



Université du Québec  
**Institut national de recherche scientifique**  
INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

**Protocole pour dénombrer deux bactéries Gram positif,  
*Lactobacillus johnsonii* et *Bifidobacterium adolescentis*, par la  
technique classique de culture et par hybridation *in situ*  
combinée à la cytométrie de flux**

Par

**MARIAM HAJJ-MOHAMAD**

Mémoire  
Présenté à l'INRS-Institut Armand-Frappier  
comme exigence partielle du programme de maîtrise en microbiologie  
appliquée

Septembre 2003

Direction: Darakhshan Ahmad

# TABLE DES MATIÈRES

<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	ii
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	vi
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	viii
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	xi
<b>RÉSUMÉ</b> .....	1
<b>INTRODUCTION</b> .....	4
<b>CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE</b> .....	8
1.1 Tube digestif humain et la microflore du tractus digestif .....	8
1.1.1 Répartition topographique de la flore digestive humaine.....	8
1.1.2 Composition classique d'une flore intestinale humaine .....	14
1.1.3 Évolution de la microflore intestinale avec l'âge .....	16
1.1.4 Fonction de la microflore colique normale .....	20
1.1.4.1 Effets sur des paramètres anatomiques, physiologiques et biochimiques du tube digestif.....	20
1.1.4.2 Effets nutritionnels et digestifs.....	22
1.1.4.3 Effet barrière et protection contre l'infection .....	25
1.1.4.4 Mise en place de l'immunité.....	29
1.1.4.5 Variations individuelles des effets de la flore humaine .....	30
1.1.5 Facteurs affectant la microflore intestinale .....	30
1.1.6 Les bactéries probiotiques et leurs effets sur les défenses naturelles de l'intestin: les lactobacilles et les bifidobactéries .....	32
1.1.6.1 Effets des probiotiques sur la microflore intestinale humaine .....	33
1.1.6.2 Effets des probiotiques sur l'épithélium intestinal .....	37
1.1.6.3 Effets des probiotiques sur le système immunitaire.....	38
1.1.6.4 Application de probiotiques en gastroentérologie clinique.....	41
1.2 Techniques utilisées pour l'étude de la composition et la fonction de la microflore intestinale (atouts et déficits).....	43
1.2.1 Techniques classiques pour l'étude de la microflore intestinale .....	44
1.2.1.1 La gnotobiologie pour l'étude de la microflore intestinale .....	44
1.2.1.2 Utilisation de milieux de culture pour l'étude de la microflore intestinale, technique classique et traditionnelle .....	45

1.2.1.3	Cytofluorométrie à flux (FCM) pour l'étude de la microflore intestinale .....	47
1.2.2	Les techniques de génétique moléculaire utilisées pour l'étude de la microflore intestinale: révolution/renaissance.....	55
1.2.2.1	Amplification par PCR de l'ADN total pour l'étude de la microflore intestinale .....	57
1.2.2.2	Hybridation <i>in situ</i> de sondes couplées à un fluorochrome (FISH) pour l'étude de la microflore intestinale: avantages et inconvénients.....	62
1.2.3	Choix de l'ARN 16S ribosomal, séquence cible, pour l'étude de la microflore intestinale par FISH.....	67
1.2.4	Choix de la séquence pour synthétiser la sonde oligonucléotidique utilisée par FISH pour l'étude de la microflore intestinale.....	69
1.2.5	Marqueurs des sondes, les fluorochromes et la fluorescence.....	70
1.2.6	Instruments d'observation des cellules fluorescentes (microscope à épifluorescence et cytomètre de flux) pour l'étude de la microflore intestinale par FISH.....	72
1.2.6.2	Cytomètre de flux.....	73
1.3	Importance du développement des techniques simples capables de détecter et dénombrer les bactéries de la microflore intestinale.....	75
1.4	Objectifs de l'étude .....	76
1.5	Importances de choisir les deux genres bactériens, <i>Lactobacillus</i> et <i>Bifidobacterium</i> comme sujet d'étude .....	79
1.6	Suivi microbien de <i>Lactobacillus</i> et <i>Bifidobacterium</i> dans la littérature.....	80
1.7	Les souches bactériennes de la microflore gastro-intestinale en étude.....	80
1.7.1	Caractéristiques et taxonomie.....	80
<b>CHAPITRE 2: MÉTHODOLOGIE .....</b>		<b>85</b>
2.1	Les micro-organismes utilisés.....	85
2.2	Les milieux de culture.....	85
2.2.1	Préparation des milieux de culture (MRS+, MRS+++ et MRSLC) .....	85
2.3	Étude de la croissance bactérienne sur milieux liquides et solides, productifs et sélectifs.....	91
2.3.2	Suivi de la croissance bactérienne sur les milieux liquide (MRS+++ et solide (MRS+++ et MRSLC) .....	92
2.4	Hybridation <i>in situ</i> en combinaison avec la cytométrie de flux (FISH) .....	92
2.4.1	Les sondes d'ADN fluorescentes utilisées .....	92
2.4.2	Les étapes de fixation/perméabilisation: Préparation des bactéries .....	94

2.4.3	Hybridation <i>in situ</i> des sondes fluorescentes (FISH) .....	97
2.4.4	Observation et détection de la fluorescence par microscope à épifluorescence .....	97
2.4.5	Désagrégation des cellules par sonication .....	97
2.4.6	Observation et détection de la fluorescence par cytomètre de flux (FCM) .....	98
2.5	Étude de l'état métabolique des cellules par mesure de l'intensité de la fluorescence (IMF) .....	98
2.6	Distinction entre <i>L. johnsonii</i> et <i>B. adolescentis</i> en mélange .....	99
2.7	Analyse des résultats des fluorescences .....	99
<b>CHAPITRE 3: RÉSULTATS .....</b>		<b>100</b>
3.1	Développement des milieux de culture électif et sélectif simples pour dénombrier les deux souches étudiées, <i>Lactobacillus johnsonii</i> (ATCC 332) et <i>Bifidobacterium adolescentis</i> (ATCC 15703) .....	100
3.1.1	Croissance de <i>L. johnsonii</i> ATCC 332 et <i>B. adolescentis</i> ATCC 15703 sur les milieux gélosés MRS+, MRS+++ et MRSLC: Étude qualitative .....	100
3.1.2	Dénombrement dans les milieux liquides (bouillon) MRS+++ et MRSLC: Étude quantitative .....	102
3.2	Détection et dénombrement par la technique d'hybridation <i>in situ</i> des sondes couplées à un fluorochrome en combinaison avec la cytométrie de flux (FISH-FCM) .....	102
3.2.1	Optimisation de l'étape de fixation/perméabilisation et dénombrement des cellules par FCM par utilisation du bromure d'éthidium comme fluorochrome libre .....	104
3.2.1.1	Optimisation de l'étape de fixation/perméabilisation pour <i>L. johnsonii</i> ATCC 332 par utilisation de paraformaldéhyde, lysozyme et éthanol .....	104
3.2.1.2	Optimisation de l'étape de fixation/perméabilisation pour <i>B. adolescentis</i> ATCC 15703 .....	108
3.2.2	Optimisation de l'étape d'hybridation <i>in situ</i> des sondes fluorescentes (FISH) .....	108
3.2.2.1	Optimisation de l'étape d'hybridation <i>in situ</i> pour <i>L. johnsonii</i> .....	111
3.2.2.2	Optimisation de l'étape d'hybridation <i>in situ</i> pour <i>B. adolescentis</i> .....	111
3.2.3	Optimisation de la dispersion des cellules .....	114
3.2.3.1	Détection de l'état de dispersion des cellules après hybridation par microscope à épifluorescence .....	117

3.2.3.2	Effet de l'hybridation sur le profil de dispersion et le compte cellulaire obtenus par cytométrie de flux (FCM): Exemple de la souche <i>L. johnsonii</i> .....	117
3.2.3.3	Effet de sonication sur l'agglutination des cellules des souches <i>L. johnsonii</i> et <i>B. adolescentis</i> .....	119
3.3	Vérification de l'état métabolique de cellules par FISH-FCM: Exemple de la souche <i>L. johnsonii</i> ATCC 332.....	128
3.4	Suivi des 2 souches <i>L. johnsonii</i> et <i>B. adolescentis</i> mélangées après hybridation par FCM, utilisant des sondes spécifiques couplées à un même fluorochrome .....	132
<b>CHAPITRE 4: DISCUSSION .....</b>		<b>137</b>
4.1	Développement des milieux de culture sélectif simple pour dénombrer les deux souches étudiées <i>L. johnsonii</i> et <i>B. adolescentis</i> .....	137
4.1.1	Évaluation de la sélectivité du milieu MRSLC .....	137
4.1.2	Évaluation de la productivité du milieu MRSLC .....	138
4.2	Développement de protocole d'hybridation in situ pour le dénombrement des deux souches étudiées <i>L. johnsonii</i> et <i>B. adolescentis</i> .....	138
4.3	Optimisation de la technique d'hybridation in situ pour le dénombrement des deux souches étudiées <i>L. johnsonii</i> et <i>B. adolescentis</i> .....	139
4.4	Vérification de l'état métabolique de cellules par FISH-FCM .....	142
4.5	Suivi des 2 souches <i>L. johnsonii</i> et <i>B. adolescentis</i> mélangées après hybridation par cytométrie, utilisant des sondes spécifiques couplées à un même fluorochrome .....	142
4.6	Perspectives.....	143
<b>CONCLUSION .....</b>		<b>145</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>		<b>147</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>149</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I:	Flore normale des voies digestives chez l'homme (d'après Falk et al., 1998; Moore et Holdeman, 1974) .....	13
Tableau II:	Microorganismes les plus fréquents du côlon chez l'homme .....	15
Tableau III:	Influence de la flore intestinale sur certains paramètres anatomiques, physiologiques et biochimiques du tube digestif chez l'animal (d'après Midtvedt, 1999) .....	23
Tableau IV:	Pourcentages de récupération de probiotiques vivants dans les selles après leur ingestion (d'après Marteau et Ramb, 1998).....	35
Tableau V:	Études cliniques contrôlées sur le recours aux probiotiques dans les maladies gastroentérologiques et allergiques .....	42
Tableau VI:	Méthodes de typage moléculaire couramment utilisées pour différencier les souches bactériennes (adapté de Tannock 2001) .....	61
Tableau VII:	Classification des fluorochromes selon leur longueur d'onde d'émission.....	71
Tableau VIII:	Différents milieux de culture pour la détection et l'énumération des espèces de <i>Bifidobacterium</i> et de <i>Lactobacillus</i> potentiellement probiotiques .....	77
Tableau IX:	Compositions de milieux sélectifs pour <i>Bifidobacterium</i> .....	78
Tableau X:	Les souches de bactéries de la microflore gastro-intestinale étudiées ainsi que leur provenance .....	86
Tableau XI:	Composition des milieux de culture utilisés.....	87
Tableau XII:	Séquences et position des sondes universelles et des sondes spécifiques aux souches <i>L. johnsonii</i> et <i>B. adolescentis</i> .....	93
Tableau XIII:	Croissance de <i>L. johnsonii</i> et <i>B. adolescentis</i> sur les milieux gélosés étudiés .....	101
Tableau XIV:	Variation de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) détectée par FL3 en fonction du protocole utilisé pour traiter la culture de <i>L. johnsonii</i> ATCC 332, utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre.....	107
Tableau XV:	Variation de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) détectée par FL3 en fonction du protocole utilisé pour traiter la culture de <i>B. adolescentis</i> ATCC 15703, utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre.....	110
Tableau XVI:	Variation de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) détectée par FL1 en fonction du protocole utilisé pour traiter la culture de <i>L. johnsonii</i> ATCC 332, utilisant les sondes fluorescentes LACTO, EUB et NON.....	113

Tableau XVII: Variation de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) détectée par FLI en fonction du protocole utilisé pour traiter la culture de <i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703, utilisant les sondes fluorescentes BIF, EUB et NON.....	116
Tableau XVIII: Comparaison des nombres d'événements de la souche <i>L. johnsonii</i> avant et après l'étape d'hybridation obtenus par cytométrie, utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre.....	121
Tableau XIX: Nombre d'événements en fonction du temps de la sonication de la souche <i>L. johnsonii</i> ATCC 332, utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre.....	125
Tableau XX: Variation du nombre d'événements en fonction du temps de la sonication de la souche <i>B. adolescentis</i> ATCC 15703, utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre.....	129
Tableau XXI: Comparaison des IMF obtenues par cytométrie de 8 heures et 24 heures de croissance de la souche <i>L. johnsonii</i> , utilisant les sondes fluorescentes (EUB, NON et LACTO).....	133

## LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Schéma anatomique du tube digestif humain .....9
Figure 2 :	Évolution de la flore intestinale selon la position anatomique (d'après Holzapfel <i>et al.</i> , 1998, modifié) ..... 10
Figure 3:	La densité bactérienne dans les divers segments du tube digestif humain (d'après Flandrois <i>et al.</i> , 2001)..... 11
Figure 4:	Comparaison de la colonisation intestinale lors d'allaitement maternel et d'alimentation artificielle (Adapté de: Pediatrics 1983 ; 72 (3): 319)....18
Figure 5:	Évolution de la flore du côlon avec l'âge (d'après Mitsuoka, 1990).....21
Figure 6:	Microflore bénéfique et nuisible (d'après Mitsuoka, 1992).....26
Figure 7:	Approche pharmacologique des effets des probiotiques ou de leurs principes actifs dans le tractus digestif (d'après Marteau et Ramb. 1998).....34
Figure 8:	Les 2 gaines liquides assurant le déplacement et le positionnement cellulaire (A), schéma général de la fluidique (B) et principe du cytomètre de flux (C).....49
Figure 9 :	La lumière diffusée vers l'avant (Forward Scatter) reflète la taille (A), la lumière diffusée à 90° (Side Scatter) reflète la granulosité et le rapport nucléo-plasmique (B) et principe de la fluorescence (C) .....52
Figure 10:	Exemples d'histogrammes de profil de dispersion et des signaux de fluorescence de cytométrie de flux.....53
Figure 11:	Schéma général de l'hybridation <i>in situ</i> (tiré de Morel et Cavalier, 1998).....63
Figure 12:	Parois cellulaires des bactéries Gram positives (tiré par McKenna et Mondal, 1996, Long Island University, Brooklyn Campus).....65
Figure 13:	Principe du microscope à épifluorescence .....74
Figure 14:	<i>Lactobacillus acidophilus</i> . Observation en microscopie électronique...82
Figure 15:	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> . Observation en microscopie électronique à balayage ou MEB (échelle = 1 $\mu$ , grosseur= 91 Ko) .....84
Figure 16:	Système d'ébullition du milieu de culture sur des colonnes réfrigérantes.....89
Figure 17:	Barbotage du milieu de culture dans des bouteilles sérologiques avec un mélange gazeux contenant 10 % d'H <sub>2</sub> , 10 % de CO <sub>2</sub> et 80 % de N <sub>2</sub> ..... 90



Figure 18:	Croissance de la souche <i>L. johnsonii</i> en fonction du temps en culture pure sur MRS+++ (A) ainsi que de la souche <i>B. adolescentis</i> sur MRS+++ et MRSLC (B et C).....	103
Figure 19:	Profil de dispersion (A) des signaux de fluorescence (avec le bromure d'éthidium) obtenus par les différents protocoles testés et de l'autofluorescence des cellules <i>L. johnsonii</i> (B).....	106
Figure 20:	Profil de dispersion (A) des signaux de fluorescence (avec le bromure d'éthidium) obtenus par les différents protocoles testés et de l'autofluorescence des cellules <i>B. adolescentis</i> (B) .....	109
Figure 21:	Signaux de fluorescence des sondes spécifique (LACTO), universelle (EUB), non spécifique (NON) obtenus par les différents protocoles testés pour la souche <i>L. johnsonii</i> en culture pure.....	112
Figure 22:	Signaux de fluorescence des sondes spécifique (BIF), universelle (EUB), non spécifique (NON) obtenus par les différents protocoles testés pour la souche <i>B. adolescentis</i> en culture pure .....	115
Figure 23:	Souches <i>L. johnsonii</i> (A) et <i>B. adolescentis</i> (B) en culture pure après l'étape d'hybridation et addition du bromure d'éthidium et observée par microscopie à épifluorescence (grossissement 1000X pour <i>L. johnsonii</i> et 400X pour <i>B. adolescentis</i> ).....	118
Figure 24:	Profils de dispersion avant l'étape d'hybridation (A), présenté en 3 dimensions (B) et après l'étape d'hybridation (C), en 3 dimensions (D) pour la souche <i>L. johnsonii</i> ATCC 332 .....	120
Figure 25:	Profils de dispersion sans sonication (A), avec sonication avant l'étape d'hybridation (B), avec sonication 4 minutes (C), 6 minutes (D), 8 minutes (E) et 10 minutes (F) après l'étape d'hybridation de la souche <i>L. johnsonii</i> ATCC 332, utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre.....	122
Figure 26:	Variation du nombre d'événements en fonction du temps de la sonication de la souche <i>L. johnsonii</i> ATCC 332, utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre.....	123
Figure 27:	Profils de dispersion A, B, C, D et E en 3 dimensions de la souche <i>L. johnsonii</i> ATCC 332, utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre.....	126
Figure 28:	Profils de dispersion sans sonication (A), avec sonication avant l'étape d'hybridation (B), avec sonication 2 minutes (C), 4 minutes (D) et 6 minutes (E) après l'étape d'hybridation de la souche <i>B. adolescentis</i> ATCC 15703, utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre .....	127
Figure 29:	Variation du nombre d'événements en fonction du temps de la sonication de la souche <i>B. adolescentis</i> ATCC 15703, utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre.....	130

Figure 30:	Profils de dispersion A, B et C en 3 dimensions de la souche <i>B. adolescentis</i> ATCC 15703, utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre.....	131
Figure 31:	Signaux de fluorescence des sondes spécifique, universelle, non spécifique obtenus par hybridation de culture de <i>L. johnsonii</i> après 8 heures et 24 heures de croissance, et de l'autofluorescence des cellules .....	134
Figure 32:	Profils de dispersions des souches <i>L. johnsonii</i> et <i>B. adolescentis</i> en mélange, et du signal de fluorescence des sondes spécifiques (LACTO et BIF).....	135

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	: acide désoxyribonucléotidique
ADNc	: acide désoxyribonucléotidique complémentaire
ADNr	: acide désoxyribonucléotidique ribosomal
AGCC	: acides gras à chaînes courtes
AP-PCR	: arbitrarily primed-PCR
ARN	: acide ribonucléique
ARNr	: acide ribonucléique ribosomal
ATCC	: American type culture collection
C	: cytosine
cFDA	: carboxyfluorescéine diacétate
cPCR	: competitive PCR
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-phenylindole
DGGE	: denaturing gradient gel electrophoresis
DiBAC <sub>4</sub>	: 1,3-dibarbituric acid
DO	: densité optique
FCM	: flow cytometry
FISH	: fluorescent <i>in situ</i> hybridization
FITC	: fluorescein isothiocyanate
FS	: forward scatter
FV	: facteur V
g	: gramme
G	: guanine
GACs	: germ-free animal characteristics
GALT	: gut-associated lymphoid tissue
IDF	: fédération internationale laitière
IgA	: immunoglobulin A
IgG	: immunoglobulin G
IgM	: immunoglobulin M
ILSI	: international life science institute
IMF	: intensité moyenne de fluorescence
L	: litre
LAB	: lactic acid bacteria

LGP	: <i>Lactobacillus</i> group probe
LH-PCR	: length heterogeneity PCR
MACs	: microflora-associated characteristics
MMP	: matrix metalloproteinases
MRS	: De Man-Rogosa-Sharpe
N	: nombre des bactéries
NK	: cellules tueuses naturelles
NYA	: national yogurt association
PBS	: Phosphate buffered saline
PCR	: polymerase chain reaction
PFGE	: pulsed field gel electrophoresis
PMT	: photomultiplicateur
PNA	: peptide nucleic acid
p/v	: poids/volume
RAPD	: random amplification of polymorphic DNA
RT-PCR	: reverse transcriptase PCR
sIgA	: secretory IgA
sp.	: species
SS	: side scatter
TgF-beta	: transforming growth factor beta
TGGE	: temperature gradient gel electrophoresis
Th1	: système de régulation
Th2	: système de défense
TNF-alpha	: tumor necrosis factor alpha
T-RFLP	: terminal restriction fragment length polymorphism
TRFPs	: terminal restriction fragment patterns
UFC	: unité formant des colonies
v/v	: volume/volume

## RÉSUMÉ

Grâce à des expériences nombreuses et riches d'informations révélatrices, le voile est en voie d'être levé sur l'effet qu'ont les bactéries endogènes, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sur le système digestif. On peut désormais leur attribuer un rôle indéniable, bénéfique pour la santé humaine. Cependant, *Lactobacillus johnsonii* et *Bifidobacterium adolescentis* sont deux bactéries symbiotiques de la microflore gastro-intestinale endogène de l'homme. La colonisation de l'intestin s'effectue dans les heures qui suivent la naissance, et se poursuit toute la vie. Elles sont présentes en grandes quantités (entre  $10^8$  et  $10^{11}$  bactéries/g de matière colique) et sont considérées comme dominantes parmi plus de 400 espèces bactériennes qui composent la microflore du côlon. Ces deux bactéries jouent un rôle très important pour la santé humaine en aidant notamment à la digestion des aliments, en synthétisant des vitamines essentielles et en prévenant la prolifération des pathogènes. Elles ont également plusieurs vertus probiotiques potentielles, en particulier des effets anti-microbiens, immunomodulateurs, de réduction du risque de cancer, et elles influencent l'équilibre de la microflore intestinale une fois ingérées en quantité suffisante. Les lactobacilles et les bifidobactéries sont les plus utilisées comme probiotiques dans les aliments fonctionnels à cause de leur capacité de survie élevée durant leur passage le long du tube digestif. De plus, ce sont des bactéries lactiques qui sont utilisées en alimentation humaine et sont à la base de la fabrication des produits laitiers, carnés, végétaux et de la pêche. Elles sont également utilisées comme perspectives biofonctionnelles dans les produits pharmaceutiques pour une thérapie probiotique. Afin d'estimer les variations des populations de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* avec l'état sanitaire de l'Homme et de connaître quels sont les dosages de probiotiques les mieux adaptés à chacune des pathologies, le dénombrement de ces bactéries se révèle comme un paramètre important à étudier.

Vue leur importance en santé et en maladie des êtres humains, l'étude de ces bactéries a été le sujet de centaines d'articles publiés depuis Pasteur (1885) qui estimait que la vie est impossible sans bactéries. Mais leur étude nécessite des outils

d'investigation très spécifiques et se heurte à de nombreux obstacles méthodologiques et par suite leur connaissance reste restreinte. Certains chercheurs ont développé des milieux de culture spécifiques. Or ces milieux, soit qu'ils inhibent partiellement les souches étudiées, soit ils sont insuffisamment sélectifs, soit qu'ils ne sont pas adaptés à l'emploi dans un laboratoire de routine car leur préparation est fastidieuse, soit qu'ils sont complexes par utilisation, par exemple, des antibiotiques, des agents inhibiteurs et des sangs humain et animal. D'autres chercheurs ont utilisé les techniques modernes de biologie moléculaire dont l'amplification par PCR, PCR-DGGE et la technique de l'hybridation *in situ* de sondes couplées à un fluorochrome (FISH). Plus récemment, la cytométrie de flux est utilisée pour dénombrer et détecter les bactéries vivantes.

Les objectifs de ce travail étaient en premier lieu de développer un milieu de culture sélectif simple qui favorise la croissance de *Bifidobacterium adolescentis* et inhibe la croissance de *Lactobacillus johnsonii*, et d'en effectuer une étude comparative de la croissance sur d'autres milieux électifs; en second lieu de détecter et dénombrer ces deux souches bactériennes de type Gram positif par hybridation *in situ* en combinaison avec la cytométrie de flux (FISH-FCM).

Dans ce projet de recherche, nous avons utilisé des milieux de culture, MRS+++ comme milieu électif pour *Lactobacillus johnsonii* et *Bifidobacterium adolescentis*, et MRSLC, développé dans cette étude, comme milieu sélectif et reproductif pour *B. adolescentis* dont le chlorure de lithium est l'agent inhibiteur. Ce milieu est simple en comparaison avec les autres milieux publiés dans la littérature. La croissance de la souche *Bifidobacterium adolescentis* sur MRSLC a été comparée avec sa croissance sur un autre milieu électif MRS+++ . L'utilisation de ces milieux nous permet d'obtenir des informations sur la présence et l'abondance des microorganismes d'intérêt. Ce sont des milieux simples, faciles à préparer et, dont le temps de croissance est de 24 heures. Puisque le temps est un facteur critique, une nouvelle technique a été optimisée pour contourner l'étape de culture afin d'effectuer des analyses à haute vitesse, multiparamétriques et automatisées. La technique de l'hybridation *in situ* en combinaison avec la cytométrie de flux (FISH-FCM) a été utilisée pour la première fois afin de détecter ces deux bactéries à Gram positif de la microflore gastro-intestinale en

cultures pures. L'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* combinée à la cytométrie de flux a permis de détecter avantageusement les deux bactéries de type Gram positif *L. johnsonii* et *B. adolescentis* en culture pure. Cette technique optimisée est basée sur la fixation à la paraformaldéhyde 3% pendant 16 heures, la perméabilisation à l'alcool 50%, la dispersion des cellules par l'utilisation du pyrophosphate et de la sonication avant et après l'hybridation réalisée à 50 °C pendant 16 heures, et la détection des cellules fluorescentes par FCM. De plus, l'utilisation de la cytométrie de flux a permis d'effectuer des analyses rapides et automatisées. Par contre, bien que la technique ait réussi à détecter les deux souches en culture pure, elle a aussi confirmé une importante corrélation de la réussite de la technique avec la dispersion des cellules et la phase de croissance de culture.

---

Mariam Hajj-Mohamad  
Étudiante

---

Darakhshan Ahmad  
Directeur de recherche

# INTRODUCTION

Tous les mammifères, y compris l'Homme, sont adaptés pour vivre dans un monde de bactéries. Pasteur, Koch, Metchnikoff et Escherich ont posé les bases de notre compréhension actuelle des interactions de cette flore avec son hôte (De Kruif et Paul, 1926). Pasteur a postulé que les microbes sont nécessaires pour la vie humaine normale (Schottelius, 1902). Metchnikoff a proclamé que la composition de la flore est essentielle pour le bien-être de l'hôte et a souligné l'importance des interactions entre l'hôte et les bactéries (Metchnikoff, 1908; Metchnikoff, 1910). Escherich a été convaincu que la connaissance précise de la flore endogène était essentielle, non seulement pour comprendre la physiologie de la digestion mais également pour comprendre la pathologie et la thérapie des maladies intestinales microbiennes (Escherich, 1885). En dépit de ces premières perspicacités, les scientifiques ont développé tout récemment les méthodes qui leur permettent de caractériser directement les mécanismes moléculaires fondamentaux pour l'établissement et l'entretien de divers écosystèmes microbiens situés sur nos surfaces muqueuses au cours de l'évolution. Donc, l'humain participe à une forme de symbiose avec des micro-organismes tout au long de son cycle de vie. Que ce soit sur la peau, dans la bouche ou dans l'intestin qui est le principal réservoir, l'être humain est l'hôte de milliards de microbes qui vivent la plupart du temps en relation paisible avec lui. Bon nombre de ces micro-organismes ont eu avantage, ne serait-ce que pour défendre leur niche écologique, à aider leur hôte à se maintenir en santé. C'est ainsi que plusieurs types de micro-organismes symbiotiques compétitionnent avec des pathogènes potentiels au niveau de l'épiderme, du vagin ou du tube digestif. La complexité de l'écosystème que forme la microflore intestinale est comparable à n'importe quel autre écosystème retrouvé dans la nature, et tout déséquilibre qui ferait obstacle à cette relation symbiotique deviendrait ainsi fort dommageable pour l'hôte. De plus, des bactéries sont responsables de la synthèse de vitamines dans l'intestin, et d'autres peuvent également métaboliser des toxines et autres déchets nocifs pour l'hôte.



Une proportion importante de la flore microbienne dans le tube digestif se compose d'un grand nombre de bactéries anaérobies diverses qui ne peuvent pas être cultivées sur les milieux sélectifs ou non sélectifs existants. La culture en condition anaérobie entraîne également des études limitées et lentes sur la dynamique de population. Par conséquent, l'utilisation des méthodes moléculaires pour analyser l'écosystème gastro-intestinal permet une évaluation plus complète et plus rapide de la biodiversité dans cet écosystème (Paster *et al.*, 2001; Suau *et al.*, 1999; Franks *et al.*, 1998; Zoetendal *et al.*, 1998; Rosenbaum et Riesner, 1987).

Quoique différentes espèces de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus*; espèces prédominantes, furent isolées dans toutes les parties du système gastro-intestinal humain (Molin *et al.*, 1993), l'iléon terminal et le colon semblent être les emplacements préférentiels de la colonisation des lactobacilles (Hirtzmann et Reuter, 1963; Lerche et Reuter, 1962) et des bifidobactéries (Fuller, 1991), respectivement. Différentes espèces de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus* constituent également une proportion significative de cultures probiotiques utilisées dans les pays développés dans (*microbial adjunct nutrition*) (Charteris *et al.*, 1997; Gibson et Roberfroid, 1995; Fuller, 1992) et sont prises en compte dans des nouvelles théories en matière de nutrition et de santé (Rao, 2002). Le mot « probiotique » fait référence à l'administration de bactéries spécifiques dont la prépondérance dans le gros intestin exercerait un effet bénéfique sur la santé humaine ou animale (Rao, 2002).

La disponibilité de plusieurs méthodes traditionnelles, telle que la culture sur des milieux de sélection, pour l'identification et l'énumération de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, est par conséquent importante en microbiologie environnementale et nutritionnelle (Charteris *et al.*, 1997). Cependant, les bifidobactéries sont difficiles à cultiver à cause de leur physiologie anaérobie stricte et des conditions complexes pour leur croissance. La première partie de ce projet consiste en le développement d'un milieu de culture sélectif simple pour la souche *Bifidobacterium adolescentis* utilisée, entre autre, comme indicateur de la contamination fécale d'origine humaine (Resnick et Levin, 1981).

