



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Validation de méthodes de quantification du microbiote intestinal humain : effet de l'inuline sur la microflore d'un intestin artificiel

14 février 2013 - 14 août 2013

Par

Charlotte Baptiste

Encadrants

Dr. Hafida KHORSI-CAUET

Dr. Pascale GADONNA-WIDEHEM

Unité de recherche EGEAL (Expression de Gènes et
régulation Epigénétique par l'Aliment)- UPSP 2007.05.137.
Institut Polytechnique LaSalle Beauvais

LaSalle★
Beauvais • Institut Polytechnique

Remerciements



Je tiens à remercier le Dr Véronique Bach et le Dr Latifa Abdennebi-Najar de m'avoir ouvert leurs portes et laissé la possibilité d'effectuer mon stage de recherche au sein des laboratoires PERITOX et EGEAL.

Je remercie tout particulièrement le Dr Hafida KHORSI-CAUET et le Dr Pascale GADONNA-WIDHEM de m'avoir formé avec patience sur les différentes techniques de laboratoire, de m'avoir montré leur façon de travailler et ainsi de m'avoir guidé tout le long de ma formation. J'ai été très heureuse de travailler avec mes 2 responsables qui ont toujours été présentes pour moi et qui m'ont soutenu malgré les problèmes rencontrés lors des expériences.

Travailler en synergie entre 2 laboratoires m'a permis de découvrir 2 façons de travailler qui m'ont été complémentaires et qui m'ont permis d'avancer et progresser dans l'autonomie au travail. Mais surtout, j'ai pu découvrir 2 équipes de recherches sympathiques et travailleuses avec qui j'ai effectué mon stage dans la bonne humeur et dans l'efficacité.

C'est grâce également à Véronique et David que j'ai pu trouver rapidement mes marques dans le laboratoire de Microbiologie et je leur remercie d'avoir été là pour moi, pour m'avoir montré les règles et protocoles de travail au sein du laboratoire.

Je remercie les doctorants avec qui j'ai pu travailler. Merci à Julie qui m'a accueillie les premiers jours de stage et qui m'a tout de suite intégrée au sein du laboratoire, grâce à elle j'ai beaucoup appris et elle m'a surtout énormément aidée. Merci à Cynthia aussi d'avoir pris le temps de m'expliquer avec patience les protocoles et de m'avoir transmis sa rigueur et sa précision au travail et merci aussi à Samir d'avoir toujours pu répondre à mes questions et m'avoir montré quelques techniques pour améliorer mon travail.

Enfin merci aux autres stagiaires avec qui j'ai pu travailler, je pense notamment à Anaïs et Lucie qui m'ont aidé lors d'expériences contraignantes et que j'ai pu aider à mon tour.

Merci à tous, non seulement pour la richesse de travail que cela m'a apporté mais également pour l'ambiance et la bonne entente qui régnaient. Grâce à ce stage, et à toute l'équipe mon envie de continuer dans le monde de la recherche s'est confirmée.

Merci



Sommaire

Liste des abréviations

I. Introduction	1
A. Contexte	1
B. Présentation des laboratoires	2
C. Généralités	3
1. Tractus digestif : composition et fonctions.....	3
2. Microbiote intestinal	4
a) Variation du microbiote au cours du temps	4
b) Grandes fonctions du microbiote intestinal	7
c) Exemples de Maladies liées au microbiote intestinal	8
3. Prébiotiques	8
a) Définition.....	8
b) Inuline.....	9
II. Matériel et méthodes.....	11
A. Etude <i>in vitro</i> : SHIME(Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem).....	11
1. Principe.....	11
2. Solutions nécessaires au fonctionnement du système	11
3. Mise en route du système	12
4. Suivi quotidien.....	12
5. Démarche expérimentale	13
6. Préparation des échantillons	13
B. Etude <i>in Vivo</i> (fèces humaines)	13
C. Analyse du microbiote intestinal	14
1. Méthode de la microbiologie classique	14
2. Méthode de la Cytométrie de flux.....	14
3. Méthode de la qPCR	16
D. Mise au point d'un protocole d'hybridation d'une sonde sur cellules bactériennes	17
III. Résultats	18
A. Validation des méthodes d'analyses de la flore fécale	18
1. Comparaison de dénombrement par microbiologie classique et par qPCR.....	18
2. Dénombrement par cytométrie de flux.....	19
B. Etude <i>in vivo</i>	20

1. Variation de la flore fécale en fonction de l'âge	21
2. Variation de la flore fécale en fonction de la congélation	22
3. Influence d'un traitement prébiotique (inuline) sur la flore fécale	23
4. Variation inter-individus de la flore fécale.....	24
5. Analyses cytométriques.....	25
C. Etude <i>in vitro</i> / SHIME	25
1. Analyse de la flore totale	25
2. Analyses des différents profils bactériens	26
3. Variation du pH.....	27
D. Mise au point d'un protocole d'hybridation.....	28
IV. Discussion / Perspectives	29
A. Mises au point des méthodes.....	29
B. Étude <i>in vivo</i>	30
C. Etude <i>in vitro</i>	31
V. Conclusion.....	33
VI. Références bibliographiques	35
VII. Annexes	40
VIII. Figures	49

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AGCC	Acide Gras à Courte Chaîne
ANOVA	ANalysis Of VAriance
BCP	BromoCresol Purple
BD	Baird Parker
BEA	gélose à la Bile, à l'Esculine et à l'Azide de sodium
CPF	Chlorpyrifos
CY	Cyanine
DFG	Débit de Filtration Glomérulaire
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EGEAL	Expression de Gène et régulation Epigénétique par l'Aliment
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FOS	Fructo-oligosaccharides
FSC	Forward Scatter
GOS	Galacto-oligosaccharides
INERIS	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
IP	Iodure de Propidium
LOG	Logarithme
M	Molaire
MICI	Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
MRS	Man, Rogosa et Sharpe
MSA	Mannitol Salt Agar
NBR	Nombres
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
PERITOX	Périnatalité et Risques toxiques
pH	Potentiel Hydrogène
PLSD	Procédure de « <i>least significant difference method</i> »
POTENTIEL	Potentiel d'oxydoréduction
REDOX	Potentiel d'oxydoréduction
PPM	Partie par million
QPCR	PCR en temps réel
R²	Coefficient de détermination
SDS	dodécylsulfate de sodium
SFP	Shahidi-Ferguson Perfringens
SHIME	Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem
SPS	Sulfite de Sodium –Polymixine
SSC	Side Scatter
TOS	Transgalacto-oligosaccharides
TRIS	Trishydroxyméthylaminométhane
UFC	Unité formant une colonie
UPJV	Université de Picardie Jules Vernes
VITROSIM	Simulation in vitro
VRBG	Gélose au cristal violet, rouge neutre, bile et glucose
XOS	Xylo-oligosaccharides



I. Introduction

A. Contexte

Depuis quelques années, les questions environnementales ont pris une place importante dans la société. Ceci est dû notamment à la prise de conscience du réchauffement climatique et de l'impact de l'action humaine sur l'écologie. Notre environnement et notre santé sont menacés par différents éléments comme le rejet des gaz à effet de serre (Petit, 2001), (Tubiana, 2000) ou encore la pollution par les produits radioactifs (Baysson et Tirmarche, 2008). Parmi ces éléments, nous retrouvons les pesticides qui sont utilisés de façon importante dans l'agriculture et qui entraînent une contamination de notre alimentation notamment des fruits et légumes (Wang et al., 2013). Le risque lié à l'exposition aux pesticides est devenue un sujet de préoccupation, d'autant que la France est le troisième consommateur mondial et premier utilisateur en Europe de pesticides avec 62 700 tonnes de pesticides consommées en 2011 (selon l'union des industries de la protection des plantes). Les preuves de la nocivité des pesticides pour la santé humaine commencent à s'accumuler : les données récentes indiquent que les pesticides peuvent endommager le système immunitaire (Weselak et al., 2007), et seraient capable d'imiter les hormones causant divers troubles de santé. Ainsi les études démontrent une incidence accrue des cancers du sein, de la prostate, du côlon, des testicules, de l'estomac (Mostafalou et Abdollahi, 2013)(Alavanja et Bonner, 2012). De plus, les pesticides auraient une incidence sur certaines maladies neurologiques (Dutheil et al., 2010) comme Alzheimer, ou Parkinson et seraient responsables de certains troubles du comportement liées aux suicides et dépressions (Freire et Koifman, 2013). D'autres troubles de santé sont associés comme le diabète, les maladies cardiovasculaires, les problèmes respiratoires (Weselak et al., 2007),(Gilden et al., 2010). C'est pour cela que la France s'est engagée dans un processus de réduction de l'emploi des pesticides dans l'agriculture via un plan interministériel en 2006 (Plan ECOPHYTO 2018 visant une diminution de 50% des pesticides d'ici 2018) et le Grenelle de l'environnement a confirmé cette orientation (Butault et al., 2011).

Dans cette optique, le projet PREBIODIG « Effets bénéfiques des **PREBIO**tiques suite à l'ingestion d'un pesticide, le chlorpyrifos, sur le développement et la maturation du système **DIG**estif » a été proposé dans le but de réduire les effets d'un pesticide, le Chlorpyrifos (CPF), très utilisé en Picardie. Dans des études préliminaires (Joly et al., 2012) la toxicité du CPF chez des rats exposés lors de la gestation a été mise en avant. Le transfert du pesticide de la mère vers le fœtus pendant la période critique de développement des organes a entraîné des perturbations dans la maturation du tractus gastro intestinal chez le raton conduisant à un déséquilibre du microbiote intestinal pouvant conduire par la suite à des troubles digestifs. Ce projet a pour objectif de déterminer s'il est possible de prévenir les effets digestifs du CPF chez l'enfant en modifiant l'alimentation de la mère via l'utilisation des fibres alimentaires (prébiotiques). La finalité du projet est de déterminer si l'enrichissement de l'alimentation en prébiotiques peut être proposé comme alternative à l'impact du pesticide sur le développement de maladies chroniques en restaurant la balance du microbiote.

Mon sujet de stage s'intègre dans une partie de ce projet menée par le laboratoire PERITOX d'Amiens et le laboratoire EGEAL de Beauvais. Il a pour but la validation de méthodes de



quantification du microbiote intestinal humain et l'étude de l'effet de l'inuline sur la microflore d'un intestin artificiel.

B. Présentation des laboratoires

L'unité Pérیتox a été créée en janvier 2008 et se situe dans le prolongement d'une équipe d'accueil reconnue depuis 1992. Sa création est l'œuvre d'une collaboration scientifique entre l'unité « Toxicologie Expérimentale » de l'INERIS (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, organisme de recherche en tant qu'EPIC, Verneuil en Halatte, Oise) et l'équipe UPJV (Université de Picardie Jules Vernes).

L'INERIS, responsable en outre de la direction des risques Chroniques, a pour mission d'évaluer l'impact à court terme des substances toxiques, des agents biologiques et des nuisances physiques de l'environnement afin de prévenir et de réduire les risques sur la santé de l'Homme. Cette mission de recherche s'ajoute à celle d'évaluation et prévention des risques pour l'Homme et son environnement, et d'expertise auprès des services publics et industriels, missions qui lui ont été confiées par son ministère de tutelle, le Ministre de l'Ecologie. Ainsi l'unité Pérیتox centre ses thématiques de recherche sur le thème majeur des effets toxiques et physiques environnementaux sur la santé de la femme enceinte et de l'enfant.

L'institut Polytechnique Lasalle Beauvais est une école formant des ingénieurs généralistes mais rassemble également des équipes de recherches scientifiques. Ces activités de recherche sont structurées en 3 axes stratégiques :

- Agroressources visant la diversification des productions agricoles, de leurs usages, l'adaptation des pratiques et des systèmes de production.
- Aliments et santé ayant pour but l'amélioration de la nutrition humaine et animale, la préservation de la santé et la compréhension du comportement du consommateur.
- Géosciences ciblant l'appréhension de l'Histoire de la Terre, les méthodes de protection et des gestions de l'environnement et la valorisation des ressources minérales.

L'unité de recherche EGEAL (Expression de gène et régulation Epigénétique par l'Aliment) a été créée à l'institut polytechnique Lasalle Beauvais en 2006 par un noyau de 4 enseignants-chercheurs. L'unité a bénéficié de la labellisation Unité propre Soutien Programme (2007) et a été accréditée (2011) par le ministère de l'Agriculture.

Le programme scientifique de l'unité a pour objectif de mieux appréhender les risques santé liés à l'exposition précoce aux contaminants de la matrice alimentaire. La finalité des travaux entrepris vise la réduction des contraintes des facteurs environnementaux de nature alimentaire notamment à destination des populations à risques que sont les femmes enceintes et leurs enfants.



C. Généralités

1. Tractus digestif : composition et fonctions

L'appareil digestif est responsable de la transformation de la nourriture et permet d'en extraire les nutriments et l'énergie.

Il se compose de divers éléments (Figure 1):

- La cavité buccale : La bouche qui a pour rôle le broyage mécanique des macromolécules, la digestion de certaines molécules par la salive. Le pharynx et l'œsophage pour le transport des aliments (appelé bol alimentaire) vers l'estomac via des mouvements de péristaltismes.
- Le tube digestif qui va assurer la digestion, l'assimilation et l'élimination des molécules non assimilables. (Hallouët, 2010) . Il se constitue de :
 - L'estomac, sous forme de poche en J, sa fonction est la digestion des aliments mastiqués. Pour cela, les glandes présentes sur la muqueuse de l'estomac sécrètent des sucs gastriques (eau, acide chlorhydrique, enzymes) entraînant une acidification importante du milieu (pH de 3 dans l'estomac pour une digestion optimale) permettant la dissolution des macromolécules. Un brassage mécanique vient optimiser cette digestion. Cet environnement acide détruit la plupart des bactéries présentes dans la nourriture mais certaines peuvent résister et se retrouver par la suite dans l'intestin. A la sortie de l'estomac, le liquide alimentaire est appelé le chyme.
 - L'intestin grêle qui a pour fonction principale l'absorption des molécules digestibles. Il se divise en 3 parties : Le duodénum où agissent les enzymes pour finaliser la digestion. Dans cette section, deux autres organes annexes vont intervenir : le pancréas (situé derrière l'estomac) excrète les ions bicarbonates, les enzymes digestives et le foie sécrète les sels biliaires. Ces sécrétions sont à un pH neutre (compris entre 7,4 et 8,4) et ont pour but de favoriser la digestion par l'intervention d'enzymes mais aussi la désacidification du chyme issu de l'estomac. Le chyme devient alors le chyle. Le jéjunum et l'iléon sont responsables plutôt de l'absorption intestinale des sucres (sources d'énergie), de l'eau, des électrolytes, des acides aminés, métaux et minéraux.
 - Le gros intestin ou côlon. Ce dernier se compose du caecum et du côlon qui se divise en 3 parties : Côlon ascendant, transversal et descendant. Il a pour fonction principale le stockage des déchets, l'absorption de l'eau, d'ions et des produits synthétisés par les bactéries (acides gras et vitamines). Il se finit par le rectum où le stockage des fèces se fait en vue de la défécation. (Hallouët, 2010)



Lors de la digestion, le temps de transit intestinal moyen varie d'un compartiment à l'autre et selon le type d'aliment ingéré (liquide ou solide). Dans l'estomac, le temps de transit varie de 1h30 à 3h. Le long de l'intestin grêle le transit fluctue de 4 h à 5 h. Enfin c'est dans le côlon que le temps de transit est le plus long environ 40h chez les sujets jeunes mais ce temps varie en fonction de l'âge et des conditions environnementales. En effet, (Madsen et Graff, 2004) ont montré que ce temps de transit était augmenté (60h) chez les personnes âgées ou accéléré chez les fumeurs (30h).

2. Microbiote intestinal

L'ensemble des micro-organismes présents tous le long du tractus digestif est appelé microflore intestinale. Sa subsistance 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). (Figure 2)

a) Variation du microbiote au cours du temps

Nouveau-né, Implantation :

Le tractus digestif du nouveau-né à la naissance est dépourvu de micro-organismes. Il est appelé axénique. La colonisation débute dès l'accouchement et le niveau de population bactérien atteint rapidement 10^{11} bactéries par gramme de selles. Cependant cette colonisation reste contrôlée, en effet des équipes françaises d'immunologie ont mis en évidence la présence d'un système immunitaire primaire innée chez le nourrisson qui permet de réguler la mise en place du microbiote intestinal pour éviter la prolifération d'agents pathogènes (Manus, 2011) .

Cinétique d'implantation :

En raison de la teneur élevée en oxygène initialement présente dans l'intestin du nouveau-né, les premières bactéries implantées sont des organismes anaérobies facultatifs : Les *Enterobacteriaceae* (notamment *Escherichia coli*), les *Enterococcus* et les *Staphylococcus* (colonisation 24 à 48h après la naissance). Ces bactéries dont le niveau atteint rapidement 10^9 - 10^{10} UFC/g de contenu colique vont consommer progressivement l'oxygène du tube digestif permettant l'implantation par la suite des genres anaérobies stricts (*Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*) mais aussi des *Lactobacillus* et microaérophiles. Ainsi rapidement le potentiel redox devient négatif et inhibe à son tour le niveau d'implantation des genres aérobies (Campeotto et al., 2007).

De nombreux éléments vont influencer cette cinétique de colonisation et la composition de la microflore intestinale du nouveau-né (Figure 3) :

- **Le mode d'accouchement** : Un accouchement par voie naturelle favorise le contact du nouveau-né avec la flore de sa mère (flore vaginale et fécale), la naissance par césarienne favorise les interactions avec les bactéries de l'environnement (air, personnel hospitalier). Les nourrissons



nés par césarienne ont un développement des bactéries anaérobies strictes plus tardif (*Bifidobacterium* et *Bacteroides*) (Campeotto et al., 2007).

- **L'environnement** : Les conditions d'hygiène entourant un accouchement influencent directement l'implantation de cette microflore. Ainsi la flore intestinale des nouveau-nés dans les pays en développement va différer de ceux des pays développés. En condition d'hygiène stricte, nous avons réduction de l'exposition du nourrisson à la flore de sa mère ainsi un retard de colonisation par les bactéries anaérobies strictes est constaté (Matamoros et al., 2013).
- **Le type d'alimentation** : En comparant la cinétique de la microflore intestinale de nouveau-nés nourris au lait maternel et au lait industriel, il a été montré que les genres anaérobies facultatifs (*Enterobacteriaceae*) étaient prédominants chez les enfants nourris au lait industriel tandis que les genres anaérobies stricts telles que les *Bifidobacterium* et *Bacteroides* sont très présents (flore dominante) chez les enfants nourris au lait maternel dans les premiers jours de la vie. Cependant, l'amélioration des formules de lait infantile tend à faire baisser cet écart. (Moreau et al., 1986).
- **L'antibiothérapie** : Les conséquences sur la flore totale du nourrisson ne sont pas très bien connues mais il a été montré que l'antibiothérapie pouvait entraîner une sélection des bactéries résistantes à l'antibiotique ou/et une modification de la flore de barrière (diminution de la flore anaérobie bénéfique laissant place aux bactéries anaérobies facultatives potentiellement pathogènes). Ce phénomène se retrouve soit par effet direct : chez les nourrissons traités par antibiothérapies ou par effet indirect : chez les femmes enceintes soumises à l'antibiothérapie précédant la période de naissance de leur enfant (Langhendries, 2008).

Dès qu'une alimentation semi-solide est introduite, la différence qui existait entre les enfants nourris au sein et ceux nourris avec du lait industriel pour nourrisson s'estompe (Stark et Lee, 1982).

L'équilibre de la flore intestinale est atteint au bout de la 2ème ou 3ème année de la vie et dès que l'alimentation devient variée, elle se rapproche de celle de l'adulte.

Adulte / Composition de la microflore intestinale

Le microbiote n'est pas distribué de façon homogène, sa composition varie tout au long du tractus et se densifie de l'intestin grêle au côlon (Figure 4).

L'estomac héberge peu de bactéries (10^1 à 10^3 UFC/g de contenu) en raison de l'environnement acide empêchant la survie de ces dernières. Au niveau des segments de l'intestin grêle, nous retrouvons 10^4 à 10^7 UFC/g. En effet le transit intestinal étant relativement rapide dans ces régions, les micro-organismes n'ont pas le temps de s'y implanter. C'est au niveau du côlon qu'on retrouve la plus forte concentration bactérienne (10^{12} UFC/g) car le transit y est fortement ralenti permettant la colonisation du milieu par les micro-organismes mais aussi un potentiel redox bas laissant place à la multiplication des bactéries anaérobies strictes. Le côlon est la seule zone du tractus digestif qui est colonisée de façon permanente par une flore résidente. (Service médico-scientifique Pileje, Le microbiote intestinal dans tous ses états, tiré à part documentation Pileje), (Goulet, 2009).

La recherche traditionnelle de micro-organismes par la culture *in vitro* est aujourd'hui délaissée car seulement 30 % du microbiote intestinal est cultivable (Moore et Holdeman, 1974). Les outils moléculaires ont permis une meilleure caractérisation de cette flore et permettent de dire que 80% des espèces bactériennes dominantes dans le microbiote fécale sont spécifiques de cet individu.



L'analyse des genres bactériens ou des groupes phylogénétiques permettent cependant d'identifier des groupes dominants chez tous les individus.

L'étude de la flore intestinale direct chez l'Homme est difficile, c'est pourquoi la flore fécale a été la plus étudiée pour essayer de caractériser dans son ensemble cette flore intestinale mais elle ne reste qu'informative. Cette flore fécale est caractérisée par une flore dominante anaérobie stricte et une flore sous-dominante aéro-anaérobie facultative. Parmi cette flore, 3 *phyla* dominants ressortent : *Firmicutes*, *Bacteroidetes* et *Actinobacteria* et 1 *phylum* sous-dominant, les *Proteobacteria*. Leurs différentes caractéristiques sont les suivantes :

Firmicutes (Gram positif) est toujours fortement représenté (14 à 31 % des bactéries totales). Il est composé de 6 genres bactériens :

- **Clostridia** : Bacilles Gram positifs anaérobies strictes souvent sous forme sporulé et généralement mobiles via des flagelles. Il comporte de nombreux genres comme les *Clostridium* surtout présents dans le sol (*Clostridium butyricum*) mais certains sont pathogènes pour l'Homme comme *Clostridium difficile* (Kee, 2012) et *C.perfringens* (Redondo et al., 2013) qui sont responsables de nombreuses infections graves associées aux soins hospitaliers provoquant de graves diarrhées. La capacité à sporuler de *Clostridium* rend difficile son éradication du fait de sa résistance aux traitements chimiques et physiques (Setlow, 2007). Il comprend également les genres *Ruminococcus*, majoritairement présentes dans l'intestin humain (*R. flavefaciens*) et récemment certains *Ruminococcus* ont été reclassé dans un nouveau genre de la classe des *Clostridium* nommé *Blautia*(Liu et al., 2008).
- **Enterococcus spp.**: Coques Gram positives, non sporulés, aéro-anaérobies facultatives dont les 2 principales espèces sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* chez l'Homme. Il existe des effets bénéfiques d'*Enterococcus faecium* car elle inhibe la croissance des germes pathogènes d'origine alimentaire dans l'organisme et elle est maintenant utilisée comme probiotique pour prévenir les infections intestinales (Giraffa, 2003). Mais c'est aussi un pathogène opportuniste à l'origine de nombreuses infections intestinales (Fisher et Phillips, 2009).
- **Streptococcus spp.**: Coques Gram positif, non sporulés, aéro-anaérobies facultatives. Elle rassemble un large panel de micro-organismes qui sont commensales (*Streptococcus salivarius*), saprophytes (*S.thermophilus*) et pathogènes (*S. pyogenes*). Ils sont reconnus également pour leurs propriétés bénéfiques avec leurs utilisations en tant que probiotique (*S.thermophilus*) (Corthier, 2013).
- **Eubacterium** : Groupe hétérogène à bacilles Gram positifs, anaérobies strictes non sporulantes. La plupart des bactéries de ce groupe ont une croissance lente, fastidieuse et généralement non réactive aux tests biochimiques les rendant difficile à cultiver et à identifier (Downes, 2001). Elles sont retrouvées fréquemment dans la cavité buccale et intestinale (notamment *Eubacterium lentum*). Elles peuvent être responsables d'infections dentaires (*Eubacterium yurii*) mais aussi intestinales provoquant des endocardites infectieuses (*Colinsella aerofaciens*).
- **Lactobacillus spp.** : Bactéries Gram positives, aéro-anaérobies facultatives qui sont capables de convertir le lactose en acide lactique. Commensales, elles se retrouvent principalement dans le vagin et le tractus intestinal. Elles sont fréquemment utilisées en tant que



probiotiques pour leur effet protecteur vis à vis des pathogènes de la flore intestinale afin de lutter par exemple contre les diarrhées chez le jeune enfant (Reinert et al., 1997).

- *Peptostreptococcus spp.* : Coques Gram positifs, anaérobies strictes, non sporulantes. Elles font parties de la flore commensale de l'Homme et des animaux et sont généralement associées à plusieurs types d'infections humaines liées notamment à *Peptococcus Magnus* (Bourgault et al., 1980).

Bacteroidetes représentés par les genres apparentés à *Bacteroides* (*Bacteroides*, *Prevotella* et *Porphyromonas*). Ce sont des bacilles Gram négatifs, non sporulants et anaérobies stricts, associées parfois à des infections humaines. *Bacteroides fragilis* est le pathogène opportuniste le plus fréquent parmi les espèces du genre (Liu et al., 2003). Dans le colon, ils sont toujours présents et partagent la dominance avec le groupe précédent (9 à 42 % des bactéries totales suivant les études).

Actinobacteria moins systématiquement détecté en dominance mais il représente en moyenne quelques pourcents des bactéries totales. On y trouve les *Bifidobacterium* (0,7 à 10 %) : Bacilles Gram positifs, anaérobies stricts. L'espèce *Bifidobacterium bifidum* est la plus représentée dans le tractus digestif et est considérée comme un probiotique pour son maintien de l'équilibre microbien en évitant la prolifération de bactéries pathogènes (Germond et al., 2002) .

Proteobacteria représentées par les *Enterobacteriaceae* et sont en quantité moindre dans le microbiote fécal (0,4 à 1%). Ce sont des bacilles Gram négatifs, aéro-anaérobies facultatifs, non sporulants. Elles sont commensales de l'intestin de l'Homme et des animaux et constituent la majorité de la flore digestive aérobie. Le genre est représenté à 80% par *Escherichia coli* dans l'intestin humain. Elles peuvent être pathogènes et provoquent dans la plupart du temps des diarrhées (Kurakawa et al., 2013) .

Personnes âgées / modification de la flore intestinale

En ce qui concerne les personnes âgées (à partir de 65 ans), peu d'études ont été menées. Une augmentation des *Clostridium*, des *Enterobacteriaceae* et des *Enterococcus* a été constatée alors qu'une diminution des *Bifidobacterium* est observée. De plus, il existe une modification de la balance *Firmicutes* / *Bacteroidetes* avec une nette augmentation des *Bacteroides* et une perte des *Firmicutes* (Duncan et Flint, 2013). Enfin, la diversité et la fraction non cultivable de la flore augmentent avec l'âge (Figure 5) (Goulet, 2009).

b) Grandes fonctions du microbiote intestinal

De plus en plus d'études démontrent les fonctions importantes jouées par ce microbiote intestinal. En effet les micro-organismes du tractus digestif assurent des fonctions essentielles pour le maintien et la santé de l'hôte.

Fonction de protection : La microflore forme une barrière à la colonisation de bactéries pathogènes. L'équilibre de la flore résulte d'un système de compétition pour les substrats, de la capacité



d'adhésion mais aussi de l'aptitude à la synthèse de molécules à effet bactéricide inhibant ainsi les micro-organismes pathogènes. (Goulet, 2009).

Fonction de structuration et de développement immunitaire : Il existe un lien entre flore bactérienne, muqueuse intestinale et système immunitaire. Ce dernier va permettre le développement des défenses immunitaires préservant par la suite l'homéostasie et l'intégrité de l'hôte (Corthier et Doré, 2010). Elle va également être impliquée dans la physiologie intestinale notamment dans la structure et la fonction de l'épithélium car les bactéries sont responsables de l'élaboration de la microvascularisation de l'épithélium intestinal (angiogenèse) et de la motricité intestinale (Stappenbeck et al., 2002) .

Fonction métabolique : Un autre rôle primordial de cette communauté bactérienne est la nutrition et la dégradation de composés d'origine alimentaire non digestibles via le processus de fermentation. En effet ces processus fermentaires sont corrélés aux substrats disponibles, la plupart des métabolites fermentaires synthétisés par le microbiote seront absorbés puis utilisés par l'hôte .La majorité de ces métabolites sont potentiellement bénéfiques (acide gras à courte chaîne, gaz) toutefois certains peuvent avoir des effets délétères sur la santé (production de nitrosamines cancérigène par exemple) (Bernalier-Donadille, 2010) .

c) Exemples de Maladies liées au microbiote intestinal

Obésité : Plusieurs études démontrent une modification de la flore intestinale chez les personnes atteintes d'obésité notant une augmentation du nombre de *Firmicutes* et une diminution des *Bacteroides*. Cependant ces résultats sont remis en cause dans d'autres publications (Duncan et al., 2008).

Physiopathologie des MICI (maladies inflammatoires chroniques intestinales) dont les 2 majeures sont : la Maladie de Crohn et la Rectocolite Hémorragique. Il y a apparition d'une dysbiose ou déséquilibre du microbiote fécal chez les personnes atteintes avec une diminution de la diversité du microbiote associé à une augmentation du nombre de bactéries pathogènes (*Enterobacteriaceae* tel que *E.coli*) et une diminution d'autres bactéries (*Firmicutes*, *Bifidobacterium spp.* et *Lactobacillus spp.*) (Seksik, 2011). En ce qui concerne les *Bacteroidetes* les données restent contradictoires, (Seksik, 2010).

3. Prébiotiques

a) Définition

Il est important de distinguer le terme probiotique de prébiotique. Les probiotiques sont des suppléments alimentaires (comme les laits fermentés) contenant des bactéries vivantes qui en quantité administrée adéquate peuvent être bénéfiques pour l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale (Kleerebezem et Vaughan, 2009). Les principaux probiotiques utilisés sont les bactéries lactiques comme *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, et certaines *Enterococcus*.



(Gibson et Roberfroid, 1995) ont défini les prébiotiques comme des ingrédients alimentaires qui influencent de façon bénéfique l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'un nombre limité de groupes bactériens dits bénéfiques (*Bifidobacterium*) (Dupont, 2001) dans le côlon et qui améliorent ainsi la santé.

Les prébiotiques sont souvent définis comme des fibres alimentaires. Ces 2 types de produits ont en commun leur non digestibilité ainsi que leurs effets sur la flore colique mais la différence majeure entre les 2 se trouve être la spécificité. En effet, les prébiotiques vont favoriser la croissance et l'activité de seulement quelques populations bactériennes alors que les fibres alimentaires vont stimuler la croissance de la totalité des bactéries dominantes (Cherbut, 2003).

