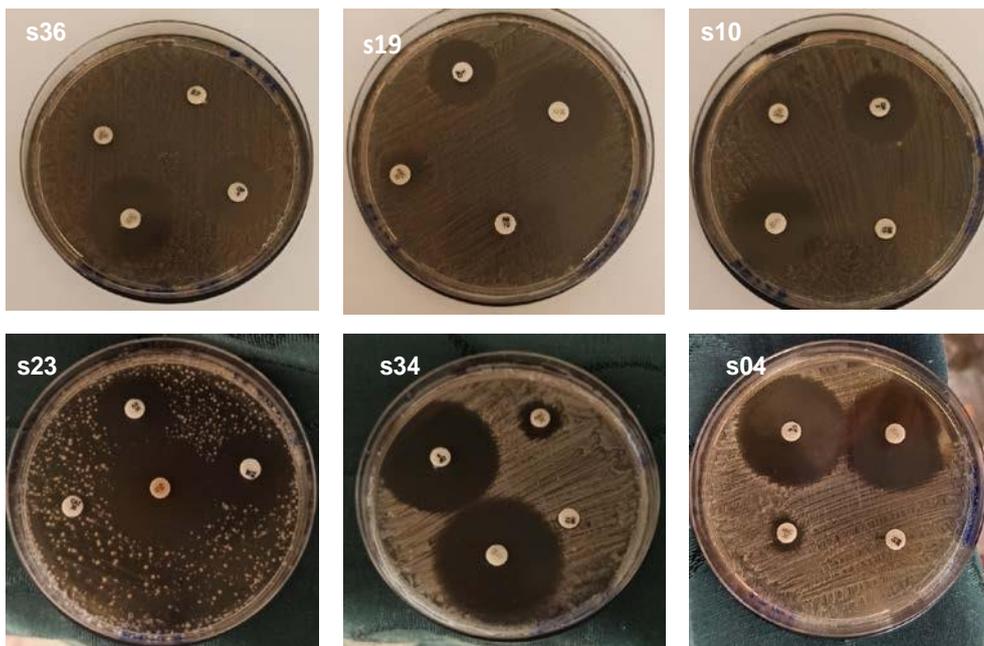


Figure 25. Exemples de résultats de l'antibiogramme de quelques souches lactiques.

5.6. Étude de quelques aptitudes technologiques des bactéries lactiques isolées

A. Pouvoir acidifiant et acidité titrable

Le pouvoir acidifiant des bactéries lactiques demeure l'une de leurs propriétés métaboliques les plus recherchées vu de son intérêt en technologie alimentaire. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 26, où on peut constater que le comportement acidifiant de ces bactéries est variable d'une souche à l'autre. D'après ces résultats, la totalité des bactéries lactiques isolées ont présenté une production progressive d'acides organiques (Acidité titrable ou degré Dornic). Cette dernière est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu dont une relation inversement proportionnelle avec le degré a été observée. La production d'acide lactique est effectivement une des principales fonctions désirées des bactéries lactiques car cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière, en intervenant comme coagulant et aussi comme antimicrobien (Schmidt et al. 1994).

Au bout de 24h d'incubation les valeurs de pH diminuent et se trouvent situées entre pH4.75 et pH6.56 (Figure 26). D'après le résultat, les souches testées ont été classées en deux catégories, la première présentant un pouvoir acidifiant le plus faible avec des valeurs d'acidité dornic de 15 et 45°D, et la deuxième classe (Souche fortement acidifiantes) où des valeurs d'acidité de 46 et 90°D ont été enregistrées.

B. Activités enzymatiques (protéolytiques, amylolytique)

L'activité protéolytique des souches a été recherchée sur milieux MRS additionnés de 1% (m/v) de lait écrémé et 1% de la gélatine. Après incubation, cette activité s'est manifestée par l'apparition d'un halo clair autour des coloniesensemencées en touches à la surface des géloses ou en puits. Un exemple de ces résultats est montré dans la figure 27. Plus de 70% des isolats testés ont exprimé une activité protéolytique. Les résultats obtenus lors de la réalisation de ces tests sont résumés dans le tableau. Il en ressort que toutes les souches étudiées présentent une croissance avec une activité protéolytique sur milieu au lait traduite par l'apparition d'un halo clair autour des points de culture (Tableau 10). La technique à l'agar au lait est une méthode simple et rapide permettant de mesurer l'activité protéinasique des bactéries lactiques, bien qu'il soit parfois difficile de mesurer précisément l'aurole formée par la souche bactérienne.

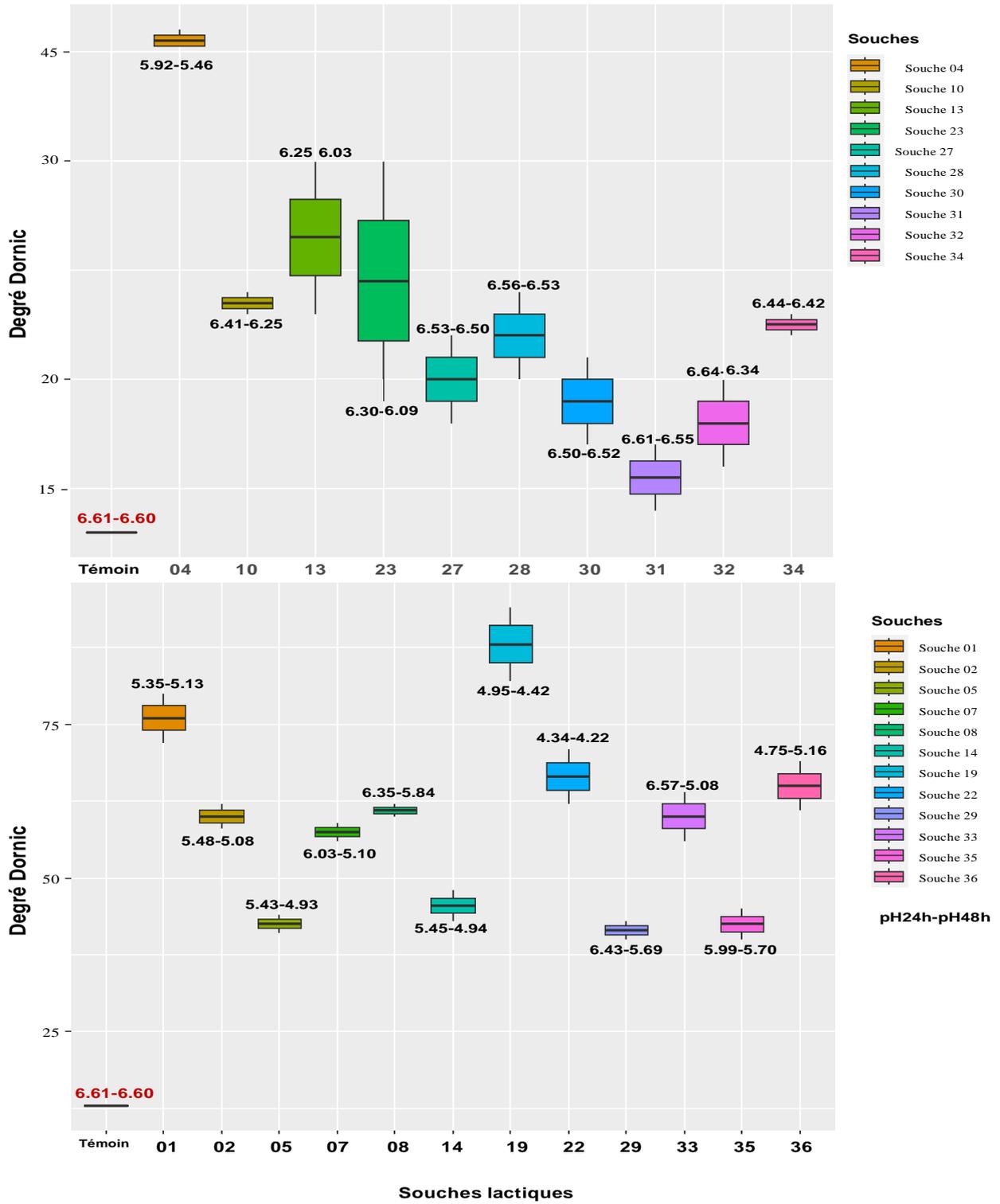


Figure 26. Résultats de la production de l'acide lactique par les souches isolées et la variation de pH en fonction de temps.