La biologie moléculaire propose des moyens de contourner la difficulté de l'étape de culture par l'utilisation de sondes moléculaires. L'hybridation *in situ* est une méthode alternative moderne qui permet la détection de bactéries spécifiques. Elle consiste en l'hybridation d'une sonde d'ADN spécifique à l'ARN 16S ribosomal ou à d'autres gènes spécifiques de la bactérie. La sonde est couplée à un fluorochrome afin d'être détectée par un appareil détectant et mesurant la fluorescence. L'hypothèse de recherche de la deuxième partie de ce projet consiste donc en l'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* afin de suivre et de quantifier la concentration des deux souches bactériennes de type Gram positif de la microflore gastro-intestinale en culture pure.

Les objectifs de ce projet de maîtrise étaient 1) de développer un milieu de culture sélectif simple pour la souche *B. adolescentis*; 2) d'optimiser la technique d'hybridation *in situ* en culture pure en milieu liquide pour les deux souches étudiées, *L. johnsonii* et *B. adolescentis* afin de les détecter par cytométrie de flux.

La première section de ce mémoire, le chapitre 1, est consacrée à une revue des différents sujets reliés aux phénomènes décrits dans ces pages. Elle comprend sept parties, la première traitant de la microflore gastro-intestinale endogène, la deuxième du suivi microbien de la microflore par différentes techniques classiques et modernes; la troisième de l'importance du développement des techniques simples capables de détecter et dénombrer les bactéries de la microflore intestinale; la quatrième des objectifs de ce travail de recherche; la cinquième de l'importance de choisir *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* comme sujet de cette étude; la sixième de la méthodologie utilisée pour le suivi microbien de ces deux genres dans la littérature, et la septième des souches bactériennes de la microflore gastro-intestinale à l'étude, ainsi que leurs caractéristiques et taxonomie. La seconde section, le chapitre 2, contient les protocoles expérimentaux utilisés pour rencontrer les objectifs énumérés ci haut. Les matériels et techniques y sont décrits en détails. La troisième section, le chapitre 3, regroupe les résultats des expériences, principalement présentés sous forme de graphiques. Un texte explicatif accompagne ces données. La quatrième section, le chapitre 4, constitue une tentative d'interpréter les résultats obtenus, pour les mettre en

relation avec les connaissances actuelles et discuter des perspectives futures dans le domaine.

# CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE

En 1885, Pasteur estimait que l'évolution avait rendu les organismes supérieurs incapables de vivre en l'absence de flore, et par conséquent, la vie n'est pas possible sans bactérie (Schottelius, 1902). Le tractus intestinal représente le principal réservoir à bactéries du corps humain. On estime que 400 à 500 espèces différentes de bactéries se trouvent dans le gros intestin, pour une population totale vivante de  $10^{14}$  à comparer aux  $10^{13}$  cellules composant le corps humain (Falk *et al.*, 1998; Berg, 1996; Conway, 1995 ; Luckey et Floch, 1972). Cela signifie que l'on héberge dans notre tube digestif 10 fois plus de bactéries que de cellules constituant notre organisme (Falk *et al.*, 1998; Ducluzeau, 1994; Zetterström *et al.*, 1994; Savage, 1977). La microflore du tractus gastro-intestinal est donc caractérisée par sa grande diversité de populations (Conway, 1995) et par la complexité de leurs interactions. Elle diffère selon l'espèce et l'individu et évolue avec l'âge et l'alimentation (Tannock *et al.*, 1982). Toute modification de l'un ou l'autre de ses constituants est susceptible de perturber l'équilibre et le fonctionnement de l'ensemble. Donc, la microflore du tractus gastro-intestinal joue un rôle important pour la santé chez l'homme ( Saloff-Coste, 1997).

Les relations entre le tractus digestif et sa flore sont difficiles à observer. À l'heure actuelle, plusieurs types d'outils permettent cependant de mieux connaître la flore digestive, de mieux comprendre ses fonctions et ses interactions.

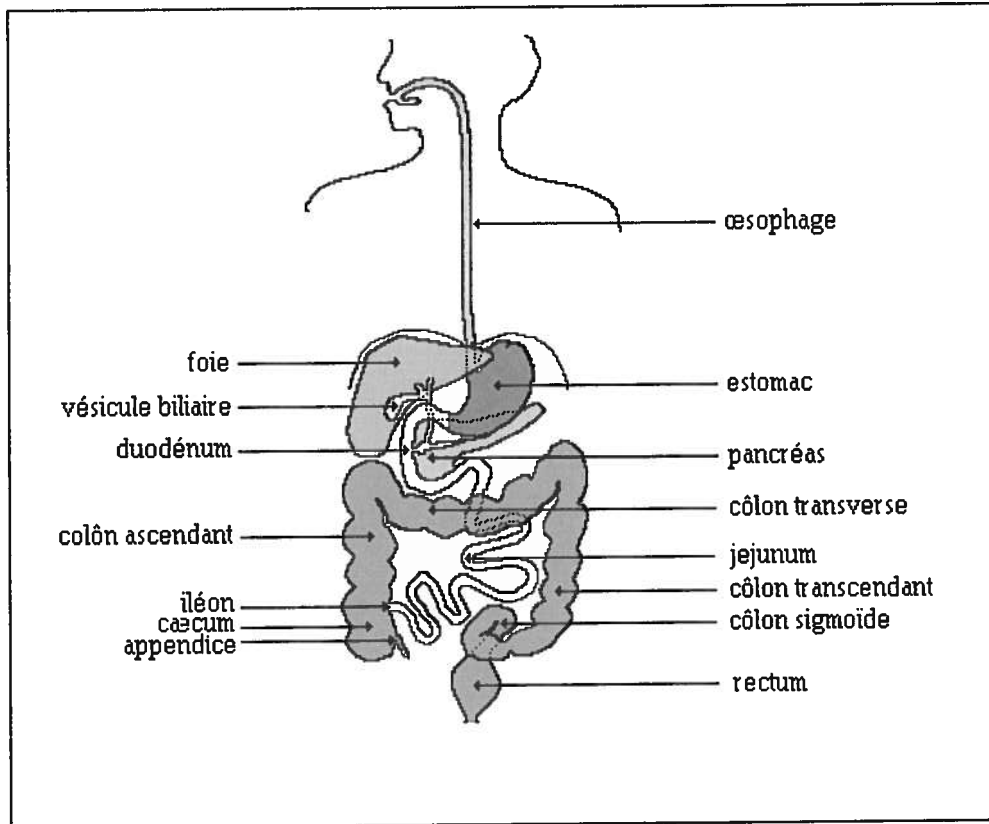
## 1.1 Tube digestif humain et la microflore du tractus digestif

La figure 1 décrit l'anatomie du tube digestif humain. Les segments du tube sont successivement la cavité buccale, l'oesophage, l'estomac, l'intestin grêle, le côlon et le rectum. La surface de l'intestin, 150 à 200 m<sup>2</sup> au total, constitue une énorme surface d'échanges avec l'environnement. Dans des conditions normales, la cavité buccale et le tractus gastro-intestinal sont colonisés par une flore complexe.

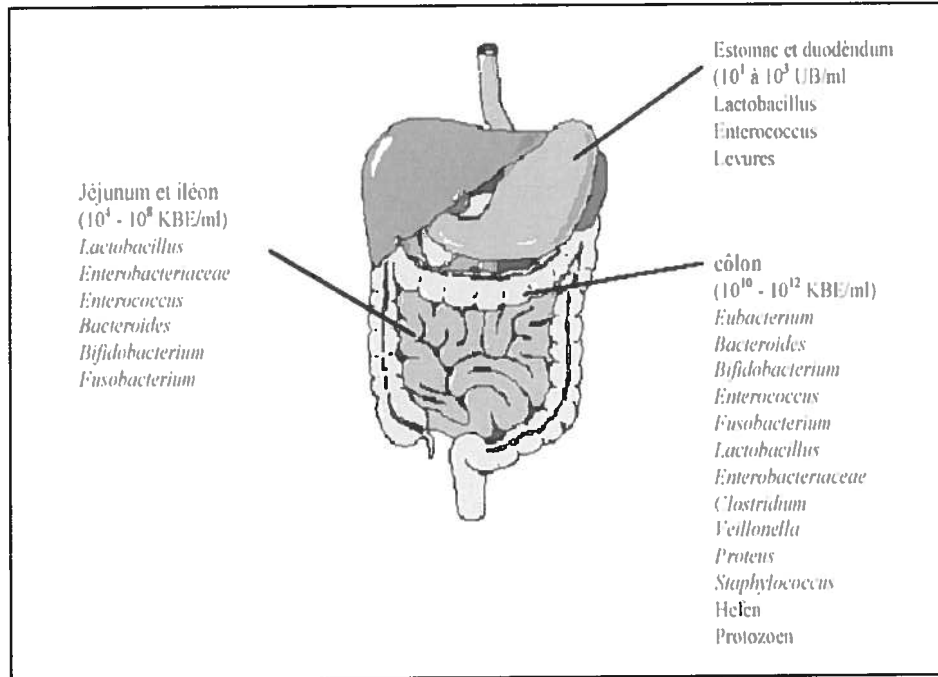
### 1.1.1 Répartition topographique de la flore digestive humaine

La répartition de la flore varie selon les segments du tube digestif (Fig. 2 et 3).

**Figure 1: Schéma anatomique du tube digestif humain**

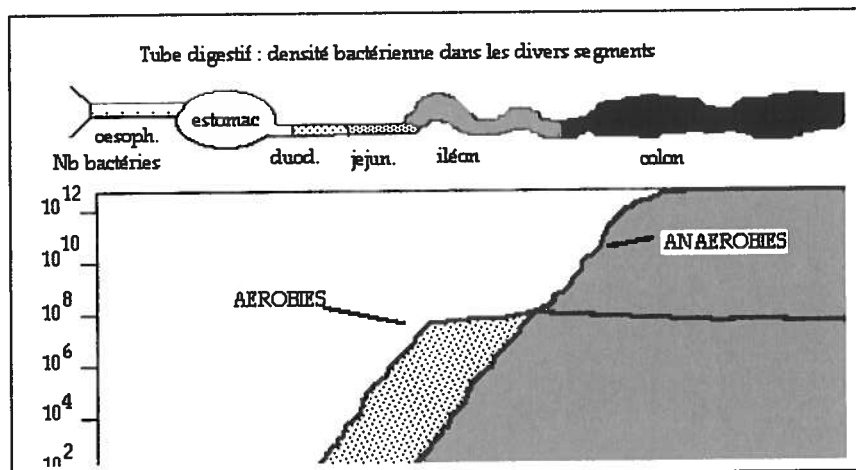


**Figure 2: Évolution de la flore intestinale selon la position anatomique (d'après Holzapfel *et al.*, 1998, modifié)**



Les genres y sont mentionnés dans l'ordre de leur fréquence.

**Figure 3: La densité bactérienne dans les divers segments du tube digestif humain (d'après Flandrois, 1997)**



Elle dépend de la teneur du milieu en oxygène, des sécrétions du tube digestif haut, des nutriments disponibles et de la vitesse du transit (rapide de la bouche au caecum, plus lent ensuite). Globalement il existe un gradient croissant oral-aboral (Bourlioux, 1998). Normalement, la flore présente dans la bouche, surtout composée d'espèces des genres *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* est peu active car le temps de transit buccal est court, est comprise entre  $10^7$ /mL et  $10^9$ /mL environ. L'estomac contient très peu de bactéries résidentes ( $<10^3$  unités formant des colonies (UFC) / g) composées d'espèces des genres *Lactobacillus* et *Enterococcus* ainsi que des levures) (Tableau I). La flore est quasi inexistante en raison de son pH bas, autour de 2 (Marteau *et al.*, 1993). L'estomac est traversé par un flux constant de micro-organismes introduits par la bouche et le nez, provenant aussi bien de l'environnement que de l'alimentation, solide ou liquide. Dans l'intestin grêle, on observe une variation quantitative et qualitative. L'intestin grêle supérieur ou duodénum contient également relativement peu de micro-organismes,  $10^3$ - $10^4$  UFC/g,  $10^4$ - $10^6$  UFC/g dans le jéjunum et  $10^6$ - $10^8$  UFC/g dans l'iléon (Tableau I) (Salminen *et al.*, 1995). Dans l'intestin grêle, le péristaltisme fait avancer les bactéries et les empêche de proliférer dans cette région (Ducluzeau, 1994). Des études *in vitro* ont montré que les sels biliaires peuvent également inhiber la croissance de la flore, mais ceci n'a pas été démontré *in vivo* (Ducluzeau, 1997). A proximité de l'intestin grêle inférieur, le nombre de bactéries à Gram positif et négatif, anaérobies strictes ou facultatives, augmente au profit des bactéries aérobies. Au niveau de l'iléon distal, les bactéries à Gram négatif anaérobies stricts deviennent prédominantes et, dès que l'on arrive au côlon, le nombre et la variété des anaérobies stricts augmentent très fortement. Dans le côlon, le transit, très fortement ralenti, est à l'origine d'une stase d'où l'augmentation importante de la population bactérienne de  $10^9$  à  $10^{11}$  UFC/g (Tableau I) (ce nombre reflète la composition de la microflore du côlon descendant) (Ducluzeau, 1997). C'est une véritable chambre de fermentation, siège de très nombreuses biotransformations des aliments non assimilés au niveau du grêle. Le côlon est la seule zone colonisée de façon permanente: la flore microbienne essentiellement anaérobie est dense et active, produisant localement de nombreux métabolites, les acides gras à chaînes courtes (Mackie *et al.*, 1999; Bourlioux, 1998). Il



**Tableau I: Flore normale des voies digestives chez l'homme (d'après Falk *et al.*, 1998; Moore et Holdeman, 1974)**

Localisation	Quantité /g de matériel	Anaérobie / aérobie
Estomac	$<10^3$	0
Duodénum	$10^3-10^6$	0
Jéjunum	$10^5-10^8$	0
Iléon	$10^5-10^8$	0-1
Iléon terminal	$10^9-10^{11}$	1-10
Côlon	$10^{10}-10^{11}$	100-1000

existe des disparités entre les différentes parties du côlon : étant donné que le côlon proximal accède à une plus grande quantité d'aliments, il présente de ce fait une activité métabolique plus importante que le côlon distal (Gibson *et al.*, 1995). Notez alors l'importance croissante des anaérobies le long du tube digestif (Fig. 3). La flore fécale atteint  $10^{12}$  UFC/g de selles. La flore intestinale résidente est essentiellement anaérobie et minoritairement (100 fois plus faible) aérobie ou anaérobie facultative (Flandrois, 1997).

### 1.1.2 Composition classique d'une flore intestinale humaine

On peut définir, de façon "simpliste", une flore normale par l'ensemble des espèces présentes dans l'écosystème de façon constante et capables de s'y multiplier dans les conditions environnementales du tube digestif. Mais il existe de très grandes variations dans les résultats publiés, selon les modes de prélèvement, les méthodes microbiologiques, la présence éventuelle de bactéries d'origine alimentaire, la physiologie intestinale et le contexte environnemental. On est loin de connaître toutes les espèces et leurs différents types, donc de bien appréhender les variations de flore induites par les modifications de régime alimentaire, les bactéries exogènes, les substances antibiotiques. Bien que la microflore humaine présente globalement une même composition, chaque individu a sa propre microflore caractéristique (Kimura *et al.*, 1997 ; Marteau *et al.*, 1993). Des différences ont été trouvées dans la composition de cette société microbienne parmi les différentes espèces de mammifère par exemple, entre les ruminants et les non ruminants et entre les omnivores et les carnivores (Falk *et al.*, 1998 ; Smith et Crabb, 1961).

Les bactéries habituellement présentes dans l'intestin grêle appartiennent aux genres : *Lactobacillus*, *Streptococcus* (Mackie *et al.*, 1999), et à quelques espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* à des concentrations faibles jusqu'à l'iléon où elles apparaissent dominées par des espèces anaérobies à Gram négatif appartenant au genre *Bactéroïdes*.

Dans le côlon, il faut distinguer 4 types de flore (Tableau II) : **flore dominante** ( $N > 10^9$  UFC/g) exclusivement anaérobie : *Bactéroïdes*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*,

**Tableau II: Microorganismes les plus fréquents du côlon chez l'homme**

Groupe taxonomique	Espèces les plus fréquentes
<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Eubacterium</i>	<i>Eubacterium aerofaciens</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Fusobacterium, Neisseria</i>	
<i>Veillonella, Staphylococcus</i>	
<i>Peptococcus, Propionebacterium</i>	
<i>Saccharomyces, Candida</i>	

*Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, **flore sous dominante** ( $10^6 > N > 10^8$  UFC/g) : différentes espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* (surtout *E.coli*) et les genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Desulfovibrio*, *Methanobrevibacter* (Marteau *et al.*, 1993), **flore résiduelle** ( $N < 10^6$  UFC/g) : bactéries en transit ou réprimées par la flore résidente, et **flore fécale** : facilement accessible pour l'analyse, elle a été très étudiée, mais elle ne reflète que l'équilibre présent dans la dernière partie du côlon, même si l'on y trouve la population bactérienne présente dans les segments antérieurs. L'analyse de la flore fécale permet de retrouver des souches pathogènes ou potentiellement pathogènes pour l'hôte (Ducluzeau, 2000). L'étude comparative des écosystèmes bactériens caecal et fécal chez l'homme a montré que le nombre des bactéries anaérobies strictes, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, et les membres du groupe *Clostridium coccoïdes* et sous-groupe *Clostridium leptum* étaient inférieurs dans le caecum. Les bactéries anaérobies facultatives ont représenté 25% de bactéries totales dans le caecum contre 1% dans les matières fécales (Marteau *et al.*, 2001). Donc l'analyse de la flore fécale ne donne qu'une vue très limitée de l'écosystème (Zoetendal *et al.*, 2002). Mais selon Tannock et son équipe, la composition de la microflore fécale reflète celle du colon (Tannock, 1999 ; Moore et Holdeman, 1978). On retrouve des lactobacilles dans toutes les portions du tube digestif, même s'ils ne constituent pas toujours le groupe dominant.

### 1.1.3 Évolution de la microflore intestinale avec l'âge

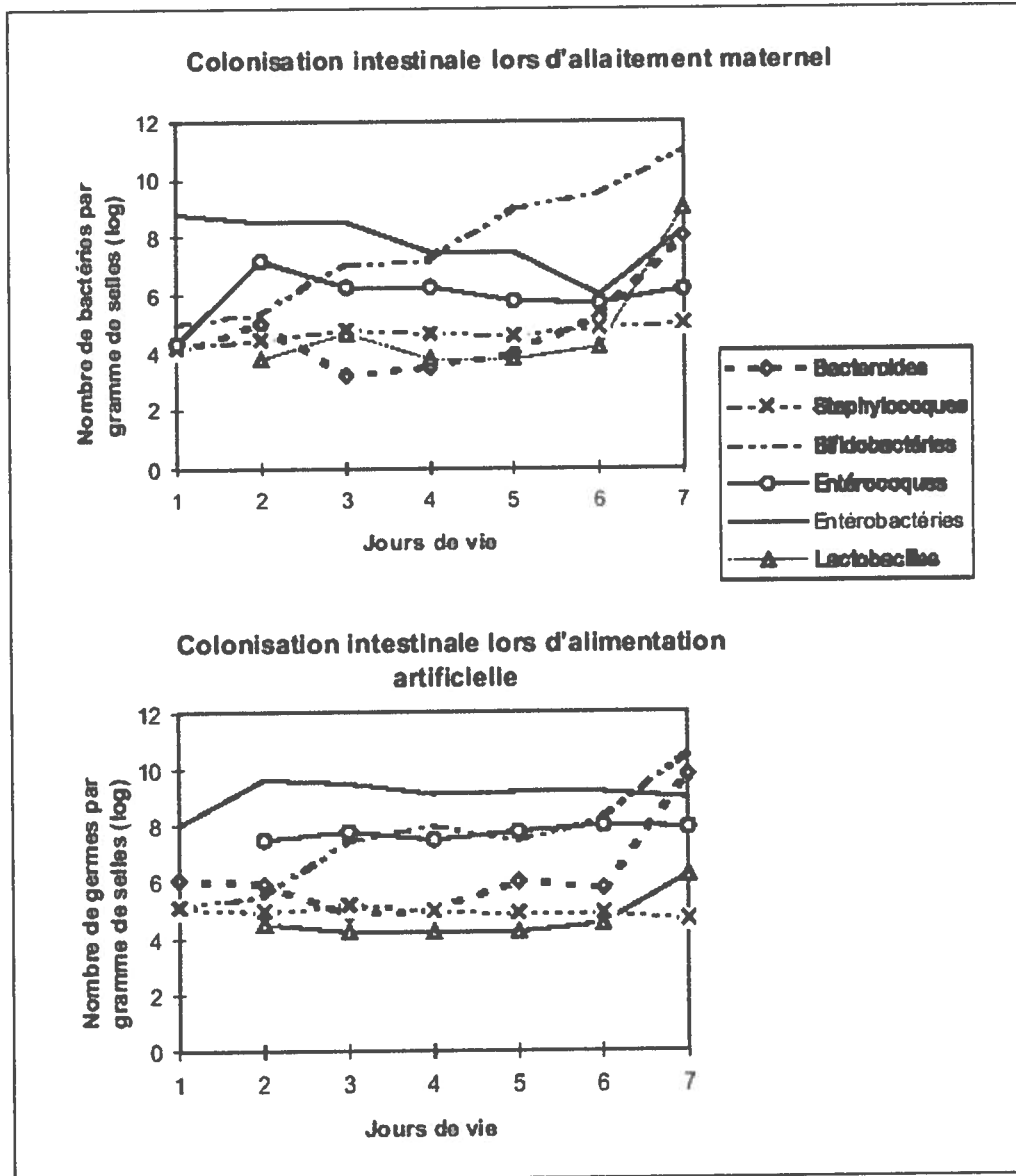
Dans les heures qui suivent la naissance, le tube digestif du nouveau-né, précédemment stérile, atteint un équilibre entre bactéries aérobies et anaérobies (Saloff-Coste, 1997; Zetterström *et al.*, 1994) pour une population comprise entre  $10^9$  et  $10^{11}$  UFC/g au bout de 48 h dans le côlon (Mackie *et al.*, 1999; Mata et Urrutia, 1971). Phénomène complexe, encore mal connu, relativement spécifique à chaque espèce animale, la colonisation s'effectue différemment, selon que l'enfant est né par voie vaginale ou par césarienne (Mackie *et al.*, 1999; Brook *et al.*, 1979; Bettelheim *et al.*, 1974). Bien que la microflore de l'enfant ait pour origine la flore de la mère, elle n'en est pas la réplique exacte (Saloff-Coste, 1997; Ducluzeau, 1993). Un tiers des bébés ont en effet une flore digestive identique à celle de la mère (Barbe *et al.*, 2001). Elle contient

les bactéries appropriées pour l'enfant et est principalement composée de *Enterococci*, *E. coli* non pathogène, *Bifidobacterium* et *Bactéroïdes* (Mackie *et al.*, 1999; Falk *et al.*, 1998; Zetterström *et al.*, 1994; Tannock, 1994). La microflore de l'enfant est simple, mais devient plus complexe avec le temps (Favier *et al.*, 2002).

Par la suite, le type d'alimentation (Fig. 4) influence fortement le développement de la microflore, particulièrement celle du côlon. La microflore de l'enfant est globalement moins complexe que celle de l'adulte, plus sensible à son environnement et a tendance à fluctuer (Saloff-Coste, 1997; Zetterström *et al.*, 1994). Chez les nourrissons exclusivement nourris au lait maternel des femmes sanitaires qui contient plus que  $10^9$  bactéries/L (Mackie *et al.*, 1999; Moughan *et al.*, 1992), les conditions favorisent généralement la croissance et la prédominance des bifidobactéries (90%-100% de la population totale (Falk *et al.*, 1998; Saloff-Coste, 1997; Kok *et al.*, 1996; Kleessen *et al.*, 1995; Bullen *et al.*, 1976), bien qu'on puisse trouver également de fortes teneurs en *Bactéroïdes* (Mackie *et al.*, 1999; Saloff-Coste, 1997; Zetterström *et al.*, 1994). De plus, la principale entérobactérie est *Escherichia coli*. Une explication plus détaillée montre que 12 heures après l'introduction d'une alimentation maternelle, on constate l'apparition des anaérobies facultatifs au niveau digestif, les bifidobactéries et les clostridies étant à ce moment présents chez moins de 50% des enfants, les *Bactéroïdes* chez moins de 30%. Après quelques jours, la quantité de bifidobactéries augmente très rapidement ( $10^{10}$ - $10^{11}$  UFC par gramme de selles) chez 100% des nouveau-nés, parallèlement à une chute du nombre des anaérobies. Les *Bactéroïdes* représentent toujours moins de 30% de la flore présente. Il existe un pic de clostridies entre le 2<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour. Après une semaine de vie déjà, les bifidobactéries représentent plus de 99% de la flore digestive, puisque leur croissance est favorisée par le pH fécal bas permettant leur répliation (Barbe *et al.*, 2001; Mackie *et al.*, 1999).

Chez les enfants nourris par lait artificiel, la colonisation s'est modifiée au cours de ces dernières années. En effet, auparavant, la flore résultant d'une alimentation par lait artificiel ressemblait à celle d'un colon adulte. Actuellement, elle ressemble davantage à celle de l'alimentation par lait maternel, suite à la maternalisation des laits,

**Figure 4: Comparaison de la colonisation intestinale entre l'allaitement maternel et l'alimentation artificielle (Adapté de: Pediatrics 1983; 72 (3): 319)**



les entérobactéries sont plus diverses mais *Lactobacillus* est prédominant (Ducluzeau, 1997). Cependant, si la colonisation primaire (pendant les premières 48 heures) est identique, les bifidobactéries se répliquant toujours rapidement, les autres anaérobies, au contraire, ne diminuent pas (surtout les Gram négatifs). Des clostridies sont retrouvées chez 50-80% des nourrissons de 6 jours, mais ne sont en aucun cas dominantes. Les *Bactéroïdes* sont présentes dans 60-80% des cas avec des taux de  $10^8$ - $10^{10}$  germes par gramme de selles (Fig. 4). La flore est donc plus diverse et moins stable chez les enfants nourris par lait artificiel. L'allaitement a un effet protecteur contre la diarrhée, particulièrement dans les pays en voie de développement (Heinig et Dewey, 1996). Cet effet peut être partiellement associé aux teneurs en *Bifidobactéria*. Chez les nourrissons recevant du lait maternisé, le taux d'anaérobies telles que *Bacteroïdes* a tendance à augmenter (Zetterström *et al.*, 1994) mais, dans ce cas également, il existe des différences importantes entre individus et les *Bifidobactéria* peuvent être prédominantes (Barbe *et al.*, 2001; Mackie *et al.*, 1999).

Pendant la période de diversification alimentaire, la microflore intestinale devient plus complexe et variée (Mackie *et al.*, 1999; Saloff-Coste, 1997; Zetterström *et al.*, 1994). Dès l'âge de deux ans, la composition et le métabolisme de la microflore de l'enfant commence à ressembler à ceux de l'adulte (Saloff-Coste, 1997; Guérin *et al.*, 1997) et devient plus stable. Si la composition de base est spécifique de l'espèce humaine, il existe des différences importantes entre individus en terme d'espèces bactériennes et de quantités (Kimura *et al.*, 1997; Mikelsaar et Mandar, 1993). De plus, bien que la flore adulte soit, dans l'ensemble, relativement stable, les souches spécifiques tendent à varier chez certains individus (Saloff-Coste, 1997; McCartney *et al.*, 1996). Même si la flore reste stable, ses fonctions peuvent varier avec des changements transitoires de composition.

Des variations caractéristiques de composition et de fonctionnement de la microflore pourraient apparaître avec l'âge (Saloff-Coste, 1997; Roberfroid *et al.*, 1995). Selon le groupe de Mitsuoka (Saloff-Coste, 1997; Mitsuoka et Hayawakawa, 1972), une légère diminution des bifidobactéries et une augmentation des *clostridium*, *lactobacillus*, streptocoques et entérobactéries, semblent être associées au vieillissement

(Fig. 5). Dans une autre étude conduite sur une population d'Abkhasie, des personnes très âgées (plus de 90 ans) présentaient des teneurs élevées en *Lactobacilli* et *Bifidobactéria* ( $>10^8$ ) (Saloff-Coste, 1997; Kvasnikov *et al.*, 1984). Par ailleurs, la distribution des espèces du genre *Bifidobacterium* dans la flore fécale d'enfants, d'adultes et de personnes âgées a été étudiée par (Gavini *et al.*, 2001). L'espèce *Bifidobacterium longum* est la plus fréquemment isolée chez l'enfant et l'adulte, *B. adolescentis* chez la personne âgée. La distribution de *B. adolescentis* est significativement différente chez l'enfant et la personne âgée.

#### **1.1.4 Fonction de la microflore colique normale**

Pour étudier les fonctions de la microflore intestinale, il est essentiel de comprendre que les activités des bactéries, ainsi que la composition (genres, espèces, souches) et les quantités en présence sont importantes, car selon Roberfroid et ses collègues (1995), ce sont les activités de la microflore colique qui affectent la physiologie colique en générale et non pas les bactéries elles-mêmes. Un effet de symbiose existe entre la microflore colique et l'hôte. Dans ce partenariat, l'hôte participe activement à la fourniture d'un composant nutritionnel nécessaire à la microflore. La microflore est capable d'indiquer activement à l'hôte le niveau de ses besoins. L'hôte ajuste sa production aux besoins précis de la microflore, limitant ainsi une surproduction qui pourrait être utilisée par des pathogènes.