Mais de quoi se compose ces prébiotiques : Pour la plupart, ce sont des glucides d'origine végétale, synthétique et parfois animale ou microbienne. Les mieux connus sont les fructanes, les polymères de fructose et les fructo-oligosaccharides (FOS) qui sont pour l'instant les plus étudiés dans la littérature. D'autres oligosaccharides sont considérés comme prébiotique tels que les galacto-oligosaccharides (GOS), transgalacto-oligosaccharides (TOS) ou même les xylo-oligosaccharides (XOS) (Cherbut, 2003).

b) Inuline

L'inuline (Figure 6) est le glucide de réserve appartenant à la famille des fructanes. Il se compose d'un mélange de polysaccharides constitués d'unités fructose (liées par des liaisons osidiques $\beta(2\rightarrow1)$) et d'une unité glucose terminale. Elle est le plus abondant après l'amidon chez les plantes mais elle se retrouve le plus souvent dans les plantes de la famille des *Asteraceae*. La racine de chicorée présente également une teneur en inuline élevée, c'est pourquoi son extraction se fait dans la majorité des cas à partir de cette racine (Van den Ende et al., 1996).

Intérêt industriel et utilisation scientifique:

L'inuline est utilisée dans l'industrie comme ingrédient dans différentes préparations agro-alimentaires. En effet les polymères d'inuline de petites tailles (unités de fructose inférieures à 10), aussi appelés fructo-oligosaccharides (F.O.S.) sont utilisés comme agents sucrant alors que ceux de grandes tailles n'ont pas de pouvoir sucrant mais sont utilisés pour améliorer la texture des aliments ou remplacer des matières grasses. Les industriels utilisent également ce produit comme nouveau coupe faim car il provoquerait des effets satiétogènes.

Au niveau scientifique, l'inuline est le marqueur considéré, encore aujourd'hui comme la référence pour la détermination du débit de filtration glomérulaire (DFG) (Delanaye et al., 2011). Mais c'est en tant que prébiotique que l'inuline reste reconnue pour ses effets bénéfiques sur la santé.

Effets de l'inuline sur l'organisme (Figure 7):

- Effet sur la composition du microbiote : L'effet majeur constaté est l'augmentation des populations bactériennes produisant de l'acide lactique soit les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (Ramirez-Farias et al., 2009). Or cet effet bifidogène constaté est dose-dépendant et nécessite une dose minimale de 5g/jour d'inuline (Rao, 2001). Des études ont également



révélé une diminution d'autres populations bactériennes comme *Bacteroides*, les *Clostridium* et les *Enterobacteriaceae* (Roberfroid, 2000).

- **Effet sur les activités métaboliques** : L'inuline influence les activités fermentaires dans le côlon. En effet l'une des fonctions principales de la flore colique est la fermentation des substrats non digérés. L'inuline étant un glucide, sa fermentation est un processus anaérobie qui produit des gaz (CO_2 , H_2 , CH_4) et des acides organiques comme le lactate et les acides gras à courtes chaînes (AGCC) tels que l'acétate, le propionate et le butyrate. Il a été montré qu'un traitement prébiotique de type inuline augmente la quantité d'AGCC dans le contenu colique et notamment une prolifération de la production du propionate et butyrate (De Wiele et al., 2004). Il existe aussi une augmentation du taux de lactate et acétate mais ils vont être rapidement utilisés par des micro-organismes pour les convertir en butyrate. Directement corrélée à la production de l'acide lactique et des AGCC, une diminution du pH intraluminal est observée. (Cherbut, 2003). Enfin une diminution de la production d'ammoniac a été constatée (De Wiele et al., 2004).
- **Application pour la santé humaine** :
 - Protection contre les agents pathogènes : Les Bifidobactéries sont bactériostatiques, c'est-à-dire qu'elles sont capables de contrôler la croissance d'autres populations bactériennes grâce à leurs productions d'agents anti-microbiens. Elles abaissent le pH à un niveau défavorable à la survie des pathogènes, elles agissent également comme un système de compétition via l'occupation des sites par les bactéries stimulées par les prébiotiques (Boutron-Ruault, 2007).
 - Effet bénéfique sur la santé : Ils permettent la baisse de composés ammoniacaux et soufrés considérés comme néfastes pour la santé, ils stimulent la production du butyrate qui est capable d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses et qui agit comme agent différenciant (Aube et al., 1995). Les prébiotiques améliorent l'absorption minérale (Rousseau, 2005) et jouent un rôle dans la diminution des risques de cancer colorectal (Boutron-Ruault, 2007).
 - Exemple d'applications médicales des prébiotiques : diminution des infections et des allergies chez le nourrisson (Putet, 2007), traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Gibson et Roberfroid, 1995), amélioration du transit intestinal pour lutter contre la constipation (Lamassiaude-Peyramaure, 2008).

Dans le but d'étudier l'effet d'un prébiotique sur le microbiote intestinal par un système d'intestin artificiel (étude *in vitro*), nous avons mis au point des méthodes d'analyses de la flore microbienne via des fèces humaines en utilisant 3 techniques différentes : la microbiologie classique, la qPCR et la cytométrie de flux. En complément de cette étude, la mise au point d'une technique d'hybridation *in situ* a été faite pour des analyses futures du microbiote. Dans cette seconde partie, nous allons présenter les principes et techniques de nos méthodes.



II. Matériel et méthodes

A. Etude *in vitro*: SHIME(Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem)

1. Principe

Le tractus gastro intestinal est un écosystème complexe avec une grande diversité microbienne, son étude reste difficile et nécessite une étude *in situ*. Cependant l'étude *in vitro* présente plusieurs avantages par rapport à l'étude *in vivo*. En effet elle permet d'éviter les contraintes éthiques dues à l'expérimentation animale et permet une reproductibilité élevée en raison d'un contrôle strict des facteurs environnementaux (temps de rétention, pH, température et apport nutritif) qui peuvent influencer sur le microbiote (Van den Abbeele et al., 2010). Pour ces raisons (Molly et al., 1993) ont mis au point un système digestif artificiel modélisant l'écosystème intestinal humain appelé SHIME. Ce dispositif artificiel modélise les principaux compartiments du tractus digestif. Il est composé initialement de 5 réacteurs à double paroi chauffés à 37°C sous agitation constante mimant respectivement les conditions du duodénum/jéjunum, iléon/caecum et les 3 régions du côlon (ascendant, transversal et descendant). (De Boever et al., 2001) introduisent par la suite un sixième réacteur représentant l'estomac. Les 6 fermenteurs possèdent un volume utile et un temps de résidence des aliments (Tableau 1). Le transit du système est réglé automatiquement par un système informatique contrôlant le passage de l'alimentation d'un fermenteur à un autre. Ce transport est assuré par des pompes mimant le péristaltisme humain. Ce SHIME a fait l'objet d'un transfert technologique de l'université de Gand (Belgique) vers l'UPJV (laboratoire Peritox) et est actuellement nommé VITROSIM (pour simulation *in vitro*) (Figure 8).

2. Solutions nécessaires au fonctionnement du système

- Alimentation primaire : Cette solution permet la croissance des micro-organismes et mime les conditions environnementales de l'intestin humain. Elle est introduite dans tous les fermenteurs selon leurs volumes utiles lors du démarrage du système et sert de nourriture pour l'intestin artificiel. Elle se compose essentiellement de sources carbonées, azotées et énergétiques nécessaires à la croissance des micro-organismes naturellement présents dans le tractus gastro intestinal et son pH est régulé à 2 afin de mimer le pH acide de l'estomac (Annexe 1).
- Jus pancréatique : Dans l'organisme humain, ce jus est produit par les glandes pancréatiques et se compose d'enzymes. Il est reproduit artificiellement via un mélange de bile bovine, de bicarbonate de sodium et de pancréatine (Annexe 2). Cette solution à pH basique neutralise l'acidité de l'alimentation primaire lui permettant par la suite d'être prise en charge dans le duodénum comme dans le processus *in vivo*.
- Inoculum : Il a pour but d'installer la microflore fécale naturellement présente dans l'intestin. Pour cela, 4 échantillons de selles ont été récoltés provenant de 2 femmes et 2 hommes n'ayant pas consommé d'antibiotiques durant les 3 derniers mois. L'inoculum est obtenu après un



mélange homogène de 50 g des 4 échantillons de selles avec 300 ml de sérum physiologique (Annexe 3). Le mélange est réparti dans plusieurs flacons de 50 ml et sont centrifugés à 1200 tours/min pendant 10 min. Le surnageant est récupéré etensemencé dans les 3 derniers fermenteurs (côlon).

- **Alimentation secondaire** : Elle représente l'alimentation habituelle d'un individu et permet d'installer dans F1 (estomac) la microflore présente habituellement dans l'estomac. Cette solution est préparée à partir de 70g d'un mélange de produits alimentaires divers correspondant à un repas type riche en glucides, lipides et protéines auquel nous ajoutons 300 ml d'eau distillée stérile. Dix millilitres de cette solution sont administrés dans F1 tous les jours pendant 1 semaine lors du démarrage du système. La solution est conservée à 4°C.
- **Solution de Prébiotique** : Dix grammes d'inuline (Fibruline Instant®, Cosucra) sont dilués dans 70 ml d'alimentation primaire et sont rajoutées dans F1 tous les jours après la phase de stabilisation et après le prélèvement de contrôle.

3. Mise en route du système

Avant la mise en route, le bon fonctionnement de l'appareil est vérifié (débit des pompes, agitateur magnétique, pompe à chaleur). Chaque fermenteur est rempli avec de l'alimentation primaire selon son volume utile et le système informatique est lancé pour le démarrage des cycles. Les pompes (notées P) sont mises en route et permettent ainsi la migration de l'alimentation d'un fermenteur à un autre (Tableau 2) :

- Toutes les 8 heures, la Pompe 1 s'active pendant 10 min pour verser 200 ml d'alimentation primaire (pH=2) dans F1.
- 3 heures après, P3 déverse 210 ml dans Fermenteur 2 et simultanément P2 ajoute 90 ml de jus pancréatique dans F2 permettant de neutraliser le pH acide de l'estomac.
- 3 heures après, 280 ml sont versés dans F3 puis 3h après 280 ml dans F4.
- Dans les 3 derniers fermenteurs (F4, F5, F6) les pompes fonctionnent en continu à un débit de 0,6ml/min puis le contenu est versé dans un bidon déchet à un débit de 0,9ml/min.

L'intestin artificiel n'a accès à aucune source lumineuse. Le paramètre obscurité est respecté et la lumière n'est allumée que lors des prélèvements et des observations.

4. Suivi quotidien

- **Ajustement du pH** : Chaque fermenteur doit respecter une gamme de pH reflétant l'environnement de tractus intestinal qu'il représente (Evans et al., 1988). La mesure du pH s'effectue 2 fois par jour au niveau des fermenteurs F4 (pH compris entre 5,5 et 6), F5 (pH 6-6,4) et F6 (pH 6,4-6,8) (côlon). La méthode d'ajustement se trouve en annexe 4.
- **Administration du gaz** : Les fermenteurs sont maintenus sous une atmosphère faible en oxygène comme dans l'organisme humain. Pour cela de l'anaérogaz constitué de N₂ (90,5%), de CO₂ (5%) et de H₂ (4,5%) est apporté pendant 10 min tous les jours dans F3, F4, F5, F6.



5. Démarche expérimentale

Elle se divise en 2 phases :

- **Phase de stabilisation** : Pour s'assurer que les effets sont dus uniquement au traitement par le prébiotique et non à l'adaptation des microorganismes à l'environnement *in vitro*, l'état d'équilibre de la flore microbienne doit être établi avant le début de l'expérience. Cette phase de stabilisation en terme de composition de microbiote dure environ 2 semaines. Durant la première semaine, 10 ml d'alimentation secondaire sont introduit tous les jours dans F1.
- **Phase d'exposition au prébiotique (30 jours)** : Elle consiste en une exposition chronique du SHIME à une quantité de prébiotique dans le but d'étudier l'impact sur le microbiote intestinal. Après stabilisation du système, 10 g par jour d'inuline sont administrés dans le fermenteur 1 (estomac).

6. Préparation des échantillons

Cinq millilitres sont prélevés dans F3, F4, F5 et F6. Des dilutions en cascade sont réalisées dans 9 ml de solution de Ringer (évite les chocs osmotiques pour les bactéries). La majorité des bactéries se trouve sous forme de cellules végétatives (forme sous laquelle la bactérie se multiplie en condition favorable) mais seulement certaines (*Clostridium spp.*, *Bacillus spp.*) sont capables de former des spores. Les spores permettent aux bactéries se trouvant dans un milieu défavorable (température, pH extrême, carence nutritive...) de survivre dans un état de dormance (Raju et al., 2006). Nous avons choisi un stress thermique, pour cela les dilutions choisies (10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6}) sont mises à 70°C pendant 10 min afin de sélectionner les spores de *Clostridium spp* et/ou *Bacillus spp.* puisensemencées par la suite sur boîte. L'ensemencement se déroule en 3 parties et s'effectue pour les fermenteurs F3, F4, F5 et F6 (3 points/prélèvements) :

- Après stabilisation de la flore soit 2 semaines après le démarrage du SHIME et avant l'administration du prébiotique (J0) .
- 15 jours après l'ajout du prébiotique pour l'étude de l'effet à court terme (J15)
- 30 jours après l'ajout de l'inuline afin d'analyser l'effet à long terme (J30).

B. Etude in Vivo (fèces humaines)

Sept hommes et femmes ont donné volontairement les différents échantillons (Tableau 3). Cinq échantillons (1, 2, 4, 6 et 7) ont été récoltés 1 à 2 jours précédents la manipulation et ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation et 2 autres échantillons (3 et 5) ont été récoltés le matin même de l'expérience. Ces échantillons nous permettent d'observer la différence de flore intestinale entre les bébés et les adultes, l'effet d'une courte période de congélation sur le microbiote intestinale et enfin l'effet de l'inuline à court et moyen terme. Puis une deuxième expérience du même type est réalisée avec l'échantillon 3 (8) après 1 mois de congélation à -20°C dans le but d'observer l'effet de la congélation à long terme sur la microflore intestinale. Les prélèvements se sont effectués le plus stérilement possibles (matériels stériles).



Les 7 échantillons sont passés en enceinte anaérobie et pesés (environ 5 g/échantillon) à l'aide d'une balance de précision. Une dilution au 1/10 est effectuée pour chaque prélèvement à l'aide d'une solution de Tryptone sel+ cystéine (0,5g/L) dans des sacs stomachers stériles. La préparation est homogénéisée à l'aide d'un stomacher. Puis des dilutions en cascade sont réalisées dans du Tryptone sel + cystéine (0,5g/L) dans un volume final de 10 ml en condition anaérobie puis aérobie.

C. Analyse du microbiote intestinal

1. Méthode de la microbiologie classique

L'ensemencement :

Différents milieux de culture sont utilisés pour étudier la microflore intestinale. Les milieux sont disponibles sous forme de poudre et leur préparation est indiquée sur l'étiquette précisant la masse de poudre à dissoudre dans l'eau distillée. Les milieux sont ensuite autoclavés pendant 15 min à 121°C excepté pour le milieu SFP (10 min à 121°C). Enfin les ensemencements sont réalisés sur les différents milieux de culture et incubés aux températures optimales de croissance selon le type de flore recherchée. Le protocole d'ensemencement utilisé pour le SHIME et l'étude *in vivo* se trouvent en annexe 5 et 6. Les caractéristiques des différents milieux sont présentées en annexe 7.

L'incubation : la Chambre anaérobie

La chambre anaérobie utilisée est une chambre à atmosphère contrôlée «BACTRON II» de SHELLAB. Son fonctionnement repose sur l'utilisation d'un gaz anaérobie et d'un gaz de purge (pour la réalisation du vide) qui vont mettre en place les conditions anaérobies dans l'enceinte. Des incubateurs électriques dont la température choisie sont réglés via le panneau de commande permettant l'incubation des différents milieux microbiologiques. Un manomètre est présent à l'intérieur de l'enceinte. Il est rempli d'eau et donne à l'utilisateur un moyen visuel de mesurer la pression dans l'enceinte. Il agit également comme système de libération de pression en cas de surpression. Pour éliminer toute trace d'oxygène de l'enceinte, une cartouche de catalyse contenant du palladium est installée. La régénération du catalyseur se fait à 200°C pendant 2 heures. Enfin un indicateur d'oxygène, la résazurine, est présent constamment lors des manipulations en anaérobie, il permet de vérifier que l'enceinte est bien en anaérobiose. La solution de résazurine est jaune en condition anaérobie mais elle vire au rose/violet quand la concentration en oxygène est aux alentours des 300 ppm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en oxygène.

2. Méthode de la Cytométrie de flux

Principe : Une autre méthode de numération des bactéries n'impliquant pas la culture bactérienne est utilisée, c'est la cytométrie en flux. Cette méthode rassemble les caractéristiques essentielles des techniques d'analyses : quantitatif, sensible, rapide et multiparamétrique. Elle permet l'étude précise de cellules isolées entraînées dans un flux liquide. Le cytomètre utilisé est le MACSQuant® Analyzer de Milteni Biotec. Il est équipé de 3 lasers et permet l'analyse de 9



paramètres optiques (FSC, SSC et 7 canaux de fluorescences) (Tableau 4). Son principe repose en plusieurs parties (Figure 9) : la partie fluide où les cellules passent à travers un liquide de gaine dans lequel elles sont alignées les unes derrière les autres et séparées d'au moins 1 mm, défilant à grande vitesse devant une source lumineuse (laser). La partie optique où chaque événement passant devant un faisceau va créer un phénomène de diffusion lumineuse caractérisant les cellules selon :

- Leur taille (FSC, Forward Scatter) = lumière diffractée aux petits angles détectés dans l'axe de la lumière incidente
- Leur granulométrie (SSC, Side Scatter) = lumière diffractée aux grands angles détectés à 90° par rapport à l'axe de la lumière incidente
- Leur fluorescence = détectés à 90°

La lumière déviée à 90° passe par un miroir dichroïque qui va réfléchir une partie de la lumière vers un filtre concentrant l'intensité lumineuse sur un détecteur et une autre partie des rayons sont renvoyés vers un autre miroir dichroïque. Ces phénomènes sont détectés par des photodétecteurs ou photomultiplicateurs spécifiques d'un intervalle de longueur d'onde. La partie électronique où la quantité de lumière diffusée ou émise par fluorescence est convertie en voltage pour être mesurée et ensuite reconvertie en valeurs digitales, enregistrée sur l'ordinateur pour analyse (partie informatique).

Préparation des échantillons : Un millilitre des échantillons des 4 derniers fermenteurs prélevés sur le SHIME sont centrifugés à 10 000 xg pendant 10 min dans le but de récupérer les cellules bactériennes qui auront migré dans le culot puis 3 lavages successifs avec 1 ml de PBS (10 000 xg/ 5min) sont effectués pour éliminer toutes traces de débris qui pourraient par la suite interférer sur les analyses en cytométrie. Enfin des séries de dilution en cascade sont réalisées dans du PBS dans un volume final de 500 µl. Pour les échantillons de l'étude *in vivo*, la dilution 10⁻¹ est utilisée directement pour effectuer les dilutions en cascade.

L'analyse : Elle s'effectue à l'aide de LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability kits, L7012 (Invitrogen). Ce kit utilise deux fluorochromes : Le SYTO9 (λ_{ex} 480/λ_{em} 500nm) et l'iodure de propidium (λ_{ex} 490/λ_{em} 635nm) qui sont tous deux des colorants des acides nucléiques. Ces 2 fluorochromes diffèrent par leurs propriétés spectrales et leurs capacités à pénétrer dans les cellules. Le SYTO9 pénètre toutes les cellules mortes et vivantes et les colore en vert. L'iodure de propidium pénètre seulement les cellules dont l'intégrité membranaire est perturbée et les colore en rouge. Dans ce kit les deux colorants sont présents à des concentrations optimisées (SYTO9, 3.34 mM et IP, 20 mM) et agissent en compétitivité vis-à-vis des sites de fixation à l'ADN. Dans le cas d'un mélange des 2 colorants, l'IP étant un colorant plus fluorescent que le SYTO9 les cellules mortes doublement marquées apparaissent en rouge (cellules dont la membrane est endommagée (cellules non viables) alors que les cellules vertes sont considérées comme les cellules intactes (cellules viables). La coloration est réalisée sur 500 µl des dilutions effectuées en ajoutant 3 µL de SYTO9 et d'iodure de propidium. Ce mélange est incubé 15 minutes à température ambiante à l'obscurité.

Mise au point du cytomètre : L'analyse par cytométrie nécessite une mise au point pour la détection des zones de viabilité et de non viabilité. Pour cela des cultures pures d'*Escherichia coli* sont utilisées dont la croissance s'effectue dans 100 ml de BD Brain Heart Infusion à 37°C pendant une nuit. Les cellules sont centrifugées à 10 000 xg, 10 min puis une série de dilution en cascade est réalisée dans du PBS stérile. En parallèle, une partie des cellules bactériennes est traitée pendant 15



min avec 70% éthanol pour obtenir des cellules mortes, après lavage dans du PBS, une série de dilution en cascade est également réalisée. La coloration suit le protocole précédent. L'analyse s'effectue sur les cellules non traitées à l'éthanol et un mélange 50/50 de cellules non traitées et traitées.

3. Méthode de la qPCR

Extraction d'ADN : Cette technique permet d'isoler l'ADN présent dans les cellules. Le kit utilisé est le QiAamp DNA stool : Isolation of DNA from stool for pathogen Detection (Qiagen) auquel une étape de lyse mécanique via des colonnes de lyse « Lysing Matrix E » de MPbio a été rajouté pour optimiser la quantité d'ADN extrait. L'ADN extrait est analysé avec le NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Les échantillons sont conservés à -20°C.

La PCR ou Polymerase Chain Reaction est une technique permettant l'amplification exponentielle d'une région d'ADN en utilisant des amorces qui vont s'hybrider de façon complémentaire de chaque côté de la région ADN à amplifier. Cette méthode repose sur une répétition de cycles de transition de température (dans nos expériences 40 cycles) constituée chacune de 3 étapes dans les conditions suivantes :

- 1 : Dénaturation préliminaire de l'ADN : 5 min à 95°C
- 2 : Dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 10 secondes
- 3 : Hybridation des amorces sur l'ADN matrice pendant 30 secondes à 60°C

La qPCR ou PCR quantitative en temps réel (ABI prism 7300) repose sur la possibilité de suivre au cours du temps, le processus de PCR à l'aide de la fluorescence. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN alors que la PCR classique ne donne que la mesure finale. Le système de détection utilisé pour la détection ou la quantification du signal fluorescent en temps réel est le SYBR®Green de Quantifast SYBR Green PCR kit (Qiagen). C'est un agent intercalant de l'ADN, à l'état libre, il ne fluorescence quasiment pas et il est mesuré à la fin de chaque étape d'élongation (Poitras et Houde, 2002)

Préparation des échantillons : Une gamme de dilution pour chaque ADN extrait des fèces et des souches témoins est effectuée dans l'eau Rnase Free fournit dans le kit pour des concentrations allant de 20ng/μl à 0,002ng/μl dans un volume final de 200 μL. Chaque puits de réaction qPCR contient 12,5μl de SYBR, 0,75μL d'amorce Reverse et Forward, 6μl d'eau Rnase free et 5μl d'ADN. Les amorces utilisées sont représentées sur le Tableau 5 et les gammes étalon sont représentées en annexe 8. Des témoins positifs de réaction sont présents, il s'agit pour chaque couple d'amorce d'une culture pure spécifique testée préalablement dans le laboratoire, l'eau Rnase free sert de contrôle négatif.



D. Mise au point d'un protocole d'hybridation d'une sonde sur cellules bactériennes

Principe : Cette technique va nous permettre de localiser et dénombrer les cellules bactériennes. L'hybridation repose sur la complémentarité des bases azotées entre elles.

La sonde utilisée est une sonde complémentaire à l'ARN16 S bactérien et va permettre la détection de toutes les bactéries. Elle est appelée Eub338 (Tableau 6). Lors de nos expériences, 2 sondes sont utilisées pour un soucis de détection : La sonde Eub338 couplée au fluorochrome FITC(fluorescein isothiocyanate ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}, 495/520nm$)) et la même sonde Eub338 couplée au Cy3(Cyanine ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}, 550/570nm$)).

Protocole :

Préparation des cultures : Les cultures bactériennes utilisées sont *Escherichia coli* (Gram négatif) et *Enterococcus faecalis* (Gram positif) dont les pré-cultures et cultures sont effectuées dans un milieu BD Brain Heart Infusion (BHI) à 37°C. Les bactéries sont récupérées après centrifugation à 10 000xg pendant 10 min. Puis les cellules bactériennes sont lavées dans du PBS (phosphate buffered saline) stérile et centrifugées à 10 000xg, 5 min.

Etape de perméabilisation : Dans un premier temps, des tests de perméabilisation (Tableau 7) sont effectués sur les cellules dans le but de choisir le meilleur traitement perméabilisant.

1 ^{er} traitement : Lysozyme	2 ^{ème} traitement : Choc thermique	3 ^{ème} traitement : Alcool
Les culots lavés sont repris dans du Tris-EDTA(100mM Tris.pH[8],50 mM EDTA) à 1 mg/ml de lysozyme et incubés à 37°C pendant 30 min	Les culots sont repris dans du PBS puis incubés à 70°C pendant 15 min	Les culots sont repris dans 70% éthanol pendant 15 min à température ambiante et sous agitation

Tableau 7 : Caractéristiques des différents tests de perméabilisation

Après les culots lavés dans le PBS, l'efficacité du traitement est vérifiée via une analyse cytométrique avec marquage à l'iodure de propidium (marquage réalisé sur des dilutions bactériennes (Vf de 500µL pour 3µl d'iodure de propidium), l'échantillon mère est préservé pour l'hybridation).

Etape d'hybridation : Les cellules perméabilisées et lavées sont centrifugées à 10 000 xg et reprises dans une solution d'hybridation (900mM NaCl, 20mMTris-Hcl [pH 8] ,0.01%SDS ,40% formamide) puis centrifugées à 10 000xg, 5min. Les culots sont repris dans 40µl de cette solution d'hybridation contenant 5ng/µl de sonde Eub338. L'hybridation se fait dans le noir pendant 2 heures à 46°C.

Etape de lavage : 150 µl de solution de lavage (65mM NaCl, 5mM Tris-Hcl[pH 8] ,0.01%SDS) sont ajoutés aux échantillons et centrifugés 15 min à 4000 xg. Les culots obtenus sont repris dans 200 µl de cette solution de lavage. Le lavage se fait à 48°C pendant 25 min.



Préparation de l'échantillon pour l'analyse : Après lavage, les cellules sont centrifugées à 4000xg, 15 min puis les culots sont repris dans 200 µl de PBS.

Lecture/observations des résultats : La lecture des résultats s'effectue à l'aide de 2 méthodes :

La cytométrie de flux notamment pour le fluorochrome FITC (le plus adapté au laser et filtre du système). L'observation des résultats par cette méthode utilise le laser argon à 488 nm du cytomètre et s'appuie sur la détection du pic de fluorescence émise par FITC en faisant varier le voltage du channel B1 entre 282 et 600 volts (augmentation de la sensibilité de détection).

La microscopie à fluorescence : Le microscope utilisé est le BX-FLA d'Olympus (microscope à fluorescence verticale) avec le laser WG (excitation 510-550nm). C'est un microscope optique classique faisant passer la lumière excitatrice par l'objectif et non pas par dessous le spécimen. Il est aussi nommé microscope à épifluorescence. Il est constitué de filtre d'excitation permettant de laisser passer les longueurs d'ondes d'excitation des faisceaux lumineux, des miroirs dichroïques qui renvoient la lumière et un filtre de barrière permettant le passage des longueurs d'onde d'émission de l'objet fluorescent. Le principe de fonctionnement se trouve en Figure 10. Il est employé pour le fluorochrome Cy3.

III. Résultats

Nous avons dans un premier temps, testé les protocoles d'analyses de la flore fécale selon 3 méthodes différentes ce qui nous permet par la suite de les améliorer ou les valider. Ces protocoles sont mis en application pour l'étude *in vivo* de fèces humaines et enfin pour une expérience *in vitro*. Les résultats obtenus sont corrélés à la littérature et vont permettre de confirmer ou non notre méthodologie.

A. Validation des méthodes d'analyses de la flore fécale

1. Comparaison de dénombrement par microbiologie classique et par qPCR

Il est important de préciser que la méthode par qPCR est sensible et que certains facteurs peuvent influencer la qualité des résultats. Parmi ces facteurs, nous retrouvons dans notre situation :

- Si les témoins positifs utilisés en qPCR ne sont pas représentatifs des genres dominants pour les espèces recherchées ceci peut entraîner une sous ou surévaluation du nombre véritable de bactéries présentes.
- La qualité et la pureté des acides nucléiques extraits comptent parmi les facteurs les plus critiques pour l'analyse PCR.



- Le protocole de qPCR utilisé dans notre étude a été mis au point pour l'analyse de la flore fécale chez le rat dans un projet ultérieur au sein du laboratoire or il existe une différence entre le microbiote du rat et de l'homme (Tomas et al., 2012).

En corrélant mes résultats obtenus par qPCR en abscisse et par microbiologie classique en ordonnée (graphique 1) selon les études *in vivo*, nous observons que les différentes données forment un nuage de point qui est orienté selon une droite préférentielle. Une droite de régression linéaire est ajoutée au graphique 1, elle est calculée selon la méthode des moindres carrés (droite la plus probable). Une relation linéaire positive est observée, en effet le coefficient directeur de la droite de régression linéaire étant égale à 1,0153, nous indique un accroissement de y proportionnel à celui de x. Un autre critère est pris en compte : La valeur de R^2 (coefficient de détermination) est une mesure de la précision de l'ajustement de la droite de régression soit elle nous permet d'évaluer le degré d'association entre les deux méthodes. Plus ce coefficient se rapproche de 0, plus le nuage de points est diffus autour de la droite de régression, au contraire, plus le R^2 tend vers 1, plus le nuage de points se rapproche de la droite de régression. Dans notre cas $R^2 = 0,9696$, ce qui signifie que l'équation de la droite de régression est capable de déterminer à 96,96%, la distribution des points et donc une corrélation forte entre les 2 méthodes d'analyse.

Ces résultats sont obtenus pour les *Enterobacteriaceae*, pour les autres genres bactériens, les 2 méthodes ne sont pas corrélables.

2. Dénombrement par cytométrie de flux

Mise au point des zones de viabilité : Nous partons d'échantillons d'*Escherichia coli* dont la concentration de départ est connue. Pour les cellules non traitées la solution mère est de 10^9 UFC/ml et les cellules traitées à l'éthanol sont à la même concentration. Ainsi l'échantillon possédant le mélange 50/50 se trouve dans les mêmes proportions pour chacun des 2 échantillons.