Tableau 10. Résultats des activités enzymatiques testées chez les bactéries lactiques

Souche	Gélatinase	Amylase	Activité proteolytique	Coagulase
01	+	-	++	+++
04	-	-	+	-
05	+	-	+	+++
08	+	-	++	+++
10	-	-	+++	-
13	+	-	-	-
19	-	-	+	+++
23	-	-	-	-
34	+	-	-	-
35	+	-	++	+++
36	-	-	++	+++

+. Activité faible, ++. Activité moyenne, +++. Forte activité., -. Absence d'activité.

Le comportement protéolytique de ces souches est variable d'un milieu à l'autre : c'est le cas des souches 13 et la souches 34 qui manifestent des halo de protéolyse dans le milieu à gélatine sans aucune hydrolyse du lait. Cette activité est vraisemblablement liée à l'existence d'une protéinase de paroi décrite chez quelques bactéries lactiques, *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus paracasei*, *Lb. helveticus*, *Lb rhamnosus*, *Sc. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* (Kunji et al.1996 ; Savijoki et al. 2006).

Ces observations nous permettent de confirmer de nouveau, que l'activité protéolytique dépend en partie de la composition chimique du milieu culture. Ces mêmes observations ont été constatées par Drici (2000) et Hassaine (2002). D'autres travaux ont démontré l'existence d'une relation directe entre l'expression de cette activité protéolytique et la composition du milieu de culture et particulièrement sa teneur en peptides libres (Marugg et al. 1995 ; Meijer et al. 1996).

La protéolyse est l'un des processus biochimiques les plus importants impliqués dans la fabrication de beaucoup de produits laitiers et carnés fermentés. La capacité de produire des protéinases extracellulaires est une caractéristique très importante des bactéries lactiques. Ces enzymes hydrolysent les protéines du lait, en fournissant les acides aminés essentiels pour la croissance (El-Ghaish et al. 2011).

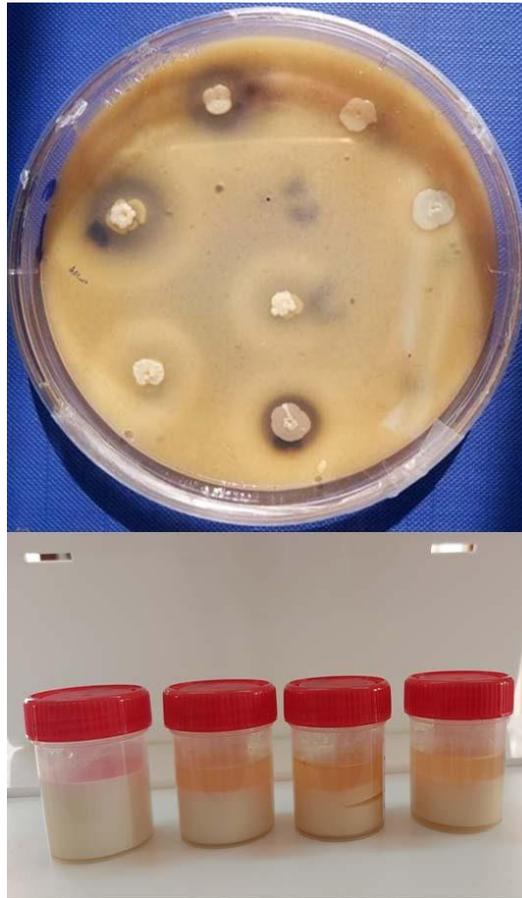


Figure 27. Activité protéolytique et cagulante des isolats lactiques sur milieu MRS.

Les résultats obtenus montrent également qu'il existe une variation qualitative de l'activité protéinasique entre les souches tant de la dégradation de la caséine du lait ou le pouvoir de dégradation de la gélatine. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Idoui et Karam (2008)**, qui ont trouvé que les bactéries lactiques, isolées à partir de différentes sources, présentent un caractère protéolytique variables entre les espèces du même genre que mêmes espèces.

Les résultats rapportés ici montrent l'absence d'une éventuelle relation entre cette activité protéolytique et le pouvoir acidifiant pour ces isolats. Cette observation a été déjà rapportée pour les souches de lactobacilles par **Bottazi (1962) et Fontina et al. (1998)**. Dans notre étude, c'est le cas des souches potentiellement acidifiantes qui ne montrent pas une activité protéolytique élevée, comme (souches 1) et souche 19. À l'inverse d'autres souches s'avèrent faiblement acidifiantes et potentiellement protéolytiques, comme 10), et la souche 4) et enfin, il y a l'exemple de souches révélant un double potentiel en pouvoir acidifiant et en protéolyse, comme souches 5 et 8

L'activité protéolytique des bactéries lactiques occupe une place capitale lors de la croissance de ces dernières dans lait et contribue fortement dans le développement des propriétés organoleptiques de différents produits laitiers fermentés (Axelsson, 1998 ; Christensen et al. 1999). La production d'un produit alimentaire fermenté de haute qualité dépend en partie du système protéolytique des bactéries starters, puisque les peptides et acides aminés formés ont un impact direct sur l'apparition des saveurs dans ces produits transformés. Chez ces bactéries, plusieurs peptidases intracellulaire de spécificités variables ont été rapportés, et leurs libérations après lyse cellulaire a été évoqués pour jouer ce rôle recherché dans les produits laitiers fermentés (Axelsson, 1998).

Les résultats de l'activité amylolytique des souches lactiques a été reportée dans le tableau 11. D'après ces résultats, il apparaît que l'ensemble des bactéries lactiques ne présente pas une activité amylolytiques. Les amylases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites par les bactéries à Gram positif que par des bactéries à Gram négatif (Fickers et al. 2008). Les bactéries lactiques sont considérées comme faiblement amylolytiques et lipolytiques par comparaison avec d'autres espèces bactériennes telles que *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ou *Flavobacterium* (Brennan et al. 2002).

5.6.1 Identification biochimiques des isolats lactiques

La détermination des caractères biochimiques préconisés des différentes souches microbiennes isolées et sélectionnées a permis d'identifier dix(10) isolats bactériens appartenant aux plusieurs genres probables (*Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*). Les résultats des tests d'identification biochimique des souches isolées sont rapportés dans le tableau. Selon les résultats obtenus Figure 28, les glucides ont été utilisés différemment par les souches. En effet, le glucose et le saccharose ont été fermenté par l'ensemble des souches, tandis que la fermentation de mannose été moindre. Les souchesensemencées dans le milieu MRS contenant la cloche de Dhurame ont montré une bonne croissance, mais sans dégagement de gaz à l'exception des souches 10, 23, 34 et 36 qui sont hétéro fermentaires.

Tableau 11. Résultats des différents tests d'identification des souches isolées

Souche	Type fermentaire	Assimilation des sucres										Identification
		GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	
01	HO	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Lactococcus
04	HO	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	Lactococcus
05	HE	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	pediococcus
08	HO	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	pediococcus
10	HE	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	pediococcus
13	HO	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	pediococcus
19	HO	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	Lactobacillus
23	HE	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	Lactococcus
34	HE											Lactococcus
35	HO	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	Lactococcus
36	HE	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	Lactobacillus



Figure 28. Caractérisation biochimique par système Api20E de trois souches lactiques.

Conclusion

Le microbiote exerce de nombreuses fonctions physiologiques et il est clairement établi qu'il joue un rôle primordial dans l'homéostasie intestinale. Cependant, cet équilibre est fragile et toute perturbation du microbiote peut engendrer des réactions pathologiques. Un rôle délétère du microbiote (qu'on dit alors dysbiose) est suspecté dans la pathogénie de diverses affections intestinales infectieuses, telles que les : diarrhées, les infections à *clostridium difficile* et à *helicobacter pylori*, l'entéocolite nécrosante ..., dans ce contexte, l'administration de probiotiques pourrait permettre de rétablir, au moins temporairement, cet équilibre.