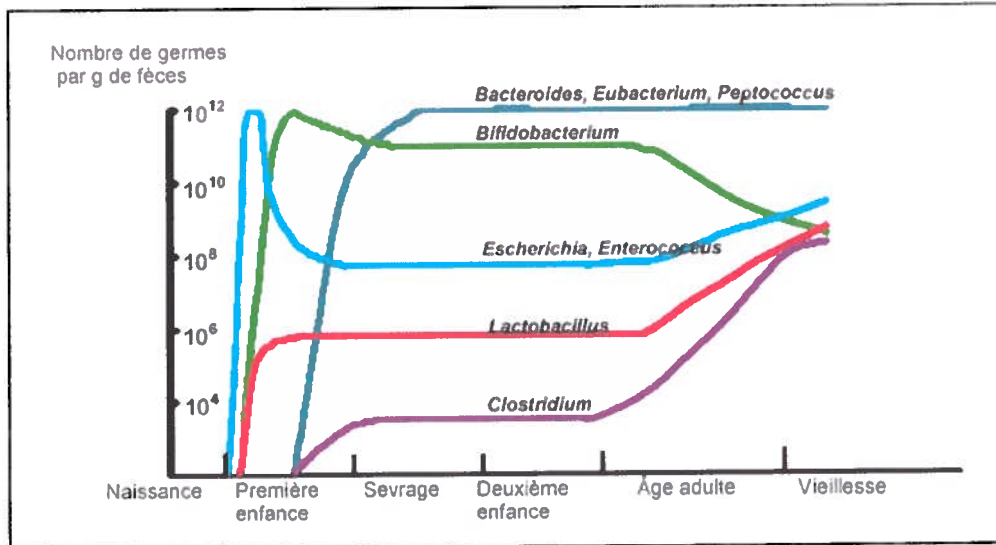
La microflore colique remplit trois fonctions fondamentales: métabolisme, barrière et protection de l'hôte et interactions avec l'hôte (immunomodulation). Elle constitue également une première ligne de défense intestinale. Ces effets peuvent, dans certaines conditions, être augmentés par quelques souches bactériennes probiotiques en transit (bactéries lactiques).

##### **1.1.4.1 Effets sur des paramètres anatomiques, physiologiques et biochimiques du tube digestif**

Des modifications anatomiques, physiologiques et biochimiques du tube digestif liées à la présence de la microflore sont mises en évidence en comparant ce qui se passe



Figure 5: Évolution de la flore du côlon avec l'âge (d'après Mitsuoka, 1990)



chez l'animal conventionnel par rapport à l'animal axénique (dépourvu de germes). Les fonctions anatomiques, physiologiques et biochimiques du tube digestif peuvent se mesurer par différents paramètres. Midtvedt et son équipe ont défini le profil de ces paramètres en présence de flore, qu'ils intitulent MACs (*microflora-associated characteristics*) (Hooper *et al.*, 1998), alors que le profil qui s'exprime en l'absence de flore est appelé GACs (*germ-free animal characteristics*). Le tableau III (Midtvedt, 1999) récapitule certaines études faites sur des animaux en présence et en absence de la flore intestinale. Plusieurs paramètres anatomiques, physiologiques et biochimiques ont été mesurés pour évaluer l'influence de la flore intestinale sur le tube digestif.

#### **1.1.4.2 Effets nutritionnels et digestifs**

Parce qu'il héberge la plus grande quantité de bactéries, le côlon a une grande activité métabolique. Les bactéries ne remplissent pas qu'une seule fonction, mais interagissent en synergie avec les autres bactéries. Leurs activités peuvent conduire à des effets nutritionnels et digestifs bénéfiques aussi bien que nocifs pour l'hôte.

La diversité des bactéries permet la décomposition de pratiquement toutes les substances qui entrent dans le côlon. La décomposition par la microflore des substances non digérées, en particulier les glucides alimentaires non absorbés (e.g., fibres, amidon résistant, sucres non absorbés) (Gibson *et al.*, 1995) et les substances endogènes telles que le mucus conduisent à la production de gaz ( $H_2$ ,  $CO_2$ ,  $CH_4$ ), d'acides gras à chaîne courte (AGCC) (environ 60% d'acétate, 20% de propionate et 20% de butyrate (Rumney *et al.*, 1992; Høverstad, 1989) diminuant ainsi la synthèse hépatique du cholestérol (Falk *et al.*, 1998; Sadzikowski *et al.*, 1977), d'acide lactique, d'acides gras à chaîne ramifiée assimilables par l'hôte, d'éthanol et d'ammoniac (Roberfroid *et al.*, 1995). Les produits de décomposition ont des fonctions nutritives, comme par exemple les AGCC, le butyrate en particulier, et l'acide lactique, qui servent d'apports énergétiques importants pour les colonocytes, les cellules du foie et les tissus périphériques (Roberfroid *et al.*, 1995). Elles peuvent jouer un rôle dans l'hydrolyse des lipides alimentaires non absorbés grâce aux lipases bactériennes et à la conjugaison des acides biliaires primaires, indispensable pour une bonne absorption des graisses (Falk *et*

**Tableau III: Influence de la flore intestinale sur certains paramètres anatomiques, physiologiques et biochimiques du tube digestif chez l'animal (d'après Midtvedt, 1999)**

	Paramètre	Effet des MACs	Effet des GACs
<b>Anatomie / physiologie</b>	Paroi intestinale	Epaisse	Mince
	Cinétiques cellulaires	Rapides	Lentes
	Moteur de migration	Normal	Moindre
	Production de peptides	Normale	Altérée
	Sensitivité aux peptides	Normale	Réduite
	Tailles du cœcum (rongeurs)	Normal	Elargi
	Osmolalité	Normale	Réduite
	Pression oncotique	Normale	Augmentée
	Pression partielle d'oxygène	Basse	Elevée (comme dans les tissus)
	Potentiel électrique	Bas (moins de 100)	Elevé (plus de 100)
<b>Biochimie</b>	Aspartylglycine	Absent	Présent
	Métabolisme des acides biliaires	Déconjugaison Déshydrogénation Déshydroxylation	Pas de déconjugaison Pas de déshydrogénation Pas de déshydroxylation
	Métabolisme de la bilirubine	Beaucoup de déconjugaison Urobiline	Peu de déconjugaison Pas d'urobiline
	Cholestérol	Coprostanol	Pas de coprostanol
	Gaz intestinaux	Dioxyde de carbone Hydrogène Méthane	Un peu de Dioxyde de carbone Peu d'hydrogène Pas de méthane
	Mucine	Dégradation	Pas de dégradation
	Acides gras à courte chaîne	De grandes quantités	Beaucoup moins
	Activité tryptique	Réduite ou absente	Elevée

*al.*, 1998; Midtvedt, 1974), et dans la dégradation de certaines protéines et de certains acides aminés (tryptophane), permettant la récupération de l'azote.

Certaines bactéries anaérobies facultatives (*E.coli*, *E.aerogenes*) sont capables de synthétiser *in vitro* un large éventail de vitamines essentielles (biotine, riboflavine, acide pantothénique, pyridoxine et vitamine K) (Ramotar *et al.*, 1984). Des bactéries anaérobies strictes (*C.butyricum*, *Veillonella* sp.) sont capables de synthétiser la vitamine B12, d'une grande utilité pour la croissance locale bactérienne (Hill, 1997). Il n'existe pas de données précises sur l'utilisation de ces vitamines par l'hôte, notamment par l'homme (Roberfroid *et al.*, 1995; Mitsuoka, 1996).

Par ailleurs, certaines bactéries ont des effets nutritionnels défavorables pour l'hôte. Plusieurs enzymes bactériennes sont impliquées dans la génération de toxines, substances mutagènes ou cancérigènes et promoteurs tumoraux (McIntosh, 1996). Grâce à ces enzymes, elles peuvent jouer un rôle dans **le métabolisme glucidique** (les activités de type  $\beta$ -glucuronidase libèrent à partir des  $\beta$ -glucuronides des aglycones à pouvoir cancérigène), **le métabolisme azoté** (la dégradation par la microflore des nitrates et des amines secondaires aboutit à la production de nitrosamines cancérigènes), ainsi que dans **le métabolisme des xénobiotiques** (possibilité d'inactivation de médicaments, inactivation de la digoxine par *Eubacterium lentum* ou de production de métabolites toxiques. Ainsi les myrosinases d'origine bactériennes, capables d'hydrolyser les glucosinolates des crucifères (choux) peuvent être responsables de diarrhées) (Bourlioux, 1998). L'influence de la flore dans la cancérogénèse a également été étudiée grâce aux animaux axéniques. Selon Midtvedt (1997), plusieurs types de facteurs exogènes ont été décrits, capables d'induire un cancer dans presque tous les organes du corps humain. Ces facteurs peuvent soit agir comme facteurs primaires de la cancérogénèse, soit (le plus souvent) être transformés par la microflore intestinale en facteurs de la cancérogénèse. En général, les enzymes responsables de la production de ces composés potentiellement cancérigènes sont moins actives chez *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, que chez les eubactéries et les clostridies. Ceci suggère que l'augmentation de la population de ces bactéries lactiques dans l'intestin serait bénéfique

pour l'hôte. La figure 6 résume la microflore bénéfique et nuisible pour la santé chez l'homme (Mitsuoka, 1992).

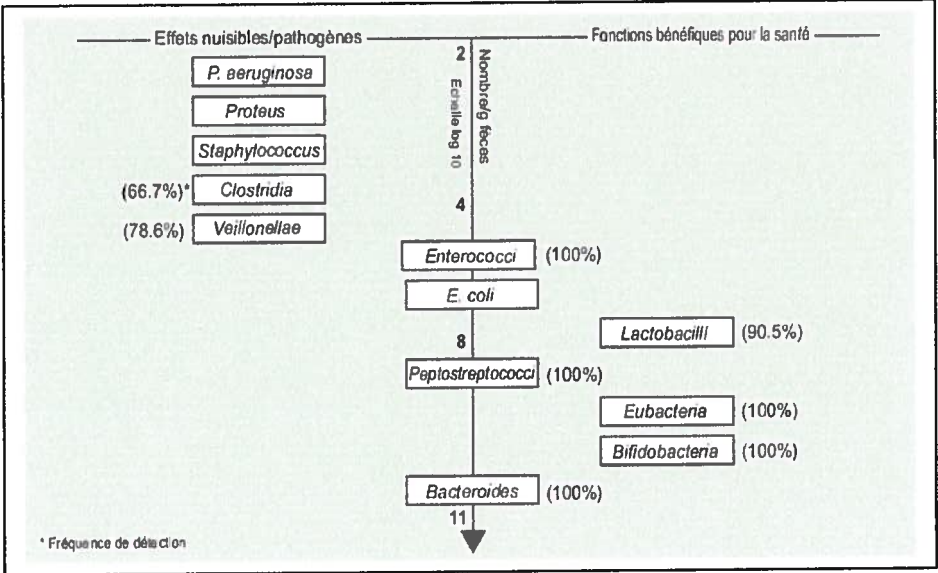
#### 1.1.4.3 Effet barrière et protection contre l'infection

Elle s'exerce d'abord par l'effet de barrière exercé par la flore résidente vis-à-vis des bactéries exogènes ("résistance à la colonisation") (Gomez *et al.*, 1999), par élimination totale de la souche exogène (effet drastique), ou par maintien de la souche exogène en sous-dominance (effet permissif). Les mécanismes expliquant ces phénomènes, mal connus, sont étroitement liés aux souches anaérobies strictes dominantes de la flore résidente. Deux grands types de mécanismes sont mis en jeu : un effet direct des bactéries de la flore endogène sur les bactéries exogènes (compétition pour les substrats, compétition pour les récepteurs, mise en place d'un environnement restrictif et élaboration de substances antimicrobiennes) et un effet indirect avec intervention de l'hôte (modification chimique des sécrétions biliaires, mucus, stimulation du péristaltisme, production de défensines). Dans un second temps, si le besoin s'en fait sentir, le système immunitaire prend le relais.

Les bactéries exogènes ne colonisent normalement pas l'intestin des animaux holoxéniques (à flore conventionnelle), elles s'implantent facilement dans celui d'animaux axéniques. Donc, l'effet barrière est plus complet lorsque la microflore est intacte, avec ses interactions complexes, qu'avec des espèces uniques isolées de la microflore (Ducluzeau, 1994). Selon Robert Ducluzeau, il faut bien comprendre que deux grands types de flore existent : la flore résidente et la flore de transit. Ainsi, les pathogènes ne peuvent être qu'en transit : s'ils s'installent dans l'écosystème de l'hôte en nombre suffisant, celui-ci meurt. Il souligne encore que, cela ne veut pas dire que seule la flore résidente a une action. Les bactéries en transit jouent un rôle très important dès qu'elles sont en nombre suffisant : par exemple dans l'intestin grêle où la flore résidente est très peu nombreuse.

- **Effet direct:** L'effet dit barrière de la flore intestinale est mis en évidence avec des souris axéniques. Chez celles-ci, par exemple, *Shigella flexneri* s'installe, alors

**Figure 6: Microflore bénéfique et nuisible (d'après Mitsuoka, 1992)**



qu'elle ne s'installe pas chez une souris holoxénique (Ducluzeau, 2000; Raibaud *et al.*, 1977). L'effet barrière n'est cependant pas simplement dû à l'occupation du premier arrivant. Ainsi, *Bacillus licheniformis* n'oppose à *Clostridium perfringens* une substance antibiotique analogue à la bacitracine, que s'il s'établit avant lui. En revanche, *B. licheniformis* ne s'oppose pas à *C. perfringens* en présence de lactobacilles.

La production de substances antibactériennes constitue d'ailleurs un des moyens les plus utilisés par la flore dans le cadre de cet effet barrière. Les bactériocines sont des composés protéiques, synthétisés au niveau des ribosomes et actifs contre les microorganismes assez proches des bactéries qui les produisent (Gomez *et al.*, 1999). Détruites par les protéases digestives, ces bactériocines n'assurent donc qu'un rôle local. La capacité de produire des bactériocines est largement partagée au sein de la flore intestinale (Nemcova, 1997). Leur production peut aussi être régulée par des composants présents dans le tractus digestif, comme la ruminococcine A par la trypsine.

La présence d'une flore stable et bien régulée augmente aussi la résistance non spécifique de l'hôte contre les infections (Ducluzeau, 2000; Tannock, 1988). Cela est mis en évidence chez les sujets dont la flore intestinale a été perturbée par l'administration d'antibiotiques, et en comparant la résistance aux infections chez des animaux axéniques (faible résistance) et des animaux à flore complète (forte résistance). Rang a montré qu'il suffisait de traiter des souris à la streptomycine, ce qui leur ôte la majeure partie de leur flore Gram négatif aérobie facultative, pour laisser le passage à des entérobactéries comme *Escherichia coli* (Rang *et al.*, 1999). *E. coli* appartient au même groupe d'entérobactéries que les salmonelles, et est connu pour sa capacité d'exclusion de celles-ci. Il est donc probable que ces bactéries entrent aussi en compétition pour s'établir, selon des critères de similitude (Baba *et al.*, 1991). Dès les années 60, des chercheurs ont comparé le passage de *Salmonella typhimurium* de la lumière intestinale aux ganglions mésentériques de souris axéniques ou hétéroxéniques (Ducluzeau, 2000; Gordon et Pesti, 1971). La flore résidente exerce un effet inhibiteur sur la multiplication des salmonelles en maintenant leur population en-dessous du seuil nécessaire pour leur passage à travers la paroi de l'intestin grêle, ou "*translocation*". Cette translocation est déterminée par la taille de la population bactérienne dans la

lumière intestinale, et non par la nature de la paroi, car celle-ci diffère selon qu'il s'agit d'un animal axénique ou d'un animal hétéroxénique. Chez un animal sans flore, la première flore qui arrive "transloque" facilement car l'effet barrière ne joue pas. Ensuite, cette translocation dépend de la nature de la flore implantée. Ainsi, la translocation de *E. coli* et de *L. acidophilus* est réduite par la présence concomitante de germes à Gram positif anaérobies comme *Peptostreptococcus*. L'augmentation significative du niveau des anticorps anti-*E. coli* est aussi observée chez les rats colonisés par ces trois bactéries. Les rats colonisés par *Peptostreptococcus* montrent également des niveaux élevés d'IgM dans le sérum, c'est-à-dire une réponse immunitaire à la présence d'une bactérie (Herias *et al.*, 1998).

- **Effet indirect:** Le système immunitaire inné est de mieux en mieux exploré. Il s'appuie sur des mécanismes pouvant être activés lors d'une première exposition à des micro-organismes extérieurs. Son importance est essentielle chez le nouveau-né. Il lui permet de se protéger contre les pathogènes tant que son système immunitaire spécifique n'est pas mature, comme il permet à l'organisme de se prémunir tout au long de la vie contre les infections. L'un des mécanismes essentiels est la production de peptides et lysozymes antimicrobiens par des cellules spécialisées, principalement situées dans l'intestin grêle. Ces défensines jouent un rôle important dans la sélection et la modulation de la flore intestinale. Elles sont capables de tuer de nombreuses bactéries Gram positif et Gram négatif, des champignons ou des protozoaires. Des études complémentaires doivent être menées pour comprendre l'importance de ces molécules non seulement sur la restriction de la flore normale du tractus digestif, mais aussi sur la protection de l'hôte contre les invasions de pathogènes (Mahida *et al.*, 1997; Selsted *et al.*, 1992).

La flore est également capable de produire des hormones et des parahormones stimulant le péristaltisme et donc l'élimination naturelle de pathogènes (Ducluzeau, 2000; Borriello, 1984).

En 1980, Mutai et Kawai illustrent le rôle de la capacité d'adhésion dans la colonisation bactérienne. Ils montrent le rôle du mucus, non seulement par sa position contre l'épithélium intestinal, mais également comme nutriment pour certaines souches



bactériennes (Mutai et Kawai, 1981). Par exemple une surproduction de fucose fournit une source alimentaire aux pathogènes (Bry *et al.*, 1996). La flore normale intervient dans la production de certaines glycoprotéines du mucus. *Bacteroides thetaiotaomicron*, un composant de cette flore normale, intervient sur la fucosylation des protéines. Les glycoprotéines du mucus sont des médiateurs pour l'adhésion de pathogènes à la paroi intestinale. La flore intestinale, en modifiant la glycosylation des protéines du mucus, pourrait donc moduler l'adhésion des pathogènes. Voici d'ailleurs l'une des explications possibles de l'effet barrière de la flore endogène.

#### 1.1.4.4 Mise en place de l'immunité

Le tractus gastro-intestinal possède une structure immunitaire appelée "*gut-associated lymphoid tissue*" ou GALT (Moreau, 1986). La flore microbienne influence la réponse immunitaire de l'hôte, que celle-ci soit spécifique ou non spécifique. La gnotobiologie permet d'observer l'impact de la flore sur le système immunitaire (Falk *et al.*, 1998): il constitue un bon exemple de coopération entre la flore et son hôte. La paroi intestinale des animaux axéniques est plus fine, car le système immunitaire est au repos. Ces animaux présentent de façon générale un système immunitaire moins développé que les animaux gnotoxéniques, par défaut de stimulation extérieure : ils ont moins de  $\gamma$ -globulines dans le sang, des nodules lymphatiques plus petits et moins de lymphocytes et de phagocytes mononucléaires dans la muqueuse (Ducluzeau, 2000; Tannock, 1988). Leur muqueuse intestinale est dix fois plus pauvre en plasmocytes à IgA que celle de la souris holoxénique appartenant à la même lignée (Ducluzeau, 2000; Crabbe *et al.*, 1968). Ils sont également dépourvus de co-récepteurs solubles Fv, qui permettent aux IgA de circuler et d'être actifs dans le tube digestif. Chez un animal doté de sa flore, la paroi intestinale s'épaissit, en partie à cause du développement du système immunitaire. Le taux de Fv varie au long de la vie des mammifères, ce qui prouve l'intervention de facteurs microbiens. La flore dominante n'intervient pas dans ce mécanisme (Andrieux *et al.*, 1998). Des travaux récents suggèrent que la flore pourrait être un facteur environnemental indispensable pour construire l'équilibre entre Th1 (système de régulation) et Th2 (système de défense) (Bottcher *et al.*, 1999). En effet, la comparaison entre les MACs d'enfants allergiques et ceux d'enfants non allergiques

indique une différence de composition de la microflore entre ces deux populations. Ce facteur est encore aujourd'hui peu étudié. Selon Moreau et ses collègues (1994), les bactéries présentes dans la flore intestinale ont une action modulatrice sur les réponses immunitaires de l'hôte. Elles représentent une possibilité d'action sur la suppression (greffes, maladies auto-immunes) ou la stimulation (défenses bactériennes et virales) de la réponse immunitaire.

#### **1.1.4.5 Variations individuelles des effets de la flore humaine**

En comparant des groupes de souris gnotoxéniques ayant reçu les flores de six humains différents, Hirayama a mis en évidence des différences individuelles dans l'activité fermentaire de cette flore (Hirayama *et al.*, 1995). En travaillant sur les glycosides alimentaires hydrolysés par les  $\beta$ -glycosidases produites par la flore intestinale anaérobie, Kobashi a montré que les glycosides sont des précurseurs de composés pharmaceutiques (Kobashi, 1998). Il a estimé que les différences individuelles des effets de produits pharmaceutiques pourraient être dues aux différences de flore intestinale chez l'Homme et chez les animaux.

#### **1.1.5 Facteurs affectant la microflore intestinale**

Différents facteurs associés à l'hôte, aux bactéries et à l'environnement contribuent à maintenir la composition et le bon fonctionnement de la microflore. Toute déstabilisation d'un de ces éléments peut conduire à une prolifération bactérienne et à des problèmes de santé. Le pH extrêmement faible dans l'estomac humain agit comme une barrière et empêche la colonisation par les bactéries ingérées; la plupart d'entre elles ne peuvent survivre à l'acidité gastrique (Mackie *et al.*, 1999; Conway, 1997; Richardson, 1996). Dans l'intestin grêle, tout changement affectant la concentration des acides biliaires ou le péristaltisme peut perturber les taux normalement faibles de bactéries (Mackie *et al.*, 1999; Conway, 1997). Le risque de diminution des sécrétions gastriques est plus élevé chez les personnes âgées (hypochlorhydrie) et cette maladie peut conduire à une prolifération bactérienne dans l'estomac (Saloff-Coste, 1997; Pedrosa *et al.*, 1995) et l'intestin grêle. Dans le côlon, où les bactéries se trouvent en abondance, la compétition pour l'espace et les nutriments contribue à maintenir l'intégrité de la microflore (Rumney *et al.*, 1992). De plus, les bactéries produisent des

substances telles que les bactériocines et des métabolites bactériens tels que le peroxyde d'hydrogène, les acides acétique et lactique qui inhibent la prolifération bactérienne (Rumney *et al.*, 1992; Richardson, 1996).

L'environnement joue également un rôle important dans la colonisation digestive du prématuré (Barbe *et al.*, 2001). La flore digestive d'un nouveau-né hospitalisé est différente de celle d'un enfant retourné rapidement à domicile. Dès 15 jours d'hospitalisation, on remarque l'apparition de souches résistantes, y compris en absence de traitement antibiotique. De plus, la transmission de germes manuportés (*Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacteriaceae*, *Candida albicans*, etc.) a été prouvée. La saison (l'été) peut aussi favoriser une colonisation plus rapide (Barbe *et al.*, 2001). Un isolement relatif (isolette) peut également expliquer la colonisation bactérienne intestinale retardée des prématurés. Le prématuré connaît une colonisation digestive au début par des Klebsielles et des anaérobies avec un retard de l'installation de la flore bifide au-delà de 8 jours. Celle-ci prédomine finalement entre le 12<sup>ème</sup> et le 35<sup>ème</sup> jour de vie, mais dans une proportion plus faible que chez les nouveau-nés à terme. On compte 10 bifides pour une entérobactérie à 7 semaines de vie chez le prématuré contre 1000 bifides pour une entérobactérie chez le nouveau-né normal. Il est intéressant de noter que la rapidité de colonisation par les bifides chez les enfants de petits poids de naissance n'est pas liée au mode d'accouchement (Barbe *et al.*, 2001). Des différences distinctes dans la composition de la flore fécale ont été trouvées entre les enfants de différentes régions géographiques, reflétant, en partie, l'impact de l'environnement (Adlerberth *et al.*, 1991; Falk *et al.*, 1998).

D'autres facteurs, dont l'alimentation par exemple le jeûne alimentaire, la modification brutale de régime ainsi que l'ingestion de grandes quantités de bactéries vivantes probiotiques par la consommation de laits fermentés (Mackie *et al.*, 1999; Collins et Gibson, 1999) et l'addition des oligosaccharides dans le lait artificiel (Mackie *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1983) peuvent avoir un effet sur la composition ou l'activité de la microflore et donc sur la santé. Différents états pathologiques et le stress, peuvent modifier le fonctionnement et la composition de la microflore intestinale (Mackie *et al.*, 1999; Tannock, 1983). Les traitements antibiotiques affectent souvent la microflore en

diminuant les teneurs en bactéries sensibles et en entraînant une prolifération des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques (Mackie *et al.*, 1999; Falk *et al.*, 1998; Bennet et Nord, 1989; Bennet *et al.*, 1986; Bennet *et al.*, 1982). Les observations épidémiologiques ont montré que les bifidobactéries au niveau intestinal variaient du simple au double entre les enfants non allergiques et ceux allergiques (Sears *et al.*, 2002). Ces différents types d'agressions peuvent avoir alors une influence sur la stabilité de la flore digestive avec comme conséquences des modifications des effets physiologiques, métaboliques et immunitaires liées à la microflore digestive de l'hôte. Généralement, la microflore intestinale se rééquilibre d'elle-même en quelques semaines (Ducluzeau, 1997).

#### **1.1.6 Les bactéries probiotiques et leurs effets sur les défenses naturelles de l'intestin: les lactobacilles et les bifidobactéries**

Les bactéries probiotiques sont à la sphère intestinale ce que l'atmosphère est à la planète Terre : un complément indispensable. La notion de probiotiques est apparue dès 1970. La définition des probiotiques a évolué au cours du temps, mais la définition généralement retenue est celle récemment approuvée par la *National Yogurt Association* (NYA) ou le *International Life Science Institute* (ILSI) aux Etats-Unis: "Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet positif sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels" (Roberfroid, 2000). Cependant l'idée d'incorporer des micro-organismes dans l'alimentation humaine ou du moins d'utiliser les effets bénéfiques potentiels de la présence de ces micro-organismes semble remonter à la plus haute antiquité. Les genres bactériens les plus utilisés sont *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*), *Lactobacillus acidophilus* (*L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*), *Enterococcus* (*E. faecium*), *Streptococcus* (*S. thermophilus*) et *Saccharomyces* (*S. boulardii*). Ils peuvent être ingérés en grande quantité sous forme de médicaments, mais aussi à partir d'aliments comme les laits fermentés ou certains fromages. Les probiotiques doivent présenter les principales caractéristiques suivantes: être d'origine humaine, être adaptés pour l'alimentation, être présents sous forme de cellules vivantes, de préférence en grande quantité, avant l'ingestion, être stables et pouvoir rester viables

pendant toute la durée de conservation du produit, et doivent être capables de rester vivantes durant leur passage le long du tube digestif en premier lieu, à l'acidité de l'estomac qui peut atteindre un pH de 1.5, puis, à des concentrations d'acides biliaires allant jusqu'à 2.0% dans l'intestin grêle (O'Sullivan, 2001). La colonisation ne semble pas nécessaire au probiotique pour exercer ses effets attendus chez l'hôte. Le critère important est qu'il demeure métaboliquement actif dans le tractus gastro-intestinal (Bezkorovainy, 2001). Ils doivent dépasser un niveau situé entre  $5 \times 10^6$  et  $10^8$  cellules viables par gramme de contenu du tube digestif (Ducluzeau, 2001), être bénéfiques pour la santé de leur hôte et être ingérés de manière continue pour obtenir un effet continu (Bezkorovainy, 2001).

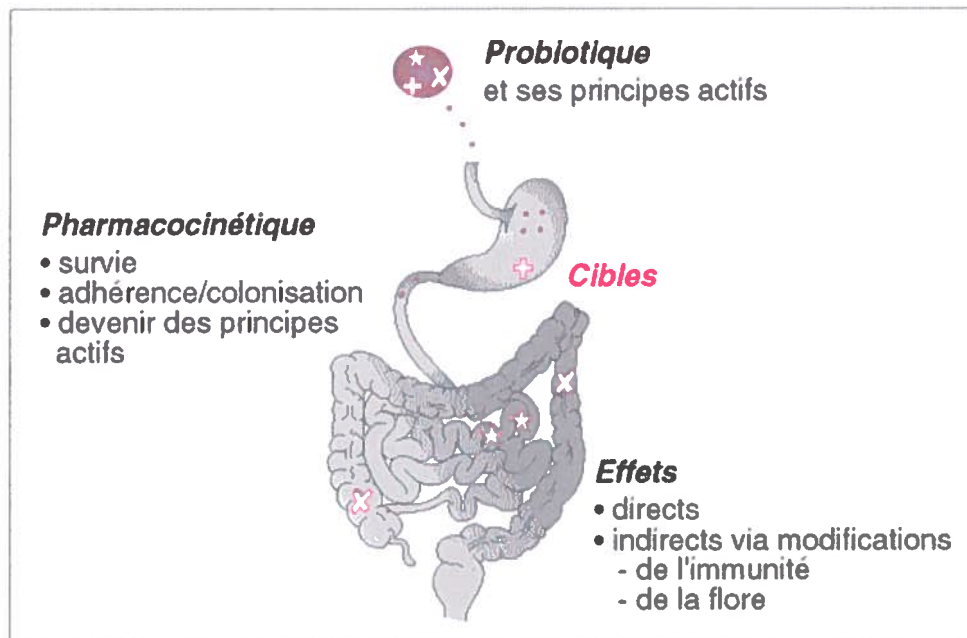
Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de véhiculer des principes actifs qu'ils contiennent (enzymes, composants de paroi, peptides immunomodulateurs, substances antibactériennes, etc.) jusqu'à leurs cibles d'action dans le tractus digestif (Marteau et Ramb, 1998; Marteau et Vesa, 1998; Marteau *et al.*, 1993) (Fig. 7).