Les mélanges 50/50 sont passés sous analyse à différentes dilutions dans le but de vérifier les zones de viabilité respectant la gamme de dilution. Nous observons 2 zones distinctes qui apparaissent sur la fenêtre de données confrontant les événements FITC détectés et ceux détectés pour l'iodure de propidium (Graphique 2). Ces événements sont représentés sous forme de dot plot où l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration d'évènements détectés. Nous avons réalisé une analyse quantitative pour chaque zone détectée et les nommons respectivement P33 et P34. Sur le graphique 2, P33 décèle $1,94.10^6$ count/ml et P34 $1,43.10^6$ count/ml pour une dilution à 10^{-3} . Ainsi l'analyse nous indique que $1,94.10^9$ UFC/ml sont trouvés en P33 et $1,43.10^9$ UFC/ml en P34. Ces résultats sont conformes aux attentes de départ et respectent la concentration de la solution mère. En analysant les résultats avec une dilution inférieure nous constatons que la gamme de dilution est respectée (P33 : $1,72.10^9$ UFC/ml et P34 : $1,41.10^9$ UFC/ml).

Pour discriminer les 2 zones, nous passons l'échantillon contenant seulement les cellules non traitées (Graphique 3), une zone apparaît clairement en P33 avec une concentration de $3,3.10^9$ UFC/ml, cette zone est marquée par FITC et représente donc la zone de viabilité. Remarquons qu'en P34, des événements sont également détectés mais en faible proportion ce qui est normale car la



majorité des cellules présentes dans l'échantillon sont vivantes. Pour conforter les conclusions, nous observons les résultats de l'échantillon traité à l'éthanol (Graphique 4) entraînant ainsi la mort cellulaire. Le dot plot apparaissant se trouve en zone P34 et quantifie $3,69.10^9$ UFC/ml de cellules marquées au iodure de propidium, cette zone est donc représentative de la zone de non viabilité.

Pour conclure, les 2 zones trouvées sont en concordance avec les concentrations mères de départ et permettent ainsi de définir la proportion de bactéries totales présentes dans un échantillon (marquage au SYTO9) et le ratio de bactéries vivantes et mortes (SYTO9 + iodure de propidium). Pour la suite des analyses sur l'étude *in vivo* et *in vitro*, nous effectuerons seulement une analyse de la flore totale.

Mettre en place une gamme étalon : La zone de viabilité étant défini, nous avons ensuite déterminer les limites de linéarité de l'appareil pour trouver les valeurs inférieures ou supérieures auxquelles l'appareil n'est plus en mesure de donner un résultat valide pour les analyses *in vivo* et *in vitro*. Pour cela nous sommes tout d'abord partie de la gamme de dilution de la culture pure d'*Escherichia coli* marqué au SYTO9 et avons testé les dilutions de 10^{-3} à 10^{-8} avec des volumes de prélèvements différents car le volume n'influence pas les analyses cytométriques. Nous constatons d'après le graphique 5 que pour les dilutions 10^{-3} (3), 10^{-4} (4) et 10^{-5} (5) les résultats suivent une linéarité proportionnelle aux différentes dilutions. A partir de dilutions plus importantes, l'appareil n'est plus en mesure de donner des résultats fiables. Nous choisissons arbitrairement les dilutions 10^{-3} et 10^{-4} pour la suite des analyses sur le microbiote fécale. Nous testons par la suite un échantillon *in vitro* aléatoire, d'après le graphique 6 nous observons une linéarité quasi parfaite pour les dilutions comprises entre 10^{-2} (2) et 10^{-4} (4) avec des coefficients de détermination supérieurs à 99% et des coefficients directeurs tous proche de 1. Les analyses *in vivo* et *in vitro* en cytométrie se poursuivront avec ces dilutions.

B. Etude *in vivo*

Ces résultats sont le reflet d'une première analyse pour la mise en place et la validation de la méthode utilisée en comparaison aux résultats attendus dans la littérature. Pour des études complémentaires, une répétabilité des expériences est nécessaire pour valider les observations faites lors de cette analyse. Les tests de significativité ne pouvant être effectués, par manque de répétabilité les différences seront désignées par rapport aux critères microbiologiques sur les denrées alimentaires de l'AFSSA (d'après les valeurs guides de tolérance analytique (incertitude de mesure acceptable) pour les dénombrements bactériens (en log UFC) établies sur la base des travaux de Augustin et Carlier (2006) et Ah Soon et Cornu (2004)).



1. Variation de la flore fécale en fonction de l'âge

Microbiologie classique (Graphique 7) :

La flore totale aérobie est la plus abondante chez le bébé de 3 mois (10^9 - 10^{10} UFC/g de fèces) et tend à diminuer rapidement avec l'âge. Ainsi chez le bébé de 8 mois et chez l'adulte, le taux de flore totale aérobie est aux alentours de 10^8 UFC/ g de fèces. Cette tendance s'explique par une présence importante des *Enterobacteriaceae* (10^9 UFC/g de fèces) et *Enterococcus* (10^9 - 10^{10} UFC/ g fèces) chez le bébé de 3 mois. Ces résultats sont en concordance avec les données de la littérature où les *Enterobacteriaceae* dominent le microbiote infantile durant les premières semaines de vie. Ces populations diminuent par la suite car les bactéries anaérobies se mettant en place créent un environnement moins propice aux genres aérobies (Campeotto et al., 2007).

La flore totale anaérobie chez le bébé de 3 mois est la plus abondante (10^{11} UFC/g de fèces) alors que pour le bébé de 8 mois et l'adulte, elle est de 10^{10} UFC/g de fèces. Ces observations peuvent trouver leur explication via les Bifidobactéries. En effet chez le bébé le taux de *Bifidobacterium* (10^{11} UFC/g) ainsi que les *Lactobacillus* (10^9 UFC/g) sont importants à cause de leur alimentation au lait maternel ou industriel supplémenté en prébiotiques. Nous trouvons donc 10^{11} UFC/g de *Bifidobacterium* chez le bébé le plus jeune, puis un taux de 10^{10} UFC/g chez le bébé de 8 mois et enfin 10^9 UFC/g chez l'adulte. Une diminution croissante des Bifidobactéries s'observe avec l'âge. Les articles récents confirment cette tendance et démontrent que le microbiote intestinal de l'enfant devient similaire à celui de l'adulte vers l'âge de 2 ans quand une alimentation variée est mise en place (Palmer et al., 2007). La même conclusion est apportée pour les Lactobacilles. Enfin le genre *Clostridium* est représentatif des tendances observées. En effet, une absence de *Clostridium* chez le bébé de 3 mois est remarquée, elle tend à augmenter à 8 mois (10^2 UFC/g) et atteint son taux maximum chez l'adulte (10^5 UFC/g). La présence de *Clostridium* est principalement due à l'environnement familial.

Toutes les observations faites lors de cette analyse sont en corrélation avec les données de la littérature et illustrent parfaitement la figure 2 (partie introduction) où le bébé de 3 mois se retrouve dans la zone naissance, le bébé de 8 mois dans la zone sevrage puis enfin l'adulte.

qPCR (Graphique 8) :

En ce qui concerne le genre aérobie représenté par les *Enterobacteriaceae*, le nombre de copies ($10^9/10^{10}$ nombre de copies ADNr 16s copies/g fèces) est le plus abondant pour le bébé de 3 mois et diminue chez celui de 8 mois et l'adulte où leur profil est très proche (10^8 nombres de copies /g). Ces résultats sont concordants avec ceux de la littérature et nos résultats en microbiologie classique, de plus nous avons démontré précédemment que les 2 méthodes sont au point pour ce genre bactérien. Pour les *Lactobacillus*, la tendance est à une augmentation du nombre de copies avec l'âge (de 10^8 à 10^9 - 10^{10} nbr copies/ g fèces), ce résultat n'est pas cohérent avec les données comparées et ceux de la microbiologie classique. Cette observation est valable pour les Bifidobactéries où le même nombre de copies est présent pour les trois groupes (10^{10} - 10^{11} nbr de copies/g).



Quand nous nous intéressons au *Bacteroidetes* et *Firmicutes*, nous observons dans un premier temps un faible taux de nombre de copies de *Bacteroidetes* chez les bébés (10^5 - 10^6 nbr de copies/g) alors que chez l'adulte il se rapproche de 10^9 nbr de copies/g fèces. Le nombre de *Firmicutes* quand à lui est plus faible chez le bébé de 3 mois (10^9 nbr copies /g) que celui de 8 mois où même l'adulte (10^{10} - 10^{11} nbr copies/g). Pour analyser en détails ces 2 phyla bactériens, un ratio *Firmicutes* /*Bacteroidetes* est réalisé (Graphique 9). Ce ratio est utilisé dans la littérature pour caractériser le microbiote intestinal notamment pour les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et même l'obésité. (Ley et al., 2006). Les résultats attendus selon la littérature montre un ratio de 5/1 à 3/5 pour les bébés entre 0 et 12 mois (Corthier, 2008). Nos résultats montrent que ces ratios sont très élevés pour le bébé de 8 mois et de 3 mois (supérieurs à 2000/1), donc les données ne correspondent pas aux résultats attendus, le nombre de *Firmicutes* étant plus important et le nombre de *Bacteroidetes* plus faible. Pour les adultes (Corthier, 2008), (Mariat et al., 2009) mettent en avant un ratio de 10/1 soit 10 fois plus de *Firmicutes* que de *Bacteroidetes* et nous trouvons un ratio d'environ 18/1. Ce ratio se rapproche donc de ceux trouvées dans des études précédentes même si des biais sont encore présents.

Ainsi en comparant les 2 méthodes, les tendances ne sont pas les même quand à la composition de la microflore fécale, la méthode par microbiologie classique reflète les données observées dans la littérature alors que l'analyse par qPCR montre des variations importantes chez le groupe des bébés.

2. Variation de la flore fécale en fonction de la congélation

Microbiologie classique (Graphique 10):

Effet à court terme : La 1^{er} observation est une diminution de la flore totale aérobie après seulement 1 jour de congélation à -20°C (perte de 1 log10). Cette baisse rapide peut se corrélér par une perte de 0,5 log10 d'*Enterobacteriaceae* mais surtout d'une diminution conséquente du nombre d'*Enterococcus* (perte de 2,89 log10). Les Lactobacilles qui sont également aéro-anaérobies facultatives subissent un dommage important soit un déficit de 1,85 log10. Cette première analyse nous permet de révéler les premières tendances de l'effet de congélation : La congélation à court terme peut avoir un effet délétère sur la flore fécale aérobie. En ce qui concerne la flore totale anaérobie le constat est similaire (perte de 1 log de 10). L'explication peut se trouver chez les *Bifidobacterium*, en effet nous constatons une réduction de 0,8 log10 après 1 journée de congélation. Cependant il est intéressant de noter que *Clostridium* ne semble pas être affecté par cet environnement hostile car son taux UFC reste constant.

Effet à long terme : Une congélation prolongée de 1 mois entraîne une diminution plus importante du nombre de bactéries aérobies (perte de 1,53 log10). En effet l'action prolongée de la congélation a pour conséquence une baisse constante des genres *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae* et *Lactobacillus* avec respectivement une perte de 1,07 log10, 0,8 log10 et 1,8 log10 entre la congélation de 1 jour et de 1 mois. Cet effet se retrouve pour la flore totale anaérobie avec un déficit de 1,10 log10 entre les 2 temps de congélation. Cependant le nombre de *Bifidobacterium* reste plus ou moins constant avec le temps de congélation et les *Clostridium* ne semblent toujours pas affecté



par la congélation. L'explication de la perte de la flore totale anaérobie doit se trouver dans une diminution d'autres genres anaérobies non étudiés ici.

Un premier constat se dégage de ses analyses préliminaires : la congélation peut avoir un effet délétère sur la flore fécale mais il est plus marqué sur la flore aérobie que la flore anaérobie. L'effet de la congélation sur la flore fécale est rapide (1 jour) et se poursuit dans le temps. Notons également que certains genres bactériens comme les *Clostridium* ont une capacité de résistance plus importante et ne semblent pas être affectés par ce mode de stockage. Ces observations sont en corrélation avec certaines études effectuées comme (Ott et al., 2004) qui met en avant une perte de la flore fécale bactérienne associée à divers modes de stockage comme la congélation, le maintien au frais (4°C des échantillons) au même un stockage à température ambiante.

qPCR (Graphique 11) :

L'effet de la congélation sur la flore aérobie semble être plus marqué après un temps de congélation prolongé à -20°C. Ainsi nous avons une baisse de 1,42 log10 chez les *Lactobacillus* et 1,36 log10 chez les *Enterobacteriaceae*. Quand on s'intéresse à la flore anaérobie et ici les *Bifidobacterium*, une perte du nombre de copies est constatée avec 1 jour de congélation (perte de 0,52 log10) mais se trouve être plus conséquente avec 1 mois de congélation (déficit de 1,33 log10). Nous retrouvons donc les mêmes tendances qu'avec la microbiologie classique et les données de la littérature. Cette orientation se confirme avec les *Firmicutes* (perte de 1,37 log10) et les *Bacteroidetes* (baisse de 1,53 log10). Si nous analysons le ratio *Firmicutes* / *Bacteroidetes* (Graphique 12), ce dernier tend à augmenter (de 18/1 à 26/1).

3. Influence d'un traitement prébiotique (inuline) sur la flore fécale

Précisons que les échantillons sont indépendants des uns des autres soit le témoin sans inuline, la femme inuline 1 mois et 2 mois proviennent de personnes différentes. Les données ainsi récoltées lors de cette expérience ne sont pas les résultats strictement attendus de l'effet de l'inuline selon la littérature mais ils sont là, à titre informatif pour nous donner une idée de la tendance. L'expérience sera refaite par la suite avec la même personne fournissant le témoin et un traitement de 2 mois.

Microbiologie classique (Graphique 13):

Selon les études menées, les personnes consommant de l'inuline ont un taux de flore lactique plus important que la moyenne or dans notre analyse cette tendance n'est pas révélée (le taux est constant entre les 3 échantillons). Mais n'ayant pas les témoins adaptés à l'expérience nous ne pouvons pas avancer d'hypothèse sur cet effet bifidogène. Cependant nous constatons qu'il y a moins de flore aérobie chez les personnes consommant le prébiotique et ceci provenant d'un plus faible taux d'*Enterococcus* (-0,58 log10) et d'*Enterobacteriaceae* (-0,86 log10). La seule tendance majeure constatée que nous pouvons avancer est l'effet défavorable de l'inuline sur une flore potentiellement pathogène que sont les *Clostridium*. Il y a ainsi une différence moyenne de 2,8 log10 de *Clostridium* entre le témoin sans inuline et les personnes traitées.



qPCR (Graphique 14) :

En qPCR, nous retrouvons la même tendance pour la flore aérobie avec les *Enterobacteriaceae* dont une différence moyenne de 0,61 log₁₀ est observée en moins avec traitement et sans traitement inuline. La qPCR nous apporte des informations complémentaires avec les tendances sur les *Firmicutes* et *Bacteroidetes* représentées par les *Bacteroides spp.*. L'inuline semblerait avoir un effet bénéfique sur les *Firmicutes* et les *Bacteroides* avec une différence moyenne de 0,51 log₁₀ entre témoin et traitement inuline 2 mois. Le ratio *Firmicutes* /*Bacteroidetes* (Graphique 15) augmente fortement lors d'un traitement de 1 mois (90/1) mais ce constat n'est pas aussi marqué pour 2 mois de traitement (45/1).

Les observations faites avec les 2 méthodes d'analyse ne nous permettent pas de confirmer les résultats obtenus dans la littérature sur l'effet bifidogène de l'inuline, mais nous donne néanmoins une première tendance quant à l'effet délétère de l'inuline sur la flore dite potentiellement pathogène.

4. Variation inter-individus de la flore fécale

Cette analyse nous permet de vérifier les observations faites dans la littérature sur le fait que le microbiote intestinal est spécifique d'un individu à l'autre et ceci principalement dû aux conditions environnementales qui l'entourent.

Microbiologie classique (Graphique 16) :

La différence s'observe tout d'abord au niveau de la flore aérobie où le bilan de la flore totale aérobie montre une différence de 2,21 log₁₀ entre les 2 individus. En effet ce contraste peut venir des *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Enterobacteriaceae* avec des différences respectives de 2,06 ; 4,72 et 1,80 log₁₀ où la flore fécale de l'adulte femme est la plus conséquente. Concernant la flore anaérobie, le bilan est similaire : la femme adulte a un taux de Bifidobactéries supérieur de 0,67 log₁₀ et une proportion de *Clostridium* supérieure de 1,72 log₁₀. Ces résultats sont en correspondance avec les constats de la littérature (Eckburg et al., 2005).

qPCR (Graphique 17) :

Les observations faites en microbiologie classique sont retrouvées en partie en qPCR. Nous constatons un taux supérieur de *Bifidobacterium* (1,5 log₁₀) et d'*Enterobacteriaceae* (1,67 log₁₀) chez la femme. Par contre au niveau des Lactobacilles, les 2 échantillons semblent avoir un pourcentage de copies d'ADN similaires (9,7 log₁₀) ce qui se trouve être en contradiction avec les analyses microbiologiques précédentes. En ce qui concerne les *Bacteroides* (9,9 log₁₀) et les *Firmicutes* (11,2 log₁₀) leur taux est constant entre les 2 individus ainsi la balance *Firmicutes* /*Bacteroidetes* (Graphique 18) ne semble pas fluctuée fortement entre les 2 échantillons (rapport compris entre 18/1 et 23/1). Cette stabilité sur les 2 familles bactériennes est semblable aux données bibliographiques qui révèlent un rapport constant chez les adultes sains (Corthier, 2008).

Constat global sur les résultats obtenus : L'analyse de ces résultats malgré un manque de répétabilité nous permet d'avoir les tendances générales sur la composition de la flore fécale et



également de valider les méthodes d'analyse utilisées. Nous constatons que l'analyse microbiologique est proche des résultats trouvés dans la bibliographie mais l'analyse par qPCR doit être améliorée.

5. Analyses cytométriques

L'analyse a été faite par marquage au SYTO9 pour détecter l'ensemble des bactéries présentes dans les différents échantillons. Par cytométrie de flux (Graphique 19), le taux de flore totale détecté se trouve aux alentours de 10^{11} UFC/g de fèces pour l'ensemble des échantillons et ne varie pas malgré les différences entre les échantillons. Ces résultats corroborent ceux de la littérature (Rambaud et al., 2004) qui dénombrent un taux constant de flore totale de 10^{11} à 10^{12} UFC/g de fèces. De plus notons qu'en comparant la flore détectée en cytométrie avec celle détectée en microbiologie classique, la tendance est à un taux de bactéries détecté plus important en cytométrie ceci pouvant s'expliquer par le fait que la cytométrie ne nécessite aucune culture bactérienne.

Constat global sur les résultats obtenus : En ce qui concerne la cytométrie de flux, elle nous permet d'obtenir rapidement une tendance globale du nombre de bactéries totales dans un échantillon mais ces résultats doivent être pris avec recul du fait de la non spécificité de notre appareil aux cellules procaryotes.

C. Etude *in vitro* / SHIME

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel statview (version 5.0, Abacus Concept Inc., Berkeley, CA, USA). Une analyse des variances ANOVA est réalisée avec un test PLSD de Fischer (Procédure de "*least significant difference method*" de Fisher) pour tester l'hypothèse nulle que toutes les moyennes de la population sont égales avec un niveau de significativité de 5%. Lorsque les résultats de ce test sont significatifs, nous comparons les moyennes des groupes 2 à 2 en utilisant un test de T de student non apparié.

Notre étude se décompose en 3 parties : Tout d'abord, une observation globale de l'évolution de la flore totale dans les différents fermenteurs. Suite à ces résultats, nous étudions en détails les profils bactériens en fonction du prébiotique. Enfin nous confrontant nos résultats avec l'évolution du pH dans les fermenteurs. Ces analyses nous permettent par la suite de définir les effets ou non du prébiotique sur le microbiote intestinal.

1. Analyse de la flore totale

Pour analyser l'évolution des micro-organismes dans le Vitrosim, nous examinons dans un premier temps la croissance de l'ensemble des bactéries dans chaque compartiment en fonction du temps de traitement à l'inuline.



Flore totale aérobie (Graphique 20) : L'analyse de la flore totale aérobie se révèle être la plus intéressante au niveau du fermenteur 6. En effet dans les 3 premiers fermenteurs (F3, F4 et F5) la flore totale aérobie reste relativement stable au cours du temps de traitement au prébiotique (entre 7 et 8 log10). Par contre c'est dans F6 qu'une différence est notée : nous observons une diminution significative de la flore totale après 15 jours de traitement (baisse de 1,32 log10) et une baisse significative plus conséquente après 30 jours de traitement (baisse de 2,09 log10). En analysant la courbe de tendance linéaire de F6, nous obtenons l'équation suivante : $y = -1.0442x + 9,5461$ avec $R^2 = 0,9775$. Ainsi nous avons une perte linéaire de la flore totale aérobie dans le colon descendant associé à l'action du prébiotique.

Flore totale anaérobie facultative (Graphique 21): Le constat est semblable entre flore totale aérobie et anaérobie facultative. Nous obtenons une stabilité de la flore totale anaérobie dans les 3 premiers fermenteurs testés (F3, F4 et F5) mais dans F6 nous avons une baisse significative de cette flore anaérobie (perte de 1,01 log10) mais cette diminution ne se retrouve pas à J30 et tend même à retrouver l'état bactériologique de départ (7,9 log10).

Dans l'ensemble, l'action du prébiotique se répercute au niveau du fermenteur 6 soit dans le colon descendant. Son action cible aussi bien la flore totale aérobie que la flore totale anaérobie facultative mais se diversifie au niveau du temps d'action. L'inuline a pour conséquence une diminution de la flore totale aérobie tout le long du traitement (30 jours) donc son action est continue et prolongée dans le temps. Pour la flore totale anaérobie facultative, l'intervention du prébiotique est transitoire, elle a une conséquence à court terme (15 jours) sur la flore totale anaérobie facultative.

Comparaison des méthodes d'analyses : Tout comme l'analyse *in vivo*, la flore totale est également mesurée par cytométrie de flux à l'aide de l'agent intercalant à l'ADN, le SYTO9. Nous effectuons une analyse comparative entre les résultats trouvés en cytométrie (en ordonnée) et les résultats de la microbiologie classique (en abscisse) (Graphique 22). Nous créons une série de données théoriques indiquant des résultats identiques en cytométrie et microbiologie afin de comparer les valeurs observées. Trois observations sont mises en évidence : Les événements détectés en cytométrie sont supérieurs à ceux observés en microbiologie classique (= valeurs observées supérieures à la droite des valeurs théoriques), les événements détectés en cytométrie sont inférieurs à ceux trouvés en microbiologie (= valeurs observées inférieures à la droite des valeurs théoriques) et enfin certains résultats indiquent que les analyses en cytométrie sont identiques aux données de microbiologie classique. La variabilité des résultats démontre que la méthode par cytométrie de flux n'est pas optimale à 100 % car nous devons par théorie trouver pour l'ensemble des échantillons, plus de bactéries détectées en cytométrie qu'en microbiologie classique.

2. Analyses des différents profils bactériens

Nous choisissons pour l'illustration et l'explication des résultats, 3 flores bactériennes dont les analyses sont statistiquement pertinentes. Pour les *Streptococcus* et *Enterococcus* (Graphique 23) le taux de bactéries reste stable dans les fermenteurs 3 et 4 représentant les régions de l'iléon/caecum et la zone ascendante du colon. Dans le fermenteur 5 et 6 nous avons une tendance à la baisse des



bactéries avec 15 jours de traitement à l'inuline or en raison des écart types élevés pour F5 seul le compartiment F6 nous dévoile une diminution significative du nombre de *Streptococcus* /*Enterococcus* à J15 (baisse de 1,12 log10).

Sur le graphique 24, le constat est proche pour les *Enterobacteriaceae* avec une baisse significative entre J0 et J15 dans le fermenteur 6. Cette tendance à la baisse (baisse moyenne 1,23 log10) se retrouve également à J30 mais toujours en raison d'écart type important n'est pas significatif. Dans les autres compartiments, le taux de bactéries reste plus ou moins stable avec le traitement. Pour le reste des genres bactériens étudiés, les résultats obtenus sont également significatifs au niveau du fermenteur F6 où l'action de l'inuline semble être la plus importante. Donc nous choisissons pour la suite des interprétations de nous baser sur l'effet de l'inuline au niveau du fermenteur 6.

Le Graphique 25 est une représentation de l'ensemble des flores bactériennes dans le fermenteur 6 en fonction du temps de traitement à l'inuline. Nous avons déjà au préalable noté la baisse du taux de *Streptococcus* /*Enterococcus* et des *Enterobacteriaceae* entre J0 et J15. Cette diminution n'étant pas linéaire en fonction du temps de traitement car leur valeur en log10 restant stable entre J15 et J30 (aux alentours de 7log10). En ce qui concerne les *Clostridium*, nous avons une réduction significative entre J0 et J30 avec une perte de 0,7 log10. Remarquons cependant que cette baisse est observée aussi entre J0 et J15 même si les différences ne sont pas significatives. Nous pouvons dire que l'inuline a un effet délétère sur les *Clostridium* proportionnel au temps d'exposition à l'inuline. Pour les *Bacteroides*, une tendance à la diminution de la croissance bactérienne est observée notamment entre J0 et J15 et cette baisse est significativement présente chez *Bacteroides fragilis* entre J0 et J15 (1 log10).

Les observations concernant les flores lactiques sont identiques, une augmentation significative des *Lactobacillus* et des *Bifidobacterium* est constatée entre J0 et J30 avec un accroissement de 0,51 log10 pour les Lactobacilles et de 0,86 log10 pour les Bifidobactéries soit une augmentation moyenne de 0,69log10 de la flore lactique tout le long du traitement au prébiotique.

Dans l'ensemble, nous constatons que l'inuline a un effet délétère sur la flore dite potentiellement pathogène (*Clostridium*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* et *Bacteroides*) soit les bactéries capables de provoquer des maladies infectieuses ou encore des toxi alimentaires quand elles ne sont plus en symbiose avec l'organisme. De plus, le prébiotique a une action positive sur la croissance de la flore dite potentiellement bénéfique (flore lactique).

3. Variation du pH

Le suivi quotidien du pH nous permet de constater les différences ou non de pH en fonction de la durée du traitement. Deux phases sont observées (Graphique 26):

La phase de stabilisation : Pendant les premiers jours de stabilisation, les valeurs du pH sont proches de 4 et 5 soit dans une zone d'acidité. Ce n'est que vers les derniers jours de stabilisation (12, 13 et 14ème jour) que le pH se trouve dans des valeurs physiologiques stables.



La phase d'exposition : Entre J0 et J15, nous observons une diminution globale du pH dans les 3 fermenteurs mimant le côlon. Il y a une baisse moyenne d'une unité pH dans F4 (5,5 à 4,5) , F5 (5,8 à 5) et F6 (6,6 à 5,5) où la diminution dans F6 est la plus importante durant les 7 premières jours de traitement. Entre J15 et J30, la variation du pH est moins prononcée. En effet nous avons toujours une diminution des valeurs pH dans F4 (baisse de 0,5 unité pH) mais elle est observée au niveau des 16, 17 et 18 ème jours de traitement. Dans les 2 autres compartiments, le pH reste constant par rapport aux résultats de J15.

En général, nous notons que l'inuline a un effet sur les 3 fermenteurs au niveau du pH et de la flore microbienne. Le prébiotique stimule la croissance de la flore lactique s'accompagnant ainsi d'une augmentation de la production d'acide lactique. Cette forte production entraine une acidité importante de l'environnement bactérien pendant les 15 premiers jours de traitements dans le côlon (diminution prononcée du pH). Cet effet acidogène se répercute sur la flore dite potentiellement pathogène présente qui n'est pas acidophile. Ce constat est observé également lors d'un traitement prolongé (J30) mais le phénomène est moins prononcé.

D. Mise au point d'un protocole d'hybridation

Pour enrichir notre capacité à étudier la microflore intestinale, nous souhaitons compléter nos mesures en cytométrie en ciblant non plus la flore totale mais aussi la flore spécifique. Pour démarrer cette étude, il est nécessaire déjà de valider le travail avec une sonde (à ADNr 16S) pour flore totale. Les expériences ultérieures réalisées dans le laboratoire n'ont pas été concluantes or l'étape critique pour une hybridation est la perméabilisation. Nous avons donc décidé de tester 3 protocoles de perméabilisation différents et de vérifier le succès de l'hybridation par microscopie à épifluorescence et par cytométrie de flux.

Dans un premier temps nous avons analysé les tests de perméabilisation par cytométrie en utilisant la coloration BacLight. Le principe d'observation des résultats est identique à ceux des zones de viabilité réalisées précédemment: La zone viable marquée au SYTO9 désignant les cellules non perméabilisées et la zone non viable marquée à l'iodure de propidium désignant les cellules perméabilisées. Les résultats des tests de perméabilisation sont représentés sur le tableau 8.

Traitements	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Ethanol 70%	Perméabilisation réussie	Perméabilisation réussie
Choc thermique 70°C	Perméabilisation réussie	Perméabilisation réussie
Lysozyme 1mg/ml	Echec de la perméabilisation	Perméabilisation réussie

Tableau 8 : Résultats des tests de perméabilisation sur les 2 souches bactériennes testées

Après hybridation, nous analysons les résultats par microscopie à épifluorescence. L'image 1 montre une coloration des cellules *Escherichia coli* traitées à l'éthanol avec le CY3 confirmant le succès de l'hybridation. Ces observations sont identiques pour le choc thermique mais le traitement lysozyme confirme les résultats obtenus en cytométrie où aucune fluorescence ou très peu au Cy3 ont été détectée donc il y a échec de l'hybridation dû à un souci de perméabilisation. L'image 2 illustre les *Enterococcus faecalis* traités au lysozyme marqué au Cy3, ces résultats sont retrouvés pour les 2 autres traitements de perméabilisation.



Le lysozyme n'étant pas adéquat aux bactéries Gram négatives. Pour la suite, un traitement de perméabilisation de type éthanol 70% ou d'un choc thermique à 70°C sera utilisé pour la perméabilisation.

Cependant, les analyses par cytométrie de flux n'ont pas été concluantes. Nous n'avons pas trouvé de fluorescence distinct FITC ou CY3 de la sonde Eub338 dans l'ensemble de nos échantillons dû aux pics d'interférences du diluant et des cellules bactériennes non marquées.

IV. Discussion / Perspectives

A. Mises au point des méthodes

Les analyses faites par qPCR s'avèrent être aléatoire selon le type bactérien recherché. Nous avons montré que les analyses réalisées sur les adultes sont proches de ceux trouvées dans la littérature ainsi notre méthode de qPCR est efficace mais il existe cependant des biais. Les variations les plus importants sont celles trouvées chez les bébés, il nous faut donc revoir le protocole notamment au niveau de l'extraction pour les fèces de bébés où nous avons remarqué que le taux d'ADN extrait était nettement inférieur à celui des adultes. Nous avons conclu que la technique de qPCR était en corrélation avec les résultats de microbiologie classique pour les *Enterobacteriaceae* mais ne sont pas concluants pour les autres genres recherchés. Pour expliquer ces variations, nous nous tournons vers les témoins des gammes étalon utilisés. Pour les *Enterobacteriaceae*, l'utilisation d'*Escherichia coli* est pertinent du fait qu'elle représente en majorité les espèces du genre. Pour les autres genres bactériens, les bactéries utilisées pour les gammes étalon ne sont pas représentatives de la majorité des espèces constituant les groupes recherchés, pouvant ainsi expliquer le biais des résultats entre qPCR et microbiologie classique car la construction des sondes utilisées sont réalisées à partir d'espèces dominantes du genre. Pour de futures analyses, il est préférable de constituer de nouvelle gamme étalon pour *Lactobacillus spp.* (*L. plantarum*), *Firmicutes* (*Clostridium leptum*), *Bifidobacterium spp.* (*B. adolescentis*) et *Bacteroides spp.* (*B. vulgatus*) (Wilson, 2004). Précisons également que la variabilité du nombre de copies du gène 16s et les variations génomiques que subit l'ADN, engendrent une sous ou sur estimation de l'abondance bactérienne réelle, les résultats fournis par qPCR ne sont donc pas totalement réaliste mais ils nous donnent une abondance relative de cette population bactérienne (Van Zenten et al., 2012).