Le nombre très important de publications consacrées aux probiotiques témoignent de l'intérêt majeur qu'accorde actuellement la communauté scientifique au potentiel thérapeutique de ces microorganismes. Leur développement est actuellement en pleine expansion et un large panel de produits à base de probiotiques (médicaments ou compléments alimentaires) est proposé pour répondre aux besoins.

Dans ce présent travail, afin de connaître la composition de la microflore autochtone du colostrum et le microbiote intestinale, diverses techniques microbiologiques de bases ont été mises en place à savoir la détermination de la flore totale et la flore lactiques. Et d'autre de mettre une collection de souches de bactéries lactiques ayant des applications probiotiques et biotechnologiques.

À l'issue de ce qui a été réalisé, huit-huit (36) souches ont été isolées, purifiées et à partir 15 différents échantillons originaire de la Wilaya de Tébessa (Est d' Algérie) et seulement 12 souches lactiques souches à potentiel probiotique ont été retenues sur la base de :

- L'étude du pouvoir antimicrobien des souches lactique vis-à-vis des bactéries pathogènes par la méthode des spots, qui a montré que une activité inhibitrice importante souche dépendante contre les diffèrent pathogènes test à Gram négatif et à Gram positif,
- L'étude de la résistance des souches aux conditions gastriques et intestinales simulées a montré que les isolats présentaient une tolérance modérée à forte aux différentes concentrations de NaCl (4%, 6%, 10%), et une bonne tolérance aux sels biliaires, et la pepsine par rapport aux variation de pH.
- L'analyse des caractères de surface cellulaire et l'hydrophobicité des souches a présenté de valeur allant de (7 et 72%), des capacités adhésives faible à modérée, et des pouvoirs de co-agrégation aux pathogènes diffère d'une souche à une autre. Les résultats obtenus ont révélé des activités considérables et montrent également qu'il existe une variation qualitative entre les souches

- Pour le test de l'activité antibiofilm, les surnageants stériles des isolats lactiques, ont exhibé une activité inhibitrice remarquable.
- L'aspect sécuritaire des isolats a été également étudié via leur résistance aux antibiotiques, dont la majorité des souches ont présenté une sensibilité à la plupart des antibiotiques tests.
- L'identification des souches a été réalisée par la détermination des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques. La totalité était des coques appartenant aux genres, *Pediococcus* et *Lactococcus* alors que les lactobacilles viennent en troisième place. D'après les résultats de l'étude des aptitudes technologiques, nous avons pu déduire que, même au sein d'une même espèce, il existe des variations entre les souches autant au niveau de l'activité acidifiante que l'activité protéolytique. Cependant, les souches avaient de bonnes fonctionnalités technologiques.

Cependant, les résultats obtenus au cours de cette étude restent préliminaires, il serait intéressant d'aborder d'autres points et des études plus poussées sont nécessaires pour tirer des conclusions définitives. En perspective nous suggérons :

- Identification au niveau de l'espèce par la galerie miniaturisée API50 CHL des souches isolées.
- L'étude à l'échelle moléculaire notamment les souches lactiques ayant présentées des aptitudes probiotiques.
- Identifier les molécules à l'origine des activités antibactérienne et antiadhésive.
- Tester l'effet antiadhésif sur d'autres surfaces biotiques et abiotiques.

Références bibliographiques

- Affssa (Agence Française de sécurité des produits alimentaires) "Effects of probiotics and prebiotics on flora and immunity in adults." Février 2005.
- **Ait Meddour, A., (2015).** Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques pour la lutte contre les biofilms de bactéries pathogènes et d'althération. *Thèse de doctorat*. Université de Bejaia. pp.137-138.
- Allen SJ, Martinez EG, Gregorio GV, Dans LF. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;CD480030.
- Anderson, R. C., A. L. Cookson, et al. (2010). "Lactobacillus plantarum MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation." *BMC microbiology*10(1): 316.
- Andreas NJ, Kampmann B, Le-Doare KM. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*. 2015;91(11):629-635
- Andriamaheryrasolofa E. Analyse du microbiote du lait par les méthodes moléculaires. *Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation université Laval Québec*; 2010.
- Antharam VC, Li EC, Ishmael A, et al. Intestinal dysbiosis and depletion of butyrogenic bacteria in Clostridium difficile infection and nosocomial diarrhea. *J Clin Microbiol*. 2013;51:2884–2892.
- ARRIETA, M.C., et al. 2014. The intestinal microbiome in early life : health and disease. *Frontiers in Immunology*. Vol. 5, 427.
- ARUMUGAM M., RAES J., PELLETIER E. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 2011, 473 (7346), 174-180. Doi: 10.1038/nature09944
- Arvola T., Laibo K., Torkkri S., Mykkanen H., Salminen S., Manula L., Isolari E. Orophylactico Lactobacillus GG reduces antibiotic associated diarrhea in children with respiratory infections : a randomized study, *Pediatrics* 104(1999) 1121-1122.
- Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov, II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K (2011) Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* 331: 337-341.
- Azad MB, Konya T, Maughan H, Guttman DS, Field CJ, Chari RS, et al. Gut microbiota of healthy Canadian infants: Profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *CMAJ*. 2013;185(5):385-394
- Azad MB, Vehling L, Lu Z, Dai D, Subbarao P, Becker AB, et al. Breastfeeding, maternal asthma and wheezing in the first year of life: A longitudinal birth cohort study. *European Respiratory Journal*. 2017;49(5):1602019
- **B., Tsakalidou, E., (2006).** Probiotic potential of lactobacillus strains isolated from dairy products.
- **Badis, A., Guetarni, D., Kihal, M, et Ouzrout, R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux population locales « Arabia et kabyle ». *Science et Technologie*. 23, 30-37.
- **Badis, A., Guetarni, D., Moussa Boudjema, B., Henni, D.E., Tornadijo, M.E.,**
- **Badis, A., Guetarni, D, Moussa Boudjemâa, B., Henni, D.E., Kihal, M., (2004a).**
- Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics*. 2013;60(1):49-74
- Benamar S, Cassir N, Merhej V, Jardot P, Robert C, Raoult D, et al. Multispacer typing as an effective method to distinguish the clonal lineage of Clostridium butyricum strains isolated from stool samples during a series of necrotizing enterocolitis cases. *J Hosp Infect*. 1 mars 2017;95(3):300 5.
- Benito D, Lozano C, Jiménez E, Albújar M, Gómez A, Rodríguez JM, et al. Characterization of Staphylococcus aureus strains isolated from faeces of healthy neonates and potential mother-to-infant microbial transmission through breastfeeding. *FEMS Microbiology Ecology*. 2015;91(3):fiv007
- Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S. & Guéhen M. Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus. *International Journal of Food Microbiology* 2008. Vol. 126 (3) : 278-285.
- Bernier L. 2010. Les probiotiques en 2010: une revue de la littérature scientifique. Angers: Thèse doctorat en Pharmacie.
- Biagi E, Quercia S, Aceti A, Beghetti I, Rampelli S, Turroni S, et al. The bacterial ecosystem of mother's milk and infant's mouth and gut. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:1214
- BOCLE J.-C., 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