#### **1.1.6.1 Effets des probiotiques sur la microflore intestinale humaine**

Des études expérimentales ont mis en évidence l'influence de l'ingestion de souches de probiotiques sur la composition et l'activité métabolique de la microflore intestinale chez l'Homme sain.

**Les probiotiques modulent la composition de la microflore intestinale suivant différents mécanismes** La survie de probiotiques ingérés dans différentes parties du tube digestif varie suivant les souches. Certains probiotiques sont détruits dès leur passage dans l'estomac alors que d'autres, tels des *Bifidobacterium*, *L. plantarum* ou *L. acidophilus*, traversent l'intestin grêle et parfois le côlon à hautes concentrations (Tableau IV). Du fait de leur concentration dans la lumière intestinale, elles contribuent à la modulation transitoire de l'écologie de la microflore, au moins pendant la période d'ingestion. Cette modification spécifique peut être observée pendant quelques jours après le début de la consommation de la préparation de probiotiques,

**Figure 7: Approche pharmacologique des effets des probiotiques ou de leurs principes actifs dans le tractus digestif (d'après Marteau et Ramb, 1998)**



**Tableau IV: Pourcentages de récupération de probiotiques vivants dans les selles après leur ingestion (d'après Marteau et Ramb, 1998)**

<b>Probiotique</b>	<b>% de survie*</b>	<b>Référence</b>
<i>Bifidobacterium sp.</i>	30	Gastroenterology 1992 ; 102 : 875-8
<i>L. plantarium</i> souche NCIB 8826	25	Marteau et Rambaud 1998
<i>L. acidophilus</i>	2-5	J Dairy Sci 1978; 61: 1-10
<i>L. rhamnosus</i> souche GG	1-5	Dig Dis Sci 1992; 37 : 121-8
- gastro protégé	1	Microb Ecol Health Dis 1993; 6 : 119-22
- lait fermenté	1	Microb Ecol Health Dis 1993; 6 : 119-22
- capsules	2	Int J Food Microb 1995; 25 : 199-203
<i>L. salivarius</i> souche UCC118	0,2	Marteau et Rambaud 1998
<i>Lactococcus lactis</i> TC 165.5	0,1-2	Appl Environ Microbiol 1995; 61: 2771-4
<i>S. boulardii</i>	0,36	Biopharm Drug Disp 1989; 10 : 353-64
<i>L. reuteri</i> capsules	0,01	Microb Ecol Health Dis 1995; 8 : 41-50

\* Résultat fourni dans la référence ou calculé à partir d'un poids de selles théorique de 150 g/j.

suivant la capacité de la souche ingérée à moduler le fonctionnement du tube digestif.

De nombreuses études ont mis en évidence des variations significatives des populations bactériennes dans des fèces humains après consommation de souches spécifiques de probiotiques, conduisant généralement à une augmentation du nombre de bactéries bénéfiques pour la santé (*Lactobacillus* et *Bifidobacterium*) et à une diminution du nombre de bactéries potentiellement nuisibles (différentes souches de *Clostridium* et *Enterococcus*). Cependant, ces études ne reflètent que la bactériologie des matières fécales et ne décrivent pas la situation dans les différentes parties du tube digestif ou dans la muqueuse intestinale.

Des essais chez l'animal et des études *in vitro* ont démontré que des souches de probiotiques spécifiques ont une action protectrice contre l'adhérence, la colonisation, la reproduction et/ou l'action pathogène d'entéropathogènes spécifiques, selon les quatre mécanismes décrits précédemment:

- priver les pathogènes de substances nutritives spécifiques; rendre des sites de liaison spécifiques indisponibles. Par exemple, la capacité de différentes souches de *Lactobacillus* à adhérer à des cellules en culture Caco-2 et inhiber l'adhérence de pathogènes tels que *E. coli* ou *S. typhimurium* (Chauvière *et al.*, 1992), probablement par simple encombrement stérique des récepteurs entérocytaires de pathogènes.
- abaisser le pH luminal par production d'acides gras volatils à chaîne courte; production de peroxyde d'hydrogène dans des conditions anaérobies; et, bien sûr, production d'acide lactique (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*), conduisant à la diminution du pH colique; cette action est considérée comme le principal mécanisme d'inhibition par les bactéries lactiques de la croissance de différentes bactéries anaérobies facultatives ou strictes (Tannock, 1984).
- et/ou production d'un large spectre de substances anti-microbiennes spécifiques telles que les bactériocines (Fons *et al.*, 2000).



### **Les probiotiques modulent l'activité métabolique de la flore intestinale**

L'expression de nombreuses enzymes bactériennes est influencée par le pH du milieu. Les probiotiques, parce qu'ils peuvent abaisser le pH dans l'intestin, peuvent interférer avec l'activité enzymatique de la flore (Mallet *et al.*, 1989; Tannock, 1984). Cependant, ce mécanisme n'a pas été mis en évidence *in vivo* à ce jour.

Il a été démontré que des souches de probiotiques diminuent l'activité des enzymes procarcinogènes produites par la flore intestinale. Cet effet a été largement démontré dans des modèles animaux et des études chez l'homme en mesurant l'activité de certaines enzymes bactériennes impliquées dans la carcinogenèse colique dans les fèces après ingestion de souches spécifiques de probiotiques (Goldin et Gorbach, 1977; Sreekumar et Hosono, 2000). Cependant, ces études ne reflètent que la biochimie dans les matières fécales et non la situation dans l'ensemble du côlon. Etant donné qu'il est impossible de mesurer le pH dans l'intestin, l'évaluation *in vivo* des effets sur la carcinogenèse de la production d'acide par des bactéries lactiques est difficile. En raison de la complexité du développement des tumeurs coliques chez l'homme, il n'est pas possible à ce moment de déduire un effet bénéfique de ces résultats pour la prévention du cancer du côlon.

#### **1.1.6.2 Effets des probiotiques sur l'épithélium intestinal**

Des études récentes ont mis en évidence les effets des probiotiques sur l'épithélium intestinal par différents mécanismes, qui dépendent tous des espèces et souches de bactéries.

**Les probiotiques modifient la couche de mucus** Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que des espèces et des souches de bactéries spécifiques produisent des glycosidases extracellulaires qui dégradent les glycoprotéines ou les mucines intestinales (Ruseler-van Embden *et al.*, 1995; Salyers *et al.*, 1977) et que certaines autres sont capables de stimuler la sécrétion de mucus (Bernet *et al.*, 1994; Hollingsworth *et al.*, 1994) bien que les données concernant spécifiquement les probiotiques soient limitées. Une étude *in vitro* récente a démontré un effet direct des probiotiques par induction de l'expression d'un gène de mucine intestinale dans les

cellules épithéliales, provoquée par des déterminants de paroi cellulaire ou des produits sécrétés par les bactéries probiotiques (Mack *et al.*, 1999).

Le rôle biologique de la modification de l'expression de glycoconjugués complexes et de mucus n'est pas encore connu. Cependant, des études récentes démontrent que les modifications biochimiques induites par les probiotiques pourraient inhiber l'adhésion de bactéries pathogènes à des cellules intestinales cultivées *in vitro* (Bernet *et al.*, 1994). Des modifications spécifiques de la couche de mucus pourraient être bénéfiques (grâce à la destruction des récepteurs de certains pathogènes) ou nuisibles (en exposant des récepteurs enfouis dans la couche muqueuse permettant aux pathogènes de s'ancrer à la paroi intestinale) (Freitas et Cayuela, 2000).

**Les probiotiques influencent la perméabilité épithéliale et renforcent l'intégrité de la barrière** Une étude récente a démontré que certains probiotiques produisent des métabolites qui modifient directement la perméabilité épithéliale et renforcent l'intégrité de la barrière *in vitro* (Madsen *et al.*, 2001). Ce mécanisme est également étayé par des études chez l'animal et chez l'Homme, démontrant que des probiotiques peuvent restaurer une perméabilité épithéliale déficiente (Czerucka *et al.*, 2000). Cette propriété peut protéger l'hôte contre la migration bactérienne et l'invasion par des bactéries pathogènes. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer les effets spécifiques des souches de probiotiques.

Bien qu'elles soient très récentes, les études mentionnées ci-dessus concernant l'effet direct des probiotiques sur l'épithélium intestinal ont déjà donné des résultats importants *in vivo* et *in vitro* et ouvrent des perspectives prometteuses. Les derniers résultats confirment l'hypothèse selon laquelle la consommation de probiotiques chez l'Homme sain peut améliorer le fonctionnement de la barrière intestinale.

#### **1.1.6.3 Effets des probiotiques sur le système immunitaire**

Les résultats d'études conduites chez l'homme et l'animal indiquent que les bactéries lactiques ont des effets immunomodulateurs, bien que peu d'études aient été conduites chez l'Homme (Meydani et Ha, 2000). A ce jour, les résultats des études sur les effets immunologiques des bactéries lactiques démontrent que les bactéries lactiques

peuvent moduler la réponse immunitaire et, donc, augmenter la résistance aux maladies immunitaires.

**Les probiotiques modulent les paramètres de l'immunité** Dans des études chez l'homme, la production de cytokines (Aattouri et Lemonnier, 1997; De Simone *et al.*, 1986; Solis-Pereyra et Lemonnier, 1993), l'activité phagocytaire (Schiffrin *et al.*, 1995), la production d'anticorps (Link-Amster *et al.*, 1994) et les populations de cellules NK (De Simone *et al.*, 1986; De Simone *et al.*, 1989) augmentent en cas de consommation de yoghourt. Il a également été démontré que les probiotiques sont capables de moduler la prolifération de lymphocytes *in vitro* (Kirjavainen *et al.*, 1999; Nagafuchi *et al.*, 1999) ainsi que la production d'anticorps spécifiques (He *et al.*, 2000; Thoreux et Schmucker, 2001) et non spécifiques (Marteau *et al.*, 1997; Vitini *et al.*, 2001) chez l'Homme et chez la souris. Des résultats *ex vivo* et *in vitro* indiquent également que les probiotiques augmentent la production de cytokines (Pessi *et al.*, 2000). Peu d'études ont été conduites chez l'Homme en utilisant différentes souches de bactéries lactiques. Etant donné que l'activité immunostimulante des bactéries lactiques peut dépendre de la souche, il est difficile de tirer des conclusions définitives en ce qui concerne les effets des probiotiques sur la réponse immunitaire chez l'Homme. Cependant, des résultats expérimentaux de plus en plus nombreux confirment l'existence d'effets de l'administration orale de probiotiques sur le système immunitaire.

**Les probiotiques modulent l'inflammation de la muqueuse** L'immunité muqueuse doit permettre d'éviter toute réactivité potentiellement nuisible et superflue à la flore commensale tout en réagissant rapidement à des épisodes infectieux. Cette fonction est remplie grâce à la collecte continue d'antigènes dans l'environnement luminal, la discrimination entre les signaux de danger pathogène et les stimulations inoffensives de la flore endogène et un contrôle rigoureux des mécanismes immunitaires. Des erreurs dans ces processus de régulation perturbent l'équilibre de la muqueuse intestinale et sont associées à l'inflammation de la muqueuse (Shanahan, 2000).

Étant donné que la microflore luminale gastro-intestinale provoque et commande la réponse inflammatoire de la muqueuse, la modification de cet

environnement par des probiotiques présente un bénéfice potentiel en induisant des réponses immunitaires protectrices de l'hôte contre la production de cytokines inflammatoires.

Des observations cliniques et des modèles de rongeurs génétiquement modifiés (qui développent spontanément des colites similaires à la colite humaine) montrent que la flore normale est impliquée dans le processus d'inflammation de l'intestin dans la colite (Madsen *et al.*, 1999), et l'ingestion de *Lactobacillus* et *Bifidobacteria* peut conduire à la rémission partielle de la colite (Gionchetti *et al.*, 2000). La réponse inflammatoire peut être modulée par la flore entérique (et probablement par différents probiotiques) et les probiotiques semblent également atténuer la réponse inflammatoire observée dans la colite. Cependant, le rôle exact de la modulation de la réponse immunitaire dans la réponse clinique aux probiotiques reste mal connu. Il est difficile à déterminer précisément étant donné que nous ne savons pas comment le système immunitaire détecte et réagit aux bactéries entériques de type Gram positif (par exemple, *Bifidobacteria* et *Lactobacillus*).

#### **Mécanismes impliqués dans les effets immunomodulateurs des probiotiques**

La microflore normale contient des composants (substances en surface ou sécrétées) capables d'abaisser la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, d'augmenter la libération de cytokines anti-inflammatoires et de neutraliser l'activité biologique des cytokines pro-inflammatoires. Les mécanismes moléculaires de l'induction des cytokines par les bactéries sont encore mal connus. Cependant, des résultats récents et prometteurs indiquent que des composants bactériens (tels que des peptidoglycanes ou des lipopolysaccharides) de bactéries commensales peuvent abaisser la réponse des cytokines (Gupta *et al.*, 1996; Miettinen *et al.*, 2000; Neish *et al.*, 2000). En conclusion, le mécanisme d'action précis des microorganismes probiotiques dans l'intestin humain n'a aussi été qu'insuffisamment étudié jusqu'ici. Dans l'expérimentation animale et dans des études *in vitro*, des chercheurs ont cependant pu montrer le rôle que peuvent jouer les mécanismes pathogéniques efficaces suivants : stabilisation de la flore intestinale par compétition avec des bactéries pathogènes au niveau de la fixation aux récepteurs et au niveau des substances nutritives, production d'acides gras à courtes

chaînes (p. ex. butyrate), acidification du suc intestinal, augmentation de la solubilité des minéraux, diminution de la résorption des acides biliaires, stabilisation de la fonction barrière de la muqueuse intestinale, production de substances anti-bactériennes, modification de toxines ou de récepteurs toxiques, et stimulation de la réponse immunologique aux germes pathogènes (production augmentée de sIgA, IgG, IgM ; augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires, Interleukin-10, TgF- $\beta$ ; diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , Interferon-gamma ainsi que d'autres médiateurs inflammatoires tel que par exemple les métalloprotéinases de la matrice ou MMP) (Braegger, 2002).

#### **1.1.6.4 Application de probiotiques en gastroentérologie clinique**

Certaines maladies connues comme l'inflammation aigüe de l'estomac, les infections gastro-intestinales, la constipation, la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse, les allergies alimentaires, les diarrhées, les maladies cardiovasculaires et certains types de cancer, lesquelles se répandent à la suite d'un déséquilibre de la flore microbienne, surgit au commencement et la réactivité immunobiologique cohérente avec elle. Le tableau V montre quelques-unes des études cliniques contrôlées les plus récentes sur le recours aux probiotiques dans les maladies gastroentérologiques et allergiques.

Bien que le concept de traitement aux probiotiques se fonde sur une longue tradition, des études cliniques contrôlées fiables n'ont été menées qu'au cours des dix dernières années. Ce phénomène est peut-être lié au fait que de nombreux concepts de "l'alimentation saine" trouvent leur origine dans la médecine alternative et dans la croyance populaire. Les tests scientifiques dans le cadre d'études cliniques contrôlées ont été longtemps en contradiction ouverte avec l'observation traditionnelle de règles de santé. Ce n'est que récemment que de telles règles ont été étudiées au moyen de méthodes scientifiques souvent avec des résultats étonnants (Alm, 1999).

Comme le montre le tableau V, les probiotiques ont été étudiés en premier lieu chez des patients atteints d'une maladie diarrhéique attribuée à une perturbation de l'équilibre de la flore intestinale. Il s'agit notamment de patients diarrhéiques sous antibiothérapie, et en particulier de patients atteints d'une colite à *C. difficile*, mais aussi

**Tableau V: Études cliniques contrôlées sur le recours aux probiotiques dans les maladies gastroentérologiques et allergiques**

Maladie	Patients	Germe probiotique	Résultat	Référence
Entérocolite nécrosume Gastroentérite virale	Nouveau-nés Enfants	Lactobacillus acidophilus Lactobacillus GG	Prévention Diminution de la durée de la maladie	Hoyos, 99 Guarino, 97
Diarrhée due aux antibiotiques Diarrhée due aux antibiotiques Diarrhée récurrente à Clostridium difficile	Enfants Adultes Adultes	Lactobacillus GG Saccharomyces boulardii Saccharomyces boulardii	Prévention Prévention Prévention	Vanderhoof, 99 Surawicz, 89 McFarland, 94
Diarrhée en cas d'alimentation par sonde oesophagienne	Adultes	Saccharomyces boulardii	Prévention	Bleichner, 97
Diarrhée des voyageurs qui reviennent des tropiques	Adultes	Saccharomyces boulardii	Amélioration	Kirchhelle ,96
Eczéma atopique Allergie au lait	Nourrissons Adultes	Lactobacillus GG Lactobacillus GG	Amélioration Diminution de la durée de la maladie	Majamaa, 97 Pelto, 98
Colite ulcéreuse Colite ulcéreuse Colite ulcéreuse	Adultes Adultes Adultes	Coli 06:K5:H1 Coli 1917 Flore mixte	Maintien de la rémission Maintien de la rémission Maintien de la rémission	Kruis, 97 Rembacken, 99 Venturi,99

de grands malades qui ont besoin d'être alimentés par sonde, de nouveau-nés qui présentent un risque d'entérocolite nécrosante ainsi que de personnes revenant des tropiques et d'enfants souffrant d'une gastroentérite virale. Les essais de traitement de la colite ulcéreuse sont particulièrement intéressants; ils font l'objet de discussions au sujet de problèmes de tolérance vis-à-vis de la microflore intestinale (Verdù *et al.*, 2000). Enfin, des patients atteints de maladies allergiques, à savoir des nourrissons atopiques et des adultes allergiques aux protéines du lait, ont également été traités.

En ce qui concerne le recours aux probiotiques dans la maladie de Crohn, dans les maladies auto-immunes, pour la prévention du cancer du côlon, dans la maladie coronarienne et sur l'absorption du calcium (prophylaxie de l'ostéoporose), seules des hypothèses ont été formulées (Biancone, 1999 ; Gallaher, 1999 ; Reddy, 1998 ; von Wright et Salminen, 1999). Dans l'ensemble, il subsiste à l'heure actuelle un manque d'études contrôlées sur le recours clinique aux probiotiques (Lewis, 1998). L'efficacité clinique n'a été démontrée sans aucun doute pour aucune des indications du tableau V; la nécessité de mener de nouvelles études cliniques est grande.

## **1.2 Techniques utilisées pour l'étude de la composition et la fonction de la microflore intestinale (atouts et déficits)**

Les sections précédentes démontrent que la microflore du tractus digestif joue un rôle très important dans le bon état de santé. Donc, il est essentiel de connaître sa composition et sa répartition pour bien comprendre son évolution, sa fonction, les facteurs qui les affectent et ses effets positifs en cas des maladies et conditions chroniques. Mais, son étude nécessite des outils d'investigation très spécifiques et se heurte à de nombreux obstacles méthodologiques.

Il existe plusieurs obstacles à la connaissance de la flore digestive. Quelque 400 espèces de bactéries la composent, avec des populations très variables et moins une vingtaine sont couramment cultivées par les laboratoires. Elles appartiennent à la flore dominante (populations les plus abondantes) et rendent difficile le dénombrement des autres espèces, sous-dominantes. La flore anaérobie stricte, pourtant largement

dominante, est difficile à cultiver et à prélever *in situ*. Certaines bactéries de la flore digestive sont impossibles à cultiver à ce jour.

## **1.2.1 Techniques classiques pour l'étude de la microflore intestinale**

### **1.2.1.1 La gnotobiologie pour l'étude de la microflore intestinale**

Historiquement, la naissance de la gnotobiologie (du grec *gnosis* connaissance et *bios* la vie) peut donc être attribuée aux travaux de Pasteur (1885) quoique la nécessité de mener des expérimentations en biologie sur des systèmes "purs" remonte encore plus loin, à Boussingault (1838). Le premier animal axénique a été obtenu par césarienne en Allemagne il y a plus de cent ans, une deuxième génération de rats axéniques est née en 1945 puis des poulets en 1949. La recherche gnotobiotique a connu son âge d'or entre 1955 et 1975. Cette expansion a connu un coup d'arrêt dans les années 80 et 90: moins de fonds disponibles, et une activité croissante des militants contre l'expérimentation animale. Au tournant du millénaire, l'optimisme est de nouveau de mise et la gnotobiologie sera incontournable dans l'écologie moderne, en toxicologie environnementale, en immunologie moléculaire, en médecine clinique moderne, lors de futures investigations sur les micro-organismes génétiquement modifiés, et en recherche alimentaire moderne (effets nutritionnels et santé directs des probiotiques) (Diplock *et al.*, 1998).

La gnotobiologie considérée comme premier outil d'investigation, utilise des animaux axéniques (sans flore) chez lesquels on peut introduire une flore définie. Il s'agit de mener une expérimentation sur l'Homme, mais par l'intermédiaire de l'animal (Ducluzeau, 1998). La gnotobiologie offre un potentiel considérable pour l'étude des relations entre les microorganismes et leur hôte car elle donne une image exacte des caractéristiques de l'hôte quand il est exempt de germe et abandonné à ses propres ressources, mais également quand il est modifié par l'apport d'un (ou plusieurs) microorganisme(s) connu(s); permet l'étude des interactions entre micro-organismes *in vivo*; et peut être utilisée pour étudier n'importe quel facteur exogène ou endogène (par exemple: la nutrition, les réactions immunitaires, les réponses de l'organisme à différentes agressions) (Ducluzeau *et al.*, 2000; Gordon et Pesti, 1971). Falk et son équipe estiment que "la stratégie expérimentale clé pour définir les interactions entre les



microorganismes et leur hôte passe en premier lieu par la définition des fonctions cellulaires en l'absence de flore et, ensuite, l'évaluation de l'impact d'un germe ou d'un mélange de germes, etc (Falk *et al.*, 1998). La puissance de la gnotobiologie réside dans la capacité de contrôler l'environnement dans lequel un organisme multicellulaire se développe et fonctionne. L'utilisation combinée d'organismes au profil génétique modifiable et de la gnotobiologie permet d'acquérir de multiples informations sur la façon dont les bactéries interviennent sur le développement normal, la mise en place et le maintien du système immunitaire associé au système digestif et les fonctions des cellules épithéliales. De plus, cette méthode fournit de nouvelles données sur le développement de maladies infectieuses, de conditions inflammatoires chroniques et aiguës, et, probablement sur celui des tumeurs. De plus, l'utilisation combinée de la biologie moléculaire pour identifier les bactéries et de la gnotobiologie pour en étudier les fonctions, permet de comprendre progressivement les mécanismes de l'écosystème complexe de la microflore intestinale. En résumé, la gnotobiologie est la seule méthode *in vivo*. Mais elle est lourde car elle impose d'obtenir des animaux sans flore puis de les maintenir en milieu sans flore ou à flore connue.

#### **1.2.1.2 Utilisation de milieux de culture pour l'étude de la microflore intestinale, technique classique et traditionnelle**

Jusqu'au début des années 60, les descriptions de la microflore intestinale étaient relativement simples. Clostridies, lactobacilles, entérocoques et *E. coli* ont été généralement considérés comme étant la microflore prédominante détectée dans les échantillons fécaux, reflétant la facilité relative de la culture de ces bactéries (Tannock, 1999; Rettger *et al.*, 1935). L'utilisation des tubes de Hungate pour l'investigation des anaérobies infectieuses sur des milieux sélectifs (Tannock, 1999; Holdeman et Moore, 1972; Hungate, 1966), ainsi que des chambres anaérobiques, a accéléré la connaissance du réservoir de ces bactéries: la microflore normale (Tannock, 1999; Summanen *et al.*, 1993; Aranki et Freter, 1972). En utilisant ces techniques appropriées, il était possible de cultiver jusqu'à 88% des bactéries présentes dans les matières fécales de l'homme (Tannock, 1999; Moore et le Holdeman, 1974). Cependant, 30 à 40 espèces

bactériennes ont constitué 99% de la microflore fécale (Tannock, 1999; Drasar et Barrow, 1985).

C'est avant la renaissance des techniques modernes de biologie moléculaire que l'analyse de la microflore intestinale dépendait, presque totalement, sur l'utilisation des méthodes bactériologiques traditionnelles de culture, de microscopie et d'identification (Tannock, 1999; O'Sullivan 1999). Cependant, la méthode la plus classique pour décrire l'écosystème bactérien du tube digestif est l'analyse différentielle qualitative. L'échantillon est dilué et les dilutions placées dans ou sur des milieux de culture, plus ou moins sélectifs pour divers groupes bactériens. Mais, de nombreuses difficultés rendent cette technique lourde et aléatoire, telles que signalées par Robert Ducluzeau (1998), parce que beaucoup de bactéries anaérobies strictes de la flore dominante sont tuées par l'oxygène de l'air. Cependant, malgré les précautions prises au niveau de l'échantillon, toutes les bactéries du tube digestif ne peuvent pas être cultivées à cause de leurs besoins complexes en nutriments (Ducluzeau, 1998). Bien que des recherches diverses sont orientées vers le développement des milieux de culture pour les bactéries de la microflore du tube digestif, il n'y a pas à ce jour un milieu simple qui permet la croissance de toutes les bactéries du tube digestif. Également, lorsqu'on veut détecter et dénombrer un micro-organisme particulier par croissance sur milieu de culture, il faut s'assurer de posséder une méthode de sélection spécifique qui ne permet que la croissance du micro-organisme ou d'un groupe de micro-organismes visé (Tannock, 1999; Summanen *et al.*, 1993). Ainsi on fait croître et estimer la présence de bactéries dans le milieu liquide par mesure spectrophotométrique de la densité optique, sur milieu solide dont le paramètre étudié est alors l'unité formatrice de colonies (UFC) en se basant sur l'hypothèse qu'une bactérie va se développer et former une colonie distincte. Cependant, cette méthode est souvent fastidieuse et inadéquate pour qualifier ces bactéries car les milieux sélectionnent certains micro-organismes seulement. Il est d'ailleurs fréquemment mentionné dans de nombreuses études scientifiques que les comptes cellulaires effectués par microscopie excèdent par plusieurs ordres de magnitude les comptes obtenus par unités formatrices de colonies (Amann *et al.*, 1995). Or, au moins 12% de la microflore fécale vue au microscope ne peut être cultivée (Tannock, 1999). L'utilisation de milieux sélectifs de culture a largement été pratiquée

pour obtenir des informations sur la présence et l'abondance des micro-organismes d'intérêt. Cependant, il est clair que ces informations demeurent incomplètes. De plus, cette méthode a besoin de 4 à 7 jours pour obtenir les résultats en raison de la période anaérobie d'incubation exigée sur des milieux qui peuvent être complexes. Elle est donc coûteuse en temps et en matériel.

### **1.2.1.3 Cytofluorométrie à flux (FCM) pour l'étude de la microflore intestinale**

En 1984, Yentsch et Yentsch font le panorama des techniques optiques nouvellement apparues permettant la résolution des problèmes biologiques à l'échelle micrométrique et globale, techniques d'analyse et d'enregistrement à haute fréquence. La cytométrie de flux est l'appareil d'analyse et d'acquisition de données répondant le mieux à cette problématique. L'application de la cytométrie de flux aux micro-organismes s'est récemment développée et semble encore en pleine expansion, dans les domaines de la microbiologie alimentaire, marine, environnementale et clinique (Shapiro, 1995). Utilisant cette technologie, en 1994, van der Waaij et son équipe ont étudié pour la première fois les bactéries anaérobies non cultivables présentes dans les matières fécales chez l'Homme (> 99,9% de la microflore fécale). Ils ont également mesuré et différencié la taille de ces bactéries. De plus, la FCM a été utilisée afin de compter les bactéries lactiques (Pinder *et al.*, 1990) et indiquer leur viabilité en cultures pures par utilisation de fluorochromes non spécifiques comme, par exemple, l'iodure de propidium, la carboxyfluorescéine diacétate (cFDA), TOTO-1 et l'oxonol (DiBAC<sub>4</sub>) (Bunthof *et al.*, 2001; Ben Amor *et al.*, 2002). Cette technique était également utilisée pour détecter et compter directement le nombre total de bactéries présentes dans un milieu riche et complexe, le lait (Gunasekera *et al.*, 2000). La barrière la plus critique contre l'analyse du lait par FCM est la présence des protéines et des lipides. L'utilisation de protéinase K ou de savinase (pour la digestion des protéines) et la centrifugation (pour éliminer les lipides) ont résolu le problème et ont donné des meilleurs résultats par FCM (Gunasekera *et al.*, 2000). Les différentes parties du cytomètre de flux, le principe général ainsi que les avantages et les limites de la technique seront détaillés dans la prochaine section.

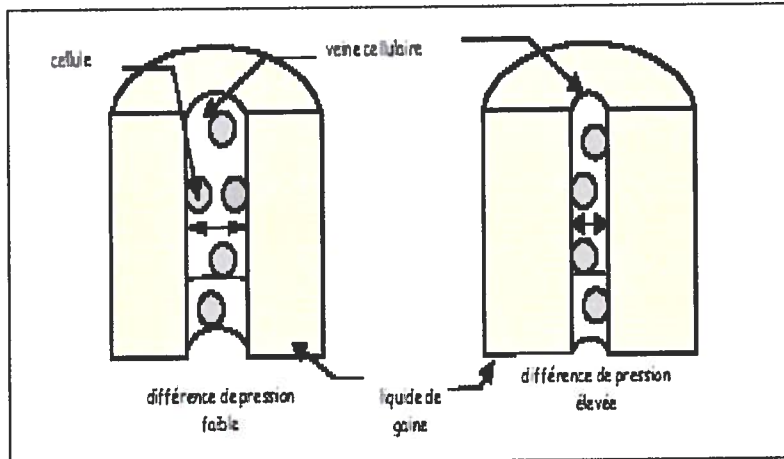
**Cytomètre de flux: instrumentation, principe général, limites et avantages** La cytométrie de flux (FCM) est une technique qui permet de compter une par une les cellules d'un échantillon en suspension dans un liquide, de discriminer des sous-populations homogènes sur des critères de fluorescence et de taille, et éventuellement de les trier en fonction de leurs propriétés optiques, géométriques et électriques (Davey et Kell, 1996; Porter *et al.*, 1996). En d'autres termes, la FCM permet de caractériser de façon individuelle une cellule, une particule sub-cellulaire, une bactérie ou tout autre objet (de 1 à quelques dixième de  $\mu\text{m}$ ) à partir de signaux optiques résultant de l'interaction avec une lumière monochromatique: diffusion de la lumière et fluorescence. Les signaux optiques mesurés en FCM peuvent refléter la morphologie de la cellule (paramètres de diffusion, la présence d'une certaine molécule, une activité physiologique, etc.). Il est ainsi possible de distinguer des sous-populations et de quantifier les signaux optiques de chacune d'elles. Ces mesures de signaux optiques sont rendues possible par le passage une par une des cellules alignées devant une source lumineuse. Cet alignement résulte de la présence de 2 flux laminaires coaxiaux soumis à des pressions différentes: les cellules circulent dans une veine liquide qui est injectée au centre d'un second flux liquide (liquide de gaine ou *sheath*).