L'analyse cytométrique nous sert à quantifier le nombre de bactéries totales présentes dans nos échantillons. Dans l'étude *in vivo* les résultats trouvés entre cytométrie et microbiologie sont similaires et les événements trouvés en cytométrie tendent à être plus importants quand microbiologie classique (10^{11} UFC/ g de fèces pour l'ensemble des échantillons). Cependant cette tendance ne se retrouve pas lors de l'étude *in vitro* ($10^{8/9}$ UFC/ g) car les résultats de cytométrie sont soit supérieurs ou inférieurs ou égaux à ceux de la microbiologie classique. La technique de cytométrie est utilisée en majorité pour l'étude de cellules eucaryotes, l'étude sur les cellules procaryotes sont plus récentes et nécessite des mises au point c'est pour cela que nous constatons des variations. Dans la littérature le taux de bactéries totales fécales retrouvées se trouvent aux



alentours de 10^{12} UFC/ g de contenu, nous avons donc un biais de 1 log10 avec les résultats *in vivo* mais surtout de 3 à 4 log10 dans les résultats *in vitro*. Comment expliquer ces biais ?

Pour les résultats *in vitro* : Une partie des explications vient des conditions expérimentales. Malgré les précautions pour préserver l'anaérobiose, le prélèvement ainsi que les conditions de mises en culture sur boîte ne respectent pas les conditions strictes d'anaérobiose or la flore fécale se constitue en grande majorité par des anaérobies strictes qui à des temps d'exposition prolongé à l'oxygène se dégradent. Nous avons donc en majorité la flore aérobie anaérobie facultative présente à des taux de $10^8/10^9$ UFC/g de contenu.

Pour les résultats *in vivo* et *in vitro* : La cytométrie est une technique sensible qui nécessite l'alignement des cellules les unes derrière les autres pour quantifier justement le nombre de cellules mais les cellules bactériennes ont tendance à former des agrégats ainsi nous pouvons avoir une sous-évaluation du nombre de bactéries car l'appareil peut indiquer un évènement alors qu'elle détecte un agrégat. De plus l'analyse cytométriques ne peut pas s'effectuer en condition anaérobiose dans nos laboratoires, les bactéries très sensibles à l'oxygène peuvent s'autolyser et sont ainsi indétectables. Une étape de fixation cellulaire au paraformaldéhyde à 4% est donc nécessaire au préalable pour limiter les pertes.

Dans l'ensemble, la cytométrie de flux est une technique rapide qui nous permet d'avoir une idée de la flore totale présente dans un échantillon bactérien mais il faut rester prudent quant aux résultats car comme nous venons de voir, des biais peuvent exister et un ajustement de la technique est alors nécessaire. Il est donc sage d'utiliser en annexe une ou plusieurs techniques complémentaires pour vérifier les résultats.

Les analyses effectuées sur les différents échantillons se sont révélées pertinentes lors des expériences en condition de microbiologie classique. La comparaison avec les données de la littérature nous permet de valider la méthode qui sera appliquée par la suite pour confirmer les observations faites ici.

B. Étude *in vivo*

Nous avons mis en évidence la variation de la flore fécale avec l'âge. Chez les bébés les genres *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* et en général les aéro-anaérobies facultatives sont prédominantes alors que chez l'adulte les anaérobies strictes sont majoritaires au détriment des aérobie. Ces résultats bien que fidèles à ceux trouver dans la littérature sont discutables. En effet pour affirmer ces observations, il faut réaliser l'expérience avec des conditions différentes : Dans un premier temps, prendre des groupes de bébés d'âges différents à intervalle régulier avec le même type d'alimentation (allaitement ou lait infantile) car nous avons vu dans l'introduction que l'alimentation des nourrissons a un effet direct sur la flore intestinale. Dans un deuxième temps, prendre des groupes d'adultes d'âges différents ayant des habitudes alimentaires communes. De plus, il est important d'utiliser les échantillons stockés dans les mêmes conditions car nous avons vu que la congélation avait un effet sur la flore fécale .



La congélation a un effet délétère sur l'ensemble du microbiote intestinal avec une perte de la majorité des espèces d'environ 1,3 log₁₀ en moyenne excepté pour *Clostridium spp.*. Il est reconnu que la congélation ne tue pas les bactéries mais ralentit leur métabolisme or ici nous avons une perte de la flore fécale (Bonten et al., 1997). Ce déficit pourrait trouver son explication dans l'eau présente dans les selles, l'eau cristallisant aux basses températures, forment des cristaux de glace qui peuvent endommager de façon létale les cellules. Enfin certaines bactéries (*Clostridium spp.*) ont la possibilité de réagir à différentes agressions de l'environnement en formant des spores. Ces spores sont généralement inertes, sans activité physiologique et surtout beaucoup plus résistantes que la bactérie elle-même. Elles permettent à la bactérie, si les conditions idéales reviennent, de reprendre une activité biologique normale donc d'expliquer les résultats constants du nombre de *Clostridium spp.* malgré le temps de congélation.

L'expérience mettant en avant la variation inter-individu de la flore fécale ne nous donne qu'une infime idée de la variation pouvant exister entre chaque personne. En effet de plus en plus d'études montrent la diversité du microbiote et il semblerait qu'il existerait autant de profil bactérien de l'intestin que d'individus et qu'il s'apparente à l'image de l'empreinte digitale ou même du profil ADN. Augmenter le nombre d'échantillons pour cette analyse est utile pour confirmer cette tendance.

Maintenant analysons les résultats obtenus pour l'effet de l'inuline sur cette flore fécale. L'utilisation d'échantillons provenant de personnes indépendantes les unes des autres ne nous permettent pas de conclure sur cette expérience car nous venons de voir que chaque personne a un profil bactérien différent et nous ne pouvons affirmer que les variations observées entre les 3 échantillons sont dus à l'effet de l'inuline seule. Cependant en comparaison avec la littérature et à la tendance des résultats, nous avançons le fait que l'inuline pourrait avoir un effet délétère sur le genre *Clostridium spp.* mais pour confirmer cette orientation et constater d'autres effets, il faut par la suite réaliser une expérience utilisant comme témoin négatif la même personne qui consomme les prébiotique par la suite et réaliser différents points de prélèvements à des temps constants. Il serait même intéressant de réaliser cette expérience sur différents groupes de personnes (nourrissons, enfants, adultes, personnes âgées).

C. Etude in vitro

L'expérience du Vitrosim nous a apporté des informations complémentaires par rapport à l'expérience *in vivo* sur l'effet de l'inuline. Nous avons étudié l'impact d'une dose journalière de 10 grammes d'inuline sur la microflore intestinale des 4 derniers fermenteurs mimant en majorité les régions du côlon.

Nous avons effectué une analyse de l'évolution de l'ensemble des bactéries aérobies totales et des bactéries anaérobies facultatives totales. Nous avons observé une diminution significative de la flore totale aérobie dans le côlon descendant (F6). Cette baisse est corrélée à la diminution des genres bactériens type *Streptococcus spp./Enterococcus spp.*, *Enterobacteriaceae* et en général des



bactéries dites potentiellement pathogènes qui sont en majorité aéro-anaérobie facultatives. En effet il a été montré qu'une augmentation de certains genres bactériens pouvait induire des problèmes et des maladies au niveau de l'intestin quand ces dernières ne sont plus en symbiose avec leur hôte et sont qualifiées de potentiellement pathogènes.

En parallèle, nous avons constaté une augmentation de la flore lactique en générale (*Lactobacillus spp./Bifidobacterium spp.*) qui est qualifiée de potentiellement bénéfique car elle est associée à un nombre important de mécanismes de défense et de stimulation du système immunitaire. Leur augmentation est constante tout le long du traitement .

Enfin l'analyse de la courbe d'évolution du pH dans les 3 derniers fermenteurs montre que le pH a connu une instabilité durant les 15 premiers jours lors de la phase de stabilisation pour permettre ainsi d'implanter la microflore dans leur nouveau environnement et démarrer par la suite l'expérience du prébiotique. Le contrôle journalier du pH a permis de conserver une valeur plus ou moins stable du pH mais malgré cela une diminution a été constatée dans les 15 premiers jours de traitement créant ainsi un environnement acide dans les régions du côlon, cet environnement restant stable les 10 derniers jours du traitement. Notons également que des perturbations sont survenues à certains jours d'analyses (21^{ème} jour ou 27^{ème} jour) avec une hausse ou baisse brutale du pH dus à des dérèglements des niveaux des volumes des fermenteurs.

Il est intéressant de croiser cette baisse de pH avec l'effet direct du prébiotique. Le prébiotique étant une fibre alimentaire n'est pas digérée dans l'estomac et va se retrouver dans le côlon pour être utilisée comme substrat par certains micro-organismes et notamment la flore lactique. L'effet direct est donc une augmentation de la flore lactique induisant une hausse de la production d'acide lactique par la flore et donc d'une acidification du milieu (baisse du pH). Ce milieu acide est mal toléré par la flore dite potentiellement pathogène qui n'est pas acidophile entraînant ainsi une régression du nombre de cette flore.

L'analyse des résultats nous permet d'avancer la conclusion que l'inuline a une double action, un effet activateur sur la flore lactique bénéfique et un effet inhibiteur sur la flore potentiellement pathogène. En croisant ces résultats avec ceux de l'étude *in vivo*, nous avons en commun l'effet délétère du prébiotique sur les *Clostridium spp.* qui sont qualifiés de potentiellement pathogènes.

Par la suite une analyse plus complète peut-être effectuée en améliorant certains paramètres physicochimiques de l'expérience. Dans un premier temps vérifier constamment le maintien des conditions anaérobies dans les fermenteurs via une mesure de potentiel redox afin de préserver au maximum la flore anaérobie. Par la suite des améliorations seront apportées pour les conditions anaérobies afin de limiter les pertes des flores anaérobies strictes qui composent en majorité la flore intestinale. Enfin pour compléter les analyses, une mesure des AGCC serait intéressante car l'augmentation de la flore lactique induit également une augmentation de la production de ces AGCC ayant un effet bénéfique sur l'organisme. Enfin, l'analyse qPCR est à réaliser en complément afin de confirmer les résultats. Ces derniers sont en cours de réalisation.

L'analyse de la flore fécale nous donne qu'un aspect global des bactéries pouvant être présentes au niveau de l'intestin, pour analyser l'effet du prébiotique sur la flore intestinale en elle-même, il est préférable d'étudier son action sur un organisme vivant. Justement au sein du laboratoire Peritox, en complément de l'étude *in vitro*, il m'a été donné l'opportunité de travailler



partiellement sur l'étude de l'effet du prébiotique et son action sur le pesticide par un travail effectué sur différents groupes de rats via des prélèvements sur les différents organes cibles. Ainsi les effets constatés du prébiotique restent à être confirmés ou non par les résultats obtenus par exposition *in utero* et post-natale sur le rat qui met en synergie l'environnement complexe d'un organisme humain avec le prébiotique permettant de définir plus largement l'effet du prébiotique.

V. Conclusion

La première partie de ce travail fut la mise au point de méthodes d'analyses de la flore fécale qui est une flore complexe et riche en micro-organisme dont une grande partie est encore inconnue. L'analyse en reste d'autant plus difficile et nécessite donc des méthodes précises. Nous avons pu voir que les études réalisées en microbiologie classique avec des conditions d'anaérobiose strictes (chambre anaérobie) nous permettent d'obtenir des résultats cohérents et proches de ceux observés par d'autres auteurs. Mais malgré des milieux bactériologiques précis et de bonnes conditions expérimentales, la flore bactérienne fécale reste pour la plupart non cultivable, il faut donc se tourner vers d'autres méthodes d'analyses de biologie moléculaire. C'est pour ces raisons, que des expériences en qPCR et cytométrie ont été réalisées.

La méthode qPCR nous donne le taux d'ADN présent dans les échantillons en fonction des différents amorces utilisées, bien que cette méthode soit fiable elle reste cependant difficile à mettre au point du fait du choix de bon témoin de gamme qui peut conduire à des erreurs d'analyses. Enfin la cytométrie est une bonne technique rapide et multiparamétrique mais elle reste sensible et sa mise au point est nécessaire car notre cytomètre n'est pas adéquat pour les organismes procaryotes. Il faut donc dans ces démarches expérimentales, mettre en comparaison les 3 méthodes d'analyses afin de détecter les erreurs ou biais possibles.

Ce travail étant un préambule à de futures analyses, il nous a permis de valider la méthode d'analyse microbiologique et d'optimiser les 2 autres méthodes de biologie moléculaire. Les expériences à venir pourront nous confirmer les tendances trouvées dans les analyses qui montrent une diversité de cette flore intestinale entre individus et en fonction de l'âge, l'effet inhibiteur de la congélation sur la plupart des espèces bactériennes pouvant conduire par la suite à une sous-évaluation des micro-organismes recherchés et enfin l'effet de l'inuline sur le microbiote intestinal.

L'étude *in vivo* complétée avec l'étude *in vitro* nous permet de démontrer que le prébiotique a bien un effet délétère sur certaines flores potentiellement pathogènes et un effet activateur sur les flores lactiques, ce qui est cohérent avec les résultats trouvés dans la littérature. C'est pour ces raisons que les prébiotiques connaissent un effet de mode auprès des nourritures infantiles dans le but d'augmenter les flores lactiques chez les nourrissons afin d'apporter un bénéfice sur la santé. Ces derniers s'utilisent également en compléments alimentaires afin de rééquilibrer la flore intestinale après consommation d'antibiotiques par exemple ou pour d'autres troubles intestinaux. L'utilisation des prébiotiques se trouve être sur une pente ascendante et son champ d'action complet reste encore à définir.



Pour conclure, notre microflore intestinale est le reflet de notre mode de vie, il est propre à chacun de nous et peut se substituer à nos empreintes digitales. Il est même plus que considéré aujourd'hui comme un organe à part. Son dérèglement peut conduire à des troubles intestinaux mais certains compléments alimentaires comme les prébiotique peuvent maintenir cet équilibre et améliorer notre santé.

Nos bactéries intestinales sont donc nos alliées à condition d'y prendre soin...



VI. Références bibliographiques

- 1 **Alavanja, Michael C. R, et Matthew R. Bonner.** 2012. Occupational pesticide exposures and cancer risk. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews* 15 (4): 238-263.
- 2 **Aube, Catherine .A, Cherbut. C, et Galmiche. J.** 1995. Acides gras à chaîne courte : rôle en pathogénie intestinale et potentiel thérapeutique en gastroentérologie . *Hépatogastro* 2 (5) (juin 8): 447-55.
- 3 **Baysson .H, et M. Tirmarche.** 2008. Risque de cancer du poumon après exposition au radon : état des connaissances épidémiologiques. *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement* 69(1)
- 4 **Bernalier-Donadille, A.** 2010. Activités métaboliques du microbiote intestinal humain .*Gastroentérologie Clinique et Biologique* 34 (4, Supplement 1): 17-23.
- 5 **Bourgault, A M, J E Rosenblatt, et R H Fitzgerald.** 1980. *Peptococcus Magnus*: a Significant Human Pathogen . *Annals of Internal Medicine* 93 (2) (août): 244-248.
- 6 **Boutron-Ruault ,Marie-Christine.** 2007. Probiotiques et cancer colorectal . *Nutrition Clinique et Métabolisme* 21 (2) (juin): 85-88.
- 7 **Buchbinder,L, Y. Baris, et L. Goldstein.** 1953. Further studies on new milk free media for the standard plate count of dairy products . *Public Health* 43: 869 - 872.
- 8 **Butault J.P, N. Delame, F. Jacquet, G. Zardet .** 2011. L'utilisation des pesticides en France état des lieux et perspectives de réduction. *NESE* (35):7-26
- 9 **Campeotto .F , A.J Waligora-Dupriet, F. Doucet-Populaire, N. Kalach, C. Dupont, et M.J Butel.** 2007. Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 31 (5)(mai): 533-542.
- 10 **Chapman, George H.** 1945. The Significance of Sodium Chloride in Studies of *Staphylococcus*1 . *Journal of Bacteriology* 50 (2): 201-203.
- 11 **Cherbut Christine .**2003. Prébiotiques et fonctions gastro-intestinales :revue des effets et des perspectives. *Cah. Nutr. Diét* (38) : 6
- 12 **Corthier,G.** Septembre 2008. Microbiote intestinal et obésité . *Objectif nutrition* (89)
- 13 **Corthier, G.** 2013. Probiotiques : Adaptation à l'environnement digestif . *Cahiers de nutrition et de diététique* 38 (6): 355-362.
- 14 **Corthier, G, et J. Doré.** 2010. Une ère nouvelle dans le domaine des interactions entre le microbiote et la santé humaine . *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 34 (4, Supplement 1): 1-6.
- 15 **Corthier, G.** 2007. Flore intestinale et santé : quels enjeux ? . *Nutrition Clinique et Métabolisme* 21 (2) (juin): 76-80.
- 16 **De Boever, P, R. Wouters, V. Vermeirssen, N. Boon, et W. Verstraete.** 2001. Development of a Six Stage Culture System for Simulating the Gastrointestinal Microbiota of Weaned Infants . *Microbial Ecology in Health and Disease* 13 (2).
- 17 **De Man ,J.C, M Rogosa, Sharpe, M., et M.E Sharpe.** 1960. A medium for the cultivation of lactobacille . *J. App. Bacteriol* 23: 130-135
- 18 **De Wiele. T, Van, N. Boon, S. Possemiers, H. Jacobs, et W. Verstraete.** 2004. Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem . *FEMS Microbiology Ecology* 51 (1): 143-153.
- 19 **Delanaye. P, M. Souvignat, L. Dubourg, L. Thibaudin, N. Maillard, J.M Krzesinski, E. Cavalier, et C. Mariat.** 2011. Le dosage de l'inuline : mise au point . *Annales de Biologie Clinique* 69 (3) : 273-284.
- 20 **Downes. J, M. A Manson , D.A Sparrt, E, Kononen , E. Tarkka, H. Jousimies-Somer and W. G Wade.** 2001 . Characterisation of *Eubacterium*-like strains isolated from oral infections . *J. Med Microbiol* (50): 947-951



- 21 **Duncan, S. H., G. E. Lobley, G. Holtrop, J. Ince, A. M. Johnstone, P. Louis, et H. J. Flint.** 2008. Human Colonic Microbiota Associated with Diet, Obesity and Weight Loss . *International Journal of Obesity* 32 (11): 1720-1724.
- 22 **Duncan, Sylvia H. et Harry J. Flint.** 2013. Probiotics and prebiotics and health in ageing populations . *Maturitas* 75 (1): 44-50.
- 23 **Dupont, C.** 2001. Probiotiques et prébiotiques . *Journal de Pédiatrie et de Puériculture* 14 (2): 77-81.
- 24 **Dutheil, F, P. Beaune, C. Tzourio, M.A Lorient, et A. Elbaz.** 2010. Interaction between ABCB1 and professional exposure to organochlorine insecticides in Parkinson disease . *Archives of neurology* 67(6): 739-745.
- 25 **Eckburg, Paul B., Elisabeth M. Bik, Charles N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M.Sargent, S.R. Gill, Karen E. Nelson, et David A. Relman.** 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora .*Science (New York, N.Y.)* 308 (5728): 1635-1638.
- 26 **Ettreiki, Chourouk, Pascale Gadonna-Widehem, Irene Mangin, Moise Coeffier, Carine Delayre-Orthez, et Pauline M Anton.** 2012. Juvenile ferric iron prevents microbiota dysbiosis and colitis in adult rodents . *World Journal of Gastroenterology : WJG* 18 (21) (juin 7): 2619-2629.
- 27 **Evans, D F, G. Pye, R. Bramley, A.G Clark, T.J Dyson, et J.D Hardcastle.** 1988. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut* 29 (8): 1035-1041.
- 28 **Firmesse, Olivier, Elise Alvaro, Agnès Mogenet, Jean-Louis Bresson, Riwanon Lemée, Pascale Le Ruyet, Cécile Bonhomme, et al.** 2008. Fate and effects of Camembert cheese micro-organisms in the human colonic microbiota of healthy volunteers after regular Camembert consumption . *International Journal of Food Microbiology* 125 (2) (juillet 15): 176-181.
- 29 **Fisher, Katie, et C. Phillips.** 2009. The Ecology, Epidemiology and Virulence of *Enterococcus* .*Microbiology* 155 (6): 1749-1757.
- 30 **Freire, Carmen, et Koifman.** 2013. Pesticides, depression and suicide: A systematic review of the epidemiological evidence . *International journal of hygiene and environmental health* (février 16).
- 31 **Furet, Jean-Pierre, Olivier Firmesse, Michèle Gourmelon, Chantal Bridonneau, Julien Tap, Stanislas Mondot, Joël Doré, et Gérard Corthier.** 2009. Comparative Assessment of Human and Farm Animal Faecal Microbiota Using Real-time Quantitative PCR . *FEMS Microbiology Ecology* 68 (3): 351-362.
- 32 **Germond, J.E, O. Mamin, et B. Mollet.** 2002. Species Specific Identification of Nine Human *Bifidobacterium* spp. in Feces . *Systematic and Applied Microbiology* 25 (4): 536-543.
- 33 **Gibson, G R, et M.B Roberfroid.** 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics . *The Journal of Nutrition* 125 (6): 1401-1412.
- 34 **Gilden, Robyn C., K.Huffling, et B. Sattler.** 2010. Pesticides and Health Risks . *Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing* 39 (1): 103-110.
- 35 **Giraffa, Giorgio.** 2003. Functionality of enterococci in dairy products . *International Journal of Food Microbiology* 88 (2-3): 215-222.
- 36 **Goulet, O.** 2009. La flore intestinale : un monde vivant à préserver . *Journal de Pédiatrie et de Puériculture* 22 (3): 102-106.
- 37 **Hallouët, Pascal.** 2010. 11 - Le système digestif . In *Mémo-guide infirmier* (2^e édition), 80-89.
- 38 **Inuline. Wikipédia** [en ligne] (page consultée le 29 août 2013) <http://fr.wikipedia.org/wiki/Inuline>
- 39 **Isenberg, H.D, Goldberg, D., et Ampson, J.** 1970. Laboratory Studies with a Selective *Enterococcus* Medium. *Applied Microbiology* 20 (3): 433-436



- 40 **Joly, C, J. Gay-Quéheillard, A. Léké, K. Chardon, S. Delanaud, V. Bach, et H. Khorsi Cauet.** 2012. Impact of chronic exposure to low doses of chlorpyrifos on the intestinal microbiota in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®) and in the rat . *Environmental science and pollution research international* (novembre 8).
- 41 **Kee, Vicki R.** 2012. Clostridium Difficile Infection in Older Adults: A Review and Update on Its Management . *The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy* 10 (1) (février): 14-24.
- 42 **Kleerebezem, Michiel, et Elaine E Vaughan.** 2009. Probiotic and Gut Lactobacilli and Bifidobacteria: Molecular Approaches to Study Diversity and Activity . *Annual Review of Microbiology* 63: 269-290.
- 43 **Kurakawa, Takashi, Hiroyuki Kubota, Hirokazu Tsuji, Kazunori Matsuda, Takuya Takahashi, Thandavarayan Ramamurthy, G. Balakrish Nair, Yoshifumi Takeda, et Koji Nomoto.** 2013. Intestinal Enterobacteriaceae and Escherichia coli populations in Japanese adults demonstrated by the reverse transcription-quantitative PCR and the clone library analyses . *Journal of Microbiological Methods* 92 (2) (février 15): 213-219.
- 44 **Lamassiaude-Peyramaure, Sandra.** 2008. La constipation . *Actualités Pharmaceutiques* 47 (477) (septembre): 34-35.
- 45 **Langhendries, J.-P.** 2008. Microflore de la mère et du nouveau-né : quelques aspects périnataux . *Journal de Pédiatrie et de Puériculture* 21 (8) (décembre): 339-343
- 46 **Ley, Ruth E, Peter J Turnbaugh, Samuel Klein, et Jeffrey I Gordon.** 2006. Microbial Ecology: Human Gut Microbes Associated with Obesity . *Nature* 444 (7122) (décembre 21): 1022-1023.
- 47 **Liu, Chengxu, Yuli Song, Maureen McTeague, Ann W. Vu, Hannah Wexler, et Sydney M. Finegold.** 2003. Rapid Identification of the Species of the Bacteroides Fragilis Group by Multiplex PCR Assays Using Group- and Species-specific Primers . *FEMS Microbiology Letters* 222 (1): 9-16
- 48 **Liu, C., S. M. Finegold, Y. Song, et P. A. Lawson.** 2008. Reclassification of Clostridium coccoides, Ruminococcus hansenii, Ruminococcus hydrogenotrophicus, Ruminococcus luti, Ruminococcus productus and Ruminococcus schinkii as Blautia coccoides gen. nov., comb. nov., Blautia hansenii comb. nov., Blautia hydrogenotrophica comb. nov., Blautia luti comb. nov., Blautia producta comb. nov., Blautia schinkii comb. nov. and description of Blautia wexlerae sp. nov., isolated from human faeces . *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 58 (8) (août 1): 1896-1902.
- 49 **Madsen JL, Graff J.** 2004. Effects of ageing on gastrointestinal motor function. *Age Ageing* (33):154-159.
- 50 **Manus, Jean-Marie.** 2011. Avant sa naissance, un bébé déjà immunocompétent . *Revue Francophone des Laboratoires* (431) (avril): 24.
- 51 **Mariat, D., O. Firmesse, F. Levenez, V. D. Guimarães, H. Sokol, J. Doré, G. Corthier, et J.-P. Furet.** 2009. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio of the Human Microbiota Changes with Age . *BMC Microbiology* 9 (1) (juin 9): 123.
- 52 **Mata L.J, Carrillo C, et Villatoro E.** 1969. *Appl. Microbiol* 17: 596-599.
- 53 **Matamoros, S., C. Gras-Leguen, F. Le Vacon, G. Potel, et M-F de La Cochetiere.** 2013. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health . *Trends in Microbiology* 21 (4) (avril): 167-173.
- 54 **Molly, K., M. Vande Woestyne, et W. Verstraete.** 1993. Development of a 5-step Multi-chamber Reactor as a Simulation of the Human Intestinal Microbial Ecosystem . *Applied Microbiology and Biotechnology* 39 (2) (mai): 254-258.
- 55 **Moore, W E, et L V Holdeman.** 1974. Human Fecal Flora: The Normal Flora of 20 Japanese-Hawaiians . *Applied Microbiology* 27 (5) (mai): 961-979.



- 56 **Moreau, M-C., M. Thomasson, R. Ducluzeau, P. Raibaud, et M-C. Muller.** 1986. Cinétique d'établissement de la microflore digestive chez le nouveau-né humain en fonction de la nature du lait . *Reproduction Nutrition Développement* 26 (2B): 745-753.
- 57 **Mossel D.A.A, Mengerink W.H.J., et cholts H.H.A.** 1962. Use of a modified MacConkey agar medium for the selective growth and enumeration of all Enterobacteriaceae . *J. Bacteriol* 84: 381.
- 58 **Mostafalou, Sara, et Mohammad Abdollahi.** 2013. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives . *Toxicology and Applied Pharmacology*.
- 59 **Pouillart, Philippe R., Flore Dépeint, Afif Abdelnour, Laetitia Deremaux, Odile Vincent, Jean-Claude Mazière, Jean-Yves Madec, et al.** 2010. Nutriose, a Prebiotic Low-digestible Carbohydrate, Stimulates Gut Mucosal Immunity and Prevents TNBS-induced Colitis in Piglets . *Inflammatory Bowel Diseases* 16 (5): 783-794.
- 60 **Ott, Stephan J., M. Musfeldt, Kenneth N. Timmis, J. Hampe, Dirk F. Wenderoth, et S. Schreiber.** 2004. In vitro alterations of intestinal bacterial microbiota in fecal samples during storage . *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 50 (4) (décembre): 237-245.
- 61 **Palmer, C., Elisabeth M Bik, Daniel B DiGiulio, David A Relman, et Patrick O Brown.** 2007. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota . *PLoS Biol* 5 (7) (juin26)
- 62 **Pd, Ellner, Stoessel , Drakeford E, et Vasi F.** 1966. A New Culture Medium for Medical Bacteriology. *American Journal of Clinical Pathology* 45 (4) (avril): 502-504.
- 63 **Petit, Michel.** 2001. L'humanité face à l'effet de serre additionnel qu'elle crée .*Comptes Rendus del'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science* 333 (12) (décembre 31): 775-786.
- 64 **Poitras Elyse, et Houde Alain.** 2002. La PCR en temps réel: principes et applications . *Reviews in Biology and Biotechnology* 2 (2) (décembre): 2-11.
- 65 **Putet, G.** 2007. Bénéfices cliniques des prébiotiques sur l'infection et l'allergie . *Archives de Pédiatrie* 14, Supplement 5 (novembre): 8-10.
- 66 **Rada, V, et J Petr.** 2000. A New Selective Medium for the Isolation of Glucose Non-fermenting Bifidobacteria from Hen Caeca . *Journal of Microbiological Methods* 43 (2): 127-132.
- 67 **Raju, D., M.Waters, P. Setlow, et Mahfuzur R Sarker.** 2006. Investigating the Role of Small, Acid soluble Spore Proteins (SASPs) in the Resistance of Clostridium Perfringens Spores to Heat . *BMC Microbiology* 6: 50.
- 68 **Rambaud J.C, J.P Buts, G. Corthier, et B. Flourié.** 2004. Flore microbienne intestinale: physiologie et pathologie digestives. John Libbey Eurotext.
- 69 **Ramirez-Farias, Carlett, Kathleen Slezak, Zoë Fuller, Alan Duncan, Grietje Holtrop, et Petra Louis.** 2009. Effect of Inulin on the Human Gut Microbiota: Stimulation of Bifidobacterium Adolescentis and Faecalibacterium Prausnitzii . *The British Journal of Nutrition* 101 (4) (février): 541-550.
- 70 **Rao, Venketeshwer A.** 2001. The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels . *Nutrition* 21 (6) (juin): 843-848.
- 71 **Redondo, L.M., M. Farber, A. Venzano, B.H. Jost, Y.R. Parma, et M.E. Fernandez- Miyakawa.** 2013. Sudden death syndrome in adult cows associated with Clostridium perfringens type E . *Anaerobe* 20 (avril): 1-4.
- 72 **Reinert P., Leroux M., N'Guyen G., et Gaudichon C.** 1997. Influence de la consommation de laits fermentés au Lactobacillus casei (Danone strain 001) sur les diarrhées de l'enfant sain en crèche .*Archives de Pédiatrie* 3 (12): 1291-1291.
- 73 **Roberfroid, Marcel B.** 2000. Chicory fructooligosaccharides and the gastrointestinal tract . *Nutrition* 16 (7-8)(juillet): 677-679.
- 74 **Rodier, J.** 1984. Analyse de l'eau. Identification des coliformes et en particulier d' Escherichia coli. Dunod 7ème Ed. 809
- 75 **Rousseau N.** 2005. Prébiotiques et minéraux : des espoirs et des inconnues . *Health and food* (73) (novembre): 10-11.