- BOCLE J.-C., 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.
- Booth I.W., Mcneish A.S. — Mechanism of diarrhoea. *Baillière's Clinical Gastroenterology*, 1993, 7, 215-241.
- Bouarioua N, Merrouche M, Pospai D, Mignon M. Physiopathologie de la maladie ulcéreuse gastroduodénale à l'ère d'« *Helicobacter pylori* » Disponible en ligne sur : www.em-premium.com.doc-distant.univ-lille2.fr/article/66583/resultatrecherche/1.
- Bourlioux P. Actualité du microbiote intestinal. *Ann Pharm Fr. janv 2014*;72(1):15-21
- Brandtzaeg P. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *The Journal of Pediatrics*. 2010;156(2):S8-S15
- Buckley, M., Lacey, S., Doolan, A. *et al.* The effect of *Lactobacillus reuteri* supplementation in *Helicobacter pylori* infection: a placebo-controlled, single-blind study. *BMC Nutr* 4, 48 (2018).
- Burcelin, R., Zitvogel, L., Fond, G., Sokol, H. 2016. Microbiote intestinal (flore intestinale).
- Burton, JP, Wescombe PA, Moore CJ, Chilcott CN, Tagg JR. Safety assessment of the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:3050–3053.
- Buts JP, Corthier G, Delmée M. *Saccharomyces boulardii* for *Clostridium difficile*-associated enterocolopathies in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 16: 419-25.
- Buxeraud J. « La diarrhée du voyageur ou "turista", fréquente et invalidante ». *Actualités Pharmaceutiques* [En ligne]. août 2008. Vol. 47, n°476, p. 23. Disponible sur : < [http://dx.doi.org/10.1016/S0515-3700\(08\)70156-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0515-3700(08)70156-3) >
- Caballero S, Carter R, Ke X, Susac B, Leiner IM, Kim GJ, et al. Distinct but spatially overlapping intestinal niches for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS Pathog* 2015; 11:e1005132
- Cabana MD, Shane AL, Chao C, Oliva-Hemker M. Probiotics in primary care pediatrics. *Clin Pediatr* 2006;45:405–410.
- 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. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2012;96(3):544-551
- Cabrera-Rubio R, Mira-Pascual L, Mira A, Collado M. Impact of mode of delivery on the milk microbiota composition of healthy women. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 2016;7(1):54-60
- Camilleri M. Peripheral mechanisms in irritable bowel syndrome. *N Engl J Med* 2012;367:1626-35
- Campeotto., Florence., Anne-Judith., Waligora-Dupriet., Florence Doucet-Populaire., Nicolas Kalach., Christophe Dupont., Marie-José Butel. 2007. « Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né ». *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 31 (5): 533-42.
- Cardwell CR, Stene LC, Joner G, Cinéma O, Svensson J, Goldacre MJ, et al. Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetologia* 2008;51:726-35.
- Carlet, J. The gut is the epicentre of antibiotic resistance. *Antimicrob Resist Infect Control*;1:39.
- Carre D., Simon F., Hance P., Coton T., Delpy R., Guisset M. « Diarrhée du voyageur ». *EMC - Hépatogastroentérologie*. juillet 2005. Vol. 2, n°3, p. 249-263.
- Carre, D. Conduite à tenir devant une diarrhée aiguë. Etiologies. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale - Chirurgie*. Octobre 2004, Vol. 1, 5, pp. 493-532.
- Chang H-Y, Chen J-H, Chang J-H, Lin H-C, Lin C-Y, Peng C-C. Multiple strains probiotics appear to be the most effective probiotics in the prevention of necrotizing enterocolitis and mortality: An updated meta-analysis. *PLoS ONE* [Internet]. 2017 [cité 30 août 2017];12(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/pmc/articles/PM>
- Cheriguene, A., Chougrani, F., Bekada, A. M. A., El Soda, M & Bensoltane, A. (2007) Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goats' milk.
- Christl SU, Murgatroyd PR, Gibson GR, Cummings JH (1992) Production, metabolism, and excretion of hydrogen in the large intestine. *Gastroenterology* 102: 1269-1277.
- Civardi E, Garofoli F, Tzialla C, Paolillo P, Bollani L, Stronati M. Microorganisms in human milk: Lights and shadows. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2013;26(sup2):30-34

- Claesson, M. J., Van Sinderen, D. & O'Toole, P. W. The genus *Lactobacillus* – a genomic basis for understanding its diversity. Federation of European Microbiological Societies 2007. Vol. 269 (1) : 22-28.
- Clarke, G., Sandhu, K. V., Griffin, B. T., Dinan, T. G., Cryan, J. F., & Hyland, N. P. (2019). Gut reactions: breaking down xenobiotic–microbiome interactions. *Pharmacological reviews*, 71(2), 198-224.
- Coconnier MH, Klaenhammer TR, Kerneis S, Bernet MF, Servin AL. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl Environ Microbiol.* juin 1992;58(6):2034-9.
- Collado, M., J. Meriluoto, et al. (2007). "Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus." *Letters in applied microbiology*45(4): 454-460.
- COLLIGNON A., BUTEL M.-J. « Etablissement et composition de la flore microbienne intestinale ». In : Flore microbienne intestinale : physiologie et pathologie digestive. Montrouge : John Libbey Eurotext, 2004. p. 19-35
- COLLIGNON, A., BUTEL, M.-J. 2004. Etablissement et composition de la flore microbienne intestinale. [auteur du livre] J.-C. RAMBAUD, et al. *Flore microbienne intestinale. Physiologie et pathologie digestives*. Montrouge : John Libbey Eurotext, pp. 19-38.
- Corrieu, G. & Luquet, F. M. Bactéries lactiques : De la génétique au ferment. Paris : Édition Tec et Doc 2008, p. 849.
- Corsonello A, Lattanzio F, Bustacchini S, et al. Adverse events of proton pump inhibitors: potential mechanisms. *Curr Drug Metab.* 2018;19(2):142–154.
- CORTIER G. « Flore intestinale et santé : quels enjeux ? » Nutrition Clinique et Métabolisme. juin 2007. Vol. 21, n°2, p. 76-80.
- CZERUCKA, D., PICHE, T. et RAMPAL, R. Review article : yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. John Wiley and Sons, 2007, 26.
- Dann S.M. et Eckman L. 2007. Innate immune defenses in the intestinal tract. *Current Opinion in Gastroenterology*. 23: 115-120.
- DE VOS, P., et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 3^e édition. New York: Springer, 2009. pp. 21-127. Vol. 3.
- defences. *Canadian Journal of Gastroenterology*. Vol. 18, 8, pp. 493-500.
- DELLAGLIO, F. et FELIS, G.E. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. [auteur du livre] G.W. TANNOCK. *Probiotics and Prebiotics : Scientific Aspects*. Norfolk: Caister Academic Press, 2005, pp. 25-50.
- diarrhea in children ». *Pediatrics*. juillet 1991. Vol. 88, n°1, p. 90-97.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(26):11971-11975
- Doré, J., Corthier, G. 2010. The human intestinal microbiota. *Gastroentérologie Clin Biol.*(34).
- Duc LH, Hong HA, Fairweather N, Ricca E, Cutting SM. Bacterial spores as vaccine vehicles. *Infect Immun* 2003;71:2810–2818.
- Ducluzeau R. Ecosystème microbien du tube digestif. *EMC- Gastro-Entérologie*. 1998;8:1-0.
- Ducluzeau R. Le concept de probiotique : historique, définition et principales caractéristiques. *Antibiotiques*. déc 2002;4:234-8.
- Ducrotté P. Le microbiote intestinal : un organe à part entière - Microbiote et troubles fonctionnels intestinaux, John Libbey Eurotext; 2017, p. 113-24.
- Eckburg PB. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*. 10 juin 2005;308(5728):1635-8.
- El Aidy, S., Van Den Bogert, B., & Kleerebezem, M. (2015). The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health. *Current opinion in biotechnology*, 32, 14-20.
- EL ANBASSI, S., BIANCHI, V. et DUPLOYEZ, N. *Bactériologie, virologie*. Paris : De Boeck Supérieur, 2013.
- Emilie Dolié . Rôle de la flore intestinale dans l'immunité : usage actuel des probiotiques et futures indications . Disponible en ligne sur : <http://thesesante.upstlse.fr/2231/1/2018TOU32040.pdf>
- exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria isolated from Algerian.
- FALLANI, M., et al. 2010. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe : geographic influence beyond delivery mode, breastfeeding, and antibiotics. *Journal of Pediatric*