Le cytomètre de flux se compose de trois parties: une partie fluidique, une partie optique et une partie électronique et informatique (Métézeau et Delmare, 1988).

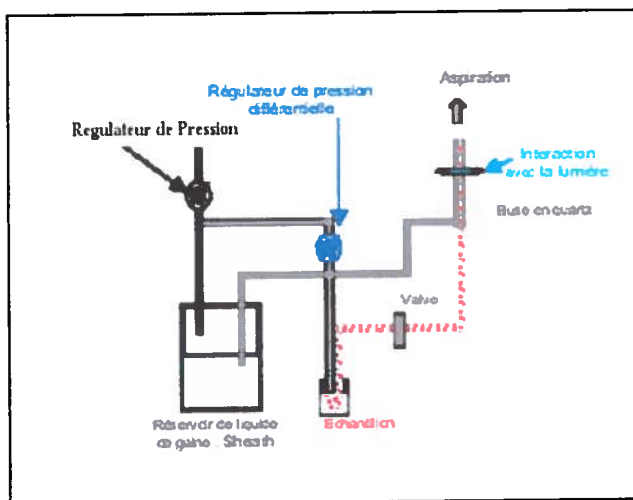
**La partie fluidique** Une veine liquide (liquide vital tel que le PBS) stable s'écoule à vitesse constante à l'intérieur d'un tube en plastique ou un tuyau sous l'effet de la pression (Fig. 8A). Le conduit contenant le liquide se termine par une buse de section étroite dont l'orifice est calibré avec grande précision. L'échantillon est introduit en légère surpression dans l'axe de la veine liquide à l'aide d'une aiguille métallique dont le diamètre interne est finement calibré. Le rapport des pressions imprimées à l'échantillon d'une part et au liquide entraîneur d'autre part détermine la vitesse de défilement des particules. Des taux de 100 jusqu'à 1000 cellules par seconde peuvent permettre des analyses individuelles de cellules (Wallner *et al.*, 1997). Ces deux flux laminaires sont créés par la mise en pression de deux réservoirs de liquide contenant: le

**Figure 8:** Les 2 gaines liquides assurant le déplacement et le positionnement cellulaire (A), schéma général de la fluidique (B) et principe du cytomètre de flux (C)

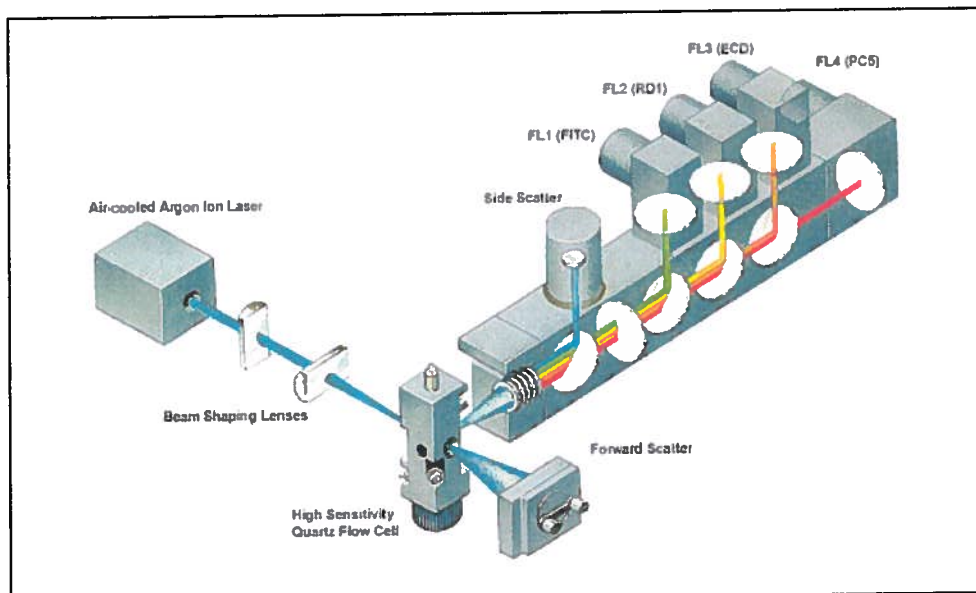
**A**



**B**



**C**



liquide de gaine; PBS et la suspension cellulaire. La figure 8B présente le type fluide écoulement vers le haut.

**La partie optique** Dans le cytomètre illustré à la figure 8C, la veine liquide est illuminée à 90° par un faisceau de lumière monochromatique émis par un laser, à ions d'argon de puissance d'émission 488nm, et focalisé au travers d'une lentille positionnée à l'aide de vis micrométriques. Les particules sont analysées au moment où elles traversent le faisceau de lumière, c'est à dire pendant 1 microseconde. Perpendiculairement à la fois à l'axe de la veine liquide et à l'axe du faisceau laser, un objectif dirige vers les photomultiplicateurs PMT (SS, FL1, FL2, FL3, FL4) les impulsions lumineuses qui résultent de l'interaction des particules fluorescentes et du faisceau laser. Devant chaque photomultiplicateur, un jeu de filtres sélectionne les longueurs d'onde spécifiques des pigments naturels ou des fluorochromes utilisés et élimine le rayonnement excitateur (Shapiro, 1995). Les filtres peuvent être de différentes natures et de spécificité variée. L'analyse en cytométrie de flux d'une suspension de particules est possible quand l'appareil est capable de discriminer les différentes populations ou sous-populations fluorescentes. Dans l'axe du laser, une photodiode (FS) collecte la lumière diffusée aux petits angles (<15°) au delà d'une barre d'obscurité qui masque le faisceau incident.

**La partie électronique et informatique** Le passage d'une particule devant le faisceau laser s'accompagne d'une modulation lumineuse. Les photomultiplicateurs détectent un signal de fluorescence qui correspond à la quantité de pigment ou de colorant associé à la particule. La diffusion du rayon incident est détectée par la photodiode et le signal est, pour la plupart des objets, proportionnel à leur surface.

La surface d'une impulsion (intégrale de fluorescence) correspond à la quantité totale de fluorochrome associée à la particule; la valeur crête de cette impulsion quantifie l'intensité de fluorescence maximum. Les impulsions électriques digitalisées sont traitées par un analyseur multicanaux et classées par canal en fonction de leur amplitude. Les impulsions s'accumulent sous forme d'histogramme (1 paramètre, 256 à 1024 canaux disponibles). La combinaison des paramètres de fluorescence et de

diffusion dans l'axe du laser permet la discrimination entre populations de particules de suspension cellulaire ou subcellulaire (noyaux, chromosomes, débris cellulaires, virus). Les différentes populations de l'échantillon constituent des histogrammes de répartition (en taille et fluorescence) et sont identifiés sous forme de pics.

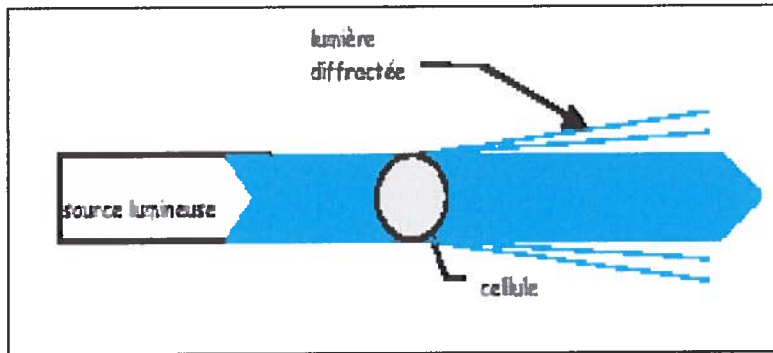
### **Les quantités mesurées en cytométrie: la lumière diffusée et la fluorescence**

Deux composantes sont mesurées en cytométrie : la lumière diffusée et la fluorescence. La première rend compte de l'aspect des cellules (taille, structure), la seconde met en évidence la présence de fluorochromes à la surface ou à l'intérieur des cellules (l'autofluorescence cellulaire étant très faible après une excitation dans le visible sauf pour les cellules végétales et les bactéries photosynthétiques).

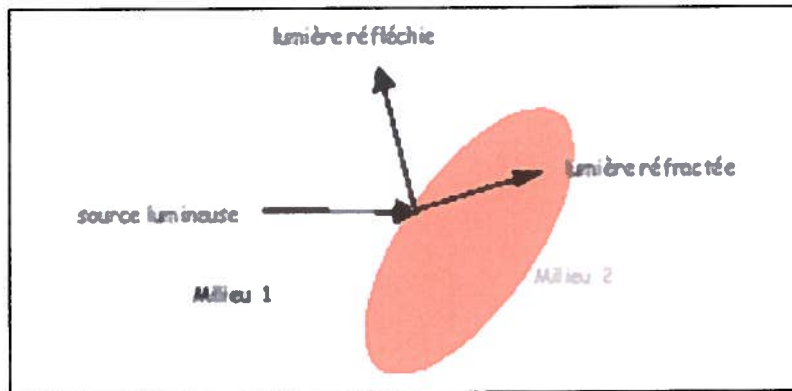
a) lumière diffusée: Lorsqu'une cellule est éclairée par la source lumineuse, elle renvoie une partie de la lumière reçue dans toutes les directions. Cette lumière diffusée est utilisée pour caractériser les cellules. La lumière collectée dans l'axe de la source lumineuse (1 à 10°) FS ou FLS (*Forward light Scatter*) correspond surtout à la lumière diffractée par la cellule. La quantité de lumière diffractée est proportionnelle à la taille (dimension) de la cellule. L'enregistrement de ce signal, FS pour *Forward Scatter* rend ainsi compte de la taille de la cellule (Fig. 9A). La lumière collectée à 90°, SS ou SSC (*Side Scatter*), résulte principalement de phénomènes de réfraction et de réflexion de la source lumineuse par la cellule et ses constituants. Ces phénomènes reflètent des caractéristiques telles que la réfringence de la cellule, la granulosité, le rapport nucléocytoplasmique (Fig. 9B), ils varient donc selon la structure même de la cellule. Les mesures des diffractions de lumière à petit angle (FS) et à grand angle (SS) sont présentées par l'histogramme du profil de dispersion de lumière de la population analysée. Les données de deux paramètres sont représentées en  $x$  et  $y$ , et chaque point désigne un événement selon les mesures des deux paramètres (Davey et Kell, 1996). Par exemple, le premier histogramme de la figure 10A présente les données enregistrées pour chacun des événements passant dans la veine d'entraînement pour les valeurs de dispersion de la lumière, c'est-à-dire la lumière réfractée par les constituants cellulaires (SS log) et diffractée par la cellule elle-même (FS log).

**Figure 9:** La lumière diffusée vers l'avant (*Forward Scatter*) reflète la taille (A), la lumière diffusée à 90° (*Side Scatter*) reflète la granulosité et le rapport nucléo-plasmique (B) et principe de la fluorescence (C)

A



B



C

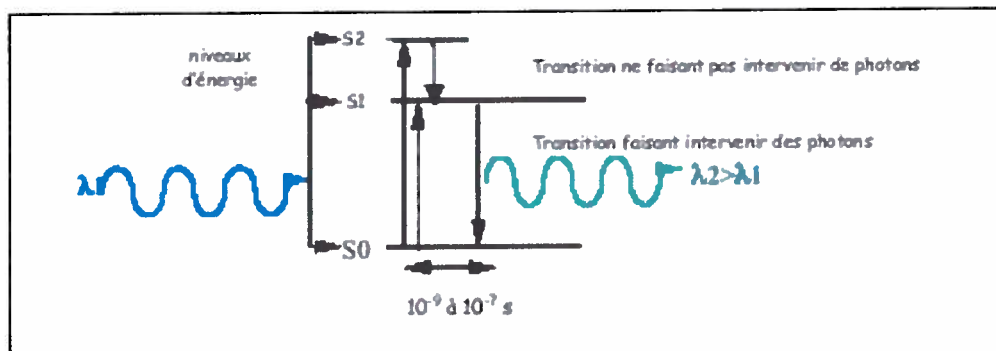
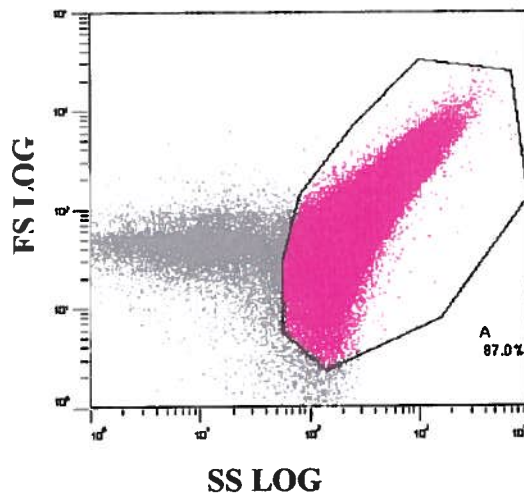




Figure 10: Exemples de profil de dispersion et des signaux de fluorescence de cytométrie de flux

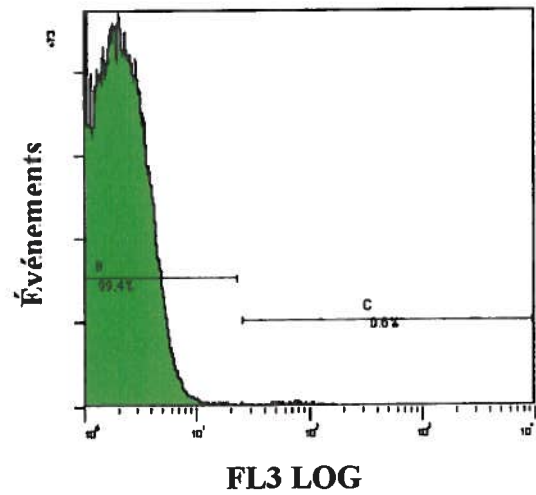
Profil de dispersion

A



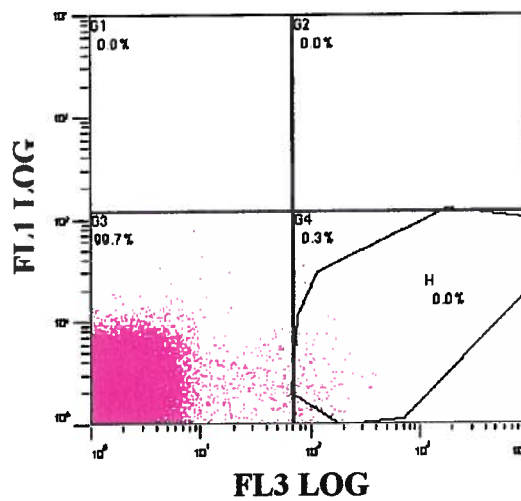
Signaux de fluorescence

B



Signaux de fluorescence

C



b) fluorescence: À un état normal, le niveau d'énergie d'une molécule fluorescente se trouve à l'état fondamental S0 (S = électron de la couche externe à l'état singlet). Sous l'action d'une source lumineuse appropriée, les électrons vont passer à l'état excité S1 ou S2 (niveaux d'énergie supérieurs). Le passage de l'état S2 à l'état S1 est très rapide et ne dégage pas de lumière. En revanche, le passage de S1 à S0 s'effectue avec émission d'un photon (Figure 9C). C'est donc un phénomène qui génère de la lumière de longueur d'onde  $\lambda_2$  supérieure à celle de la lumière excitatrice  $\lambda_1$  (émission spontanée).

Le cytomètre de flux évalue la mesure de la fluorescence de certains fluorochromes ou de l'autofluorescence de l'échantillon. L'autofluorescence réfère à la contribution des constituants cellulaires dans l'émission de fluorescence lorsque les cellules subissent une excitation à une certaine longueur d'onde. L'émission de fluorescence qui peut être observée dépend des filtres et détecteurs utilisés. Les données enregistrées sont habituellement présentées sous forme de courbes de distribution de fréquence dans laquelle l'abscisse représente l'ampleur du paramètre (type de fluorescence) mesuré tandis que l'ordonnée exprime le nombre d'événements possédant une valeur donnée du paramètre. Par exemple dans la figure 10B, le deuxième histogramme présente le résultat du signal de fluorescence enregistré par le canal FL1 (la fluorescence verte) sur l'axe des  $x$  par rapport à la distribution d'événements pour chaque valeur de fluorescence enregistrée. Aussi, il est possible de présenter les données de deux signaux de fluorescence pour chacun des événements, tel que présenté dans le troisième histogramme (Fig. 10C) où la fluorescence enregistrée au canal FL1 est présentée par rapport à la fluorescence enregistrée au canal FL3.

**Les avantages et les limites** La FCM permet l'étude cellule par cellule, la détection de cellules rares et la distinction des différentes sous populations. Elle possède une rapidité d'analyse, une détection de très faible quantité de lumière et 10000 niveaux d'intensité différents. Plusieurs centaines de cellules par seconde peuvent être analysées avec une grande sensibilité et précision. L'analyse est multiparamétrique. De plus, il est possible de trier les cellules selon les appareils. Les échantillons cellulaires doivent être mise obligatoirement en suspension. Parfois la dissociation est nécessaire, d'où le risque de rompre l'intégrité membranaire. Il est nécessaire de disposer d'un grand

nombre de cellules. De plus, il n'existe pas de mesure absolue (protocole de calibration). Les mesures (fluorescences et diffusions) représentent l'ensemble de la cellule (quand on analyse des cellules entières, cette technique ne permet donc pas de localiser les marqueurs fluorescents dans les compartiments cellulaires. Au moyen de cet appareil, l'étude morphologique est absente.

### **1.2.2 Les techniques de génétique moléculaire utilisées pour l'étude de la microflore intestinale: révolution/renaissance**

L'apport des techniques nouvelles d'écologie moléculaire basées sur la comparaison de séquences d'acides nucléiques (ADN ou ARN) permet aujourd'hui de suivre les variations de populations microbiennes de l'écosystème gastro-intestinal, indépendamment de la possibilité de leur mise en culture *in vitro* (Doré, 1997). Ces techniques vont ainsi bouleverser l'approche de l'écologie microbienne du tube digestif et fournir une description complète de cet écosystème. Il est souhaitable que les nouvelles techniques soient utilisées en combinaison avec les techniques classiques de culture, pour permettre une amélioration des méthodes de culture et d'isolement, de la classification et de la reconnaissance de la biodiversité. Le développement récent de la biologie moléculaire apporte des outils pour améliorer la spécificité de toutes les méthodes de dénombrement, et les laboratoires d'écologie microbienne ont développé des techniques utilisant des sondes moléculaires, des séquences d'ADN ou d'ARN pour révéler la présence de certains groupes spécifiques de micro-organismes dans des milieux ou écosystèmes complexes (Tannock, 1999; Brockman, 1995; Summanen *et al.*, 1993). Ces techniques sont très utiles lorsqu'il est nécessaire de détecter un micro-organisme spécifique ou simplement les micro-organismes présents sans nécessité de cultivation. Donc, des micro-organismes qui ne peuvent encore être isolés et cultivés. La méthode la plus développée est basée sur la détection de séquences spécifiques contenues dans l'ARN 16S de la petite sous-unité des ribosomes bactériens (Tannock, 1999). Matsuki et son équipe explorent avec cette méthode la répartition des espèces de bifidobactéries dans la microflore intestinale (Matsuki *et al.*, 1999). La modification de la flore bactérienne colique pourrait être un facteur déclenchant de la maladie de Crohn. Une forte augmentation du genre *Bacteroides* ainsi que d'espèces adhérentes

d'*Escherichia coli* a été observée dans la flore intestinale au cours de la maladie de Crohn active. Donc, de nouveaux outils moléculaires basés sur la spécificité des séquences des ARN ribosomiaux, permettent d'analyser la composition de populations bactériennes d'environnements complexes comme la flore intestinale, et d'en suivre l'évolution au cours du temps. De tels outils donnent accès à une information moins biaisée que par la culture, car ils prennent en compte des bactéries qui ne sont pas encore cultivées ou difficilement cultivées par les techniques microbiologiques classiques. De plus, il est souvent très hasardeux d'extrapoler le rôle joué dans le tube digestif par une population bactérienne à partir de ses caractéristiques évaluées en culture pure *in vitro*. Les études *in vitro* peuvent seulement être utilisées pour démontrer les fonctions potentielles d'une population bactérienne, mais pas pour affirmer qu'elle joue bien le même rôle dans le tube digestif. Donc, l'utilisation de ces techniques devrait permettre une image précise de l'identité et de la dynamique de la microflore intestinale, et devrait favoriser une compréhension améliorée de l'interaction entre la microflore et l'hôte. Ceci, à leur tour, mènera à un nouveau concept révolutionnaire de la microflore intestinale des humains (Tannock, 1999). Donc, la capacité des écologistes microbiens à analyser la composition des communautés bactériennes complexes comme la microflore intestinale, peut être considérablement augmentée par l'application des méthodologies moléculaires. Ajoutons que l'identification des bactéries anaérobies prédominantes du tube digestif humain par des méthodes conventionnelles est encombrante, longue et moins sensible par rapport aux méthodes moléculaires. Parmi les techniques qui tirent profit de l'utilisation de sondes moléculaires pour étudier la microflore intestinale, figurent la technique d'amplification par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) (Tannock, 1999; Wilson et Blichington, 1996), PCR-DGGE (Favier *et al.*, 2002; Tannock, 2001), PCR-TGGE (Tannock, 1999), PCR compétitive (Tannock, 1999; Reilly et Attwood, 1998), PCR-Multiplex, TRFPs (*terminal restriction fragment patterns*) (Khan *et al.*, 2001), LH-PCR, T-RFLP (Bernhard et Field, 2000), PFGE (*pulsed field gel electrophoresis*) (Kimura *et al.*, 1997; Tannock, 2001), ainsi que l'hybridation *in situ* de sondes couplées à un fluorochrome (FISH) (Franks *et al.*, 1998; Welling *et al.*, 1997), etc. Ces techniques ne nécessitent pas l'isolement et la culture des

micro-organismes, permettant ainsi l'étude de la diversité et des variations de composition complexe des populations microbiennes (Brockman, 1995).

#### **1.2.2.1 Amplification par PCR de l'ADN total pour l'étude de la microflore intestinale**

L'amplification par PCR réside dans la reproduction en multiples copies d'une portion d'un gène ou d'une région chromosomique ou plasmidique. Le fragment à amplifier est délimité par des amorces spécifiques, composées d'oligonucléotides. La séquence cible, présente en faible quantité au départ, peut donc être suffisamment abondante pour être révélée par électrophorèse sur gel d'agarose (Prescott et Harley, 1995). L'application de la technique de la PCR peut s'avérer très utile dans l'étude des communautés microbiennes mixtes (Schmidt *et al.*, 1991) comme par exemple la microflore fécale humaine en utilisant des amorces ciblant des séquences de l'ARN 16S ribosomal (Wilson et Blichington, 1996). Une équipe de l'Institut Pasteur a récemment développé une méthode fondée sur l'amplification par PCR d'un fragment codant la région hautement variable V1 de l'ARN 16S (Chagnaud *et al.*, 2001). Cette méthode peut être utilisée sur des colonies bactériennes isolées. Elle a été validée par son application à la reconnaissance de six souches référencées de lactobacilles et de différentes espèces de bactéries.

Les méthodes basées sur la PCR ont l'avantage d'être facilement accessibles à beaucoup de chercheurs et n'exigent pas les niveaux élevés de l'entrée technologique pour obtenir des données significatives. Cependant, des contaminations lors des manipulations peuvent survenir et mener à l'obtention de signal faux positif (Tannock, 1999). Également, par la méthode d'amplification par PCR, l'ADN amplifié est celui retrouvé dans l'ensemble de l'échantillon et non seulement l'ADN des cellules vivantes. Ainsi il est fréquent d'amplifier des fragments d'ADN libre provenant des cellules mortes mais dont l'ADN, molécule assez stable, n'a pas encore été détruit. La détection de ces micro-organismes peut donc entraîner une interprétation erronée de l'identification et la présence de micro-organismes à un temps donné ainsi que leur amplification. De plus, la présence d'inhibiteurs dans l'environnement d'où provient l'échantillon peut parfois nuire à la réaction de PCR (Schneegurt et Kulpa, 1998).

Ajoutons que, l'amplification du DNAr 16S exige une étape préparatoire de lyse cellulaire pour l'extraction de l'ADN. Il y a une vaste différence dans la susceptibilité des cellules des espèces microbiennes différentes aux procédures lytiques. Car seulement une méthode lytique est habituellement appliquée à l'échantillon, il est peu probable que les molécules d'ADN soient extraites avec succès égal à partir de toutes les espèces représentées dans l'écosystème. De plus, des réactions en chaîne de polymérase sont connues pour amplifier des molécules de rDNA des populations mélangées à efficacité différente (Tannock, 1999; Reysenbach *et al.*, 1992). Ces facteurs polariseront le profil de la communauté obtenu.

La PCR a été depuis 1988 déclinée en une multitude de variantes dont la liste ne cesse de s'allonger chaque jour: PCR-DGGE, PCR-TGGE, RT-PCR, cPCR, *real-time* PCR, TRFPs, PCR-*Multiplex*, PCR-*in Situ*, AP-PCR, RAPD, etc. Ce sont des méthodes prometteuses qui permettent une nouvelle démarche de confiance sur l'analyse de la microflore intestinale (Tannock, 1999). À la prochaine section, citons quelques exemples décrits dans la littérature: méthodes fondées sur l'amplification par PCR (*PCR-based method*) pour l'évaluation moléculaire de la microflore intestinale (Tannock, 1999).

**PCR-DGGE (*denaturing gel gradient electrophoresis*) et PCR-TGGE (*temperature gradient gel electrophoresis*)** Une étude employant PCR-DGGE/TGGE et l'analyse des séquences de l'ADNr 16S a eu comme conséquence une description dynamique de la colonisation bactérienne dans l'écosystème intestinal infantile et a permis la visualisation des bactéries qui sont difficiles à cultiver ou à détecter par d'autres méthodes. Dans cette technique, la sous-unité 16S de l'ADN ribosomiale a été amplifiée à l'aide d'amorces ( $\leq 400$  bp) dans laquelle une des amorces a une suite GC à son extrémité 5' (*GC clamp*). Les fragments 16S de la communauté microbienne dans l'échantillon sont amplifiés. Une méthode moléculaire, comme la DGGE, a été utilisée pour séparer les espèces 16S moléculaires dans le mélange obtenu. Les fragments 16S bicaténaires migrent sur un gel de polyacrylamide jusqu'à ce que chaque genre de fragment soit partiellement dénaturé par la température régnante (TGGE) ou par conditions chimiques (DGGE). Les fragments ne dénaturent pas complètement en

raison de la séquence type-GC (*GC clamp*), et la migration est radicalement ralentie quand la dénaturation partielle se produit. En raison de la variation des séquences 16S des espèces bactériennes différentes, les stabilité thermique et chimique sont également différentes, donc différentes espèces 16S peuvent être séparées par ces méthodes électrophorétiques. Un profil des séquences 16S amplifiées de l'échantillon est ainsi obtenu. Autrement dit, la migration d'ADN (produits de PCR) se fait dans un gel de polyacrylamide où il rencontre des concentrations croissantes d'agents dénaturants (urée+formamide) dont le rôle est de mimer une augmentation linéaire de la température du haut vers le bas du gel. La dissociation transforme le fragment d'ADN en une structure partiellement ouverte et crée une diminution brutale de sa mobilité, qui conduit l'ADN à se concentrer en un point du gel. La migration des molécules est de ce fait très dépendante de la séquence. Utilisant cette méthode, l'établissement des communautés bactériennes de deux bébés en bonne santé a été examiné pour 10 premiers mois de la vie en surveillant la diversité ribosomal de l'ADN 16S (ADNr) dans les échantillons fécaux en analysant les séquences des ribotypes principaux (Favier *et al.*, 2002). Des profils de DGGE des populations dominantes dans les intestins des bébés ont été obtenus en analysant les échantillons fécaux quotidiens. Après la naissance, les appareils gastro-intestinaux infantiles stérilisés ont été rapidement colonisés, et la succession des bactéries dans chaque écosystème a été surveillée. Pendant les premiers jours de la vie les profils étaient simples, mais ils sont devenus plus complexes puisque la diversité bactérienne augmente avec le temps dans les deux bébés. Des bibliothèques de clone des fragments amplifiés du ADNr 16S des matières fécales des bébés ont été construites, et ces bibliothèques ont permis l'identification des types bactériens par analyse comparative des séquences d'ADN; les espèces des genres *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, et *Enterobacter* ont été identifiées

TGGE et DGGE peuvent être employées pour surveiller les communautés microbiennes intestinales en fonction du temps (Tannock, 1999). Des fragments d'ADN peuvent être coupés du gel et re-amplifiés pour le séquençage et par conséquent l'identification du microbe que le fragment représente peut être faite. Des produits de PCR peuvent être arbitrairement clonés et employés comme standards dans les gels, de

sorte qu'au moins les espèces généralement en cours puissent être identifiées, et de sorte que différents gels puissent être comparés (Tannock, 1999; Muyzer et Smalla, 1998; Zoentendal *et al.*, 1998).