- 76 **Schaedler, Russell W., Rene Dubos, et Richard Costello.** 1965. The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice . *The Journal of Experimental Medicine* 122 (1) (juillet 1): 59-66.
- 77 **Seksik, P.** 2010. Microbiote intestinal et MICI . *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 34 (4, Supplement1) (septembre): 48-55.
- 78 **Seksik, P.** 2011. Microbiote et maladies inflammatoires chroniques intestinales . *Revue du Rhumatisme* 78, Supplement 5 (novembre): A31-A32.
- 79 **Setlow .**2007. I will survive: DNA protection in bacterial spores . *TRENDS in Microbiology* 15 (4)
- 80 **Shahidi, Syed A., et Alphonza R. Ferguson.** 1971. New Quantitative, Qualitative, and Confirmatory Media for Rapid Analysis of Food for *Clostridium perfringens*1 . *Applied Microbiology* 21 (3): 500-506.
- 81 **Slanetz, L. W., et Clara H. Bartley.** 1957. Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium1 . *Journal of Bacteriology* 74 (5) (novembre): 591-595.
- 82 **Stappenbeck, Thaddeus S, Lora V Hooper, et Jeffrey I Gordon.** 2002. Developmental Regulation of Intestinal Angiogenesis by Indigenous Microbes via Paneth Cells .*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24) (novembre 26): 15451-15455.
- 83 **Stark, P L, et A Lee.** 1982. The Microbial Ecology of the Large Bowel of Breast-fed and Formula-fed Infants During the First Year of Life . *Journal of Medical Microbiology* 15 (2) (mai): 189-203.
- 84 **Tubiana, Maurice.** 2000. Santé et environnement . *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences – Serie III Sciences de la Vie* 323 (7) (juillet): 651-664.
- 85 **Tomas, Julie, Philippe Langella, et Claire Cherbuy.** 2012. The intestinal microbiota in the rat model: major breakthroughs from new technologies . *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 13 (1) (juin): 54-63.
- 86 **UIPP** Consommation de pesticides phytosanitaires, consommation des pesticides en France en 2011 [en ligne] (page consultée le 14 aout 2013)
<http://www.planetoscope.com/sols/47-consommation-de-pesticides-phytosanitaires-en-france.html>
- 87 **Van den Abbeele, Pieter, C. Grootaert, M. Marzorati, S. Possemiers, W. Verstraete, P. Gerard, S.Rabot, et al.** 2010. Microbial Community Development in a Dynamic Gut Model Is Reproducible, Colon Region Specific, and Selective for Bacteroidetes and Clostridium Cluster IX . *Applied and Environmental Microbiology* 76 (15) (août): 5237-5246.
- 88 **Van den Ende, Wim, Joke De Roover, et André Van Laere.** 1996. In Vitro Synthesis of Fractofuranosyl-only Oligosaccharides from Inulin and Fructose by Purified Chicory Root Fructan:fructan Fructosyl Transferase . *Physiologia Plantarum* 97 (2): 346-352.
- 89 **Van Zanten, Gabriella C, Knudsen, Henna Röytiö, Sofia Forssten, Mark Lawther, Andreas Blennow, Sampo J Lahtinen, Mogens Jakobsen, Birte Svensson, et Lene Jespersen.** 2012. The Effect of Selected Synbiotics on Microbial Composition and Short-chain Fatty Acid Production in a Model System of the Human Colon . *PloS One* 7 (10): e47212.
- 90 **Wang, Shumei, Zhilun Wang, Yibei Zhang, Jiang Wang, et Rong Guo.** 2013. Pesticide residues in market foods in Shaanxi Province of China in 2010 . *Food chemistry* 138 (2-3) (juin 1): 2016-2025.
- 91 **Weselak, Mandy, Tye E Arbuckle, Donald T Wigle, et Daniel Krewski.** 2007. In utero Pesticide exposure And childhood morbidity . *Environmental research* 103 (1) (janvier): 79-86.
- 92 **Wilson, Michael.** 2004. The gastrointestinal tract and its indigenous microbiota . *In Microbial Inhabitants of Humans.* Cambridge University Press.



vii. Annexes



Annexe 1 : Solution d'alimentation primaire du Vitrosim

Alimentation primaire Vitrosim 5 litres	
Produits	Quantité en grammes
Glucose	2
Levure	15
Protéose Peptone	5
Mucine	20
Hémine	0.025
Cystéine	2.5
Arabinogalactan	5
Pectine	10
Xylan	5
Amidon	15
NaHCO ₃	2
NaCl	0.4
K ₂ HPO ₄	0.2
KH ₂ PO ₄	0.2
CaCl ₂	0.04
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.04
Tween 80	5 ml
H ₂ O distillée	5L
Ajuster le PH à 2 puis autoclave 20 min à 120°C	

Annexe 2 : Jus pancréatique du SHIME

Jus pancréatique	
Pancréatine	0.9 g
NaHCO ₃	12 g
Bile bovine	6 g
H ₂ O distillée stérile	1 L

Annexe 3 : Sérum physiologique pour Vitrosim

Sérum physiologique	
NaCl	8.5 grammes
H ₂ O distillée	1 litre
Ajuster le PH à 7 puis autoclave 20min à 120°C	



Annexe 4 : Méthode d'ajustement du pH

Le but de la méthode est de déterminer le volume nécessaire de HCl ou de NaOH à rajouter dans les 3 derniers fermenteurs pour ajuster le pH.

Rappel de l'intervalle de pH :

F4 : 5.5-6

F5 : 6.0-6.4

F6 : 6.4-6.8

10 ml sont prélevés des 3 derniers fermenteurs. La mesure des 3 échantillons est effectuée à l'aide d'un pH mètre (25°C) et l'ajustement s'effectue avec des solutions de NaOH (0.1M) ou de HCl (0.1M) . L'ajout de HCl permet de faire baisser le pH (acidification) alors que le NaOH va faire augmenter le pH.

Exemple de calcul pour le fermenteur F5 :

pH mesuré = 5,1

Volume prélevé pour la mesure = 10 ml

Volume présent dans le fermenteur 5 = 1600 ml

A l'aide d'une pipette pasteur , on ajoute goutte à goutte du NaOH (0.1M) .

Ici ajout de 8 gouttes pour ajuster le pH à 6.04

Soit :

8gouttes → 10 ml

X → 1600 ml

$$X = (1600 \times 8) / 10 \\ = 1280 \text{ gouttes}$$

Or 18 gouttes à la pipette pasteur représente 1 ml donc : $1280 / 18 = 71.1 \text{ ml}$

Ainsi nous ajoutons 71.1 ml au fermenteur 5 à l'aide d'une pipette .



Annexe 5 : Protocole d'ensemencement pour l'étude *in vivo*

Travail en aérobie (0,5 ml ensemencé)				
Flores recherchées	Milieux de culture	Dilutions déposées	Méthode d'ensemencement	T° + Temps incubation (jarre anaérobie)
Flore totale aérobie	PCA	10^{-3} à 10^{-7}	Masse	37°C /48H
<i>Lactobacillus spp</i> / <i>Streptococcus spp</i>	Schaelder modifié	10^{-3} à 10^{-8}	Double couche	37°C/48H
<i>Lactobacillus spp</i>	MRS	10^{-4} à 10^{-8}	Double couche	37°C/48H
<i>Enterobacteriaceae</i>	VRBG	10^{-2} à 10^{-7}	Double couche	37°C/48H
<i>Clostridium spp</i>	SPS	10^{-1} à 10^{-3}	Double couche	44°C/48H
<i>Enterococcus spp</i>	Stanley et bartley	10^{-2} à 10^{-7}	Masse	37°C/48H
Travail en anaérobie (1ml ensemencé)				
Flores recherchées	Milieux de culture	Dilutions déposées	Méthode d'ensemencement	T°+temps incubation (enceinte anaérobie)
Flore totale anaérobie	M20	10^{-5} à 10^{-9}	Masse	37°C/72H
<i>Bifidobacterium spp</i>	Wilkins chalgren modifié	10^{-1} à 10^{-7}	Masse	37°C/72H



Annexe 6 : Protocole d'ensemencement pour l'étude *in vitro*

aérobie (100 µl ensemencé)				
Flores recherchées	Milieux de culture	Dilutions déposées	Méthode d'ensemencement	T° + Temps incubation
Flore totale aérobie	Columbia	10 ⁻⁴ à 10 ⁻⁶	En surface (billes de verres)	37°C /24-48H
<i>Staphylococcus spp</i>	MSA	10 ⁻⁴ à 10 ⁻⁶	En surface (billes de verres)	37°C/24-48H
<i>Lactobacillus spp</i>	MRS	10 ⁻⁴ à 10 ⁻⁶	En surface (billes de verres)	37°C/24-48H
<i>Enterobacteriaceae</i>	BCP	10 ⁻⁴ à 10 ⁻⁶	En surface (billes de verres)	37°C/24-48H
<i>Enterococcus spp</i> / <i>Streptococcus spp</i>	BEA	10 ⁻⁴ à 10 ⁻⁶	En surface (billes de verres)	37°C/24-48H
anaérobie (100 µl ensemencé)				
Flores recherchées	Milieux de culture	Dilutions déposées	Méthode d'ensemencement	T°+temps incubation (enceinte anaérobie)
Flore totale anaérobie	Gélose au sang	10 ⁻⁴ à 10 ⁻⁶	En surface (billes de verres)	37°C/72H
<i>Bifidobacterium spp</i>	MRS	10 ⁻⁴ à 10 ⁻⁶	En surface (billes de verres)	37°C/72H
Spores de <i>Clostridium</i>	Columbia	10 ⁻⁴ à 10 ⁻⁶	En surface (billes de verres)	37°C/72H
<i>Bacteroides fragilis</i>	BEA	10 ⁻⁴ à 10 ⁻⁶	En surface (billes de verres)	37°C/72H
<i>Clostridium spp</i>	SFP	10 ⁻⁴ à 10 ⁻⁶	En surface (billes de verres)	37°C/72H
<i>Bacteroides spp</i>	Schaelder agar	10 ⁻⁴ à 10 ⁻⁶	En surface (billes de verres)	37°C/72H



Annexe 7 : Caractéristiques des milieux de cultures bactériologiques

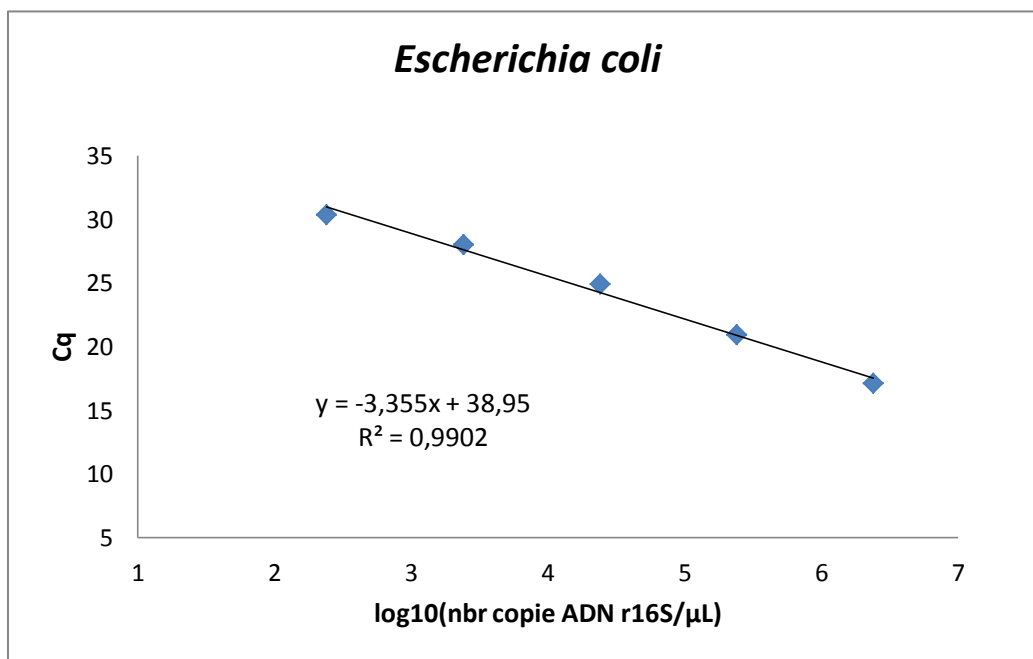
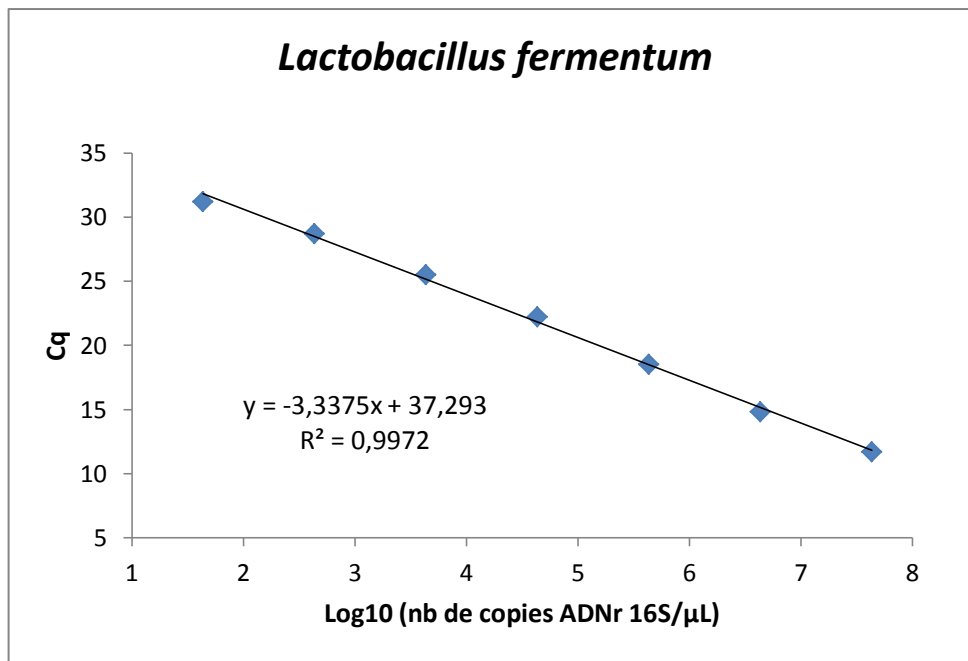
Milieux de culture	Flores recherchées	Caractéristiques des milieux
PCA (Plate Count Agar) (Buchbinder et al., 1953)	plupart des bactéries	Les substances nutritives apportées par la Tryptone, les facteurs vitaminiques de l'extrait de levure et le glucose sont utilisées comme source énergétique
Schaelder agar (Schaedler et al., 1965)	microflore anaérobie	Constitué de bouillon tryptone soja, peptone spéciale, extrait de levure, glucose chlorhydrate de cystéine, hémine et tampon Tris.
Schaelder modifié (Mata et al., 1969)	<i>Lactobacillus spp</i> et <i>Streptococcus spp</i>	Favorise la culture de certains micro-organismes dans le Schaelder par l'addition de produits sélectifs. Ici nous avons rajouté du chlorure de sodium (10g/l) et néomycine (2 mg/l).
MRS (Man, Rogosa et Sharpe) (De Man et al., 1960)	bactéries lactiques	agents inhibiteurs de croissances de contaminants bactériens (<i>Streptococcus</i> et moisissures) : citrate d'ammonium et acétate de sodium.
VRBG (Gélose au cristal violet, rouge neutre, bile et glucose) (Mossel D.A.A et al., 1962)	<i>Enterobacteriaceae</i>	Inhibiteur de bactérie à Gram positif et négatif : cristal violet et sels biliaires. La dégradation du glucose en acide effectuée par les entérobactéries est révélée par le virage au rouge de l'indicateur de pH (le rouge neutre).
SPS (Sulfite de Sodium – Polymixine - Sulfite de Cystéine)	<i>Clostridium spp.</i> sulfito-réducteur	Agent sélectif : Polymixine Et la différenciation vient du sulfite de sodium dont la réduction est révélée par le fer (colonies noires).
Stanley et Bartley (Stanley et Bartley, 1957)	<i>Enterococcus spp</i>	Inhibiteur : azide de sodium indicateur de la croissance bactérienne : TTC (chlorure de triphényltétrazolum). En effet il est réduit en formazan et cette réaction se manifeste par l'apparition de colonies de couleur rouge/marron
Wilkins Chalgren modifié (Rada et Petr, 2000)	<i>Bifidobacterium spp</i>	Agent sélectif : mupirocine (0,05mg/L), antibiotique auquel les bifidobactéries sont résistantes et de nombreux lactobacilles sensibles + acide acétique (1ml/L)

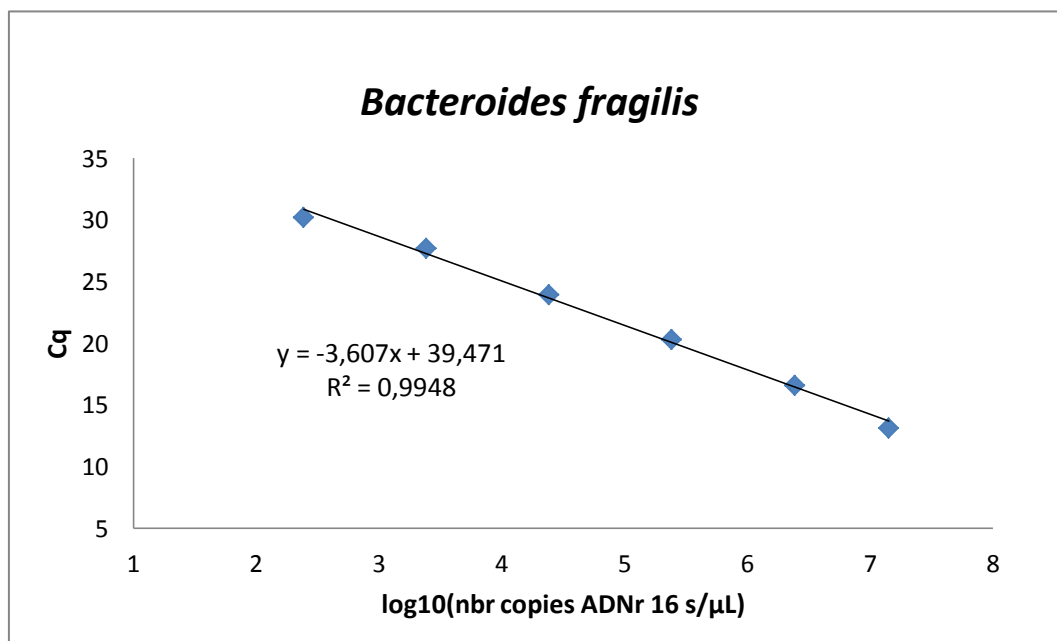
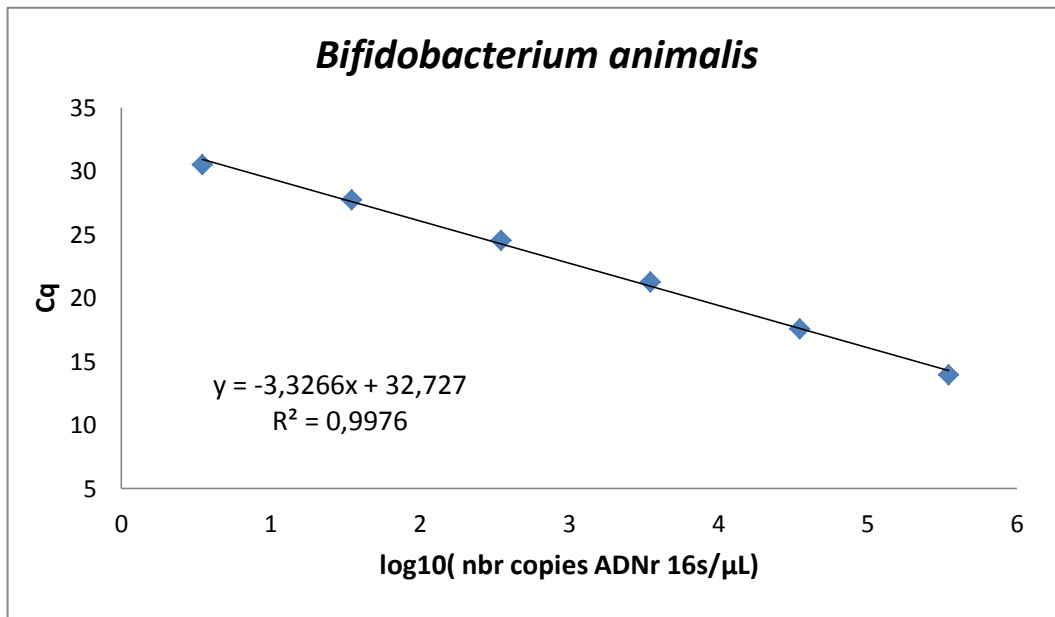


Columbia (Pd et al., 1966)	genres aérobies	milieu très nutritif (peptones, extrait de levure, amidon)
Gélose au sang	genres anaérobies	addition de 5 ou 10 % de sang de mouton stérile (Gélose au sang) dans le milieu Columbia
MSA (Mannitol Salt Agar) (Chapman, 1945)	<i>Staphylococcus spp</i>	Différencie les espèces fermentant le mannitol ou non. agent sélectif : chlorure de sodium
BCP (BromoCresol Purple) (Rodier, 1984)	<i>Enterobacteriaceae</i>	critère de différenciation= fermentation du lactose révélée par le virage en milieu acide de l'indicateur coloré de pH, le bromocrésol pourpre
BEA (gélose à la Bile, à l'Esculine et à l'Azide de sodium) (Isenberg, et al., 1970)	<i>Enterococcus spp</i>	agent sélectif: azide de sodium critère de différenciation : l'esculine qui est hydrolysées par les entérocoques et forme un complexe noir en présence des ions ferriques apportés par le citrate de fer.
SFP (Shahidi-Ferguson Perfringens) (Shahidi et Ferguson, 1971)	<i>Clostridium spp</i>	milieu nutritif sélectif auquel est ajouté de l'émulsion de jaunes d'œufs et le supplément antibiotique (Kanamycine (sulfate)) comme agent de sélection.
M20	genres anaérobies et notamment <i>Bifidobacterium spp</i>	Il est constitué de 30g/L de tryptone, de 20g/L d'extrait de levure, de 0,5g/L de L-cystéine chlorohydrate, de 5g/L de glucose et de 1g/L d'une solution d'hémine (4ml hémine chloride, 96 mL d'eau distillée et 0,1 g de Triéthanolamine)



Annexe 8 : Gammes étalon des souches témoins utilisées pour la qPCR





VIII. Figures

Figure 1 : Les organes de l'appareil digestif

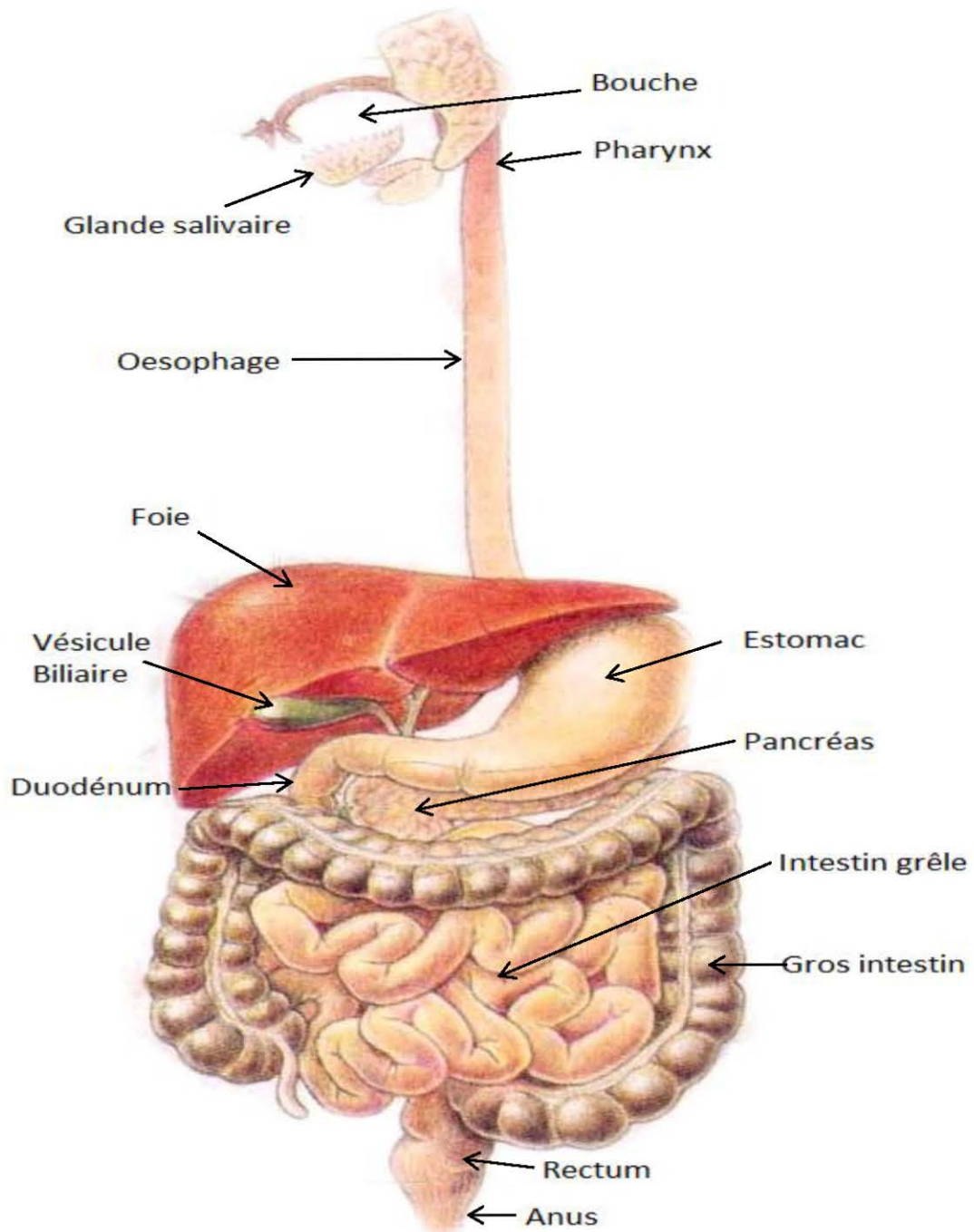
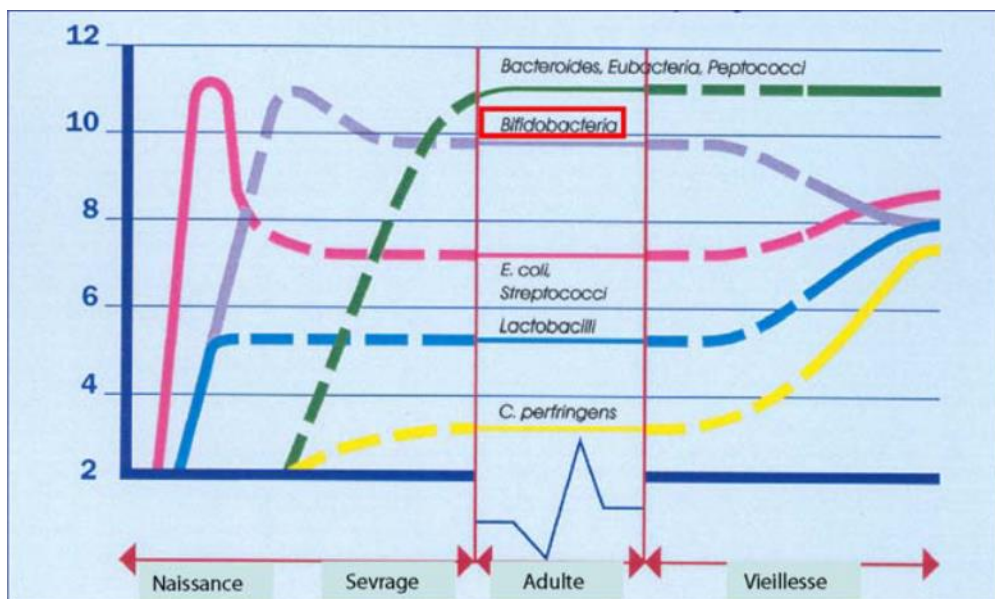
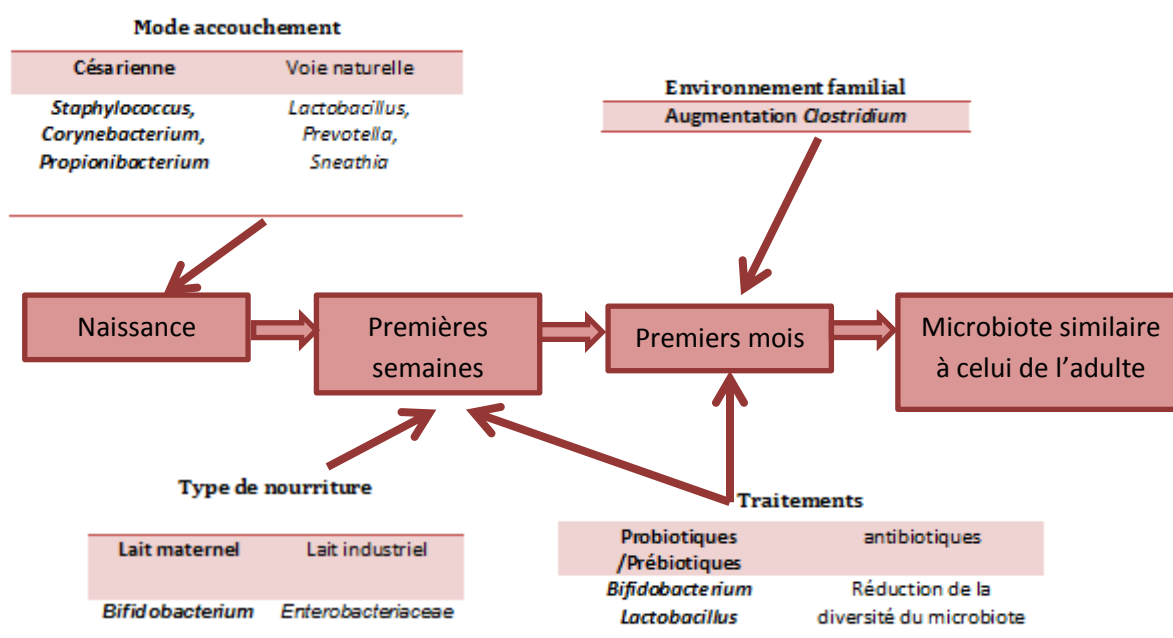