- Gastroenterology and Nutrition*. Vol. 51, 1, pp. 77-84.
- Felis G. E., Dellaglio F. « Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria ». Current issues in intestinal microbiology. septembre 2007. Vol. 8, n°2, p. 44-61.
 - Felley C.P., Corthesy-theulaz I., Rivero J.L. et al. Favourable effect of an acidified milk on *Helicobacter pylori* gastritis in man. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2001, 13 : 25-9.
 - **Fernández, M., Martínez, B M, Martín, M C., Valdivia, E., Maqueda, M., (2007)**. Hetrologous expression of enterocin AS-48 in several strains of lactic acid bacteria.
 - Fitzstevens JL, Smith KC, Hagadorn JI, Caimano MJ, Matson AP, Brownell EA. Systematic review of the human milk microbiota. *Nutrition in Clinical Practice*. 2017;32(3):354-364
 - FONTY G., CHAUCHEYRAS-DURAND F. Les écosytèmes digestifs. Tec & Doc.Paris : Lavoisier, 2007. XIX-311 p.
 - Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/ Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes. Cordoba, Argentine : FAO/OMS, 2001.
 - food and Agriculture Organization. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food 2002. Available at: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Accessed 14 February 2008.
 - Food and Drug Administration. Guidance for Industry on Complementary and Alternative Medicine Products and Their Regulation by the Food and Drug Administration. U.S. Department of Health and Human Services. 2006. Available at: <http://www.fda.gov/CBER/gdlns/altmed.pdf>. Accessed 10 February 2008.
 - Fooks, L. and G. Gibson (2002). "Probiotics as modulators of the gut flora." *British journal of nutrition*88(S1): s39-s49.
 - function." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*298(6): G807-G819.
 - Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lecuyer E, Mulder I, Lan A, Bridonneau C, Rochet V, Pisi A, De Paepe M, Brandi G, Eberl G, Snel J, Kelly D, Cerf-Bensussan N (2009) The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 31: 677-689.
 - Gendron M-C. Cytométrie en flux. EMC- Biol Médicale. 2003;1-0.
 - Gérard P, Bernalier-Donadille A (2007) Les fontions majeurs du microbiote intestinal Cahiers de Nutrition et de Diététique 42: 28-36.
 - goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology* 21, 579–588.
 - Gomez-Llorente C, Plaza-Diaz J, Aguilera M, Muñoz-Quezada S, Bermudez-Brito M, Peso-Echarri P, et al. Three main factors define changes in fecal microbiota associated with feeding modality in infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2013;57(4):461-466
 - Gonzàlaz C.J., Encinas J.P., Garcia-Lopez M.L. et Otero A. 2000. Characterization and identification of lactic acid bacteria from fresh water fishes. *Food Microbiology*. 17: 383- 391.
 - González R, Mandomando I, Fumadó V, Sacoor C, Macete E, Alonso PL, et al. Breast milk and gut microbiota in African mothers and infants from an area of high HIV prevalence. *PLoS One*. 2013;8(11)
 - Goulet O. La flore intestinale : un monde vivant à préserver. *Journal de pédiatrie et de puériculture* (2009) 22, 102—10
 - Grall, N., Andreumont, A., Ruppé, E. 2017. Microbiote intestinal. [Httpwwwem-Premiumcomdoc-Distantuniv-Lille2/fr/da/ta/ra/tes/bio/emb-75692](http://www-em-premium.com/doc-Distantuniv-Lille2/fr/da/ta/ra/tes/bio/emb-75692) [Internet]. 13 janv 2017 [cité 30 sept 2017]; Disponible sur: <http://www.em-premium.com/doc-distant.univ-lille2.fr/article/1101744/resultat Recherche/1>
 - Gregory KE, DeForge CE, Natale KM, Phillips M, Van Marter LJ. Necrotizing Enterocolitis in the Premature Infant. *Adv Neonatal Care Off J Natl Assoc Neonatal Nurses*. juin 2011.
 - Gritz EC, Bhandari V. The human neonatal gut microbiome: A brief review. *Frontiers in Pediatrics*. 2015;3:17
 - Groschwitz, K. R. and S. P. Hogan (2009). "Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis." *Journal of Allergy and Clinical Immunology*124(1): 3-20.
 - Guandalini S., Pensabene L., Zikri M. A., Dias J. A., Casali I. G., Hoekstra H., Kolacek S., Massar K., Micetic-Turk D., Papadopoulou A., Desousa J. S., Sandhu b., Szajewska H., Weizman Z. « Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial ». *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. janvier 2000. Vol.30, n°1, p. 54-60.

- Guarner F, Khan AG, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines : Probiotics and Prebiotics. World Gastroenterology Organisation; 2011.
- GUARNER, F. et SCHAAFSMA, G.J. Probiotics. International Journal of Food Microbiology. Elsevier, 1998, 39, pp. 237-238.
- Guiraud J. P. et Rosec J. P. 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire, Dunod, Paris : 238-245.
- **Hadadji, M., Bensoltane, A., (2006).** Growth and lactic acid production by *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in goat's milk. African journal of biotechnology. Vol.5 : (6) : 505-509.
- HAGIAGE M. La flore intestinale : de l'équilibre au déséquilibre. Paris : Vigot, 1994. 120 p.
- Heida FH, Harmsen HJM, Timmer A, Kooi EMW, Bos AF, Hulscher JBF. Identification of bacterial invasion in necrotizing enterocolitis specimens using fluorescent in situ hybridization. J Perinatol Off J Calif Perinat Assoc. janv 2017;37(1):67-72.;11(3):155-66.
- Heikkilä MP, Saris P. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. Journal of Applied Microbiology. 2003;95(3):471-478
- HEYMAN M., HEUVELIN E. « Micro-organismes probiotiques et régulation immunologique : le paradoxe ». Nutrition Clinique et Métabolisme. juin 2006. Vol. 20, n°2, p. 85-94.
- Hindré T. Le microbiote intestinal humain. Laboratoire adaptation et pathogénie des microorganismes; 2012.
- Hooper, L. V., M. H. Wong, et al. (2001). "Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine." *Science* 291(5505): 881-884.
- Hooper, LV., Gordon, GI. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*; (292).
- Hoyos AB. Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit. *Int J Infect Dis.* 1 juin 1999;3(4):197-202.
- Huh SY, Rifas-shiman SL, Zera CA, Edwards JWR, Okey E, Weiss ST, et al. Delivery by caesarean section and risk of obesity in preschool age children: a prospective cohort study. *Arch Dis Child* 2012;97:610-6.
- Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UM, Beck DL, Abdo Z, et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One.* 2011;6(6)
- Hunter CJ, Bean JF. Cronobacter: an emerging opportunistic pathogen associated with neonatal meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis. *J Perinatol.* août 2013;33(8):581-5.
- Hurduc V, Plesca D, et al. A randomized, open trial evaluating the effect of *Saccharomyces boulardii* on the eradication rate of *Helicobacter pylori* infection in children. *Acta Paediatr.* 2009 Jan;98(1):127-31. Epub 2008 Aug 4.
- Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw
- Isolauri E., Juntunen M., Rautanen T., Sillanaukee P., Koivula T. « A human
- IVANOV, I.I., HONDA, K. 2012. Intestinal commensal microbes as immune modulators. *Cell Host Microbe.* Vol. 12, 4, pp. 496-508.
- Iyer R., Tomar S.K. et Kapila S. 2010. Probiotic properties of folate producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Food Research International.* pp: 103–110.
- Izquierdo E. (2009). Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique (Thèse de doctorat). *IPHC Strasbourg* ; p. 1-230.
- Jeurink P, Van Bergenhenegouwen J, Jiménez E, Knippels L, Fernández L, Garssen J, et al. Human milk: A source of more life than we imagine. *Beneficial Microbes.* 2013;4(1):17-30
- Jiménez E, de Andrés J, Manrique M, Pareja-Tobes P, Tobes R, Martínez-Blanch JF, et al. Metagenomic analysis of milk of healthy and mastitis-suffering women. *Journal of Human Lactation.* 2015;31(3):406-415
- **Jiwoua, C, Millière, JB. (1990).** Flore lactique et entérocoques du lait caillé (Pindidam) produit dans l'Adamaoua (Cameroun). *Lait* 70, 475-486.
- Kalliomäki M, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr* 2008;87:534-8.
- Kalliomäki M, Kirjavainen P, Eera E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infant in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:129-34.
- Khanna S, Pardi DS, Kelly CR, Kraft CS, Dhore T, Henn MR, et al. A novel microbiome therapeutic increases gut microbial diversity and prevents recurrent *Clostridium difficile* infection. *J Infect Dis* 2016; 214:173–81.