**TRFPs (*Terminal restriction fragment patterns*)** Cette technique moléculaire a été développée par Khan et son équipe (Khan *et al.*, 2001) pour identifier la majeure partie de la flore microbienne intestinale dominante en culture pure par amplification par PCR d'un fragment de gène de l'ARNr 16S, en utilisant une paire d'amorces universelles. L'amorce (*forward*) a été marquée avec le colorant fluorescent 6-carboxyfluorescéine (6-FAM) pour détecter le fragment terminal des produits de PCR après digestion avec des enzymes de restriction. Les produits de PCR ont été purifiés, digérés par des enzymes de restriction, et analysés par l'électrophorèse capillaire à l'aide d'un compteur séquentiel automatisé d'ADN. Les données ont été analysées avec le logiciel 2.1 de GeneScan. Onze bactéries qui sont prédominantes ont été avec succès identifiées en culture pure par cette technique moléculaire rapide (Khan *et al.*, 2001). Ce protocole est rapide, précis, sensible et capable d'identifier des organismes multiples dans un échantillon simple. Mais, il est limité par l'extraction de l'ADN.

**LH-PCR (*Length heterogeneity*) et T-RFLP (*Terminal restriction fragment length polymorphism*)** En 2000, Bernhard et Field ont utilisé les techniques LH-PCR et T-RFLP afin de distinguer la contamination fécale humaine et celle de la vache dans les eaux côtières sans cultiver des organismes comme indicateur. Ces méthodes sont employées pour analyser des différences dans les longueurs des fragments de gène dues aux insertions et aux suppressions et pour évaluer l'abondance relative de chaque fragment.

**Typage moléculaire** Une identification rapide et fiable des isolats bactériens est à présent facilitée par l'utilisation de la PCR et du séquençage automatisé de l'ADN amplifié (Tannock, 2001). Cependant, ces deux méthodes ne sont pas capables de différencier deux souches appartenant à la même espèce. Ceci devrait cependant être accompli grâce au typage moléculaire comme l'indiquent les méthodes présentées dans le tableau VI telles que l'électrophorèse enzymatique, la PFGE, le ribotypage et



**Tableau VI: Méthodes de typage moléculaire couramment utilisées pour différencier les souches bactériennes (adapté de Tannock 2001)**

Méthodes	Description
Electrophorèse enzymatique ( <i>Multilocus enzyme electrophoresis</i> )	Caractérisation des isolats par les mobilités électrophorétiques relatives de plusieurs enzymes.
Electrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) ( <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> )	Caractérisation des isolats fondée sur le polymorphisme de la taille des fragments de restriction de l'ADN chromosomique.
Ribotypage ( <i>Ribotyping</i> )	Différenciation des souches bactériennes fondée sur le profil obtenu après digestion de l'ADN bactérien et sondage avec des séquences d'ARN ribosomal.
Amplification aléatoire de l'ADN polymorphique (RAPD) ( <i>Random amplification of polymorphic DNA</i> )	<p>Une amorce (fragment court d'ADN) est arbitrairement choisie et allouée à l'ADN bactérien.</p> <p>Les amorces sont hybridées au hasard pour initier la polymérisation de l'ADN en PCR.</p> <p>La proximité, le nombre et la position des sites d'initiation varient selon les souches et le profil électrophorétique des fragments amplifiés d'ADN fournit une empreinte caractéristique de chaque souche bactérienne.</p>

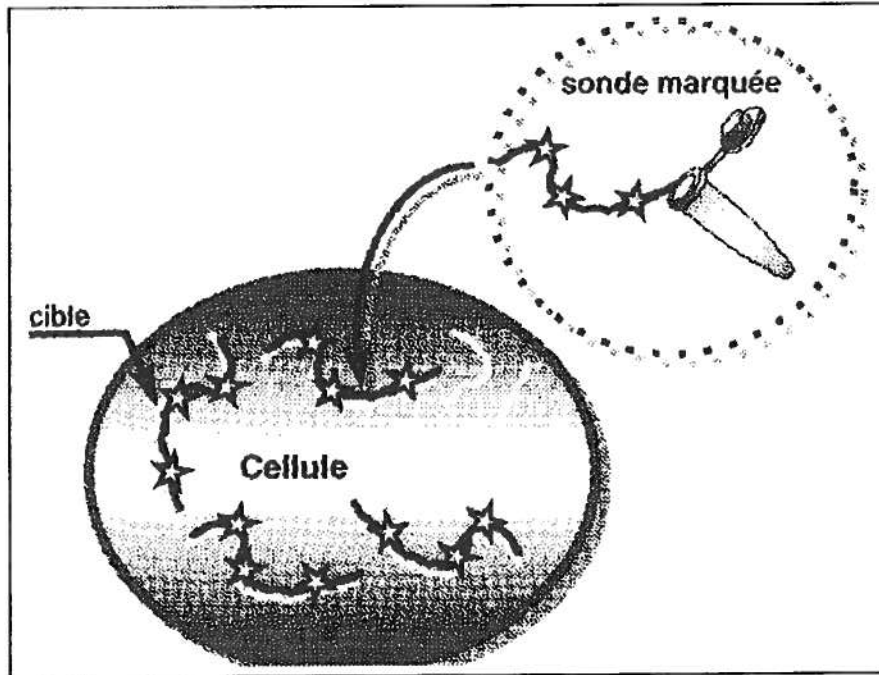
l'amplification aléatoire de l'ADN polymorphique. Cependant, les méthodes présentées sont coûteuses, lourdes et peu adaptées à des analyses en routine.

#### **1.2.2.2 Hybridation *in situ* de sondes couplées à un fluorochrome (FISH) pour l'étude de la microflore intestinale: avantages et inconvénients**

Le choix de l'hybridation *in situ* permet de contourner l'étape de culture et également d'effectuer une détection en temps réel des micro-organismes présents en localisant l'acide nucléique recherché au sein de tous les constituants cellulaires, et en déterminant la structure tissulaire ou cellulaire qui la contient. Cette technique consiste à faire pénétrer, à l'intérieur d'un micro-organisme visé, une sonde constituée d'un oligonucléotide (18 à 24 nucléotides) couplée à un fluorochrome (Fig. 11). En général, l'oligonucléotide est complémentaire à une séquence spécifique à l'ARN ou ADN 16S ribosomal (voir section 1.3). La détection des cellules ayant hybridé avec la sonde fluorescente peut ainsi se faire par cytofluoromètre de flux (voir section 1.2.3) ou par microscope à épifluorescence. En 1998, Franks et ses collègues ont utilisé des sondes marquées visant des séquences de l'ARN 16S ribosomal. Bien que, en théorie, un choix de centaines de sondes pourrait être employé pour énumérer les espèces bactériennes présentes dans un échantillon fécal par la technique de FISH, en pratique, une petite collection de sondes qui identifient de grands groupes phylogénétiques de bactéries a été employée à ce jour dans les études de la composition de la microflore intestinale. Le système est automatisé: des images numériques obtenues par microscope à épifluorescence sont analysées par ordinateur. Une fois utilisées pour analyser la microflore fécale humaine, Tannock (1999) a estimé que les sondes détectent environ deux-tiers de la collection microbienne. Actuellement, il s'avère avec cette technique que le genre *Bacteroides* et membres du groupe *Clostridium coccoïdes-Eubacterium rectale* constituent environ la moitié de la microflore microbienne.

Avant d'effectuer l'hybridation *in situ*, une première étape de fixation des cellules, entraînant des pontages entre les diverses structures cellulaires et tissulaires, est requise. Cette étape consiste à faire pénétrer par la phase aqueuse des cellules certains produits chimiques, appelés fixateurs, comme la paraformaldéhyde et le

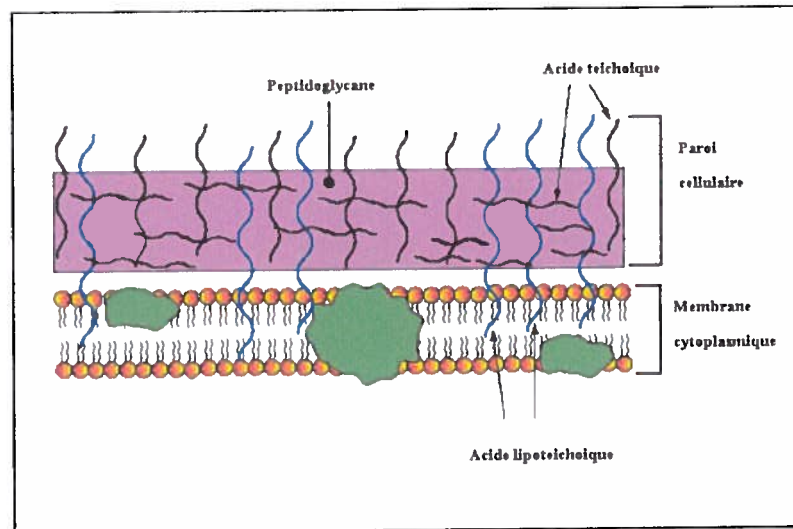
Figure 11: Schéma général de l'hybridation *in situ* (tiré de Morel et Cavalier, 1998)



glutaraldéhyde (Wallner *et al.*, 1997). Leur but est d'arrêter le métabolisme cellulaire, d'inactiver les enzymes lysosomiques et les RNases endogènes tout en conservant la morphologie cellulaire et l'intégrité des acides nucléiques car, dans le cas contraire, la détection par cytométrie (FCM) peut se révéler impossible. Loge *et al.* (1999) ont utilisé la fixation à la paraformaldéhyde (fixateur réticulant) pour les bactéries Gram négatif et l'éthanol qui entraîne la précipitation des protéines pour les bactéries Gram positif. Pour obtenir une fixation de bonne qualité et améliorer l'efficacité de l'hybridation, il est nécessaire de travailler à basse température pour réduire au maximum l'activité des enzymes qui entraînent l'autolyse des cellules, d'utiliser des solutions tamponnées proches de la neutralité (pH : 7.2 – 7.4) qui a un effet significatif sur la conservation des acides nucléiques et de bien ajuster la concentration du fixateur ainsi que la durée de fixation qui varient selon l'origine et la taille de l'échantillon.

Habituellement, l'étape de fixation entraîne aussi une perméabilisation de la paroi cellulaire (Amann *et al.*, 1995). Mais quelques espèces, souvent des bactéries de type Gram positif comme *Lactobacillus* par exemple (Tannock, 1999; Welling *et al.*, 1997), nécessitent un traitement supplémentaire pour achever la perméabilisation. L'accessibilité des sondes jusqu'à la cible ne peut s'effectuer que par l'établissement d'un protocole de perméabilisation efficace de la paroi cellulaire des bactéries Gram positif, composée presque exclusivement d'une épaisse couche de peptidoglycane (25 à 35 nm) et des acides téichoïques. Les chaînes de peptidoglycane sont reliées par des ponts interpeptidiques pour former une couche compacte (Fig. 12). Les parois cellulaires de l'ensemble des bactéries ont cependant des structures hétérogènes dépendant des espèces et varient considérablement selon les conditions de culture (Prescott *et al.*, 1995). Ainsi, lorsqu'on veut établir des protocoles, il faut tenir compte de ces différences. Parfois, la perméabilisation peut avoir été réussie mais la dimension des perforations n'est pas assez grande pour laisser pénétrer des molécules de plus grande taille que les oligonucléotides (Amann *et al.*, 1995). Il faut aussi conserver l'intégrité des constituants tout en effectuant une perméabilisation et cela sans provoquer la lyse cellulaire. À cette étape, de nombreuses alternatives sont pratiquées telles que l'utilisation d'enzymes tels le lysozyme, la protéinase K ou la mutanolysine (Matte-Tailliez *et al.* 2001; Tani *et al.*, 1997); de détergents tels le SDS, le Tween ou le

**Figure 12: Paroi cellulaire des bactéries Gram positif (tiré par McKenna et Mondal, 1996, Long Island University, Brooklyn Campus)**



Nonidet P-40 (Christensen *et al.*, 1999); d'HCl (Macnaughton *et al.*, 1994); et de mélange méthanol-formaldéhyde (Braun-Howland *et al.*, 1992). Dans le cas d'utilisation de détergent, celui-ci est fréquemment ajouté au tampon d'hybridation (Christensen *et al.*, 1999).

L'hybridation est effectuée en présence des cellules fixées et perméabilisées et des sondes fluorescentes, à des températures variant entre 46 °C et 55 °C (Wagner *et al.*, 1998) pendant 1 à 18 heures (Christensen *et al.*, 1999) selon les sondes utilisées et le type d'expérience effectué.

Les avantages de cette technique, FISH, sont nombreux. Principalement, elle ne nécessite pas la cultivation des micro-organismes à détecter. Également, la méthode d'hybridation *in situ* représente une méthode de détection avantageuse des micro-organismes car elle informe en temps réel grâce à la fixation des composantes cellulaires avant d'effectuer l'hybridation. L'utilisation de l'ARN ribosomal comme cible représente aussi un élément pratique du procédé d'hybridation *in situ* (voir section 1.2.3).

La technique peut toutefois présenter quelques désagréments et problèmes techniques. L'inconvénient majeur de cette approche résulte de l'impossibilité de déterminer les caractéristiques moléculaires de l'acide nucléique révélé (e.g. poids moléculaire, séquence) au sein du tissu (Morel et Cavalier, 1998). D'abord, l'hybridation *in situ* permet de détecter des cellules entières. Il est donc primordial de s'assurer d'avoir une quantité minimale de cellules nécessaire pour pouvoir les déceler au-delà de la limite de détection des outils disponibles comme par exemple la cytométrie de flux. L'échantillon à analyser doit donc être concentré. Dans le cas des échantillons d'eau par exemple, ils peuvent être facilement filtrés. Cependant, dans le cas des échantillons du sol et des matières fécales, la tâche devient plus complexe en raison des particules inorganiques dont il faut se débarrasser avant de tenter une concentration des cellules. Également, dans le cas des échantillons de laits fermentés, il faut se débarrasser des particules de protéines et de lipides par utilisation d'une technique (*Milk-clearing treatments*) avant de pouvoir détecter les bactéries par

cytofluorométrie de flux (Gunasekera *et al.*, 2000). De plus, si les micro-organismes visés ne représentent qu'une petite partie de la population totale, les seuils de détection restent à nouveau problématiques. On peut résoudre ce problème en procédant à un marquage multiple qui consiste à utiliser plusieurs sondes marquées et ciblées à différentes régions de l'ADN 16S ribosomal.

### **1.2.3 Choix de l'ARN 16S ribosomal, séquence cible, pour l'étude de la microflore intestinale par FISH**

L'ARN ribosomal représente un des avantages importants des techniques de biologie moléculaire, et particulièrement l'hybridation *in situ*. Les principaux bénéfices de ce choix par rapport à l'hybridation *in situ* seront donc détaillés dans la présente section. Tout d'abord, l'ARNr entre dans la composition des ribosomes, complexes responsables de la synthèse des protéines à l'intérieur de la cellule. Étant donné leur rôle capital, ceux-ci sont toujours présents en grande quantité. On retrouve, selon les différentes espèces, des contenus en ribosomes allant de  $10^3$  à  $10^5$  ribosomes par cellule (Amann *et al.*, 1995). L'abondance de l'ARNr cellulaire peut aussi varier jusqu'à un ordre de magnitude pour une même souche en relation avec le taux de croissance. Ainsi, la quantité relative d'ARNr peut donc indiquer l'activité physiologique de la population visée (DeLong *et al.*, 1989). Lors d'une hybridation, la sonde pourra s'hybrider à une grande quantité de séquences complémentaires au lieu d'une seule si, par exemple, la cible avait été l'ADN. Il s'agit donc d'une amplification naturelle de la cible qui résultera d'une amplification du signal (Porter *et al.*, 1996).

Également, les séquences d'ARNr sont composées à la fois de fragments hautement conservés parmi les différentes espèces et de fragments hautement variables entre celles-ci, situées entre les régions V1 et V2 (Tannock, 1999; Stackebrandt et Rainey, 1995). Les séquences conservées permettent la détection de l'ensemble des bactéries en utilisant des sondes dites universelles à toutes les espèces du groupe *Eubacterium*. On peut ainsi récupérer des informations sans discrimination du royaume, du genre ou de l'espèce. Les séquences très variables permettent davantage de se renseigner sur une espèce ou un genre spécifique à l'intérieur d'une flore diversifiée. Les sondes utilisées ne s'hybrideront alors qu'avec la séquence

complémentaire hautement spécifique. Des renseignements sur les séquences d'ARNr de plus en plus d'espèces sont disponibles sur les banques de données sur l'internet et ils permettent de connaître la spécificité de certaines séquences par rapport à quantité d'autres espèces connues (Porter *et al.*, 1996).

On sélectionne une séquence de 18 à 24 nucléotides d'une région présentant le plus de variabilité afin d'en faire une sonde spécifique à la souche bactérienne intéressante. Il est possible d'augmenter la sensibilité de l'hybridation *in situ* en procédant à un marquage multiple. Il y a alors utilisation de plusieurs oligonucléotides marqués qui visent deux ou plusieurs sites de la même sous-unité du ribosome, par exemple 16S, ou d'une autre sous-unité, par exemple les sous-unités 16S et 23S. Ainsi, si les hybridations réussissent, davantage de fluorescence peut provenir d'une seule cellule. L'utilisation de plusieurs sondes visant différentes parties de l'ARNr peut présenter un avantage dans la distinction de diverses populations. Il suffit de choisir des séquences cibles qui représentent différentes espèces, et de marquer les oligonucléotides respectifs avec des fluorochromes qui émettent à des longueurs d'onde distinctes. Ainsi, une certaine population peut être détectée par la fluorescence verte tandis que l'autre sera révélée par le détecteur de la fluorescence bleue (Amann *et al.*, 1995). L'utilisation des oligonucléotides non marqués (*helpers*) qui lient les sites adjacents au site cible de la sonde marquée fait augmenter les signaux faibles de fluorescence des sondes hybridées. Les oligonucléotides (*helpers*) peuvent ouvrir les régions d'ARNr inaccessibles pour l'hybridation *in situ* de sondes couplées à un fluorochrome. Ils ne causent pas le marquage des organismes additionnels non ciblés (Fuchs *et al.*, 2000). Plusieurs sondes universelles et spécifiques utilisées pour l'étude de la microflore intestinale, ont été déjà identifiées et décrites dans la littérature (Marteau *et al.*, 2001; Sghir *et al.*, 2000; Amann *et al.*, 1990; Langendijk *et al.*, 1995).

Le choix de la cible, l'ARNr, offre certes de nombreux avantages, mais peut également faire survenir des inconvénients. Il a déjà été mentionné plus haut qu'il existe une corrélation entre le contenu cellulaire en ARNr et le taux de croissance (DeLong *et al.*, 1989). Par conséquent, les micro-organismes à croissance lente ainsi que ceux en état de latence ne pourront être que difficilement détectés à cause de leur



faible contenu en ARNr et donc par la faible possibilité d'hybridation des sondes. Généralement, le contenu en ARNr diminue en relation avec le taux de croissance et il peut donc s'avérer difficile de détecter des micro-organismes en fin de croissance.

#### **1.2.4 Choix de la séquence pour synthétiser la sonde oligonucléotidique utilisée par FISH pour l'étude de la microflore intestinale**

Ces sondes sont des ADN monocaténaire de synthèse dont la séquence est complémentaire à l'acide nucléique recherché et publiée dans la littérature ou dans les différentes banques de données. Le choix de la séquence est primordial. La séquence de la sonde doit être la séquence complémentaire et anti-sens de cet ADNc. C'est une séquence entre 20 et 50 nucléotides comprise dans la région codante dont le pourcentage de G-C  $\leq$  50 et 55%. Au-delà de 60% de G-C, des liaisons aspécifiques peuvent se produire. Au niveau de la sonde, les séquences palindromiques entraînant des boucles intra-chaînes ou inter-chaînes qui limiteront l'hybridation doivent être absentes.

L'utilisation des sondes est particulièrement utile pour l'étude des rapports spatiaux des microbes dans l'écosystème intestinal (Tannock, 1999). Les avantages et les inconvénients de l'utilisation des sondes oligonucléotidiques afin de réaliser l'hybridation *in situ* se résument dans les points suivants. On peut déterminer une sonde particulière très précise, à ADN très stable. La sonde est disponible commercialement et rapidement en grande quantité que l'on peut conserver. Leur marquage est bien établi, l'extension 3' est la méthode la plus utilisée. On peut alors synthétiser des sondes marquées sens et non-sens qui procurent un excellent contrôle négatif; ne permettent pas une hybridation et n'entraînent aucun signal. Le signal peut être quantifié du fait qu'un oligonucléotide s'hybride à un acide nucléique-cible et à un seul. Pour l'amplification du signal, on peut utiliser plusieurs oligonucléotides simultanément. Par contre, la détermination des températures d'hybridation *in situ* et de lavages est difficile. Les paramètres d'hybridation et de lavages doivent être compatibles pour l'utilisation simultanée de plusieurs oligonucléotides.

### 1.2.5 Marqueurs des sondes, les fluorochromes et la fluorescence

Le choix du marqueur implique un système de révélation des hybrides qui s'effectuera par cytométrie de flux (FCM) dans le cas de sondes couplées à un fluorochrome. Le marquage peut être réalisé après l'obtention du fragment d'ADN ou bien au cours de la synthèse des oligonucléotides. Le principe du marquage choisi est l'addition de molécules marqueurs, les fluorochromes. Le fluorochrome est un colorant émettant une lumière visible d'une longueur d'onde (couleur) spécifique lorsqu'il est exposé à une lumière ultraviolette de longueur d'onde donnée (Johnson, 1996). Les fluorochromes peuvent être ajoutés librement à la suspension cellulaire ou être liés à des sondes spécifiques, oligonucléotides ou anticorps. Les fluorochromes libres peuvent se lier ou réagir avec certaines molécules telles que les protéines, l'ADN, l'ARN, et ne peuvent pénétrer ou être exclu de la cellule qu'en cas de perte d'intégrité membranaire. Parmi les fluorochromes non spécifiques qui peuvent s'intercaler dans les molécules d'ADN, se retrouvent le bromure d'éthidium, l'iodure de propidium ainsi que le DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) (Thomas *et al.*, 1997). Les fluorochromes chimiquement couplés à une macromolécule, telle qu'un anticorps ou un oligonucléotide, sont habituellement des molécules ayant une faible affinité spécifique pour les molécules biologiques. Parmi les plus utilisés, se retrouvent le FITC (fluorescéine-5-isothiocyanate), CY3 et CY5 (Davey et Kell, 1996) et sont classés selon leur longueur d'onde d'émission dans le tableau VII.

Le choix du fluorochrome peut s'effectuer en fonction des appareils disponibles ayant la capacité d'émettre aux longueurs d'onde d'excitation (dépendante de la source d'excitation) et de percevoir la longueur d'onde d'émission (dépendante des détecteurs). Le choix est aussi influencé par la nature du milieu de suspension des cellules (par exemple son pH), de la taille du fluorochrome ou de sa capacité à effectuer une liaison avec une autre molécule.

**Tableau VII: Classification des fluorochromes selon leur longueur d'onde d'émission**

<b>Fluorochromes</b>	<b>Source laser</b>	<b>Excitation / absorption</b>	<b>Émission</b>
<b>DNA</b>			
Hoechst 33342	Argon	325-355 nm	450 nm (bleu)
Iodure de propidium	Argon	342-514 nm	615 nm (orange)
Bromure d'éthidium	Argon	342-514 nm	315 nm (orange)
<b>RNA</b>			
Pyronine Y	Argon	480-550 nm	570-600 nm (orange)
Acridine orange	Argon	480-550 nm	570-600 nm (orange)
Thioflavine T	Argon	480-550 nm	550-600 nm (orange)
Thiazol orange		453-480 nm	
<b>Protéines ou membranes</b>			
FITC (fluorescéine)	Argon	488 nm	530 nm (vert)
Phycoerythrine: PE	Argon	488 nm	585-590 nm (orange)
Texas red: TR	Krypton	595 nm	680 nm (rouge)
Double marquage (PE-TR)	Argon	488 nm	680nm (rouge)
Allophycocyanine	Krypton/Helium-Neon	635-650 nm	670 nm (rouge)
<b>Fonctions cellulaires</b>			
Indo-fluo-3			

### **1.2.6 Instruments d'observation des cellules fluorescentes (microscope à épifluorescence et cytomètre de flux) pour l'étude de la microflore intestinale par FISH**

L'hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes résulte en un marquage des cellules cibles. Le signal de fluorescence émis par ces cellules est détecté à l'aide d'appareils spécialisés tels que les microscopes à épifluorescence ainsi que le cytomètre de flux. Ces appareils sont équipés d'une source d'illumination, donc d'excitation. Ces sources peuvent être, par exemple, des lampes au mercure projetant une série de longueurs d'onde de façon continue ou un rayon laser qui possède la capacité d'émettre certaines longueurs d'onde précises. Les appareils doivent aussi posséder des filtres optiques qui permettent d'isoler les photons d'émission des photons d'excitation. Ils doivent également être munis de détecteurs qui enregistrent les photons d'émission et produisent des données observables, soit une image ou un signal électrique.

La fixation des cellules et le maintien de leur forme pendant les opérations permettent la détection par microscopie ou cytométrie de flux. D'une part, la combinaison de la technique d'hybridation *in situ* avec les analyses par cytométrie de flux laisse envisager les avantages considérables des analyses quantitatives en découlant. Ainsi, il est possible de quantifier, par exemple, le pourcentage de la population totale marquée par la sonde utilisée ou encore d'effectuer des analyses multiparamétriques, et ce à de hautes vitesses d'analyse (Davey et Kell, 1996; Porter *et al.*, 1996). D'autre part, la combinaison de la fixation des cellules avec la microscopie, permet de situer la ou les espèces microbiennes visées dans leur environnement immédiat.

#### **1.2.6.1 Microscope à épifluorescence**

Microscope dont la source lumineuse est une lampe émettant un rayonnement très intense (il existe plusieurs intensités de sources lumineuses) sélectif qui est sélectionné par un filtre dit d'excitation. Il est pourvu de plusieurs jeux de filtres correspondants aux fluorochromes les plus habituellement utilisés. Chaque jeu de filtres

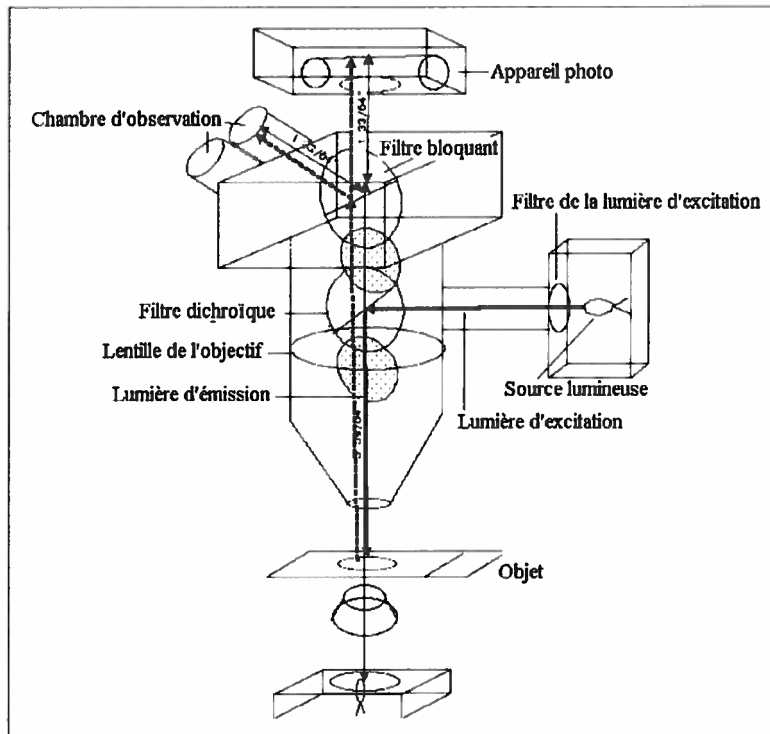
est constitué d'un filtre d'excitation, d'un miroir dichroïque et d'un filtre d'émission (Fig. 13). La lumière émise passe à travers le filtre d'excitation qui ne laisse franchir que la longueur d'onde d'excitation appropriée. Ce rayon d'excitation est réfléchi par le deuxième filtre qui est le miroir dichroïque et converge au foyer de l'échantillon par la lentille de l'objectif. Les molécules fluorescentes de l'échantillon sont donc excitées et émettent à leur tour une lumière à une longueur d'onde spécifique (Lodish *et al.*, 1995). Cette lumière est à nouveau convergée par la lentille d'objectif et passe à travers le miroir dichroïque pour franchir un dernier filtre qui bloque la lumière résiduelle de la source d'excitation (Lodish *et al.*, 1995). Les techniques d'épifluorescence fondées sur l'utilisation de fluorochromes permettent un comptage direct plus spécifique en microscopie. Après coloration, l'identification des bactéries est possible sur la base de leur couleur, de leur forme et de leur taille (Kepner et Pratt, 1994). Matte-Tailliez et son équipe ont utilisé pour la première fois des sondes *peptide nucleic acid* (PNA) fluorescentes ciblant l'ARNr et la microscopie à épifluorescence, afin de détecter et identifier les bactéries lactiques dans le lait et les levains industriels. La détection et l'identification des cellules ont été réalisées en une heure et demie. Des limites dans l'utilisation de certaines sondes ont été rencontrées à cause d'hybridations non spécifiques (Matte-Tailliez *et al.*, 2001).

En microscopie classique à épifluorescence, un des problèmes majeurs est la présence d'un bruit de fond important lié à l'épaisseur de l'objet observé. Bien que la mise au point se fasse sur un plan focal précis, l'enregistrement de l'information est entaché d'un bruit de fond qui se superpose à l'image du plan observé: ce bruit résulte de l'excitation, par la source lumineuse, de tous les fluorochromes situés sur le trajet lumineux.