Figure 2 : Evolution de la flore fécale au cours de la vie humaine



O.Goulet , 2009

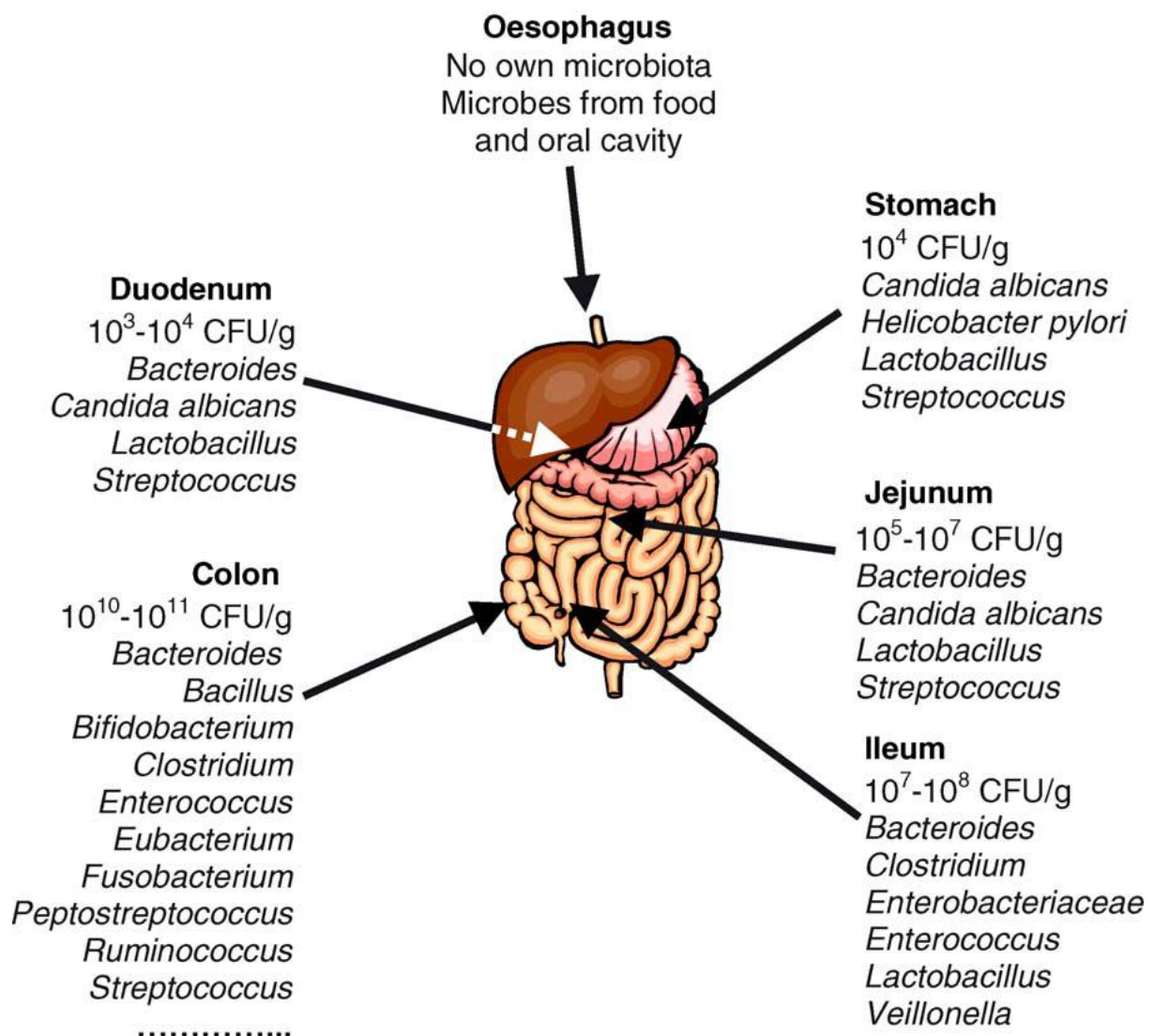
Figure 3 : Impact des facteurs externes sur le microbiote intestinal chez l'enfant



Matamoros et al., 2013



Figure 4 : Répartition des genres bactériens dominants dans le tractus gastro intestinal de l'Homme

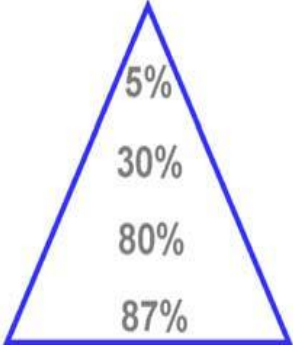


Isolauri et al., 2004



Figure 5 : Evolution de la flore fécale au cours de la vie

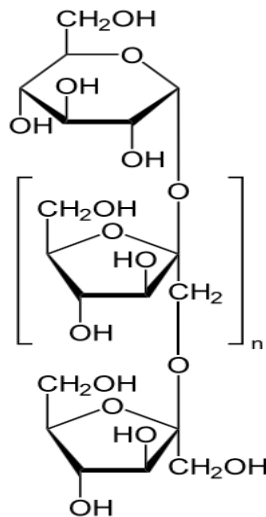
Individus	Nombre d'espèces	Espèces non cultivables
Prématurés	21	5%
Enfants	15	30%
Adultes	134	80%
Seniors	342	87%



O. Goulet , 2009

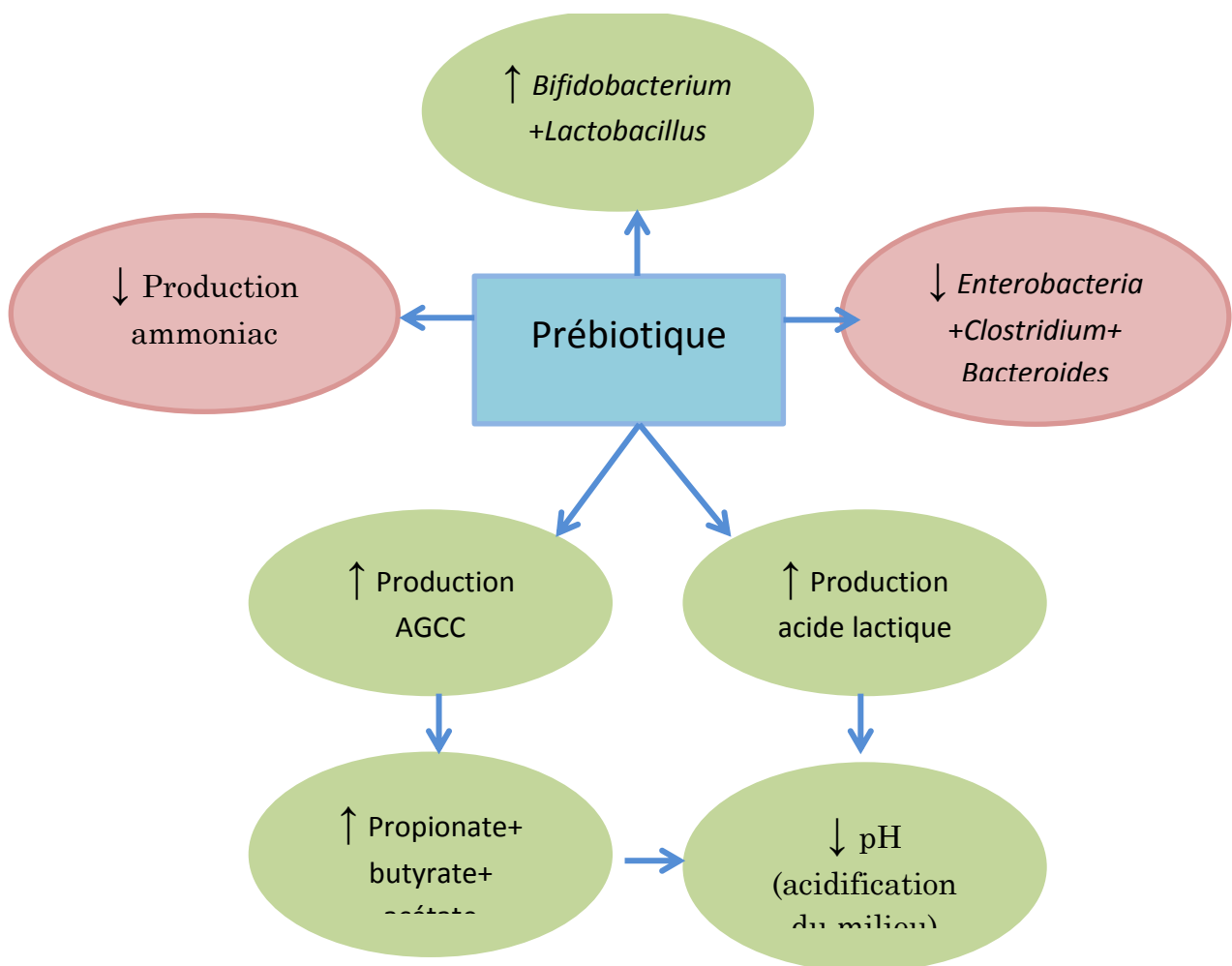


Figure 6 : Structure chimique de l'inuline



Inuline Wikipédia

Figure 7 : Principaux effets des prébiotiques au niveau du colon chez l'homme



Source personnelle



Tableau 1 : Propriétés des fermenteurs du Vitrosim

Fermenteurs	Volume utile (ml)	Temps de résidence (heures)	PH
F1 : estomac	200	3	2
F2 : duodénum/jéjunum	300	3	7
F3 : iléon/caecum	300	4	7
F4 : colon ascendant	1000	20	5,5-6
F5 : colon transversal	1600	32	6-6,4
F6 : colon descendant	1200	24	6,4-6,8

Figure 8 : Principe de Fonctionnement du Vitrosim

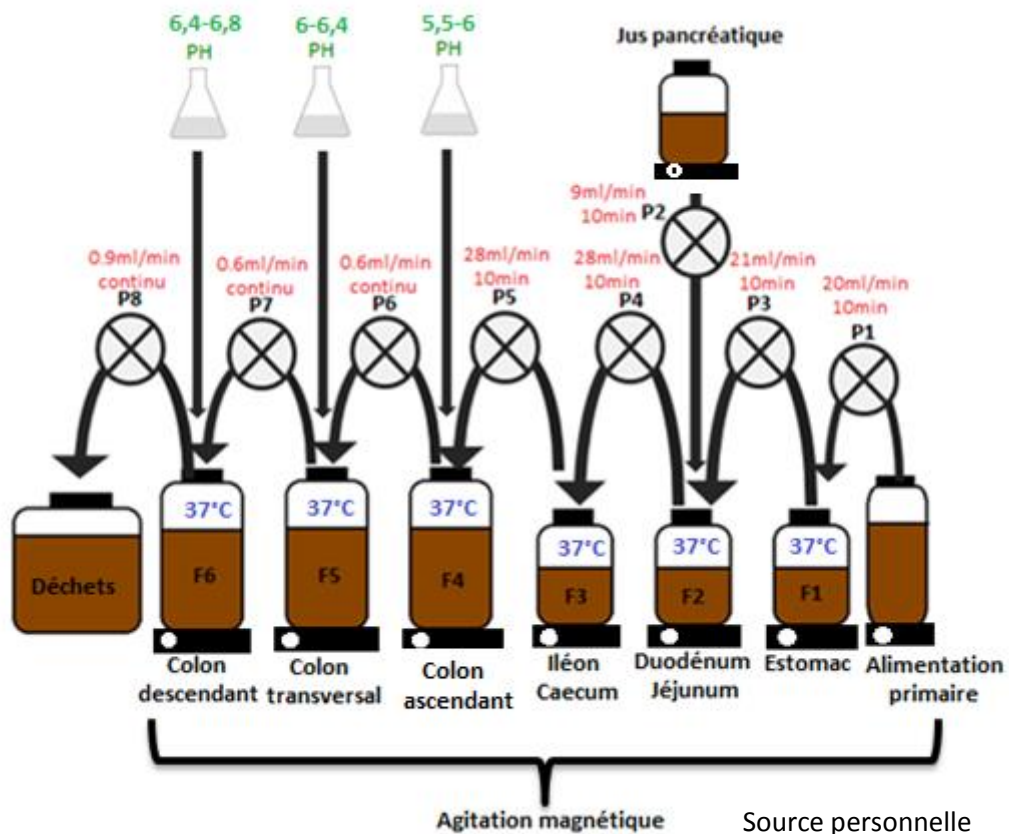




Tableau 2: Caractéristiques des pompes du Vitrosim

Pompes	Emplacement	Vitesse de rotation m^3/sec	Débit $\text{ml}/10\text{min}$
P1	Alimentation primaire vers F1	69	200
P2	Jus pancréatique vers F2	28	90
P3	F1 vers F2	67	210
P4	F2 vers F3	92	280
P5	F3 vers F4	91	280
P6	F4 vers F5	2	6
P7	F5 vers F6	2	6
P8	F6 vers bidon déchets	3	9



Tableau 3 : Caractéristiques des échantillons pour l'étude *in vivo*

Numéros	échantillons
1	Bébé male de 8 mois congelé
2	Bébé femelle de 3 mois congelé
3	Adulte femme (prélèvement frais du matin)
4	Adulte femme 3 congelé
5	Adulte homme (prélèvement frais du matin)
6	Adulte femme avec traitement inuline de 1 mois
7	Adulte femme avec traitement inuline de 2 mois
8	Adulte femme 3 congelé pendant 1 mois



Tableau 4 : Caractéristiques techniques du cytomètre

laser	Channel	Filter (nm)	Dye or parameter
Violet 405 nm	V1	450/50	CFP, VioBlue
	V2	525/50	Pacific Orange , VioGreen
Blue 488 nm	B1	525/50	GFP, FITC
	B2	585/40	PE
	B3	655-730	Pi, PerCP,Pe-Cy5.5, PerCP-Vio70
	B4	750 LP	Pe-Cy7, PE-Vio770
Red 635 nm	R1	655-730	APC
	R2	750 LP	APC-Cy7, APC-Vio770
Blue 488 nm	FSC	488/10	Taille
	SSC	488/10	Granulométrie

Figure 9 : Principe de fonctionnement du cytomètre

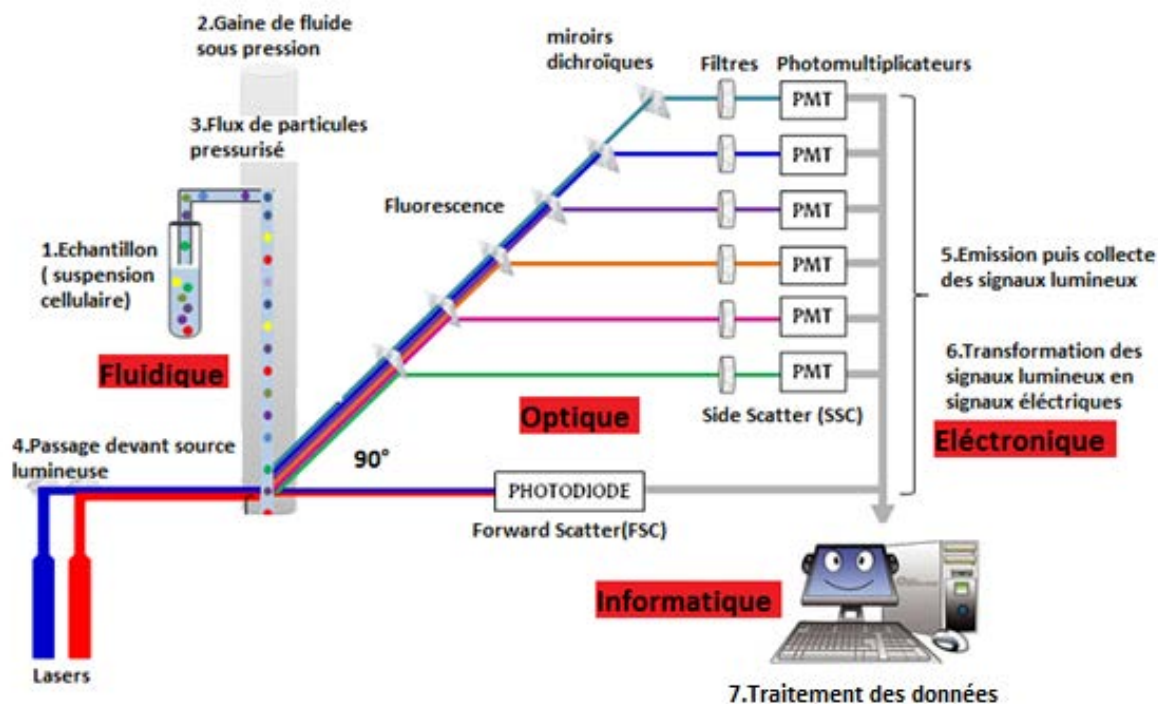




Tableau 5 : Amorces utilisées pour la qPCR

Souches recherchées	amorces	Séquence 5'→3'	Référence	Témoins positifs utilisés
<i>Bacteroidetes</i>	BactF BactR	CCTWCGATGGATAGGGGTT TCCCCAGGTGGAATACTTAACG	(Firmesse et al, 2008)	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Firmicutes</i>	FirmF FirmR	ACCCGCGTCTGATTAGCTAGTT CCTCTCAGGCCGGCTACTG	(Ettreiki et al. 2012)	(Ettreiki et al. 2012)
<i>Enterobacteriaceae</i>	EntF EntR	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAA CGCTTGCAACCCTCCGTATTA	(Ettreiki et al, 2012)	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lactobacillus</i>	Lact-F Lact-R	TGCCGGAGCTAACGCATT AGCTTCGAATTAACACATGCT	(Pouillart et al. 2010)	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Bifidobacterium</i>	F_Bifid 09c R_Bifid 06	CGG GTG AGT AAT GCG TGA CC TGA TAG GAC GCG ACC CCA	(Furet et al. 2009)	<i>Bifidobacterium animalis</i>

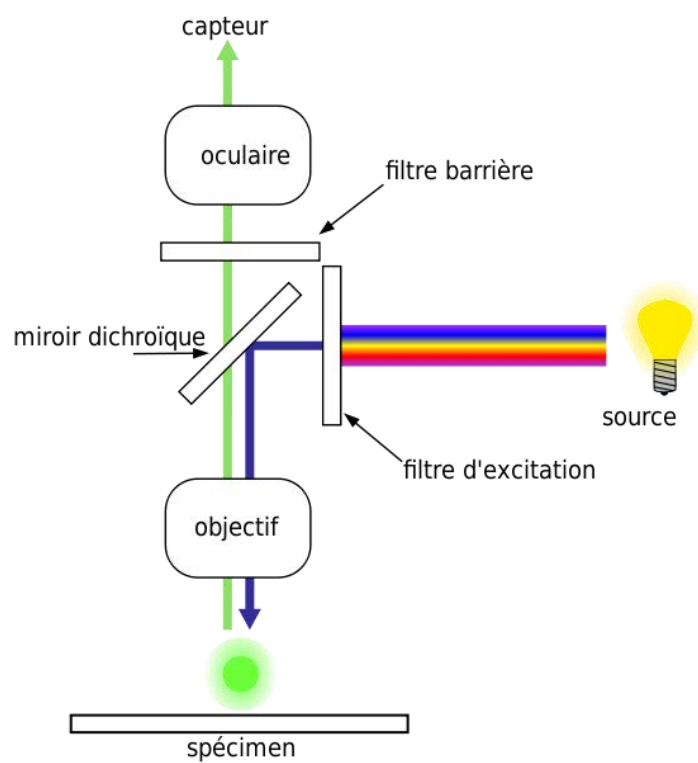


Tableau 6 : Caractéristiques de la sonde d'hybridation

Sonde	Séquence	détection	Référence
Eub338	5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3'	Toutes les bactéries	(Amann et al. 1990)

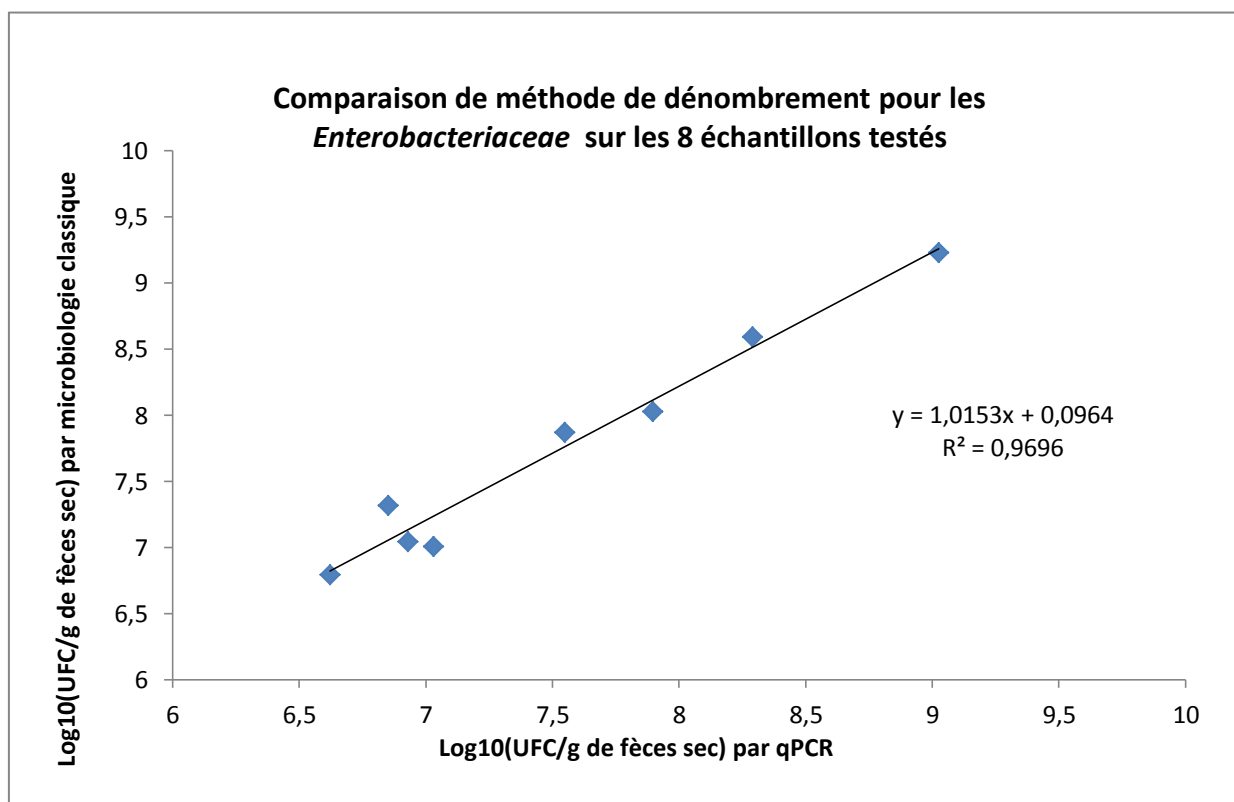


Figure 10 : Principe de fonctionnement du microscope à épifluorescence



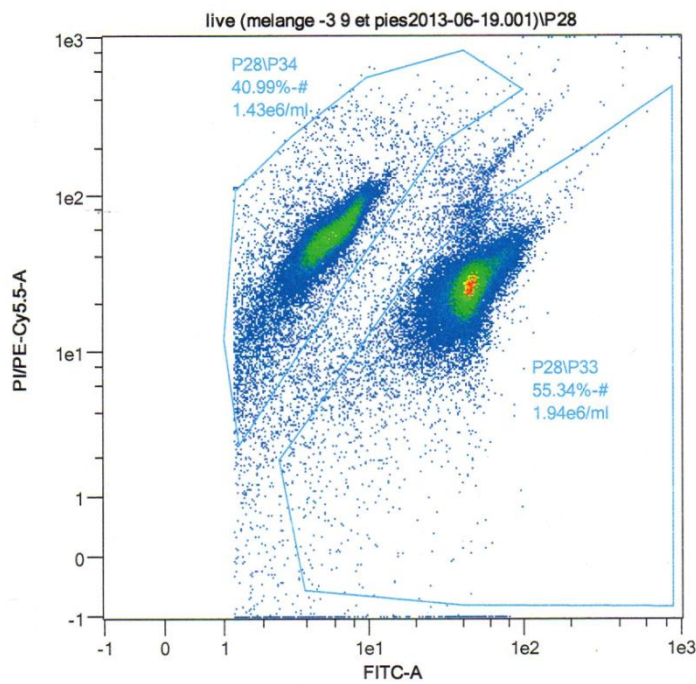


Graphique 1 : Comparaison de 2 méthodes de dénombrement pour les *Enterobacteriaceae*

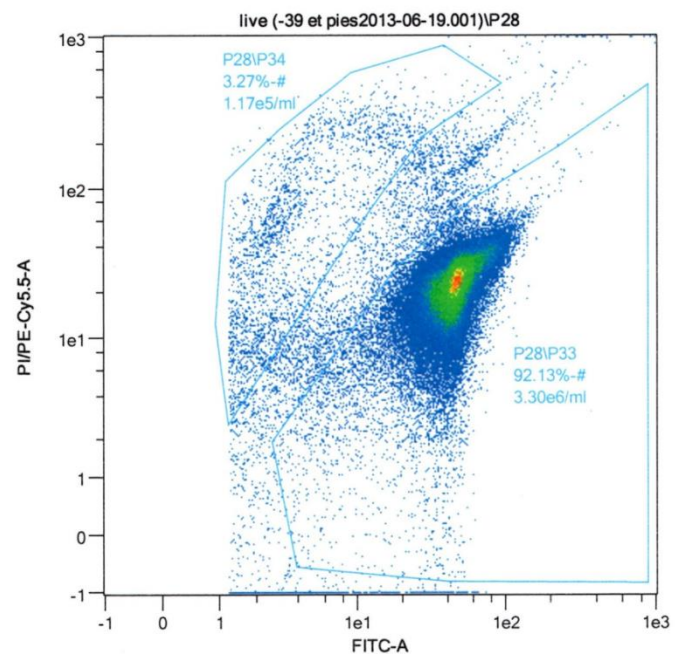




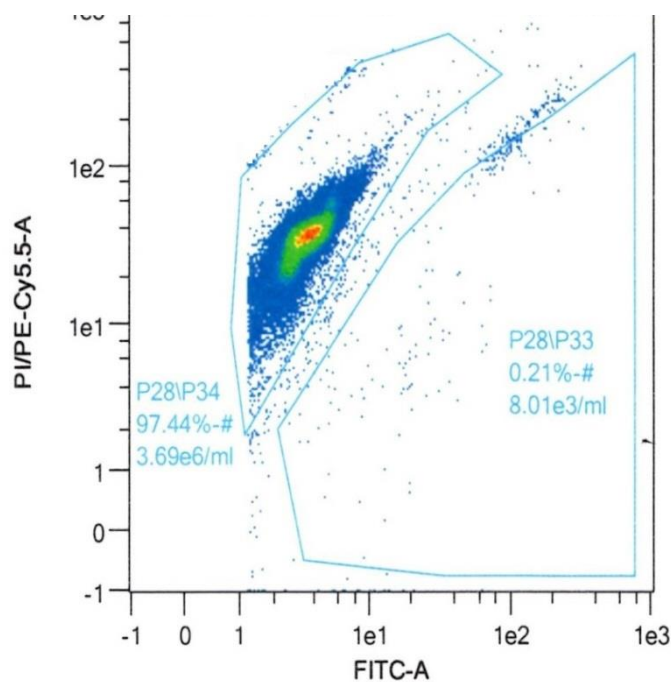
Graphique 2 : Mélange 50/50 (*E.coli*/*E.coli* traité à l'éthanol 70%) marqué au syto 9 + iodure de propidium. Dilution 10⁻³



Graphique 3 : Culture pure *Escherichia coli* marqué au syto 9 + iodure de propidium. Dilution 10⁻³

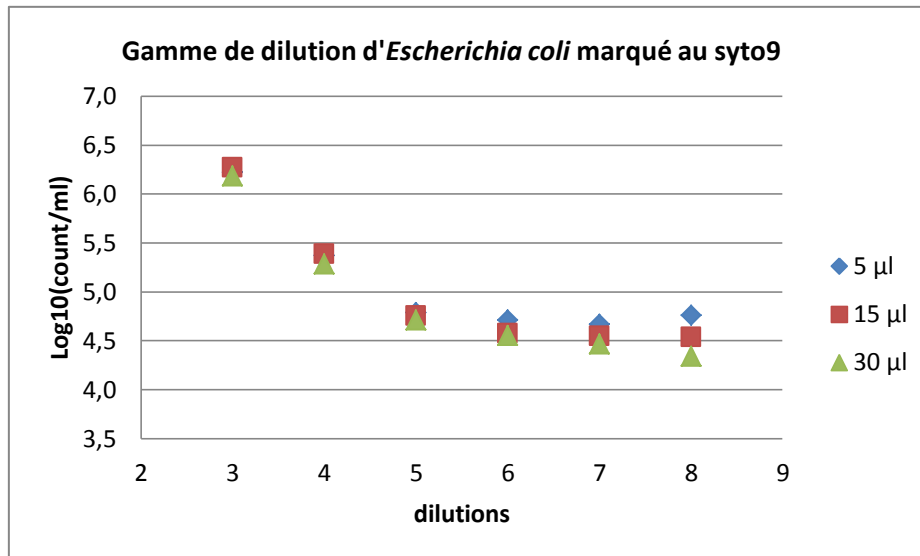


Graphique 4 : *Escherichia coli* traité à l'éthanol 70% marqué au syto 9 + iodure de propidium . Dilution 10⁻³