- Khodayar-Pardo P, Mira-Pascual L, Collado M, Martínez-Costa C. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *Journal of Perinatology*. 2014;34(8):599-605
- **Kihal, M., (2004b)**. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology* 21, 343–349.
- Klaenhammer, T. R. (1993). "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria." *FEMS microbiology reviews*12(1): 39-85.
- Klotz F. Prise en charge des diarrhées aiguës. *Med. Trop.*, 2001. 61, 220-223.
- Kotowska M, Albrecht P, Szajewska H. Saccharomyces boulardii in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 583-90.
- Kumar H, du Toit E, Kulkarni A, Aakko J, Linderborg KM, Zhang Y, et al. Distinct patterns in human milk microbiota and fatty acid profiles across specific geographic locations. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:1619
- **Labioui, H., Elmoualdi, L., Elyachoui, M., Ouhassine, M., (2005)**. Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull soc. Pharm. Bordeaux*. 144, 237-250.
- Laboratoire Pileje. Le microbiote intestinal dans tous ses états.2013
- Lactobacillus strain (Lactobacillus casei sp strain GG) promotes recovery from acute
- Lagier JC. Gut microbiota and clostridium difficile infections. *Hum Microbiome J* 2016;2:10-4.
- Lamoril J, Ameziane N, Deybach J-C, Bouizegarène P, Bogard M. Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-Anal BiolSpéc.* oct 2008;23(5):260-79.
- Landman C, Quevrain E (2016) [Gut microbiota: Description, role and pathophysiologic implications]. *La Revue de médecine interne* 37: 418-423.
- LECLERC M., JUSTE C., BLOTTIERE H., DORE J. « Microbiote intestinal : un univers méconnu ». *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. avril 2007. Vol. 42, Supplement 2, p. 22-27
- Leveau J.-Y., Bouix M. Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel. Paris : Tec & Doc - Lavoisier, 1993. 612 p.
- Lichtenstein GR, Olson A, Travers S, Diamond RH, Chen DM, Pritchard ML, Feagan BG, Cohen RD, Salzberg BA, Hanauer SB, Sandborn WJ (2006) Factors associated with the development of intestinal strictures or obstructions in patients with Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology* 101: 1030-1038.
- Lin PW, Nasrallah TR, Stoll BJ. Necrotizing enterocolitis: récent scientific advances in pathophysiology and prévention. *Semin Perinatol* 2008;32:70-82.
- LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.-H. et WHITMAN, W.B. Revised road map to the phylum Firmicutes. [auteur du livre] Paul Vos, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2^e édition. New York : Springer, 2009, Vol. 3, pp. 1-14.
- Mackiewicz V. Séquençage des acides nucléiques. *EMC- Biol Médicale*. 2003;1-0.
- Macpherson AJ, Harris NL (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature reviews Immunology* 4: 478-485.
- **Maragkoudakis,P., Zoumpopoulou, G., Miaris, Ch., Kalantzopoulos, G, pot,**
- Marteau P. (2001). Safety aspects of probiotic products. *Scand. J. Nutr*; 45: 22-24.
- Marteau P. et Rambaud J-C. (1998). Probiotiques en gastroentérologie: bases rationnelles, effets démontrés et perspective. *Hépatogastro*; 5 (4) : 267-273.
- Marteau P. et Seksik P. Probiotiques et alicaments. (2005). In : Luquet F. M. et Corrieu G. Bactéries lactiques et probiotiques. Paris: Lavoisier Tec&Doc ; p : 255-289.
- Marteau P. Microbiote intestinal. *EMC- Gastro-Entérologie*. 2013;8:1-8
- Marteau P., Seksik P. « Probiotiques et alicaments ». In : Bactéries lactiques et probiotiques. Paris : Lavoisier, 2005. p. 255-289.
- Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J : Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 2001 Feb ; 73(2 suppl): 430S-436S.
- Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*. 2003;143(6):754-758
- Martín V, Maldonado-Barragán A, Moles L, Rodríguez-Baños M, Campo RD, Fernández L, et al. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *Journal of Human Lactation*. 2012;28(1):36-44
- Mcfarland L. V. « Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea ». *Travel*

- medicine and infectious disease. mars 2007. Vol. 5, n°2, p. 97-105.
- **Mebarki , B., Aoughlis, A., (2016).** Etude de l'activité anti-*E. coli* de souches de bactéries lactiques isolées de différents produits laitiers. Mémoire du MASTER en Microbiologie Alimentaire et Santé. Université A. MIRA – Bejaia. 12-13 p.
 - Mercenier A., PAVAN S., POT B. Probiotics as biotherapeutic agents : Present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design.*, 2003, 9 : 175-91.
 - Miani C, Ticinesi A, Gerritse J, Nouvelle A, Lugli GA, Mancabelli L, et al. Gut microbiota composition and *Clostridium difficile* infections in hospitalized elderly individuals: a metagenomic study. *Sci Rep* 2016;6:25945.
 - Milani C, Ticinesi A, Gerritsen J, et al. Gut microbiota composition and *Clostridium difficile* infection in hospitalized elderly individuals: a metagenomics study. *Sci Rep.* 2016;6:25945.
 - Mimura T, Rizzello F, et al. Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut.* 2004 Jan;53(1):108-14.
 - Mohania D, Nagpal R, Kumar M, Bhardwaj A, Yadav M, Jain S, et al. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of Digestive Diseases.* 2008;9(4):190-198
 - **Mostefaoui, A., Hakem, A., Yabrir B., Boutaiba, S., Badis, A. (2014).** Screening for
 - Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. The infant microbiome development: Mom matters. *Trends in Molecular Medicine.* 2015;21(2):109-117
 - Nihal EZZARIGA « Probiotiques : Application thérapeutique et effets secondaire » 2015. Mise à jour le 09/01/2015 par le Service des Ressources Humaines. <http://hdl.handle.net/123456789/14823>.
 - O'Hara, AM., Shanahan, F. 2012. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006;7:688–93.
 - Oelschlaeger, T. A. (2010). "Mechanisms of probiotic actions—a review." *International Journal of Medical Microbiology* 300(1): 57-62.
 - Ohland, C. L. and W. K. MacNaughton (2010). "Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier.
 - Okada H, Kuhn C, Feller H, Bach JF. The "hygiene hypothesis" for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol* 2010;160:1-9.
 - Olivares M, Albrecht S, De Palma G, Ferrer MD, Castillejo G, Schols HA, et al. Human milk composition differs in healthy mothers and mothers with celiac disease. *European Journal of Nutrition.* 2015;54(1):119-128
 - Ouwehand, A. C. and S. Vesterlund (2004). "Antimicrobial components from lactic acid bacteria." *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-139:* 375-396.
 - Pammi M, Cope J, Tarr PI, Warner BB, Morrow AL, Mai V, et al. Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. *Microbiome* [Internet]. 9 mars 2017 [cité 20 juill 2017];5. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5343300/>
 - Pannaraj PS, Li F, Cerini C, Bender JM, Yang S, Rollie A, et al. Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. *JAMA Pediatrics.* 2017;171(7):647-654
 - Penders J, Stobberingh EE, van d'en Brandt PA, Thijs C. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy* 2007;62:1223-36.
 - Perez PF, Doré J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: Lessons from maternal cells? *Pediatrics.* 2007;119(3):e724-ee32
 - Pfeiler, E.A., Klaenhammer, T.R. (2007). The genomics of lactic acid bacteria. *TRENDS in Microbiology* 15 (12), 546-553.
 - Philippe Marteau., Joël Doré. 2017. Le microbiote intestinal, un organe à part entière. *John LibbeyEurotext.* 338 p.
 - PHILIPS, Cyriac Abby, AUGUSTINE, Philip, YEROL, Praveen Kumar, et al. Modulating the intestinal microbiota: Therapeutic opportunities in liver disease. *Journal of clinical and translational hepatology*, 2020, vol. 8, no 1, p. 87.
 - Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel : principes et applications. *Rev Biol Biotechnol.* Déc 2002;2(2):2-11.
 - Probiotiques et Prébiotiques. World Gastroenterology Organisation Global Guideline.
 - Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ (2002) the microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS microbiology letters* 217: 133-139.