### 1.2.6.2 Cytomètre de flux

La lecture sous le microscope à épifluorescence est généralement fastidieuse. Cependant, le comptage peut être automatisé par la détection des cellules individuelles entraînées par un flux liquide à l'aide du cytomètre en flux. La cytométrie de flux est un

**Figure 13: Principe du microscope à épifluorescence**



système fondé sur l'émission ou la diffusion de photons par les cellules lors de leur passage devant un faisceau laser. La différenciation des bactéries peut reposer sur des fluorochromes (comme en épifluorescence) ou sur les paramètres morphologiques influant sur la diffusion de la lumière (Métézeau *et al.*, 1994). Amann *et al.* (1990) ont couplé la détection par sondes oligonucléotidiques spécifiques de l'ARNr 16S marquées avec un fluorochrome ou un composé radioactif avec la cytométrie de flux. Plus récemment, la quantification de *Ruminococcus obeum*, bactérie non cultivable présentée dans les échantillons fécaux humains a été réalisée par l'hybridation *in situ* en combinaison avec la cytométrie de flux (FISH-FCM) en utilisant des sondes ciblant les ARNr 16S (Zoetendal *et al.*, 2002). Dans le travail présenté dans ce mémoire, le but est de développer et de tester cette technique FISH-FCM pour l'étude des deux souches importantes de la flore digestive. Cette technique est pour la première fois utilisée pour dénombrer les deux souches en étude.

### **1.3 Importance du développement des techniques simples capables de détecter et dénombrer les bactéries de la microflore intestinale**

Les sections précédentes montrent que le suivi de la population des souches de la microflore colique par des techniques simples et adaptées à l'utilisation dans un laboratoire de routine, est nécessaire pour détecter une condition chronique ou un état pathologique plus loin. Certaines bactéries de la microflore intestinale possédant des propriétés métaboliques bénéfiques et donc potentiellement utilisables en thérapeutique humaine sont connues sous le nom des probiotiques, nutriments fonctionnels ou nutraceutiques. Il est possible de modifier la flore colique endogène chez l'enfant et l'adulte, par l'utilisation de ces probiotiques. Donc, il est nécessaire d'évaluer les effets cliniques d'un traitement par probiotiques dans diverses maladies, citons par exemple l'allergie alimentaire, la maldigestion du lactose et les maladies inflammatoires de l'intestin, etc. Cependant, ces dix dernières années ont vu l'explosion sur le marché des aliments fermentés aux vertus présumés probiotiques (Hilliam, 1998; Kneifel et Bonaparte, 1998; Wood, 1992). Ces produits contiennent des bactéries d'origine intestinale appartenant à différentes espèces de *Bifidobacterium*, des bactéries appartenant aux espèces *L. acidophilus* et les germes classiques du yaourt *S.*

*thermophilus* et parfois *L. bulgaricus* (Tannock, 1999; Reuter, 1997; Reuter, 1990; Fuller, 1989). Or, la concentration conseillée afin d'obtenir un effet bénéfique pour la santé est de  $10^6$  bactéries probiotiques par gramme de produit à la date de préemption (Samona et Robinson, 1991). Il est donc très important pour les producteurs d'aliments, mais aussi pour les laboratoires de contrôle de pouvoir dénombrer et suivre les bifidobactéries, les lactobacilles, etc., provenant des aliments fermentés. Ce qui donne aux consommateurs des informations distinctes sur les produits administrés. Or, les milieux décrits dans la littérature sont, soit insuffisamment sélectifs, soit ils inhibent partiellement la croissance des souches étudiées, soit ils ne sont pas adaptés à l'emploi dans un laboratoire de routine car leur préparation est fastidieuse. Le tableau VIII énumère différents milieux sélectifs, électifs et différentiels utilisés pour le dénombrement des lactobacilles et des bifidobactéries. La plupart de ces milieux a une composition complexe (Tableau IXA, IXB) par addition des agents inhibiteurs, des antibiotiques, des sangs humain ou animal ainsi que de la viande. C'est la raison pour laquelle, malgré plusieurs tentatives de la Fédération Internationale Laitière (IDF), il n'existe à ce jour aucune méthode standard de dénombrement des bifidobactéries, simplement un conseil d'utilisation d'un milieu contenant du chlorure de lithium et du propionate de sodium comme agents inhibiteurs (IDF, 1999). D'où l'importance de développer une méthodologie simple, robuste et unifiée joignant la capacité quantitative et automatisée des méthodes classiques, la spécificité et la rapidité des méthodes modernes afin de détecter et dénombrer des bactéries de la microflore gastro-intestinale.

#### **1.4 Objectifs de l'étude**

Le développement d'un milieu sélectif simple pour la croissance de la souche *Bifidobacterium adolescentis*, ainsi que la combinaison de la technique de l'hybridation *in situ* des sondes couplées à un fluorochrome avec la cytométrie de flux (FISH-FCM), afin de dénombrer deux bactéries de type Gram positif (*L. johnsonii* et *B. adolescentis*) de la microflore gastro-intestinale en culture pure sont deux objectifs de ce travail de recherche.



**Tableau VIII: Différents milieux de culture pour la détection et l'énumération des espèces de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus* potentiellement probiotiques**

Groupe bactérien	Abréviation du milieu	Références
<i>Lactobacillus</i>	EC	von Hunger, 1986
	MRS-trehalose	Lapierre, 1990
	TPPY	Lapierre, 1990
	MRS-bile	Bracquart, 1981
	X-Glu	Pedersen, 1993 Kneifel et Pacher, 1993
<i>Bifidobacterium</i>	DIC	Sozzi <i>et al.</i> , 1990
	BEE	Beerens, 1990
	DP	Bonaparte <i>et al.</i> , 2001
	BFM	Nebra et Blanch, 1999
	BL	Mitsuoka <i>et al.</i> , 1965
	mMRS + sang	Pacher et Kneifel, 1996
	mRCM	Reuter, 1990
	AMC	Arroyo <i>et al.</i> , 1994, 1995
	TPY + NPNL	Ghoddusi et Robinson, 1996
MRS-NPNL	Dave et Shah, 1996	
<i>Lactobacillus</i> et <i>Bifidobacterium</i>	BIO	Reuter, 1990
	mHHD	Zúñiga <i>et al.</i> , 1993
	LB	IDF, 1993
	mTPPY	Ghoddussi et Robinson, 1996
	BCP	Ogihara <i>et al.</i> , 1983

**Tableau IX: Composition des milieux sélectifs pour *Bifidobacterium***

**A**

	DP	BIO
pH	6.2	6.2
Ingrédients (g ou mL ou mg)		
Milieu gélosé	42.0	50.0
Glucose	5.0	10.0
Lactose	5.0	
Agar	0.5	
L-Cystéine hydrochloride	5.0	
Acide propionique (mL)	1000.0	1000.0
Aqua dest. (mL)	2.0	
Dicxacilline (mg)		
Erythrocytes humains (mL)		50.0

**B**

	BFM
pH	5.5
Ingrédients (g ou mL ou mg)	
Extrait de la viande	2
Extrait de levure	7
Amidon	2
L-Cystéine hydrochloride	0.5
Chlorure de sodium	5
Peptone	5
Tryptone	2
Lactulose	5
Ribo flavine (mg)	1
Chlorhydrate de chlorure de thiamine (mg)	1
Bleu de méthylène (mg)	16
Chlorure de lithium (mg)	2
Acide propionique (mL)	5
Aqua dest. (mL)	1000.0
Agar-agar	15

### 1.5 Importances de choisir les deux genres bactériens, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* comme sujet d'étude

Choisissons deux souches des genres bactériens à étudier, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, pour des raisons diverses:

- la flore digestive dominante est composée en particulier de *Lactobacillus* (dans l'intestin grêle) et de *Bifidobacterium* (dans le gros intestin). Ce dernier genre est un groupe majeur parmi les bactéries saccharolytiques du côlon; il constitue jusqu'à 25% de la population totale de l'intestin humain adulte (Schneider, 2000);
- *Bifidobacterium* sont les premiers à coloniser dont l'allaitement maternel favorise leur développement;
- *Bifidobacterium* sont utilisés comme indicateur potentiel de la contamination fécale ainsi que son origine (Nebra et Blanch, 1999);
- *Lactobacillus* sont dominants chez les nourrissons avec du lait maternisé;
- ce sont les plus utilisées comme probiotiques à cause de leur capacité de survie élevée durant leur passage le long du tube digestif (Tamime *et al.*, 1995; Kneifel *et al.*, 1993; Reuter, 1990);
- les bifidobactéries sont souvent associées avec *L. acidophilus* dans les produits du marché pour des raisons organoleptiques;
- ce sont des bactéries anaérobies, de type Gram positif, qui ne sont jamais suivies par la technique utilisée dans ce projet de recherche.

Les lactobacilles et bifidobactéries rentrent dans la définition des probiotiques et possèdent d'autres caractéristiques intéressantes : **effets bactéricides** (Bernet *et al.*, 1994; Saavedra *et al.*, 1994); **effet hypocholestérolémiant** (Tahri *et al.*, 1997; Schaafsma *et al.*, 1996; Grill *et al.*, 1995); **effets immunomodulateurs** (Schiffirin *et al.*, 1995; Link-Amster *et al.*, 1994); **effets contre la maldigestion du lactose** (Garvie *et al.*, 1984; Kim et Gilliland, 1983; Goodenough *et al.*, 1976); **production de vitamines**

**des groupes B, K, d'enzymes** (Mitsuoka, 1996; Roberfroid *et al.*, 1995); **capacité à induire la protonation de l'ammoniac en  $\text{NH}_4^+$ , moins diffusible** (intérêt dans les pathologies hépatiques) (Takiguchi *et al.*, 1996); **prévention du cancer du colon** (absence de production de substances potentiellement carcinogènes (Bouhnik *et al.*, 1996; Marteau *et al.*, 1990); et **amélioration du transit gastro-intestinal** (Grimaud *et al.*, 1993).

## **1.6 Suivi microbien de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* dans la littérature**

Ces deux genres bactériens ont été suivis dans la littérature par des méthodes classiques et modernes. Parmi ces méthodes, citons entre autres l'utilisation des milieux de cultures électifs, sélectifs et différentiels (Bonaparte *et al.*, 2001; Roy, 2001; Martineau, 1999; Nebra et Blanch, 1999; Charteris *et al.*, 1997; Lapierre *et al.*, 1992; Beerens, 1991), les méthodes basées sur l'amplification par PCR (Khan *et al.*, 2001; Bernhard et Field, 2000; Tannock, 1999; Kaufmann *et al.*, 1997; Kok *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996), la PCR multiplex (Ventura *et al.*, 2001), la PCR-DGGE (Satokari *et al.*, 2001), le typage moléculaire (Tannock, 2001; Kimura *et al.*, 1997), la technique de FISH (Matte-Tailliez *et al.*, 2001), la cytométrie de flux (Ben Amor *et al.*, 2002; Bunthof *et al.*, 2001; Gunasekera *et al.*, 2000), etc. Mais, jusqu'à ce jour, aucun suivi de ces deux bactéries de type Gram positif de la microflore gastro-intestinale n'a été réalisé par FISH-FCM.

## **1.7 Les souches bactériennes de la microflore gastro-intestinale en étude**

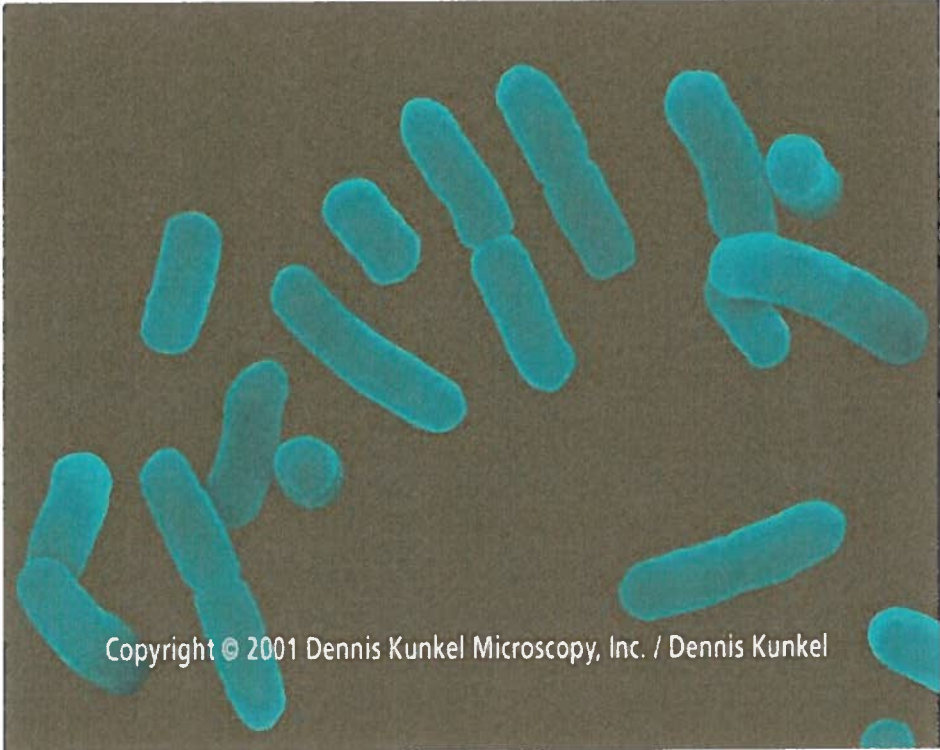
### **1.7.1 Caractéristiques et taxonomie**

*Lactobacillus johnsonii*: avec plus de 70 espèces (dont plusieurs sont divisées en sous-espèces), le genre *Lactobacillus* est, quantitativement, le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques (LAB) caractérisées par la production d'acide lactique. Elles sont distribuées dans diverses places écologiques, dans toutes les régions gastro-intestinales et génitales, et constituent une partie importante de la flore indigène de l'Homme et des animaux (Charteris *et al.*, 1997). Les *Lactobacillus* sp. sont très hétérogènes et les diverses espèces présentent des caractères phénotypiques, biochimiques et physiologiques variés. Cette hétérogénéité est reflétée par les valeurs de

pourcentage de G + C qui, selon les espèces, varient de 32 à 53 (Charteris *et al.*, 1997). Les souches de lactobacilles sont constituées de bacilles (Fig. 14) à Gram positif dont la couche de peptidoglycane est du type L-lysine-D-aspartate; difficile à perforer (Tannock, 1999; Welling *et al.*, 1997), longs et fins (parfois incurvés), ou de coccobacilles dont la forme évoque une corynébactérie. Ils sont non sporulés, généralement immobiles, micro-aérophiles (mais certaines souches sont anaérobies strictes à l'isolement), catalase négative, généralement nitrate réductase négative, possédant un métabolisme fermentatif (l'acide lactique représente au moins 50% des produits de fermentation) et présentant des exigences nutritionnelles complexes. Leur température de croissance optimale est de 44°C (Kandler et Weiss, 1986). *L. acidophilus* a été isolé la première fois dans les fèces infantiles par Moro, en 1900, qui l'a appelé *Bacillus acidophilus*. En 1929, Hollande inclus *Bacillus acidophilus* dans le genre *Lactobacillus*. Cependant, en 1980, (Johnson *et al.*) et (Lauer *et al.*) ont rapporté que les espèces différentes du genre *Lactobacillus* peuvent être distinguées par l'homologie d'ADN-ADN (Johnson *et al.*, 1980; Lauer *et al.*, 1980). Ceci plus tard a été confirmé par (Fujisawa *et al.*), dont les résultats avec cette technique ont indiqué que *L. johnsonii* étant une espèce, classifiée avec d'autres espèces telles que *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* et *L. acidophilus* (Fujisawa *et al.*, 1992; Hammes *et al.*, 1995) dans un même groupe *L. acidophilus*. *L. johnsonii* est une bactérie homofermentaire stricte et anaérobie facultative qui dégrade les hexoses en acide lactique (exclusivement par la voie homofermentaire d'Embden Meyerhof), qui ne dégrade pas les pentoses et qui ne produit pas de CO<sub>2</sub> lors de la fermentation du glucose ou du gluconate. Il existe naturellement dans le tractus gastro-intestinal chez l'homme et l'animal, dans la bouche et le vagin chez les humains (Hammes *et al.*, 1995) et dans certains produits laitiers et fermentés traditionnels tel que le kéfir.

***Bifidobacterium adolescentis*:** les espèces du genre *Bifidobacterium* sont des bacilles à Gram positif, non acido-résistants, très polymorphes, immobiles, non sporulés, anaérobies (certaines espèces tolèrent cependant l'oxygène en présence de dioxyde de carbone) (Ahrtley et Denariatz, 1993), catalase négative (à l'exception de *B. asteroides* qui est catalase positive lorsque les souches sont cultivées en présence d'air et de *B. indicum* qui est catalase positive lorsque la culture est effectuée en présence d'air et dans

**Figure 14:** *Lactobacillus acidophilus*. Observation en microscopie électronique

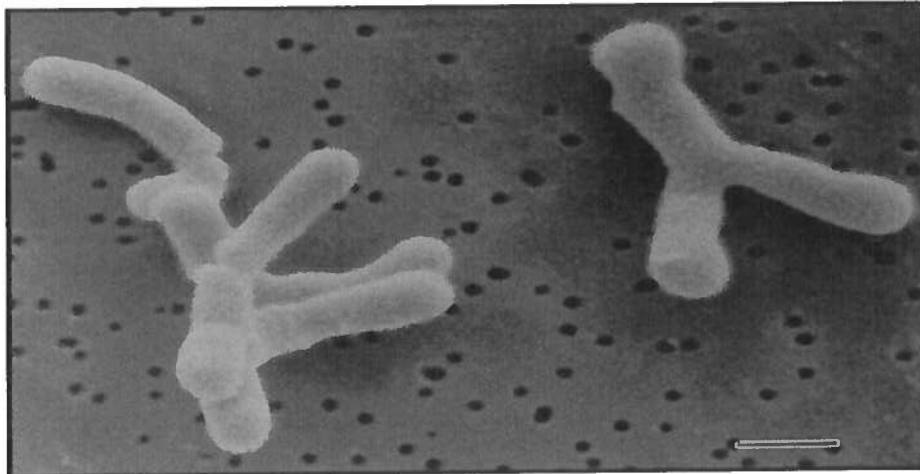


Copyright © 2001 Dennis Kunkel Microscopy, Inc. / Dennis Kunkel

un milieu qui contient de l'hémine), nitrate réductase négative (sauf si la culture est effectuée en présence de globules rouges lysés), synthétisant une fructose-6-phosphate phosphocétolase (enzyme clé du métabolisme des hexoses qui s'effectue selon une voie qualifiée de "*bifid shunt*"), fermentant le glucose sans production de gaz et produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique comme produits terminaux de la fermentation du glucose dans un rapport molaire 3:2 (Scardovi, 1986). La température de croissance optimale de *Bifidobacterium* est entre 37°C et 41°C (température minimum de croissance : 25-28°C; température maximum de croissance : 43-45°C) et le pH optimal est entre 6,5 et 7,0 (pas de croissance à 4,5-5,0 ou 8,0-8,5). Leurs besoins complexes en nutriments et leur croissance en anaérobiose stricte en font des bactéries difficiles à cultiver. La morphologie est variable selon les espèces et l'aspect bifide n'est pas constant. Par exemple, *B. animalis*, *B. bifidum* et *B. longum* (souches des trois biovars) sont des bacilles généralement bifides – en forme de y – (Fig. 15), alors que *B. coryneforme* ou *B. minimum* ressemblent à des corynébactéries. La classification des bifidobactéries a changé plusieurs fois depuis qu'elles ont été découvertes en 1899 dans les selles de nourrissons allaités (Scardovi, 1986; Tissier, 1899).

Les bifidobactéries sont une des principales espèces bactériennes de la microflore colique tout au long de la vie. En fait, elles constituent souvent le groupe bactérien le plus important chez le nourrisson allaité au sein (Ducluzeau, 1993). Par ailleurs, la distribution des espèces du genre *Bifidobacterium* dans la flore fécale d'enfants, d'adultes et de personnes âgées a été étudiée (Gavini et al., 2001). L'espèce *B. adolescentis* est la plus fréquemment isolée chez les personnes âgées. La distribution de *B. adolescentis* est significativement différente chez l'enfant et la personne âgée.

**Figure 15 :** Photo de *Bifidobacterium adolescentis*. Observation en microscopie électronique à balayage (MEB) (échelle =1  $\mu\text{m}$ , grosseur= 91 Ko)





## CHAPITRE 2: MÉTHODOLOGIE

### 2.1 Les micro-organismes utilisés

Les deux cultures de micro-organismes étudiés appartiennent aux espèces *Lactobacillus johnsonii* ATCC 332 et *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703 provenaient respectivement, de Laboratoire de Santé Publique du Québec (LSPQ) (20045, chemin Sainte-Marie, Sainte-Anne-de-Bellevue, Québec, Canada) et de laboratoire du Dr R. Wheatcroft (Agriculture et Agro-Alimentaire Canada, 93 Stone Rd. W. Guelph, Ontario, Canada). Le tableau X énumère les bactéries étudiées dans ce travail ainsi que leur provenance. Les bactéries étaient conservées en cultures congelées à - 80 °C dans du glycérol (15%).

### 2.2 Les milieux de culture

Deux milieux électifs, MRS+ (Roy, 2001) et MRS+++ (communication personnelle, R. Wheatcroft, Agriculture et Agro-Alimentaire Canada) et un autre sélectif pour *B. adolescentis*, MRSLC (développé au cours de cette étude), furent utilisés dans cette étude. Leur composition respective est détaillée dans le tableau XI.

#### 2.2.1 Préparation des milieux de culture (MRS+, MRS+++ et MRSLC)

Les milieux de culture utilisés pour les deux souches bactériennes sont des milieux complexes basés sur le milieu commercial MRS (“De Man-Rogosa-Sharpe”, Difco Laboratories, Michigan).

**Le bouillon MRS+**, qui est un milieu MRS modifié, par l’addition d’hydrochloride monohydraté de L-cystéine. La composition du milieu MRS pour un litre, tel que prescrit par les fournisseurs (Difco Laboratories, Michigan), est constituée de 10,0 g de peptone de caséine; 8,0 g d’extrait de viande; 4,0 g d’extrait de levure; 20,0 g de D(+)-glucose; 2,0 g d’hydrogéo-phosphate di-potassium; 1,0 g de Tween<sup>®</sup> 80; 2,0 g d’hydrogénocitrate di-ammonium; 5,0 g d’acétate de sodium; 0,2 g de sulfate de magnésium

**Tableau X: Les souches de bactéries de la microflore gastro-intestinale étudiées ainsi que leur provenance**

Nom	Abréviatiion	Provenance
<i>Lactobacillus johnsonii</i> 332	ATCC 332	Laboratoire de Santé Publique du Québec
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> 15703	ATCC 15703	Agriculture et Agro-Alimentaire Canada

**Tableau XI: Composition des milieux de culture utilisés**

	MRS+	MRS+++	MRS LC
pH	6.5 - 7	6.5 - 7	6.5 - 7
Ingrédients (g ou mL ou mg)			
Milieu commercial	MRS 52.2	52.2	52.2
Carbonate de sodium		0.2	0.2
Chlorure de calcium		0.1	0.1
Cystéine hydrochloride		0.5	0.5
Chlorure de lithium			2
Aqua dest. (mL)	1000.0	1000.0	1000.0

et 0,04 g de sulfate de manganèse. Le pH a été ajusté entre 6,5 et 7,0 avec du NaOH 10 N. Par la suite, le milieu a été bouilli pendant 10 minutes sur des colonnes réfrigérantes (Fig. 16) afin de réduire le plus possible la quantité d'oxygène présent dans le milieu tout en minimisant l'évaporation. Le milieu a ensuite été aliquoté et barboté dans des bouteilles sérologiques de 50 mL avec un mélange gazeux contenant : 10 % d'H<sub>2</sub>, 10 % de CO<sub>2</sub> et 80 % de N<sub>2</sub> (Praxair, Mississauga, Ontario) (Fig. 17). Les bouteilles de milieu ont été scellées avec des bouchons en butyle. Les bouteilles ont été stérilisées pendant 20 minutes à 121°C dans un contenant remplie d'eau jusqu'au niveau du milieu de culture dans les bouteilles. Après sa réduction et stérilisation, une solution stérile d'hydrochloride monohydraté de L-cystéine a été additionnée (2 mL de 25 % par litre de milieu, à une concentration finale de 0,5 g/L) (Sigma Chemicals Co., St-Louis) juste avant l'usage du milieu pour réduire davantage toute trace d'oxygène. Cet agent réducteur a été stérilisé par filtration avec un filtre de nitrocellulose de 0,2 µm (Sarstedt, Newton, North Carolina).

**Le bouillon MRS+++** est un milieu MRS+, auquel a été additionné 0,2 g/L de carbonate de sodium ainsi que 0,1 g/L de chlorure de calcium. Le milieu a été réduit comme décrit pour le milieu MRS+, bouilli et stérilisé. Enfin, une solution stérile d'hydrochloride monohydraté de L-cystéine a été ajoutée (2 mL de 25 % par litre du milieu, à une concentration finale de 0,5 g/L) juste avant l'usage.

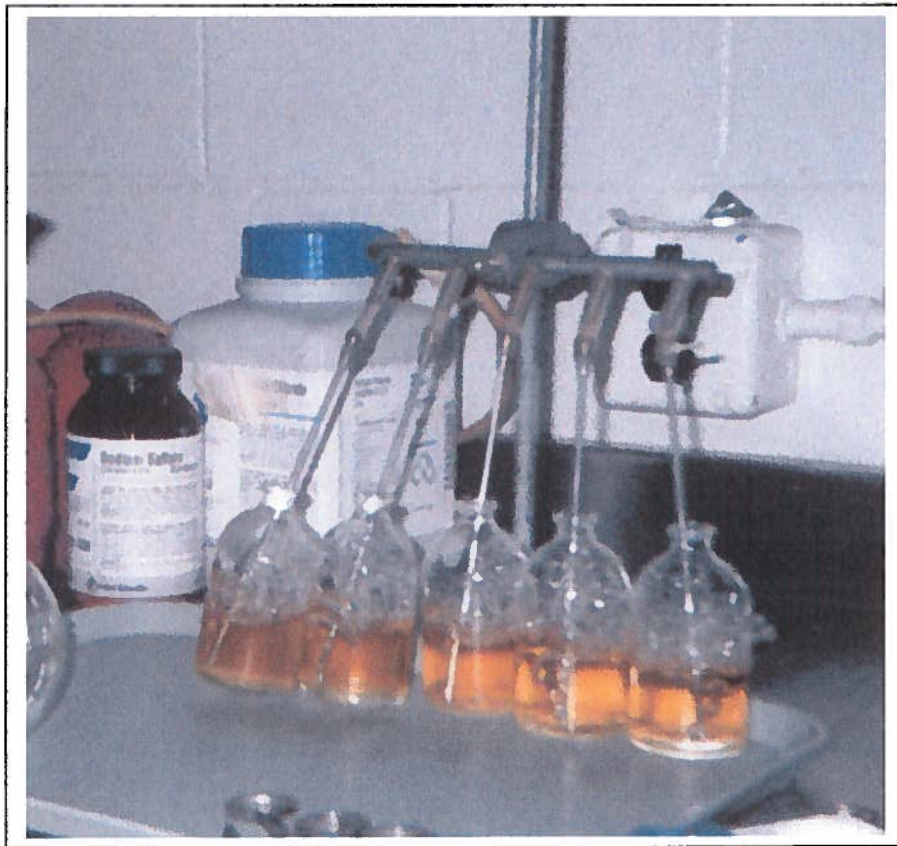
**Le bouillon MRSLC** est un milieu MRS+++ auquel a été additionné 2,0 g/L de chlorure de lithium avant l'ajustement du pH. Ce milieu a été réduit et stérilisé par la même méthode que le milieu MRS+ et la solution stérile d'hydrochloride monohydraté de L-cystéine a été additionnée juste avant l'usage du milieu.

**Les milieux solides gélosés** utilisés pour cultiver les bactéries dans les boîtes de Pétri, a été préparés par la même méthode que le milieu liquide sans les étapes d'ébullition ni de barbotage. Il a suffi de procéder à un ajout de 1,5 % (p/v) de gélose Bacto™ avant de procéder à l'étape d'ajustement du pH. Après la stérilisation, les milieux solides ont été laissés refroidir jusqu'à une température de 50 °C. Enfin, deux mL d'une solution stérile

**Figure 16: Système d'ébullition du milieu de culture sur des colonnes réfrigérantes**



**Figure 17:** Barbotage du milieu de culture dans des bouteilles sérologiques avec un mélange gazeux contenant 10 % d'H<sub>2</sub>, 10 % de CO<sub>2</sub> et 80 % de N<sub>2</sub>



d'hydrochloride monohydraté de L-cystéine (0.5 g/L) a été ajoutée et les milieux ont été étalés dans les boîtes de Pétri.

### **2.3 Étude de la croissance bactérienne sur milieux liquides et solides, productifs et sélectifs**

Un milieu sélectif étant caractérisé par sa productivité et sa sélectivité (Mossel, 1985), ces deux critères furent évalués qualitativement grâce à un isolement des deux souches sur boîte de Pétri. Chaque souche futensemencée sur une boîte puis incubée 24 h à 37 °C dans une jarre anaérobique (10 % CO<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub> et 80 % N<sub>2</sub>).

Si le germe se multipliait sur toute la surface de la boîte, sa croissance était considérée comme optimale, sur la moitié de la surface comme réduite et comme absente si aucune colonie ne se développait. La procédure, effectuée sur chaque milieu, fut répétée 3 fois.

#### **2.3.1 Préparation des cultures bactériennes**

Deux repiquages par bactérie (provenant de colonies isolées sur géloses) dans le bouillon réduit MRS+++ étaient effectués, espacés par des périodes d'incubation de 24h, afin de générer des stocks viables. Les bouteilles furent incubées dans un incubateur réglé à 37°C. Ces cultures furent emmagasinées en additionnant 15% (v/v) de glycérol, aliquotées et congelées à - 80°C dans des flacons stériles. Afin de préparer les inocula pour l'étude subséquente, chaque souche fut repiquée de nouveau à partir des cultures congelées sur des boîtes de Pétri, pour avoir des colonies isolées, et incubées dans des jarres anaérobiques BBL™ GasPak™ (Becton Dickinson and Co, Sparks, MD) conservées dans un incubateur réglé à 37°C pour une période de 24 heures. Enfin, les boîtes de Pétri contenant les colonies furent conservées en condition anaérobique à 4°C. Les colonies isolées furent repiquées et inoculées dans des bouteilles de sérum, puis incubée pendant 24 heures afin d'obtenir des stocks pour suivre la croissance bactérienne par mesure de la densité optique à 540 nm (DO<sub>540</sub>) (UV-Visible Spectrophotometer Varian Cary 50 Bio) et par dénombrement des Unité

Formant des Colonies par millilitre (UFC/mL) au moment de l'échantillonnage effectué avec des seringues de 3 mL.