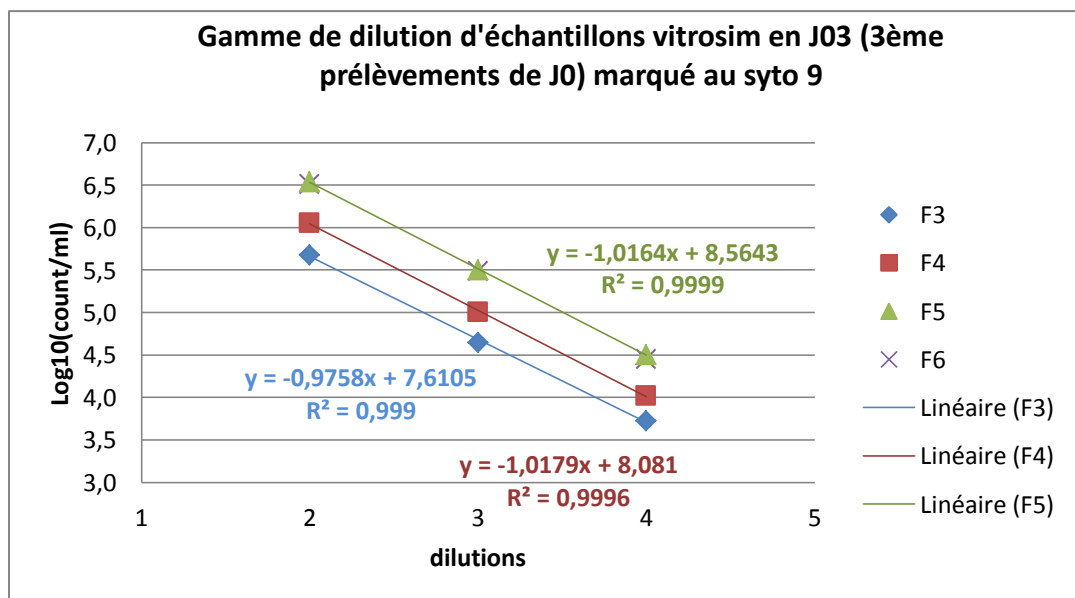




Graphique 5 : Gamme étalon d'*Escherichia coli* par marquage au syto 9

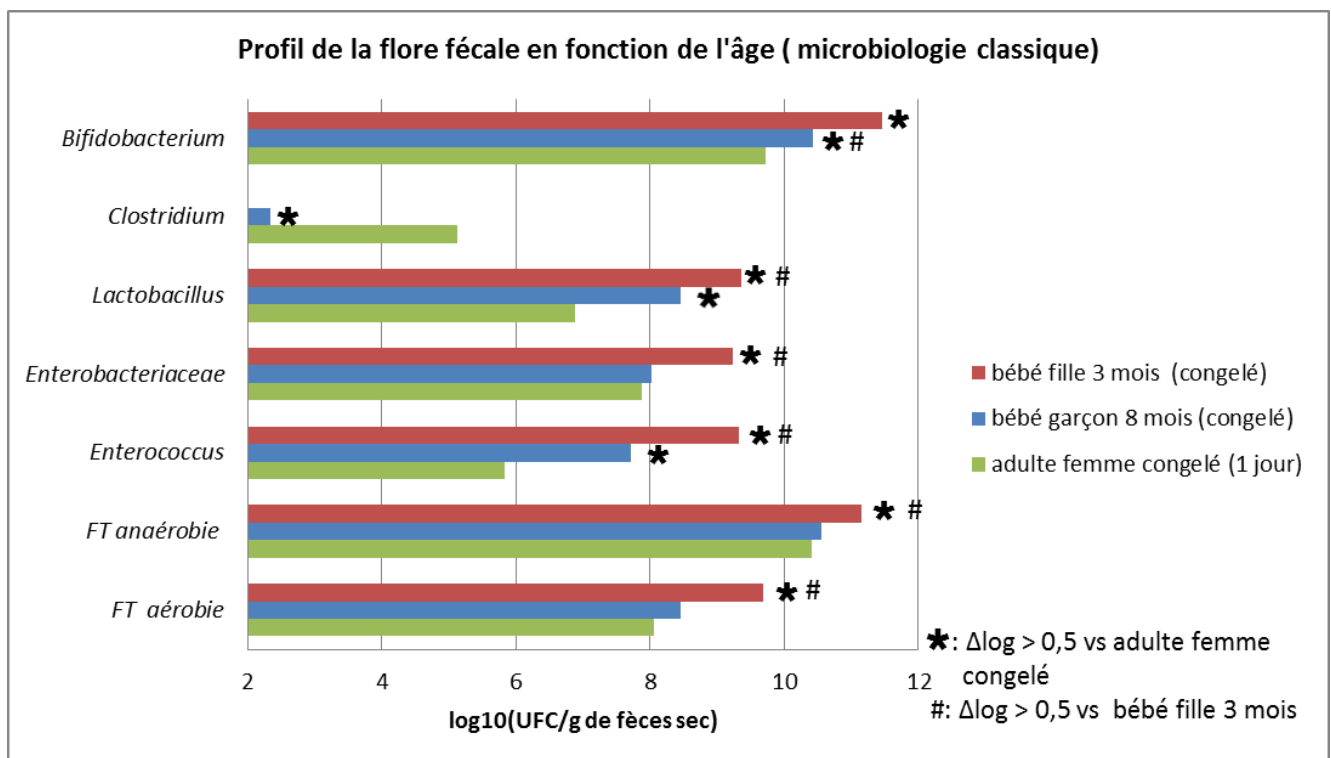


Graphique 6 : Gamme étalon d'un échantillon Vitrosim en J03 par marquage au syto 9

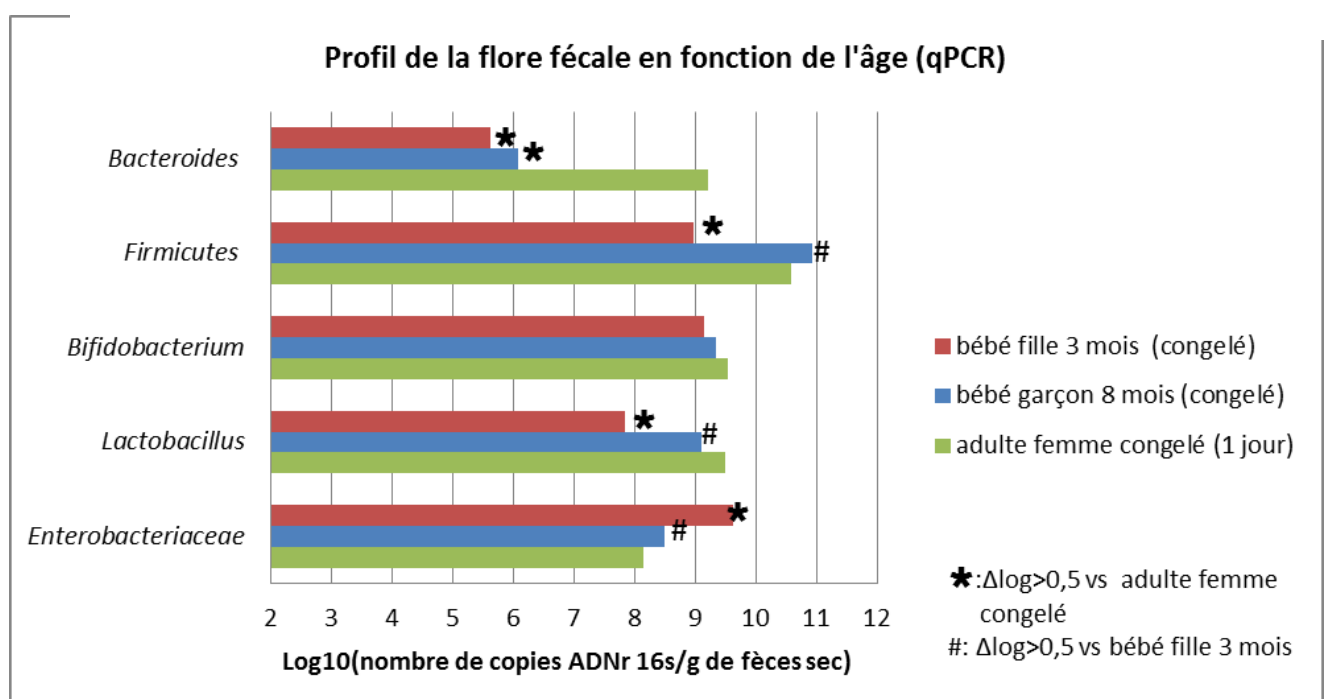




Graphique 7 : Etude du microbiote intestinal par microbiologie classique en fonction de l'âge

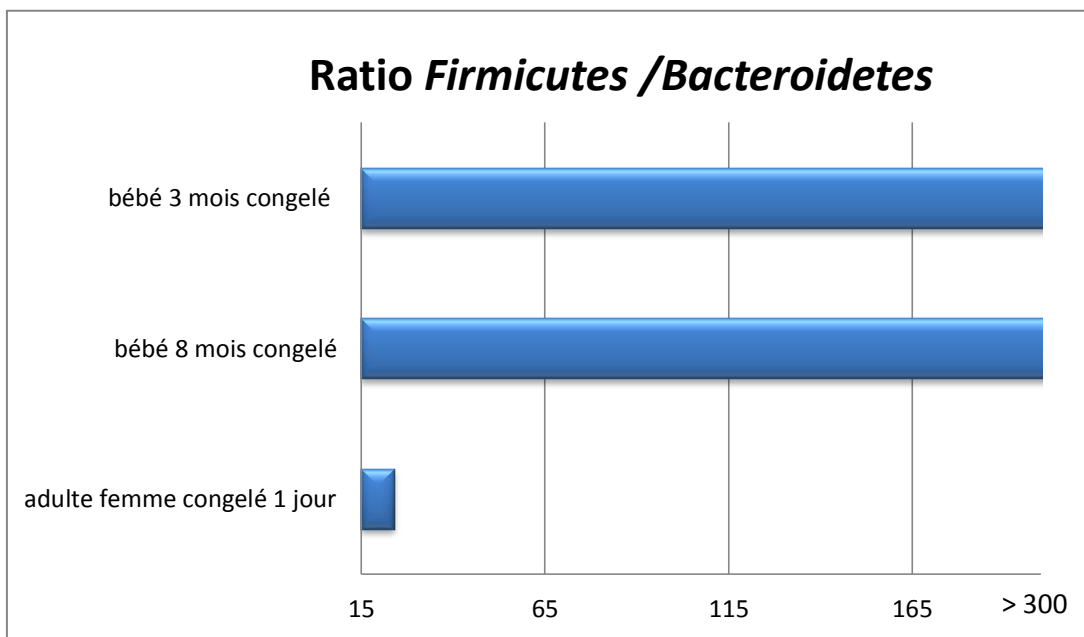


Graphique 8 : Etude du microbiote intestinal par qPCR en fonction de l'âge



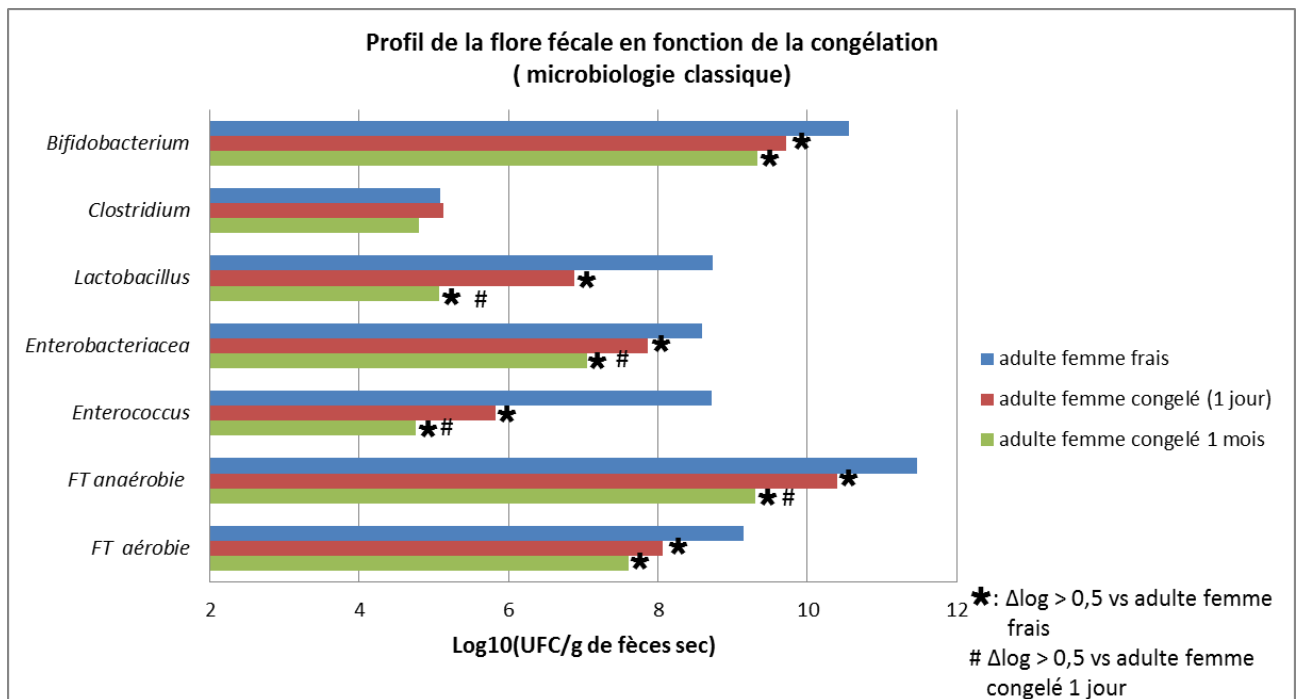


Graphique 9 : Ratio *Firmicutes* /*Bacteroidetes* en fonction de l'âge

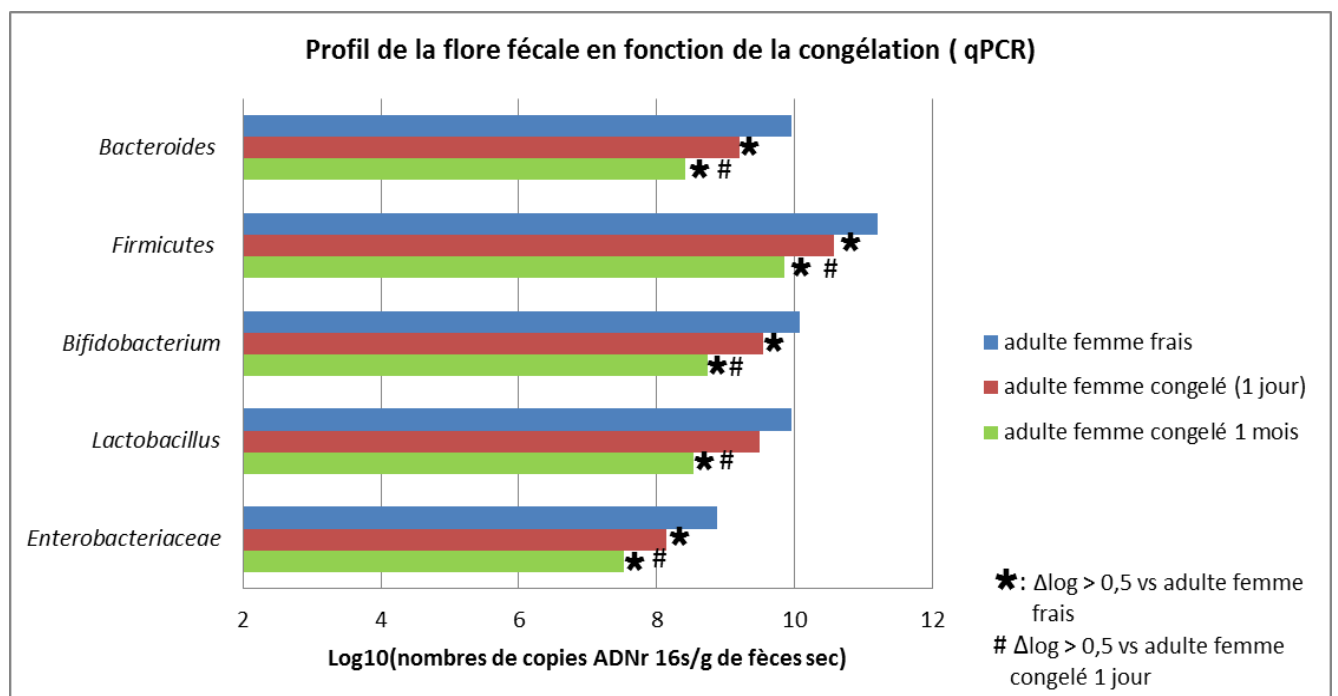




Graphique 10 : Etude du microbiote intestinal par microbiologie classique en fonction de la congélation

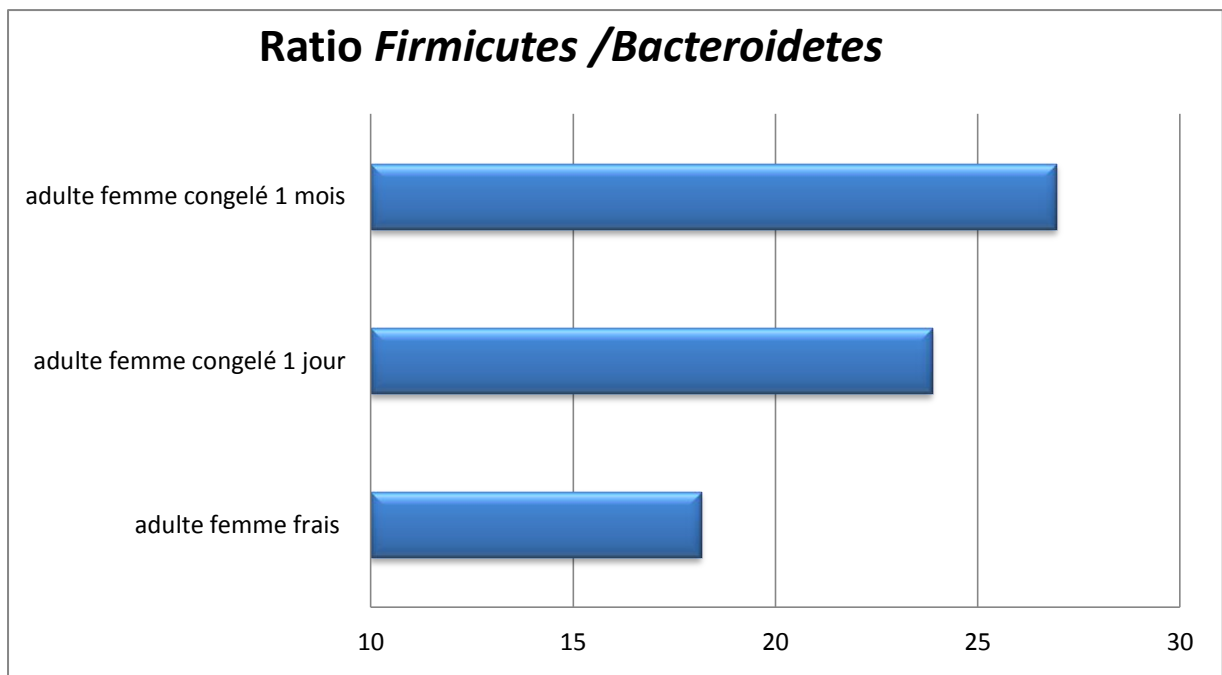


Graphique 11 : Etude du microbiote intestinal par qPCR en fonction de la congélation



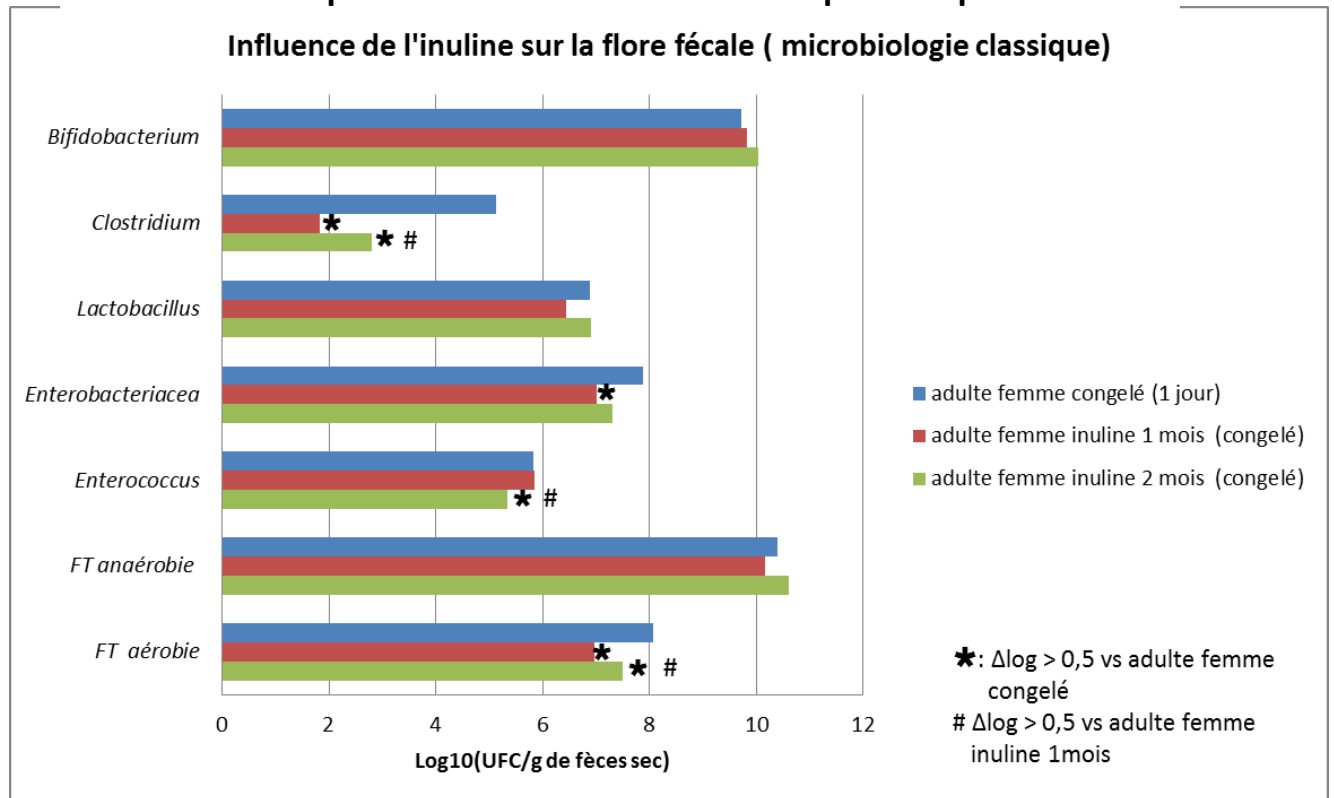


Graphique 12 : Ratio *Firmicutes* /*Bacteroidetes* en fonction de la congélation

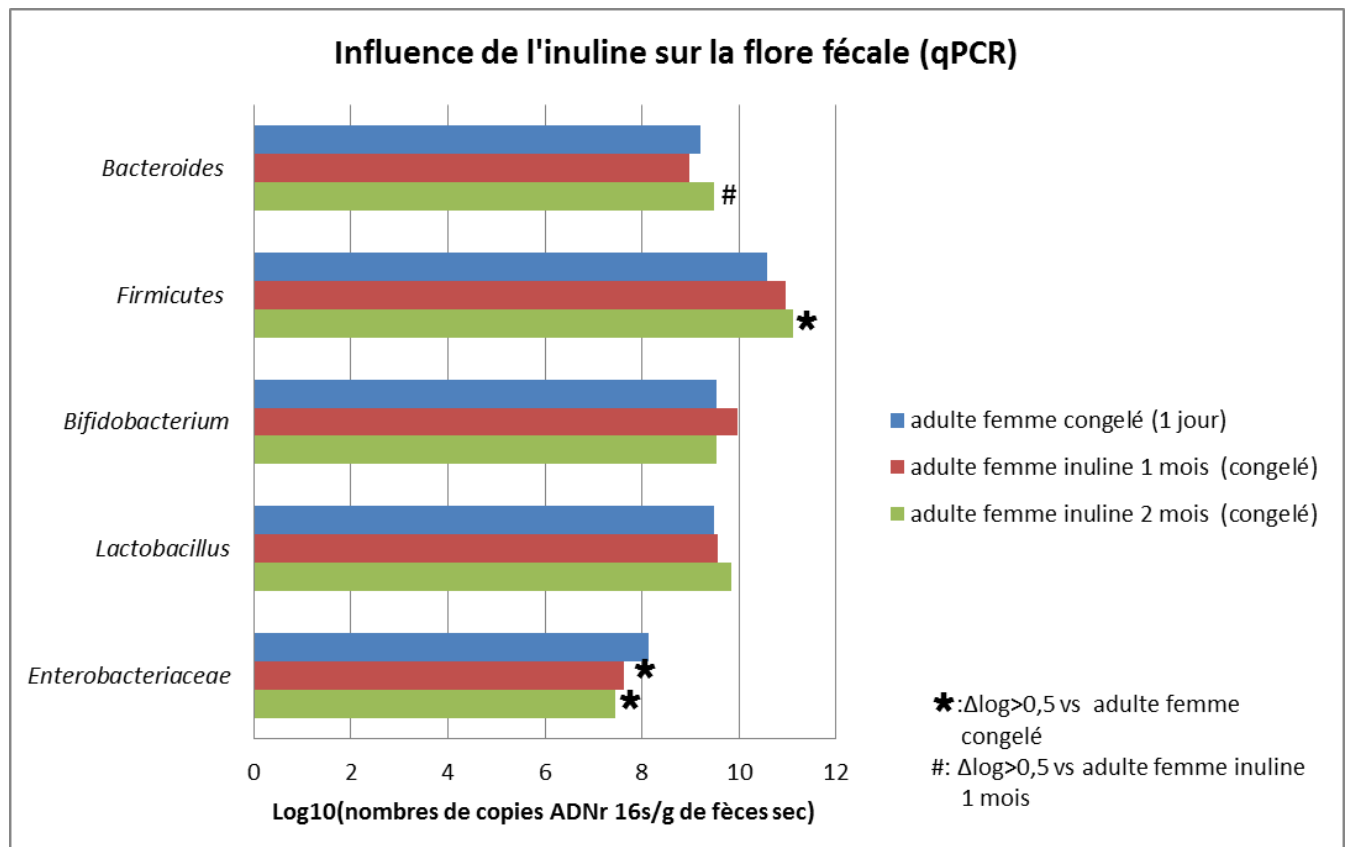




Graphique 13 : Etude du microbiote intestinal par microbiologie classique en fonction d'un traitement prébiotique

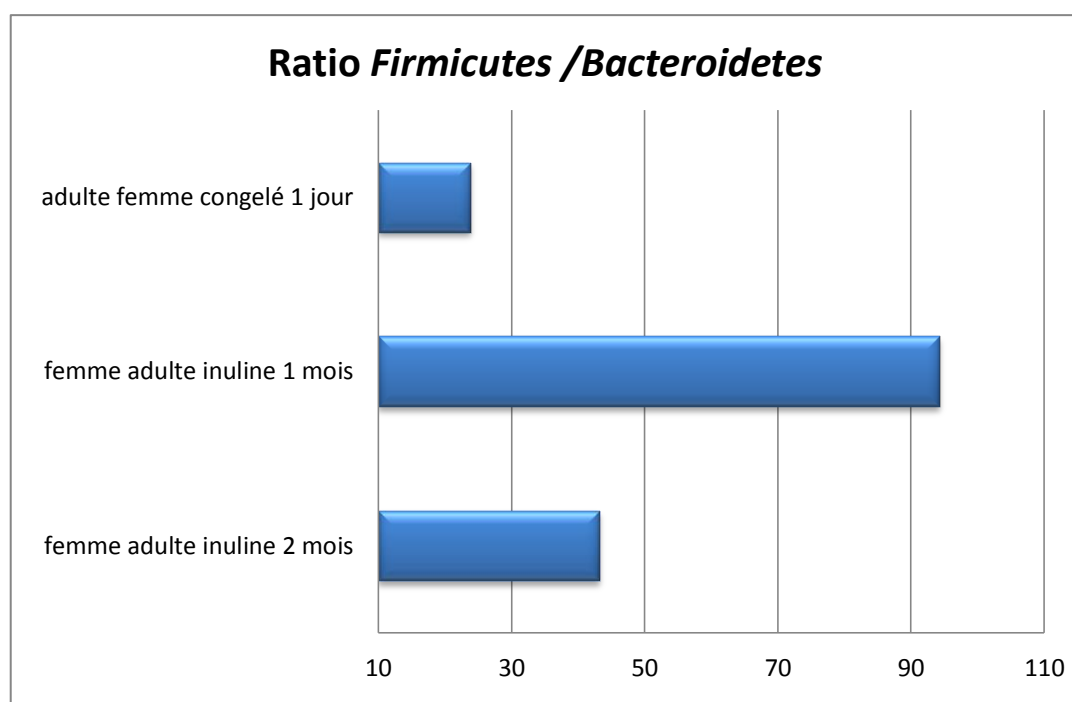


Graphique 14 : Etude du microbiote intestinal par qPCR en fonction d'un traitement prébiotique



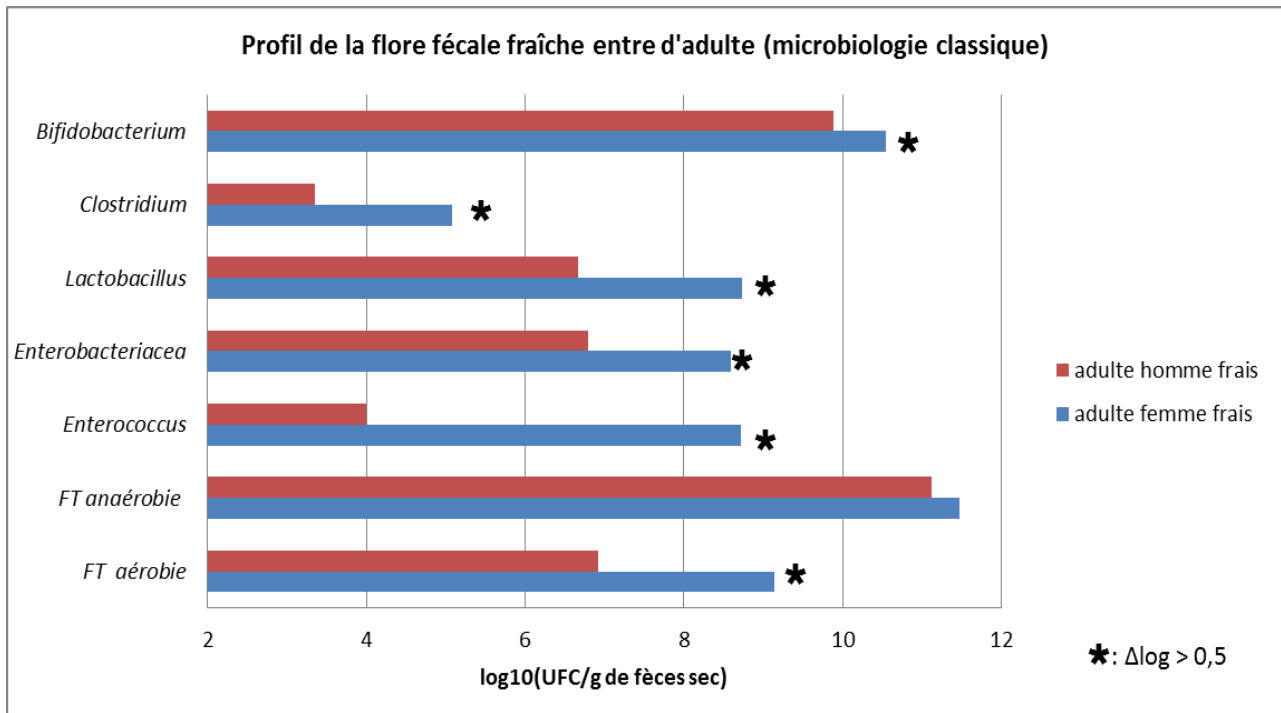


Graphique 15 : Ratio *Firmicutes* /*Bacteroidetes* en fonction d'un traitement inuline