- Rampal P, Beaugerie L, Marteau P, Corthier G. Colites infectieuses de l'adulte. *John libbeyeurtext*; 2000. 260 p.
- Ramsay DT, Kent JC, Owens RA, Hartmann PE. Ultrasound imaging of milk ejection in the breast of lactating women. *Pediatrics*. 2004;113(2):361-367
- Recruitment of Dendritic Cells Is Responsible for Intestinal Epithelial Damage in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis by *Cronobacter sakazakii* | *The Journal of Immunology* [Internet]. [cité 28 juill 2017]. Disponible sur: <http://www.jimmunol.org/content/186/12/7067.1> ong
- **Ribeiro et al., (2013)**. Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico Cheese an artisanal cow's milk cheese. *J. App. Microbiol* doi: 10.1111/jam.12388
- Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB (2006) Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of lipid research* 47: 241-259.
- RIGOTTIER-GOIS L., LE BOURHIS A.-G., GRAMET G., ROCHET V., DORE 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 Microbiology Ecology*. 2003. Vol. 43, n°2, p. 237-245.
- Robin J. M. et Rouchy A. (2001). Les probiotiques. *Nutrithérapie info*; 6: 1-4.
- Rodríguez JM. The origin of human milk bacteria: Is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Advances in Nutrition*. 2014;5(6):779-784
- RODRIGUEZ, J.M., et al. 2004. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health and Disease*. Vol. 26, 26050.
- Roselli, M., A. Finamore, et al. (2006). "Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88." *British journal of nutrition*95(06): 1177-1184.
- Roy D. (2006). Innocuité, qualité et efficacité des probiotiques. Résumé du rapport « Développement d'une expertise de pointe et de méthodes efficaces et rigoureuses en matière d'innocuité, qualité et efficacité des probiotiques. AISA ; Available from. URL: http://www.aisa-ahif.org/index.php?menu=dossier_reglementaire.
- Ruan, W., Engevik, M. A., Spinler, J. K., & Versalovic, J. (2020). Healthy human gastrointestinal microbiome: composition and function after a decade of exploration. *Digestive diseases and sciences*, 65(3), 695-705.
- **Ruiz-Barba, JL., Cathcart, DP., Warner, PJ., Jimenezdiaz, R., (1994)**. Use of *Lactobacillus plantarum* LPC010, a bacteriocin producer, as a starter culture of spanish-style green olive fermentation. *App. Environ. Microbiol*, 60 : 2059-2064.
- Sachdeva A, Nagpal J. Effect of fermented milk-based probiotic preparations on *Helicobacter pylori* eradication: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009 Jan;21(1):45-53. Review.
- Salonen and W. M. de Vos, "Impact of diet on human intestinal microbiota and health," *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, vol. 5, pp. 239-262, 2014
- **Schillinger, U., Geisen, R., Holzapfel, WH., (1996)**. Potentiel of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of food. *Trends Food Sci. Technol*, 7 : 158-164.
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*.juill 2010;90(3):859-904.
- Servin, A. L. (2004). "Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens." *FEMS microbiology reviews*28(4): 405-440.
- Sharma R, Hudak ML. A Clinical Perspective of Necrotizing Enterocolitis: Past, Present, and Future. *Clin Perinatol*. mars 2013;40(1):27 51.
- SHI, H.N., WALKER, A. 2004. Bacterial colonization and the development of intestinal
- Shu, Q. and H. S. Gill (2002). "Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20™) against *Escherichia coli* O157: H7 infection in mice." *FEMS Immunology & Medical Microbiology*34(1): 59-64.
- Singh R, van Nood E, Nieuwdorp M, van Dam B, Ten Berge IJ, Geerlings SE, et al. Donor feces infusion for eradication of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in a patient with end stage renal disease. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:O977-8
- Smith B, Bodé S, Petersen BL, Jensen TK, Pipper C, Kloppenborg J, et al. Community analysis of bacteria colonizing intestinal tissue of neonates with necrotizing enterocolitis. *BMC Microbiol*. 12 avr 2011;11:73.
- Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, Glickman JN, Garrett WS (2013) The microbial metabolites, short-

- chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 341: 569-573.
- Soto A, Martín V, Jiménez E, Mader I, Rodríguez JM, Fernández L. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: Influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2014;59(1):78
 - STEWART, J.A. Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria in the faecal microflora of children. *Journal of Medical Microbiology*. 2005, 54, pp.1239-1242.
 - **Stiles, M.E., Holzapfel, W., (1997)**. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36(1), 1-29.
 - Szajewska H, Albrecht P, Topczewska-Cabanek A. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial: effect of lactobacillus GG supplementation on *Helicobacter pylori* eradication rates and side effects during treatment in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009 Apr;48(4):431-6.
 - **Tabak, S., Bensoltane, A., (2012)**. L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. *Nature et technologie*. Page 71 à 79.
 - Tahar A. Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries : analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires impliqués. [Québec]: Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation université Laval; 2005.
 - Ted Jost., Christophe Lacroix., Christian Braegger., Christophe Chassard. .2016 Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutr Rev*. Oct 2016;73(7):426-37.
 - Thavagnanam S, Fleming J, Bromley A, Shields MD, Cardwell CR. A meta-analysis of the association between caesarean section and childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 2008;38:629-33.
 - The Universal Protein Resource. *Bacillus*. UniProt. [En ligne] [Citation : 9 Janvier 2015.] <http://www.uniprot.org/taxonomy/1386>.
 - The Universal Protein Resource. *Bifidobacterium*. UniProt. [En ligne] [Citation : 9 Janvier 2015.] <http://www.uniprot.org/taxonomy/1678>.
 - The Universal Protein Resource. *Lactobacillales*. UniProt. [En ligne] [Citation : 9 Janvier 2015.] <http://www.uniprot.org/taxonomy/186826>.
 - The Universal Protein Resource. *Saccharomycetaceae*. The Universal Protein Resource. [En ligne] [Citation : 9 Janvier 2015.] <http://www.uniprot.org/taxonomy/4893>.
 - Ticinesi A, Nouvenne A, Folesani G, et al. Multimorbidity in elderly hospitalised patients and risk of *Clostridium difficile* infection: a retrospective study with the Cumulative Illness Rating Scale (CIRS) *BMJ Open*. 2015;5(10):e0093.
 - Tinnion R, Gillone J, Cheetham T, Embleton N. Preterm birthday and subsequent insulin sensitivity: a systematic review. *Arch Dis Child* 2014;99:362-8.
 - **Todorov, SD., Dicks, LM., (2008)**. Evaluation of lactic acid bacteria from kefir, molasses and olive brine as possible probiotics based on physiological properties. *Ann Microbiol* 58:661-670.
 - **Todorov, SD., Furtado, DN., Saad, SM., Tome, E., Franco, BD., (2011)**. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. *J Appl Microbiol* 110:971-986
 - Trasande L, Blustein J, Liu M, Corwin E, COX LM, Blaser MJ. Infant antibiotic exposures and early-life boy masse. *Int J Obes* 2013;37:16-23.
 - TURNBAUGH, P.J., et al. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*.
 - Tvede M, Rask-Madsen J. Bacteriotherapy for chronic relapsing *Clostridium difficile* diarrhoea in six patients. *Lancet* 1989; 1: 1156-60.
 - Tvede M, Rask-Madsen J. Bacteriotherapy for chronic relapsing *Clostridium difficile* diarrhoea in six patients. *Lancet* 1989; 1: 1156-60.
 - Ubeda C, Bucci V, Caballero S, Djukovic A, Toussaint NC, Equinda M, et al. Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. *Infect Immun* 2013;81:965-73.
 - Ubeda C, Bucci V, Caballero S, Djukovic A, Toussaint NC, Equinda M, et al. Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. *Infect Immun* 2013;81:965-73.
 - Urbaniak C, Angelini M, Gloor GB, Reid G. Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. *Microbiome*. 2016;4(1):1
 - Urbaniak C, Gloor GB, Brackstone M, Scott L, Tangney M, Reid G. The microbiota of breast