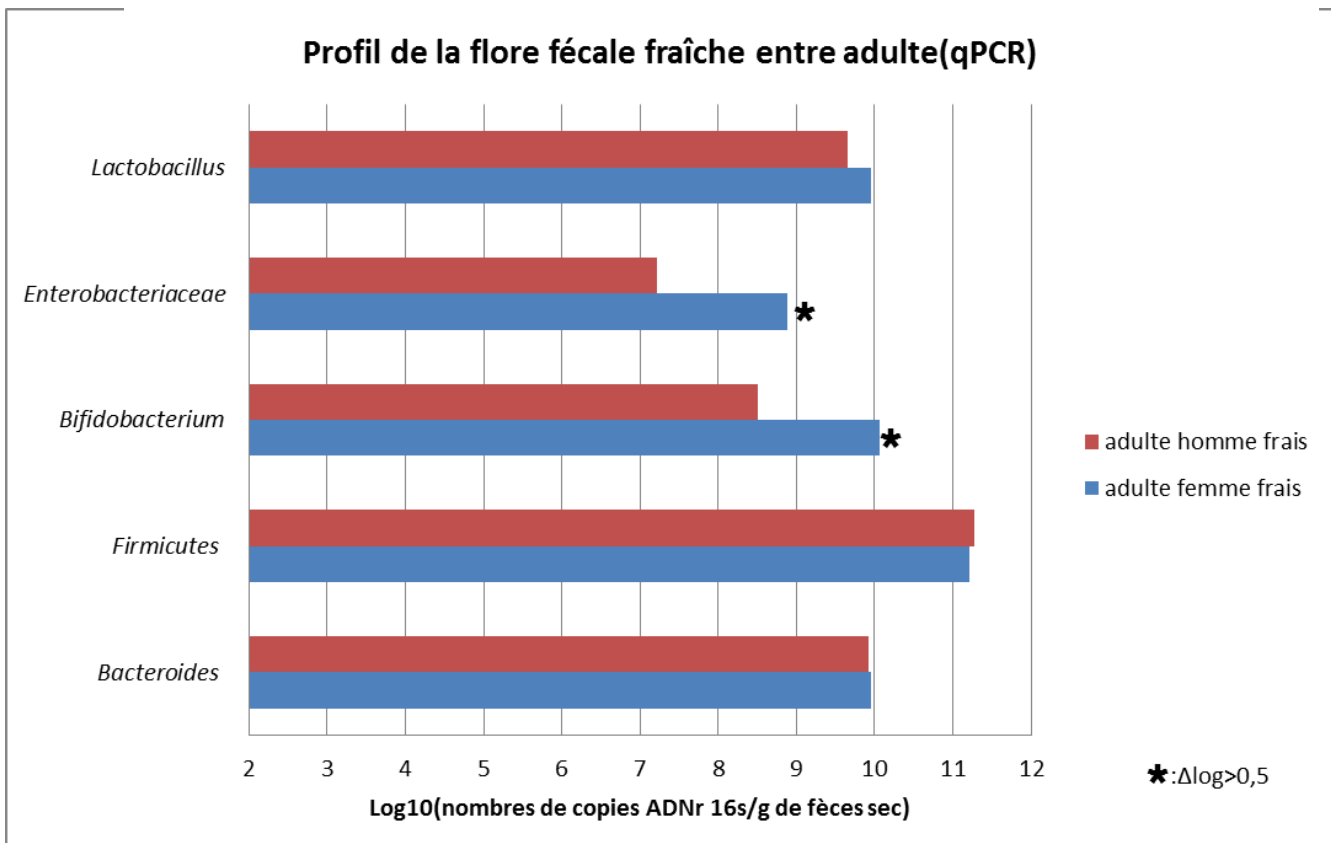




Graphique 16 : Etude inter-individus du microbiote intestinal par microbiologie classique

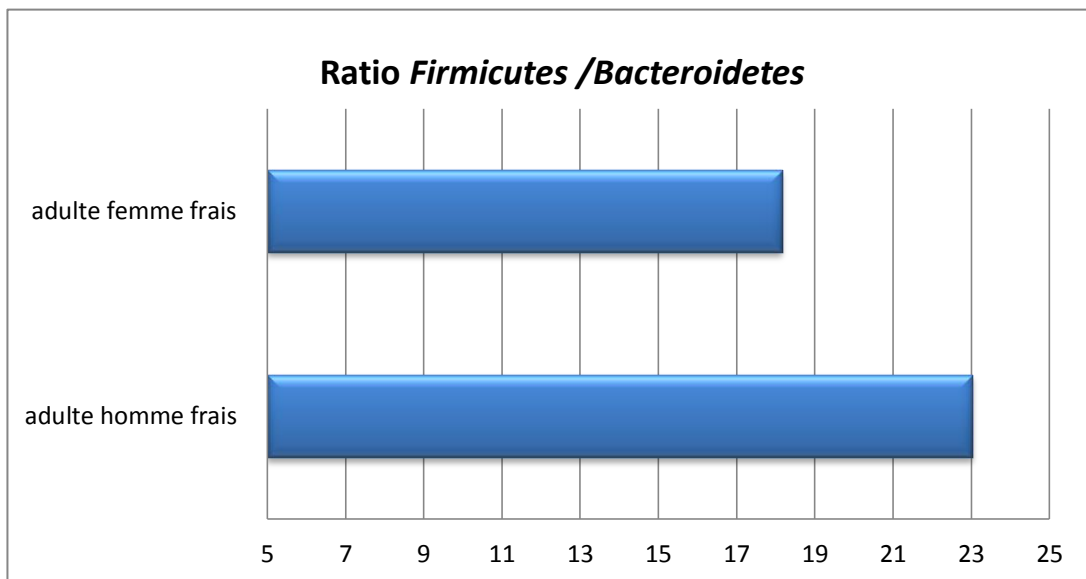


Graphique 17 : Etude inter-individus du microbiote intestinal par qPCR



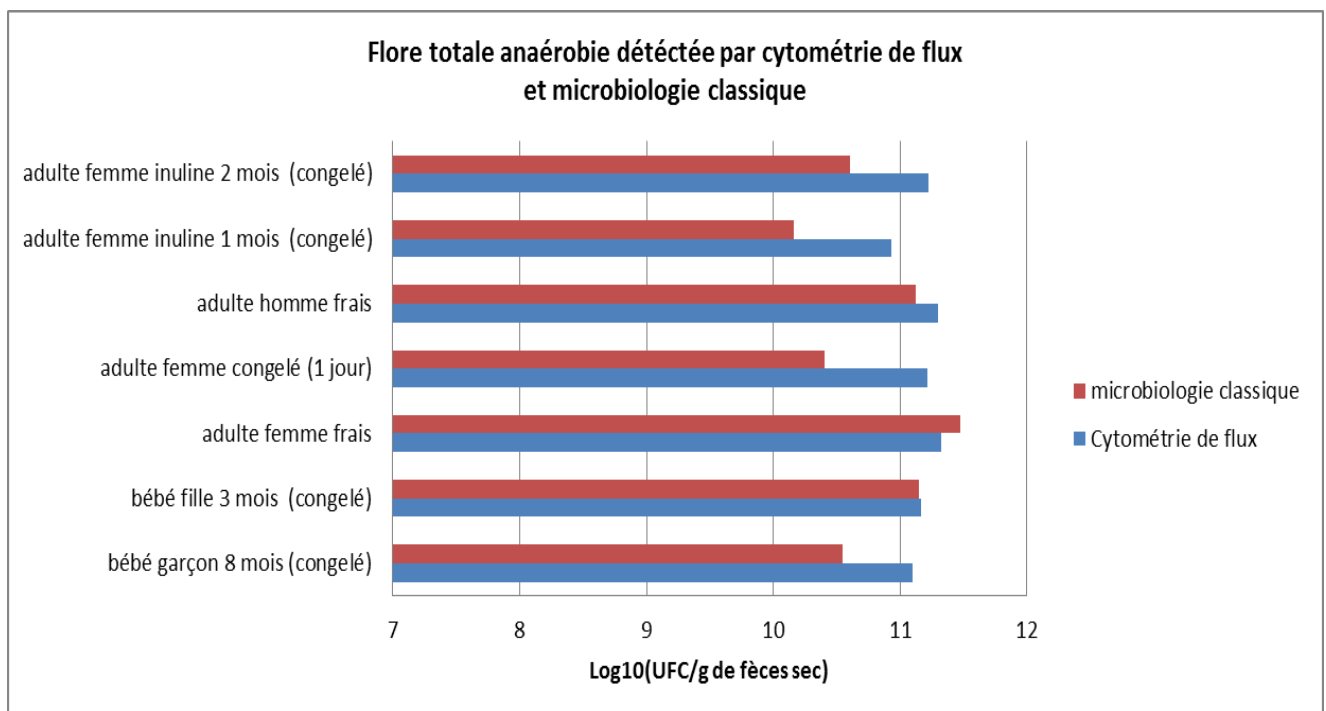


Graphique 18 : Ratio *Firmicutes* /*Bacteroidetes* entre individus



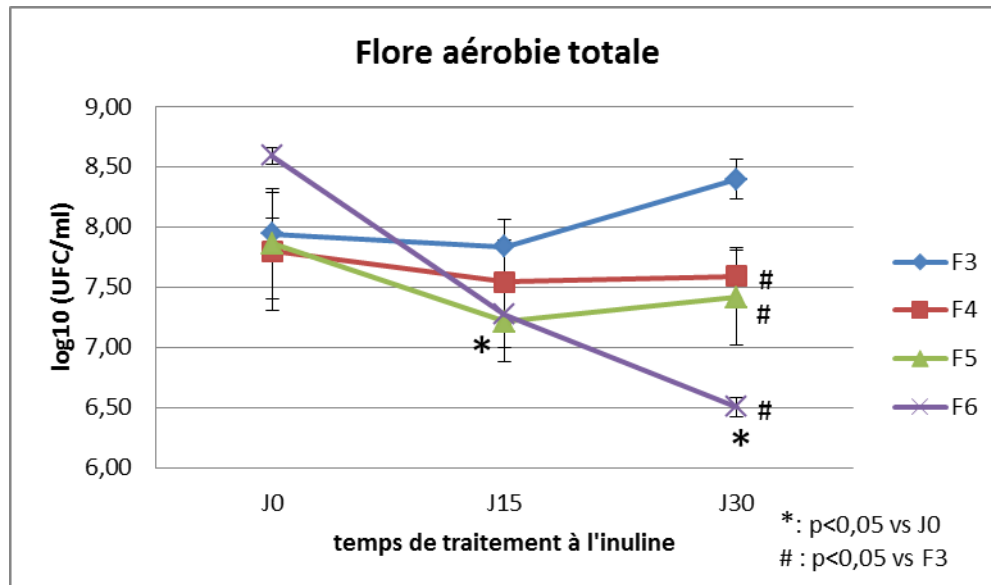


Graphique 19 : Etude de la flore totale du microbiote intestinal par cytométrie de flux dans l'étude *in vivo*

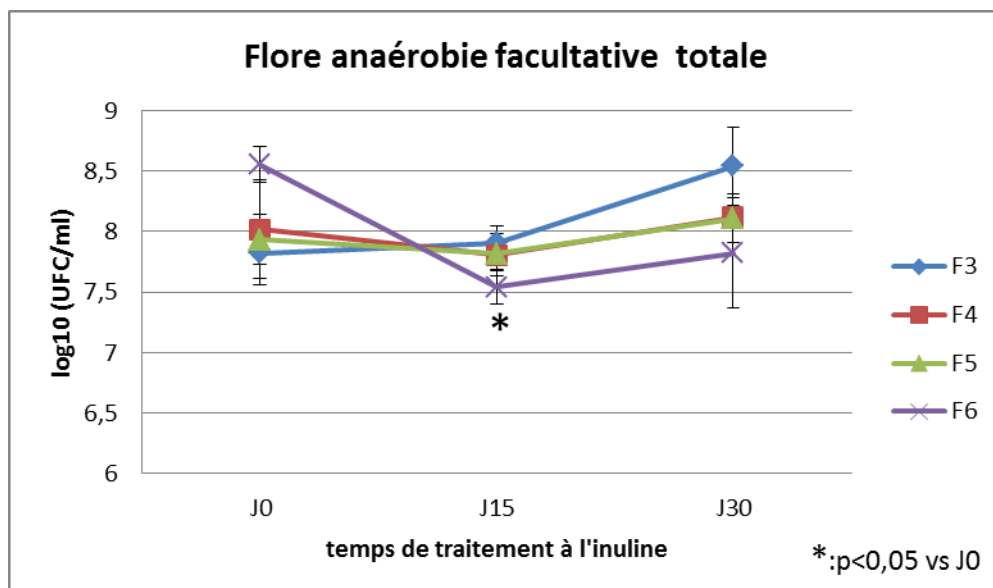




Graphique 20: Etude *in vitro* de la flore totale aérobie dans chaque compartiment du Vitrosim

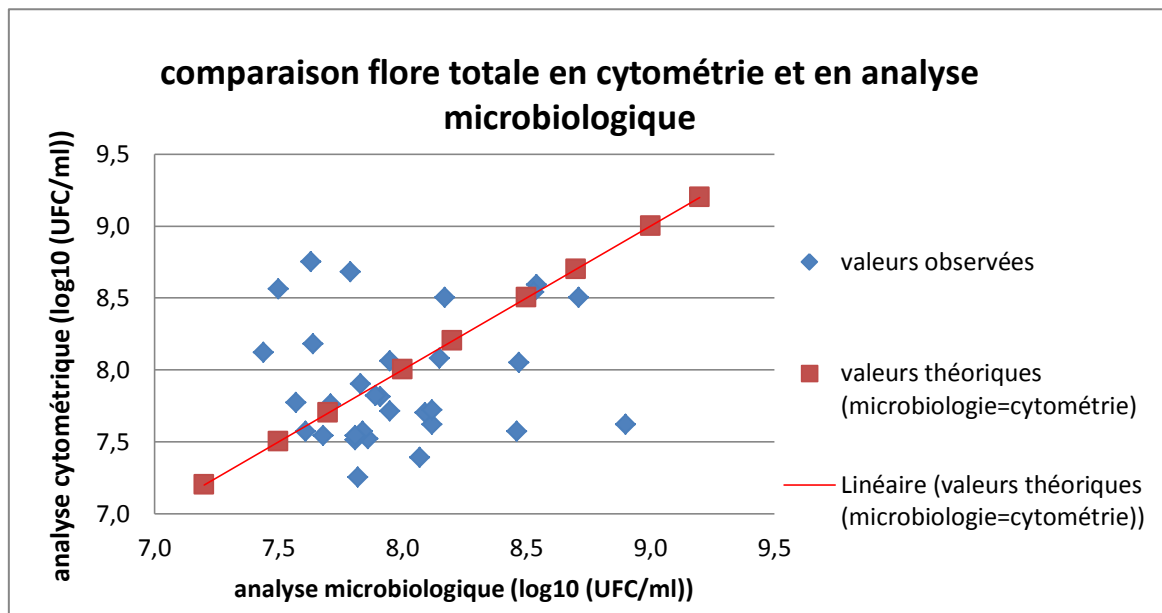


Graphique 21 : Etude *in vitro* de la flore totale anaérobie facultative dans chaque compartiment



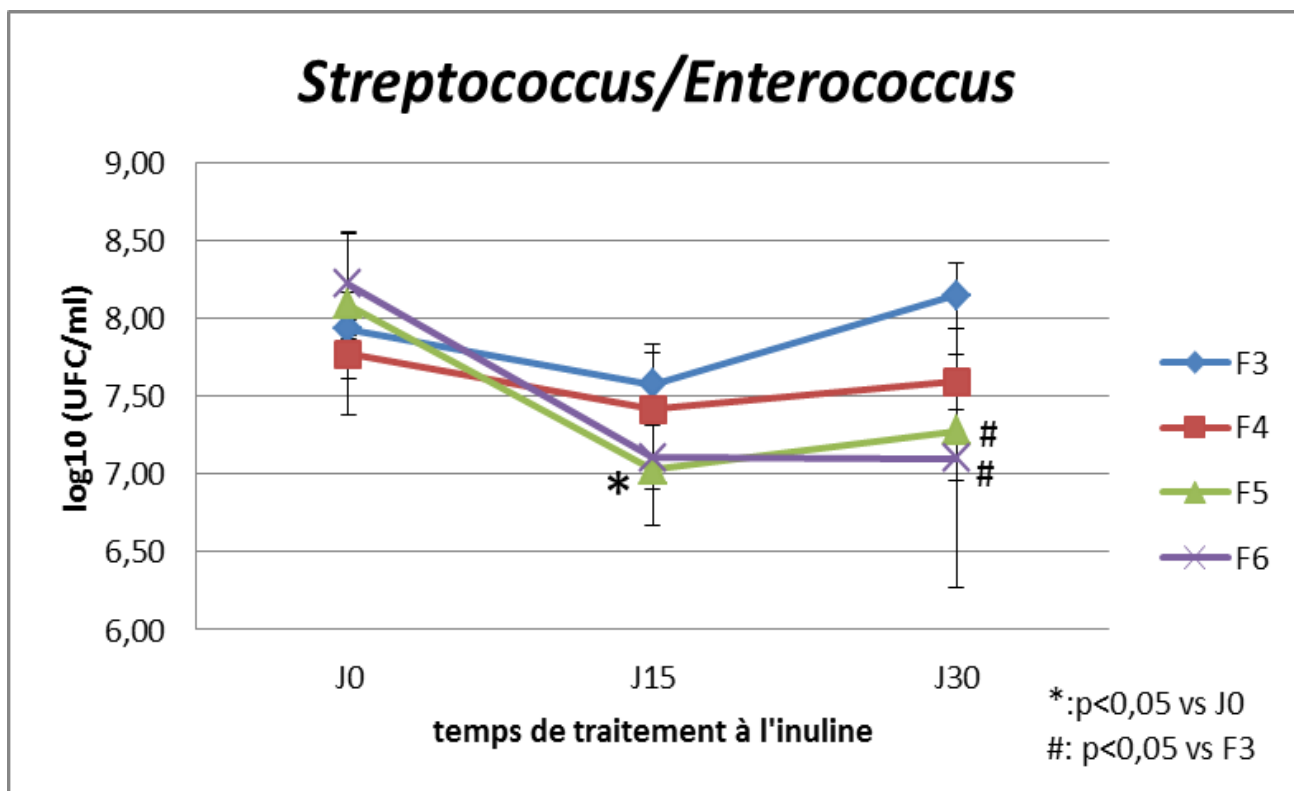


Graphique 22 : Etude comparative de la flore totale par 2 méthodes (microbiologie classique /cytométrie)

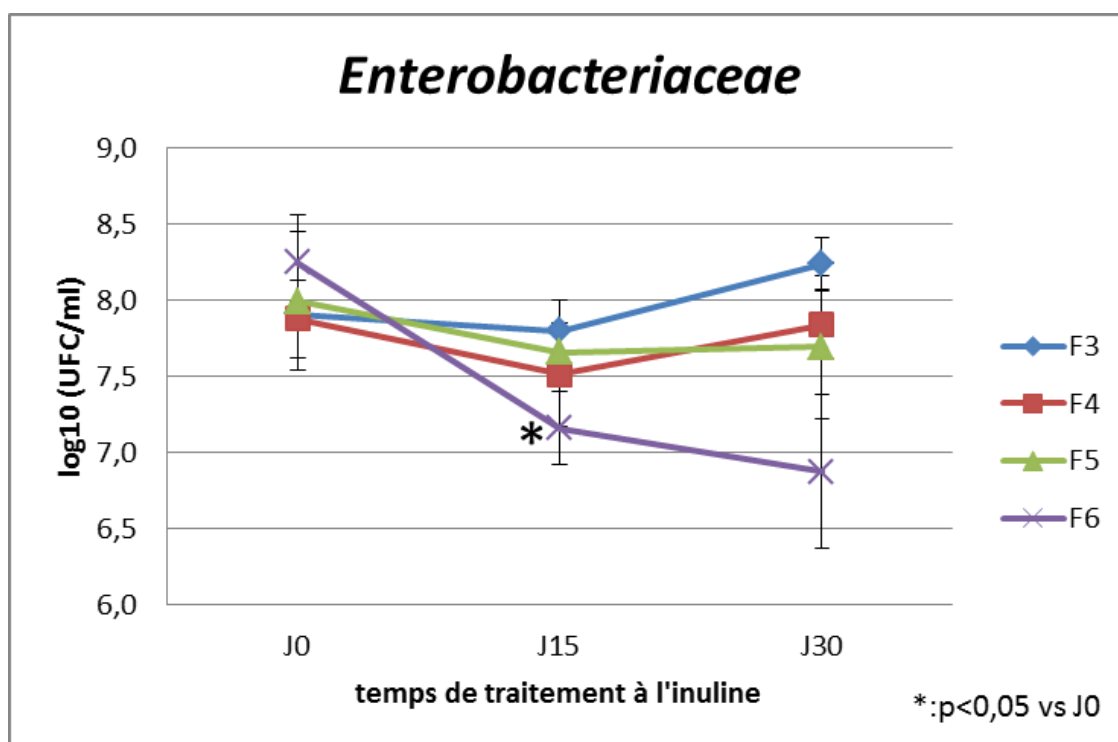




Graphique 23 : Evolution des genres *Streptococcus spp/Enterococcus spp* dans le Vitrosim en fonction du temps de traitement à l'inuline

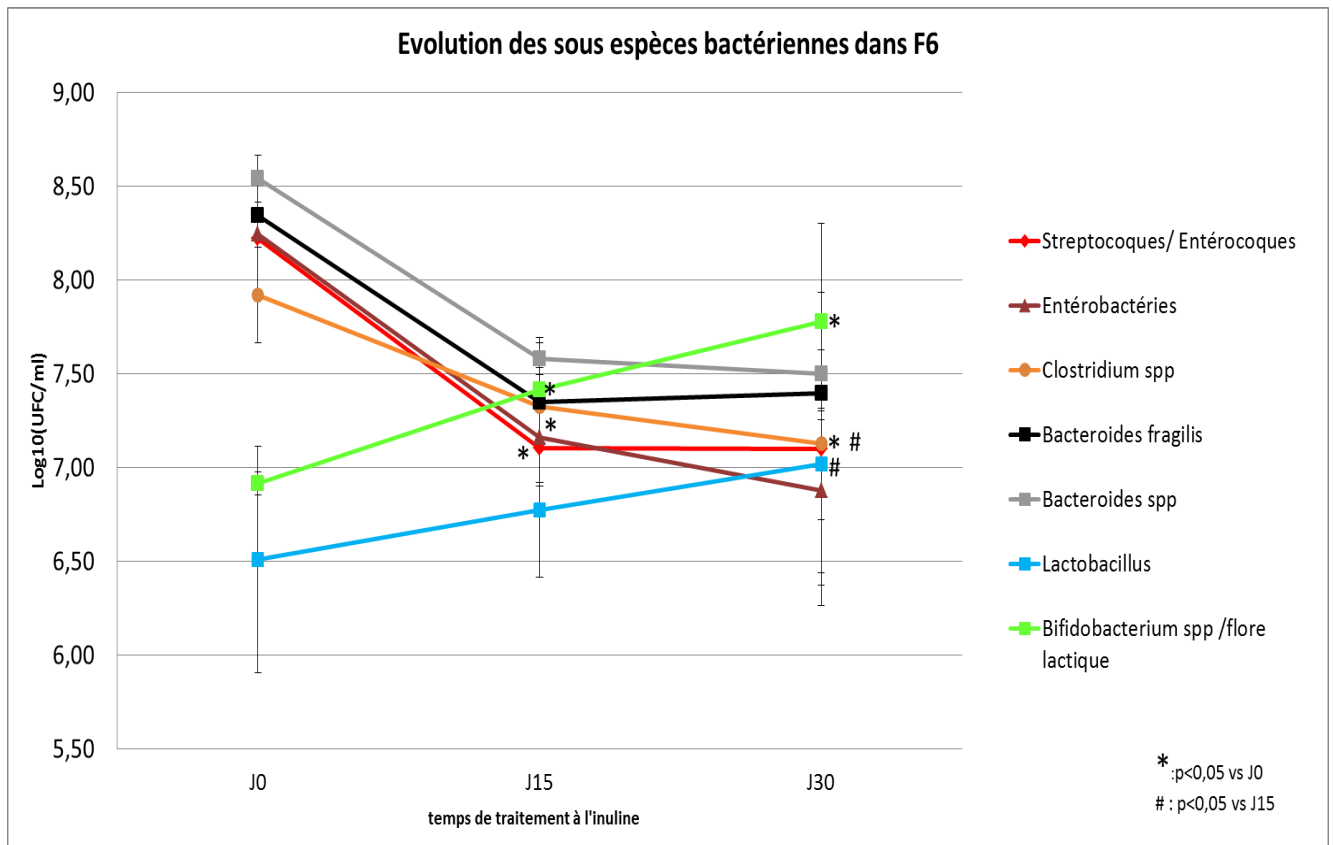


Graphique 24 : Evolution des *Enterobacteriaceae* dans le Vitrosim en fonction du temps de traitement à l'inuline





Graphique 25 : Evolution des profils bactériens au sein du Vitrosim (Fermenteur 6) en fonction du temps de traitement à l'inuline





Graphique 26 : Variation du pH dans le Vitrosim au niveau des Fermenteurs 4, 5 et 6 en fonction du temps de traitement à l'inuline

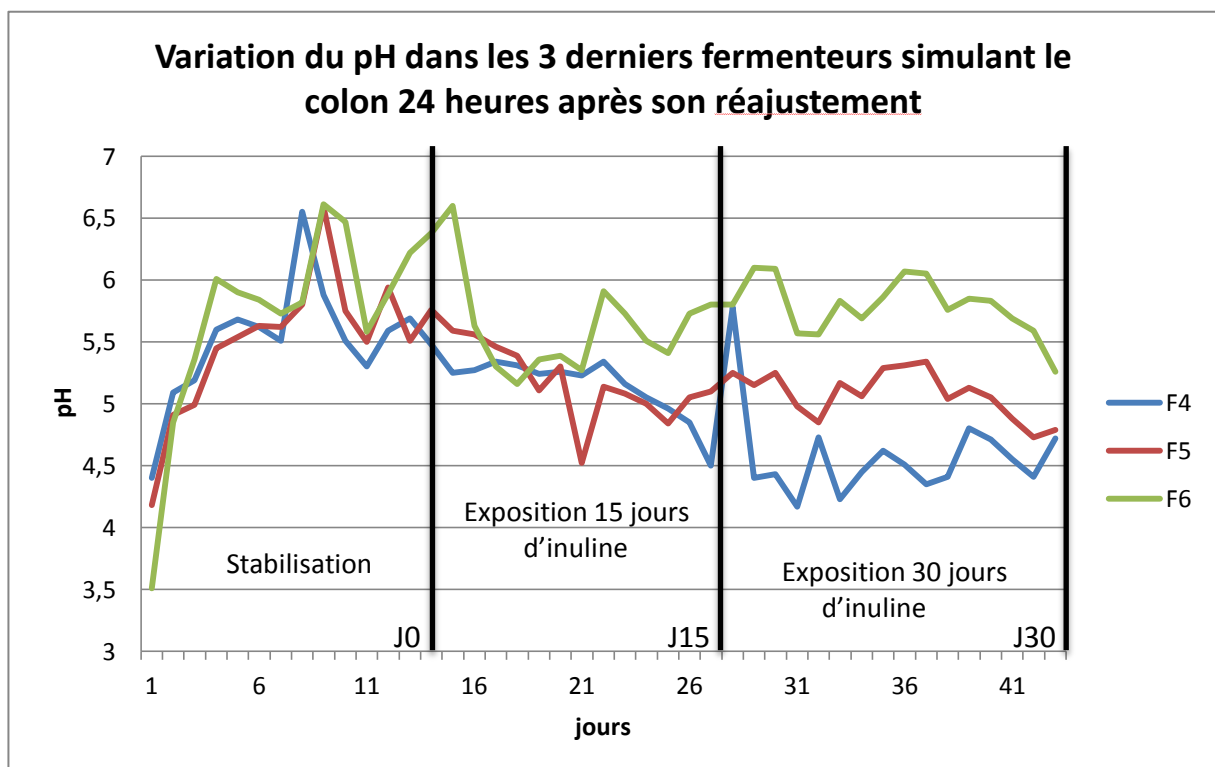




Image 1 : Photographie d'*Escherichia coli* traité à l'éthanol 70% marqué par la sonde EUB338-Cy3 par microscopie à épifluorescence

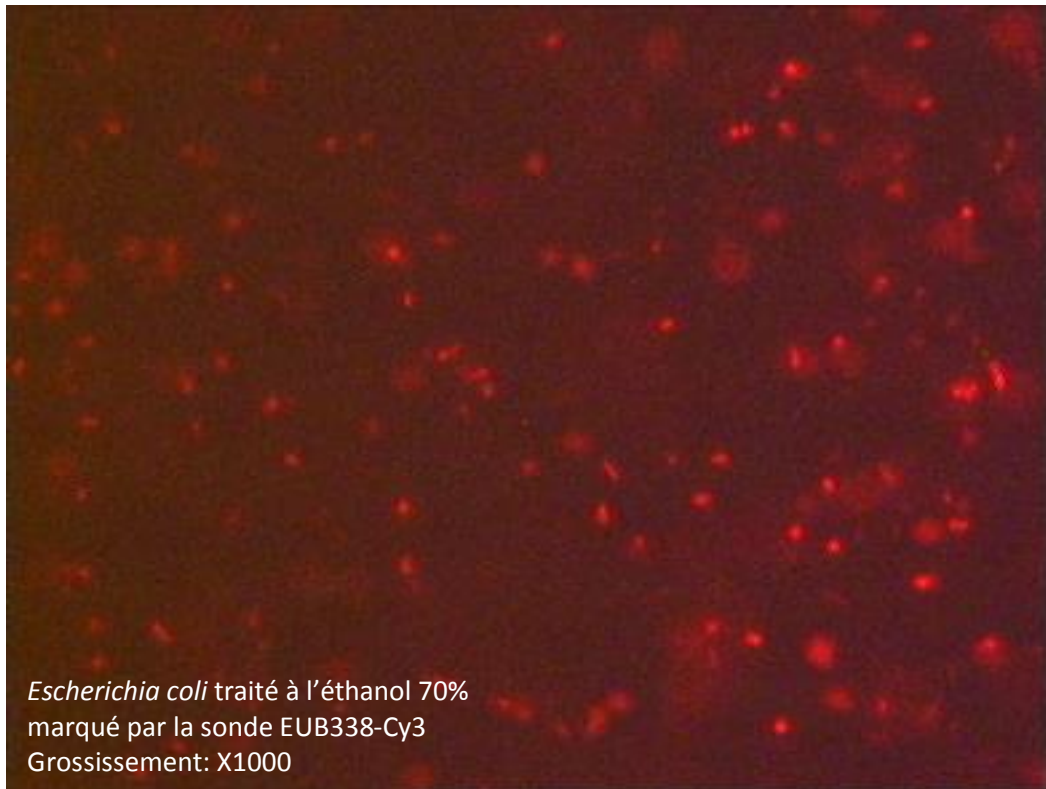


Image 2 : Photographie d'*Enterococcus faecalis* traité au lysozyme marqué par la sonde EUB338-Cy3 par microscopie à épifluorescence