- tissue and its association with breast cancer. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016;82(16):5039-5048
- Urbaniak C, McMillan A, Angelini M, Gloor GB, Sumarah M, Burton JP, et al. Effect of chemotherapy on the microbiota and metabolome of human milk, a case report. *Microbiome*. 2014;2(1):24
 - Van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2013;368:407–15.
 - Van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2013;368:407–15.
 - VANDENPLAS, Y., et al. 2008. Functional food and growth and development in infants. [auteur du livre] M. ROBERFOID et V., DELZENNE, N. COXAM. *Aliments fonctionnels*. 2è édition. Paris : Lavoisier, 19, pp. 563-574.
 - Vanderhoof J.A., Whitney D.B., Antonson D.L., Hanner T.L., Lupo J.V., Young R.J. *Lactobacillus GG* in prevention of antibiotic-associated diarrhea in children, *J.Pediatr.* 135 (1999) 564-568.
 - Vanderpool, C., F. Yan, et al. (2008). "Mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases." *Inflammatory bowel diseases* 14(11): 1585-1596.
 - Xu L, Lochhead P, Ko Y, Claggett B, Leong RW, Ananthakrishnan AN. Systematic review with meta-analysis: Breastfeeding and the risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2017;46(9):780-789
 - Zhou X, Voigt A, Paveglio S, Weinstock G, Matson A, Davidovics Z. Similar bacterial signatures in intestinal tissues, milk, and dendritic cells of lactating mice suggest a possible entero-mammary pathway. *Gastroenterology*. 2017;152(5):S172
 - Zou J, Dong J, Yu X. Meta-analysis: *Lactobacillus* containing quadruple therapy versus standard triple first-line therapy for *Helicobacter pylori* eradication. 2009 Oct;14(5):97-107
 - VASSON, M.-P. Modulation nutritionnelle de la réponse immunitaire. [auteur du livre] M.B. ROBERFOID, V. COXAM et N. DELZENNE. *Aliments fonctionnels*. 2è édition. Paris : Lavoisier, 2008, 15, p. 476.
 - Vol. 457, 7228, pp. 480-484.
 - Waligora-Dupriet A, Chanel J-M. Le microbiote intestinal :un organe à part entière – Microbiote et réactions allergiques. *John Libbey Eurotext*; 2017.
 - Wang ZJ et al. Effects of anti-*Helicobacter pylori* concomitant therapy and probiotic supplementation on the throat and gut microbiota in humans. *Microb Pathog*. 2017;109:156-161 (*World Journal of Gastroenterology*, vol.16, n°4, p445-451)
 - Wehkamp J., Schaubert J., Stange E.F. 2007. Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Current Opinion in Gastroenterology*. 23: 32- 38. WGO. 2008.
 - Wensch C, Parschalk B, Hasenhundl M, et al. Comparison of vancomycin, teicoplanin, metronidazole, and fusidic acid for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 1996 ; 22 : 813-8.
 - World Gastroenterology Organisation Global Guidelines, "Probiotics and prebiotics." 2008.
 - World Gastroenterology Organisation, Global Guideline Probiotics and prebiotics. 2011.

Annexes

Milieu MRS (de Man Rogoza et Sharpe) bouillon/ gélose

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

- pH du milieu prêt -à- l'emploi à 25°C : $6,4 \pm 0,2$.
- Préparation du milieu : Mettre en solution **55.3g** pour bouillon, et **62g** pour la gélose, du milieu déshydraté dans **1** litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Stérilisation à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

M 17 – Bouillon / Gélose (selon Terzaghi et Sandine)

Constituants	Quantité en g/l
Tryptone	2,5 (Biokar) - 5,0 (Difco)
Peptone pepsique de viande	2,50(Biokar)
Peptone papainique de soja	5.0
Extrait autolytique de levure	2.5
Extrait de viande	5.0
Lactose	5,0 (Biokar)
Sodium glycérophosphate	19.0
Magnésium sulfate	0.25
Acide ascorbique	0.5
<i>NB : rajouter le lactose à la base Difco.</i>	
Agar	15,0 (Biokar)- 11,0 (Difco)

- pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C: $7,1 \pm 0,2$ (Biokar) - $6,9 \pm 0,2$ (Difco).
- Préparation du milieu : Mettre en solution **57.2 g** (pour le bouillon) du milieu déshydraté dans **1** litre d'eau distillée ou déminéralisée, et ajouter 15g d'agar pour obtenir la gélose.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

PCA (Plate Count Agar)

Constituants	Quantité en g/l
- Tryptone.	5,0
- Extrait de levure.	2,5
- Glucose.	1,0
- Agar agar bactériologique	12,0

- pH du milieu prêt- à- l'emploi à 25°C : $7,0 \pm 0,2$.
- Préparation du milieu : Mettre en solution (g pour bouillon, et g pour gélose) de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

BHI (Bouillon Cœur-Cervelle)

Constituants	Quantité en g/l
- Extrait coeur-cervelle.	17,5
- Peptone pancréatique de gélatine	10,0
- Protéose peptone	10,0
- Chlorure de sodium	5,0
- Phosphate disodique	2,5
- Glucose	2,0

- pH du milieu prêt -à- l'emploi à 25°C : $7,4 \pm 0,2$.
- Préparation du milieu : pour bouillon mettre en solution g, de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée, pour la gélose ajouter g d'agar.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Bouillon /Gélose nutritif

Constituants	Quantité en g/l
- Peptone.	5,00
- Extrait de viande	3,00
-Agar agar bactériologique	15,00

- pH du milieu prêt -à- l'emploi à 25°C : $7,2 \pm 0,2$.
- Préparation du milieu : Mettre en solution (**08** g pour bouillon, et **23** g pour gélose) de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Mueller-Hinton

Constituants	Quantité en g/l
infusion de viande de bœuf	2.0
peptone de caséine	17.5
amidon de maïs	1.5
Calcium	0.2 à 0.25
Magnésium	0.1 à 0.125
Agar	17

- pH du milieu prêt -à- l'emploi à 25°C : $7,3 \pm 0,1$
- Préparation du milieu : Mettre en solution 25g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Matériels utilisés

- Etuve de 37°C.
- Four pasteur à 160°C.
- Microscope optique.
- Loupe binoculaire.
- Jarre d'anaérobiose utilisé pour la culture des bactéries lactiques.
- Balance analytique précision 0,01 g.
- Plaque chauffante avec agitateur magnétique.
- Vortex.
- Hotte à rayons ultra violet.
- Centrifugeuse.
- Le pH mètre avec électrode.
- Micropipettes : 10 µl, 100 µl, 1000 µl.
- Pied à coulisse.
- Spectrophotomètre.
- Microplaques de 96 puits en polystyrène.
- La verrerie : Béchers, Erlenmeyer, Eprouvette graduée, Cristallisoir, Burette, Tubes à essai, cloches de durham.

Questionnaire

Ce questionnaire a pour but de réaliser une étude bio-scientifique descriptive. Son exploitation sera purement pour des fins de recherches scientifiques (Mémoire de fin d'étude- Niveau Master) à but non lucratif. Les données sont enregistrées anonymement et en aucun cas l'identité des individus ne sera divulguée ou utilisée à d'autres fins que prévues.

Date du prélèvement :

Code de l'échantillon :

Nature du prélèvement :

Colostrum	<input type="checkbox"/>
Lait maternel cru	<input type="checkbox"/>
Matière fécale	<input type="checkbox"/>

Renseignements sur la Mère

Age :

Lieu de naissance :

Informations cliniques

Durée de la grossesse :

Voie d'accouchement :

Maladie chronique :

Prise d'antibiotique durant la grossesse : Oui Non

Prise d'antibiotique après l'accouchement : Oui Non

Types d'antibiotique :

Renseignement sur le nouveau-né/Enfant

Age :

Sexe : F M

Type d'allaitement : Maternel exclusif
Artificiel
Mixte

Prise récente d'antibiotiques : Sain Oui Non

État de santé : Malade

Description de l'échantillon

Lait cru Colostrum Matière fécale
Aspect : Épais Fluide
Couleur : Jaune-orangé Marron claire Autres à indiquer