### **2.3.2 Suivi de la croissance bactérienne sur les milieux liquide (MRS+++ et solide (MRS+++ et MRSLC)**

Chaque espèce fut repiquée une deuxième fois dans des bouteilles de culture (MRS+++ et MRSLC) de 50 mL afin d'obtenir une densité optique à 540 nm entre 0,05 et 0,1 au temps zéro d'incubation. Les bouteilles furent conservées dans un incubateur réglé à 37°C pour une période d'incubation de 16 heures pour les deux souches. Un échantillon de chaque culture fut prélevé chaque 2 heures, dilué en série et ensemencé sur gélose MRS+++ selon la méthode DP (*drop plate method*) (Herigstad *et al.*, 2001) afin de connaître le nombre d'UFC par millilitre. D'après cette méthode, 10 µL du prélèvement fut transféré dans 90 µL d'une solution de 0,1% bactopeptone. Des dilutions successives furent effectuées dans 90 µL d'une solution de 0,1% bactopeptone à partir de la première dilution (1/10). À partir des dilutions appropriées, 40 µL furent étalées en quatre gouttes de 10 µL chacune et également espacées sur la boîte de Pétri incubée dans une jarre anaérobie. Parallèlement au dénombrement d'UFC/mL, la densité optique à 540 nm fut mesurée en duplicata sur un autre échantillon de chaque prélèvement en utilisant le spectrophotomètre.

## **2.4 Hybridation *in situ* en combinaison avec la cytométrie de flux (FISH)**

Différents essais ont été effectués pour les deux micro-organismes à l'étude et sont présentés dans les prochaines sections ainsi que les sondes, les méthodes et les outils de détection utilisés.

### **2.4.1 Les sondes d'ADN fluorescentes utilisées**

Les séquences des sondes fluorescentes universelles et spécifiques sont décrites au tableau XII. Les séquences des oligonucléotides utilisées pour générer les sondes fluorescentes spécifiques (LACTO, BIF) sont issues d'une étude comparative des



**Tableau XII: Séquence et position des sondes universelles et des sondes spécifiques aux souches *L. johnsonii* et *B. adolescentis***

Sonde	Séquence (5'-3')	Site cible	Référence
EUB	5' GCT GCC TCC CGT AGG AGT 3'	338-355 <sup>1</sup>	Mareau <i>et al.</i> 2001
NON	5' ACT CCT ACG GGA GGC AGC 3'	338-355 <sup>1</sup>	Amann <i>et al.</i> 1990
LACTO	5' YCA CCG CTA CAC ATG RAG TTC CAC T 3'	722-747 <sup>2</sup>	Sghir <i>et al.</i> 2000
BIF	5' CAT CCG GCA TTA CCA CCC 3'	164-181 <sup>3</sup>	Langendijk <i>et al.</i> 1995

1 position relative au gène ribosomal 16S de *E. coli*

2 position relative au gène ribosomal 16S de *L. johnsonii*

3 position relative au gène ribosomal 16S de *B. adolescentis*

Y représente le nucléotide (C/T) et R représente le nucléotide (A/G)

séquences des gènes de l'ARN 16S ribosomal (gènes 16S) apparentées aux souches étudiées (Sghir *et al.*, 2000; Langendijk *et al.*, 1995). Les séquences des oligonucléotides spécifiques aux micro-organismes ont été trouvées dans la littérature et sont spécifiques respectivement aux espèces des genres *Lactobacillus* (LACTO) et *Bifidobacterium* (BIF). La sonde Lacto 722 est complémentaire à un site de la région semi conservée entre les nucléotides 708 et 754 chez *E. coli* (Sghir *et al.*, 1998). La sonde BIF 164 est complémentaire à un site de la région variable V2 (Langendijk *et al.*, 1995; Neefs *et al.*, 1993). La sonde EUB est un oligonucléotide complémentaire à une région conservée de l'ARN 16S chez toutes les eubactéries (Marteau *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 1997). La sonde NON est complémentaire à la sonde EUB et n'hybride à aucune séquence ribosomale. Elle a servi de témoin de l'hybridation non spécifique. Les oligonucléotides ont été synthétisés à l'aide du Gene Assembler (Pharmacia, Baie-d'Urfee, Canada) et par la suite, le fluorochrome fluorescéine amidite a été conjugué à l'extrémité 5' (FluoroP-rime, PharmaciaBiotech). Les oligonucléotides conjugués ont été purifiés sur une colonne NAP-10 et conservés dans l'eau à -20°C. Toutes les manipulations de synthèse de l'oligonucléotide et de conjugaison ont été effectuées dans le laboratoire du Dr François Shareck (INRS-Institut Armand Frappier, Laval, Québec, Canada).

#### **2.4.2 Les étapes de fixation/perméabilisation: Préparation des bactéries**

Un repiquage par bactérie dans le milieu liquide réduit MRS+++ a été effectué à partir des colonies isolées, espacé par une période d'incubation de 24 heures en anaérobiose, afin de générer des stocks viables stables. L'incubation s'est faite à 37°C. Une deuxième incubation de 8 heures pour *L. johnsonii* et *B. adolescentis* permirent d'obtenir des bactéries dans la phase logarithmique.

Pour l'hybridation *in situ*, le protocole de Thomas et son équipe (Thomas *et al.*, 1997) a été utilisé dans ce travail avec quelques modifications. Quatre essais d'hybridation *in situ* ont été effectués afin d'optimiser les étapes de fixation/perméabilisation. Ils sont détaillés ci-dessous. Les résultats ont été comparés avec ceux des cellules non perméabilisées.

Pour le protocole témoin, un échantillon de la culture bactérienne préparée (4 mL) a été prélevé dans un tube de centrifugation et a été centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Sur glace, les cellules ont été resuspendues dans 4 mL de tampon phosphate (130 mM de NaCl, 10 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2) supplémenté de 10 mM de pyrophosphate. Ce tampon a été filtré avec un filtre de nitrocellulose de 0,2 µm (Sarstedt, Newton, North Carolina) afin d'éliminer les particules pouvant intervenir avec l'analyse en cytofluorométrie de flux. Après centrifugation de 10 minutes à 10 000 g à 4°C, les cellules ont été rincées 2 fois avec 4 mL de PBS, pH 7.2. Cette fois-ci, les cellules ont été resuspendues dans 200 µL de tampon d'hybridation (0,9 M de NaCl, 20mM de Tris-HCl, pH 7,2). La réaction d'hybridation a été exécutée pendant une incubation de 16 heures, à 50°C. Pour arrêter la réaction, 3,8 mL de tampon PBS-pyrophosphate, pH 8,0 a été ajouté aux cellules en suspension. Deux premiers échantillons de 1 mL chacun, ont été utilisés pour vérifier l'autofluorescence de la réaction et de la suspension bactérienne; aucune sonde n'a été ajoutée au tampon d'hybridation. Les deuxièmes échantillons ont été utilisés pour l'addition du bromure d'éthidium (1 µg/mL) juste avant la lecture par cytofluorométrie de flux. Selon les concentrations cellulaires, une dilution (1/10) a été effectuée dans le tampon PBS-pyrophosphate afin de réaliser les analyses par microscopie à épifluorescence ou par cytométrie de flux.

Pour l'essai de la fixation des cellules avec la paraformaldéhyde et la perméabilisation avec le lysozyme, un autre échantillon de la culture préparée (4 mL) a été prélevé dans un tube de centrifugation et a été centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Sur glace, les cellules ont été resuspendues dans 4 mL de tampon PBS-pyrophosphate filtré. Une nouvelle centrifugation de 10 minutes, 10 000 g, à 4°C, a été effectuée. Par la suite, les cellules ont été resuspendues dans 4 mL d'une solution fraîche de paraformaldéhyde 3% (p/v) (A&C American Chemicals Ltd., Montréal) à la température de la pièce pour préserver la morphologie cellulaire. Cette solution a été préparée en dissolvant la paraformaldéhyde dans une proportion d'un tiers du tampon PBS concentré 3 fois pH 8,0 et de deux tiers d'eau déionisée à 60°C, afin de faciliter la dissolution. Le pH final a été ajusté à 7,2. La suspension des cellules dans la

paraformaldéhyde a été ensuite incubée à 4°C, pendant 1 heure. Après centrifugation de 10 minutes à 10 000 g à 4°C, les cellules ont été rincées 2 fois avec 4 mL du PBS, pH 7.2. Les cellules ont été centrifugées 10 minutes à 10 000 g à 4°C, et le culot a été resuspendu dans 320 µL d'une solution de lysozyme (Sigma Chemical Co., St-Louis) (50 g/L dans l'eau stérile), protéine fonctionnelle hydrolysant les molécules de peptidoglycane des parois bactériennes. Les cellules ont été incubées dans du tampon de Tris-HCl 100 mM, pH 7.2 dans un volume de 4 mL au total à 42°C pendant 10 minutes (Matte-Tailliez *et al.*, 2001). Après centrifugation de 10 minutes à 10 000 g à 4°C, les cellules ont été rincées 2 fois avec 4 mL du PBS, pH 7.2. Cette fois-ci, les cellules ont été resuspendues dans 200 µL de tampon d'hybridation (0,9 M de NaCl, 20mM de Tris-HCl, pH 7,2). La réaction d'hybridation a été réalisée dans les mêmes conditions que dans le protocole témoin. Deux échantillons ont été utilisés pour vérifier l'autofluorescence et deux autres pour vérifier la perméabilisation par addition du bromure d'éthidium (1 µg/mL).

Pour l'essai de la fixation des cellules avec la paraformaldéhyde suivie de la perméabilisation avec l'éthanol, les mêmes conditions utilisées et décrites précédemment ont été maintenues. Cependant, la perméabilisation a été achevée avec une solution d'éthanol (50:50) au lieu de la solution de lysozyme. L'éthanol a été ajoutée aux cellules sur glace et avec agitation, afin d'avoir un mélange homogène. Les cellules ont été resuspendues pendant 5 minutes, à température ambiante. Les étapes de lavage et d'hybridation sont les mêmes que celles décrites dans l'essai précédent.

Deux autres essais suivent le même protocole de fixation des cellules avec la paraformaldéhyde suivie de la perméabilisation avec l'éthanol, mais comportent quelques différences. Lors de la fixation à la paraformaldéhyde, l'incubation à 4°C a été effectuée pendant 16 heures et 30 heures selon les protocoles des expériences.

Les protocoles cités ci-dessus ont été ajustés pour *B. adolescentis* car les cellules étaient plus difficiles à resuspendre, et toutes les centrifugations ont été effectuées à 6000 g.

### **2.4.3 Hybridation *in situ* des sondes fluorescentes (FISH)**

Afin de vérifier l'accessibilité des sondes jusqu'à leurs cibles sur l'ARN 16S ribosomal après les étapes de la fixation et de la perméabilisation des cellules, un premier échantillon (1mL) a été utilisé pour vérifier l'autofluorescence de la réaction et de la suspension bactérienne, aucune sonde n'a été ajoutée au tampon d'hybridation. Un deuxième échantillon a été utilisé comme témoin de l'hybridation non spécifique où la sonde NON a été ajoutée. Les deux derniers échantillons ont été utilisés respectivement avec les sondes LACTO (spécifique aux *Lactobacillus*) ou BIF (spécifique aux *Bifidobacterium*) et EUB (sonde universelle aux eubactéries). Chaque sonde a été ajustée à une concentration finale de 10 ng/μL. La réaction d'hybridation a été exécutée pendant une incubation de 16 heures, à 50°C dans des tubes eppendorf. Un protocole témoin utilisé dans cette section consiste à fixer et perméabiliser un échantillon de la culture bactérienne de 4 mL avec une solution fraîche de paraformaldéhyde 3% (p/v) pendant 1 heure à 4°C.

### **2.4.4 Observation et détection de la fluorescence par microscope à épifluorescence**

L'observation des bactéries a été réalisée avec un microscope à épifluorescence Dialux 20 (Leitz Wetzlar, Allemagne) munie d'une lampe à mercure. Un grossissement total de 1000 X a permis l'observation à l'immersion à l'eau.

### **2.4.5 Désagrégation des cellules par sonication**

Un échantillon de la culture bactérienne, traité selon le protocole d'hybridation *in situ* (fixation à la paraformaldéhyde pendant 16 heures suivie d'une perméabilisation à l'éthanol) (voir section 2.4), est observé sous un microscope à épifluorescence Dialux 20 après addition du bromure d'éthidium, nous a montrés la formation des agrégats cellulaires. L'agrégation a été causée naturellement et pendant l'hybridation. Ceci a été vérifié par la comparaison des nombres des événements d'un échantillon traité avant l'hybridation et un autre après hybridation. Le dénombrement a été achevé avec un cytomètre de flux Coulter XL-MCL (Coulter Electronics, Hialeah, FL) après addition du bromure d'éthidium (1 μg/mL).

Le problème d'agglutination a été résolu par sonication, une avant hybridation et une autre après hybridation juste avant la lecture par FCM. Un échantillon de la culture bactérienne a été traité jusqu'à l'étape d'hybridation. Les cellules en suspension dans le tampon d'hybridation ont été soniquées sur glace pendant 1 min au maximum à 2,48 Watts et densité Watt/s.g.In= 292 (Kontes, sonicateur Micro-Ultrasonic Cell Disrupter). Après les étapes de l'hybridation, la dilution de l'échantillon et l'addition du bromure d'éthidium, la première lecture par FCM a été réalisée. Par la suite les cellules ont été soniquées (Branson, sonicateur Ultrasonic Cleaner, 117 Volts, 50/60 Hz, 0,5 Ampère) pendant une durée de 2 - 4 min (durée requise selon la souche étudiée). Une deuxième lecture par FCM a été réalisée. Plusieurs sonications de 2 min ont été faites consécutivement dont chacune a été précédée par une lecture par FCM. Un autre échantillon traité sans sonication a été utilisé comme témoin. Les comptes d'événements ont été effectués sur 20 µL de la suspension cellulaire pendant une période de 60 secondes à pression basse. Des calculs appropriés ont été effectués afin de connaître les comptes par mL de la culture.

#### **2.4.6 Observation et détection de la fluorescence par cytomètre de flux (FCM)**

L'énumération et la détection des bactéries ont été achevées avec un cytomètre de flux Coulter XL-MCL équipé d'un rayon laser d'argon à 488 nm. La fluorescence verte émise par la fluorescéine a été récoltée par le détecteur FL1, muni d'un filtre de 525 nm. La fluorescence rouge émise par le bromure d'éthidium complexé aux acides nucléiques a été pour sa part mesurée par le détecteur FL3, muni d'un filtre de 620 nm. La pression de la veine d'entraînement et de l'échantillon a été conservée à 10 µL/minute. Le taux d'événements analysés a été maintenu approximativement à 200-300 événements/seconde. Les analyses quantitatives des résultats ont été réalisées par le logiciel du WinMDI software ou du EXPO 32 ADC software (Beckman Coulter).

#### **2.5 Étude de l'état métabolique des cellules par mesure de l'intensité de la fluorescence (IMF)**

Un inoculum de la culture après 24 h d'incubation à 37°C en conditions anaérobies a été ajouté à une bouteille contenant du milieu MRS+++ réduit, de sorte que

la densité optique était entre 0,05 et 0,1 à 540 nm au temps zéro d'incubation. La bouteille a été incubée pendant 8 heures à 37°C, puis un échantillon de 4 mL a été prélevé et centrifugé à 10 000 g. Les cellules ont été resuspendues dans 4 mL de tampon PBS-pyrophosphate. De même, pour le temps 24 heures d'incubation, un échantillon de 4 mL a été prélevé, centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes, puis les cellules ont été resuspendues dans 4 mL de tampon PBS-pyrophosphate. La technique d'hybridation *in situ* a ensuite été appliquée telle que décrite plus haut (section 2.4.2) suivant le protocole choisi (fixation à la paraformaldéhyde pendant 16 heures suivie d'une perméabilisation à l'éthanol). Cependant, avant l'hybridation, les cellules en suspension dans le tampon d'hybridation ont été distribuées également dans 4 tubes eppendorf. Un premier échantillon a été utilisé pour vérifier l'autofluorescence de la réaction et de la suspension bactérienne, aucune sonde n'a été ajoutée au tampon d'hybridation. Un deuxième échantillon a été utilisé comme témoin de l'hybridation non spécifique où la sonde universelle (NON) a été ajoutée. Les deux derniers échantillons ont été utilisés respectivement avec les sondes spécifique (LACTO) et universelle (EUB). Chaque sonde a été ajustée à une concentration finale de 10 ng/μL.

## **2.6 Distinction entre *L. johnsonii* et *B. adolescentis* en mélange**

Les deux souches ont été traitées selon le protocole de fixation/perméabilisation choisi (voir section 2.4) et hybridés avec les sondes spécifiques respectivement, puis mélangées en quantité égale. De même, deux autres échantillons du mélange ont été utilisés pour vérifier l'autofluorescence par cytométrie de flux afin de détecter la fluorescence et de distinguer entre les deux populations.

## **2.7 Analyse des résultats de fluorescence**

Suite à l'acquisition des données, les résultats de fluorescence peuvent être analysés à l'aide de deux logiciels (XL SYSTEM II ou EXPO 32 ADC).

## CHAPITRE 3: RÉSULTATS

### 3.1 Développement des milieux de culture électif et sélectif simples pour dénombrer les deux souches étudiées, *Lactobacillus johnsonii* (ATCC 332) et *Bifidobacterium adolescentis* (ATCC 15703)

La première partie de l'étude consistait à tester et optimiser des milieux de culture simples sélectif et électif pour les deux souches étudiées, *L. johnsonii* et *B. adolescentis* dont le but de dénombrer et suivre facilement ces deux souches en culture pure et chercher la phase de croissance logarithmique ou exponentielle de chacune d'elle. Pendant cette phase de croissance logarithmique, la deuxième partie du projet, telle que l'hybridation *in situ* (section 3.2) a été réalisée.

#### 3.1.1 Croissance de *L. johnsonii* ATCC 332 et *B. adolescentis* ATCC 15703 sur les milieux gélosés MRS+, MRS+++ et MRSLC: Étude qualitative

Les résultats de l'étude qualitative de la croissance des deux souches étudiées sur les milieux gélosés sont rapportés dans le tableau XIII. Sur le milieu riche MRS+ (milieu basé sur MRS qui est disponible commercialement auquel on ajoute l'hydrochloride monohydraté de L-cystéine comme agent réducteur), *L. johnsonii* ATCC 332 ne se développe que faiblement et *B. adolescentis* ATCC 15703 irrégulièrement. Sur MRS+++ (MRS+ supplémenté avec le carbonate de sodium et le chlorure de calcium) se multiplient tous les deux germes, avec des morphologies de colonies différentes (forme plate pour *L. johnsonii* et bombée pour *B. adolescentis*). Quant au milieu MRSLC (MRS+++ supplémenté avec du chlorure de lithium), il inhibe la croissance de *L. johnsonii* et permet une multiplication optimale de *B. adolescentis*. Les colonies apparaissent de couleur blanche ayant la forme d'une tête d'épingle.

Ces résultats ont montré que le milieu MRS+++ est le meilleur milieu simple, productif et différentiel, pour dénombrer les deux souches et que MRSLC est un milieu



**Tableau XIII: Croissance de *L. johnsonii* et *B. adolescentis* sur les milieux gélosés étudiés**

Souches	MRS+	MRS+++	MRS LC
<i>L. johnsonii</i> ATCC 332	+	++	-
<i>B. adolescentis</i> ATCC15703	+/-	++	++

Croissance : ++ : optimale; + : réduite; +/- : irrégulière; - : absente.

sélectif pour *B. adolescentis*. La croissance de la souche *B. adolescentis* est comparable sur ces deux milieux, électif MRS+++ et sélectif MRSLC.

### **3.1.2 Dénombrement dans les milieux liquides (bouillon) MRS+++ et MRSLC: Étude quantitative**

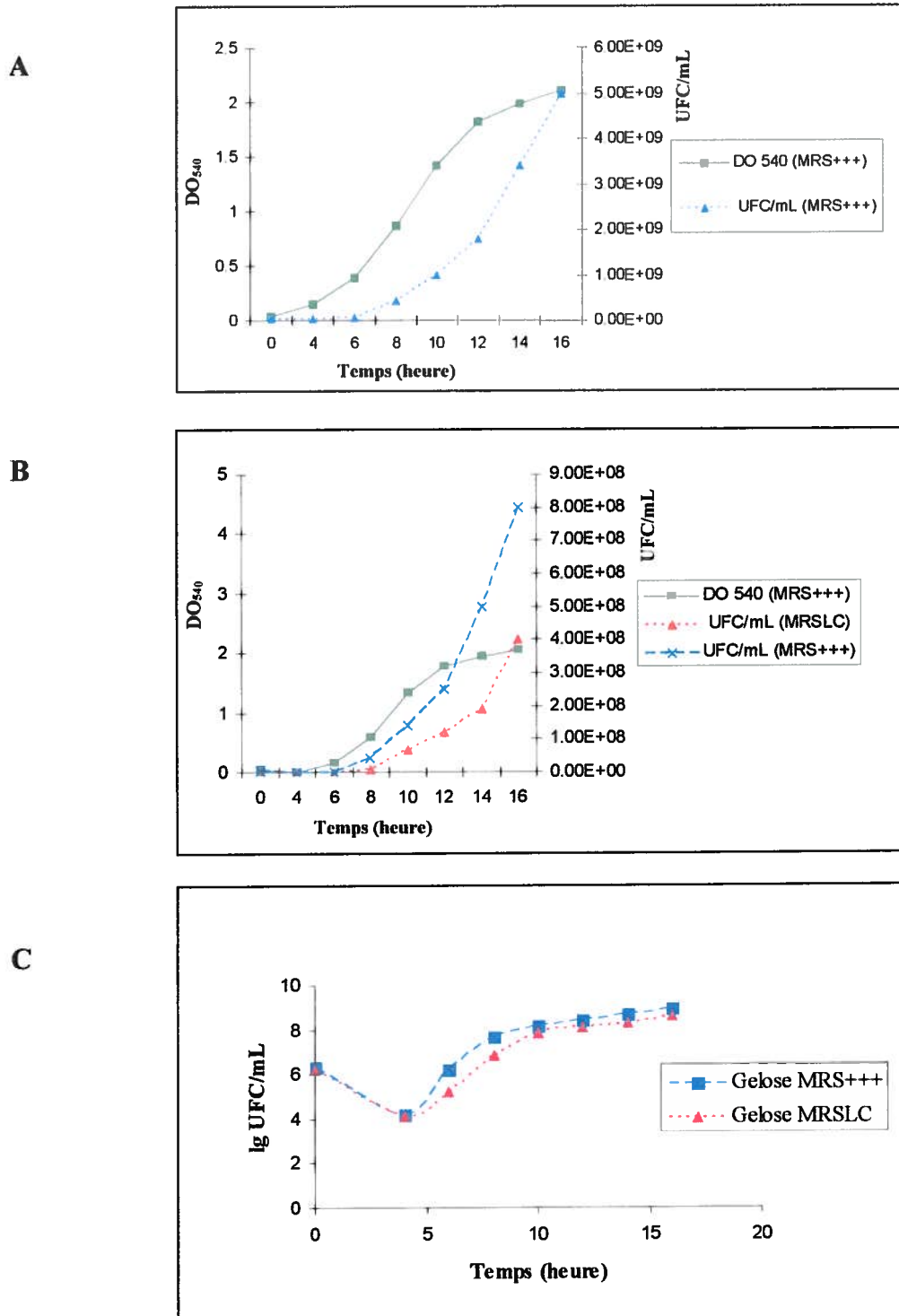
La croissance (augmentation du nombre de cellules ou de la biomasse avec le temps de culture) a été évaluée par spectrophotométrie en mesurant la densité optique (DO<sub>540</sub>) et en comptant les cellules sur gélose aux différents temps de culture.

Comme l'étude qualitative par étalement sur les géloses des souches *L. johnsonii* et *B. adolescentis*, décrite à la section précédente, l'étude quantitative par la mesure de la DO<sub>540</sub> laisse apparaître dans le milieu MRS+++ une croissance de *L. johnsonii* et aussi une croissance de *B. adolescentis* comparables à celles obtenues sur MRSLC (Fig. 18A, 18B). Cependant, à intervalles réguliers, le prélèvement d'un volume du milieu pour mesurer la densité optique (DO<sub>540</sub>) et faire le compte des cellules sur le milieu solide (unités formant des colonies / mL ou UFC / mL) permet d'établir une relation entre la DO<sub>540</sub> d'une part et UFC / mL d'autre part (Fig. 18A, 18B et 18C). En fonction du temps, les deux courbes de croissance logarithmique (DO<sub>540</sub> et UFC / mL) suivent sensiblement la même tendance et s'élèvent de façon abrupte. Les courbes de croissance utilisant le compte des cellules vivantes sur milieu solide, montrent que les cellules étaient en bon état de croissance exponentielle, entre 6h-16h d'incubation pour *L. johnsonii* et *B. adolescentis*.

### **3.2 Détection et dénombrement par la technique d'hybridation *in situ* des sondes couplées à un fluorochrome en combinaison avec la cytométrie de flux (FISH-FCM)**

L'application de la technique d'hybridation *in situ* des sondes couplées à un fluorochrome en combinaison avec la cytométrie de flux FISH-FCM (*fluorescent in situ*

**Figure 18:** Croissance de la souche *L. johnsonii* en fonction du temps en culture pure sur MRS+++ (A) ainsi que de la souche *B. adolescentis* sur MRS+++ et MRSLC (B et C).



*hybridization in combination with flow cytometry*) sur ces deux bactéries de la microflore gastro-intestinale de type Gram positif constitue la seconde partie de ce projet. L'efficacité et la sensibilité de cette technique requiert que les cellules soient en bon état de croissance (assez de ribosomes), et bien perméabilisées pour que les sondes utilisées soient accessibles jusqu'à leur cible de chaque cellule vivante.

Les étapes cruciales pour dénombrer ces deux souches bactériennes par la technique FISH-FCM, optimisées dans cette étude sont : la fixation des cellules, la perméabilisation des cellules, la dispersion maximale des cellules et l'hybridation des sondes.

### **3.2.1 Optimisation de l'étape de fixation/perméabilisation et dénombrement des cellules par FCM par utilisation du bromure d'éthidium comme fluorochrome libre**

Un premier protocole de fixation/perméabilisation a été développé et mis au point à partir d'une espèce bactérienne de type Gram négatif dans le laboratoire de Dr Richard Villemur (INRS-Institut Armand-Frappier) par Jean-Christophe Thomas (Thomas *et al.*, 1997), et consistait en un traitement consécutif à la paraformaldéhyde puis à l'éthanol. Ce protocole a été testé avec les deux bactéries de type Gram positif étudiées puis adapté pour chacune des espèces mises à l'essai, dont *L. johnsonii* ATCC 332 et *B. adolescentis* ATCC 15703.

#### **3.2.1.1 Optimisation de l'étape de fixation/perméabilisation pour *L. johnsonii* ATCC 332 par utilisation de paraformaldéhyde, lysozyme et éthanol**

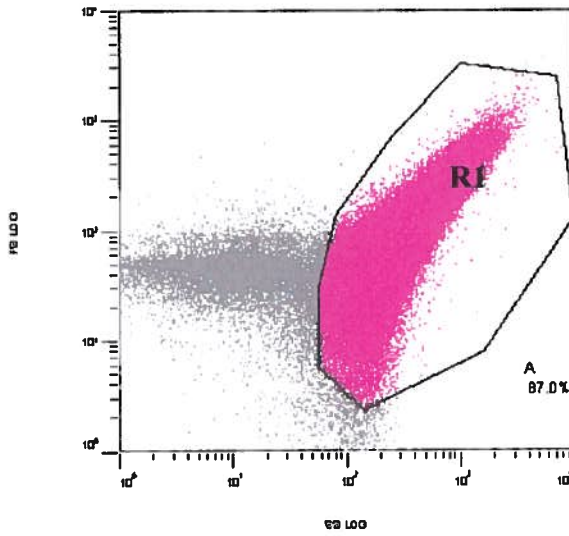
La technique a été appliquée sur une culture de *L. johnsonii* de 8 heures de croissance au moment où les cellules sont en état de croissance exponentielle d'après les résultats précédents. Les conditions de fixation et de perméabilisation ont été définies par comparaison des résultats obtenus par plusieurs protocoles développés avec ceux obtenus par les cellules non perméabilisées. Les différents protocoles développés sont : premièrement, un traitement consécutif à la paraformaldéhyde pendant 1 heure puis au lysozyme (protocole 1); deuxièmement, un traitement consécutif à la paraformaldéhyde pendant 1 heure puis à l'éthanol (protocole 2); troisièmement, un traitement consécutif à

la paraformaldéhyde pendant 16 heures puis à l'éthanol (protocole 3); et quatrième, un traitement consécutif à la paraformaldéhyde pendant 30 heures puis à l'éthanol (protocole 4).

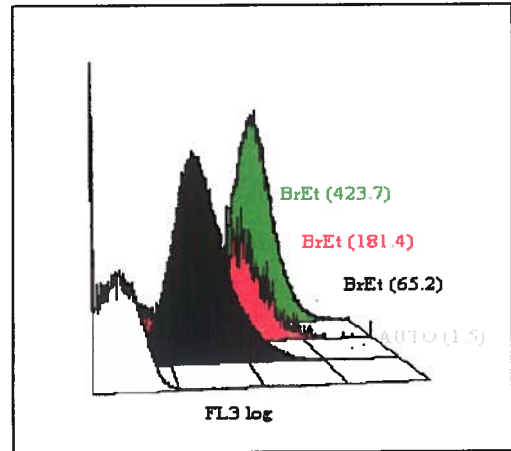
L'efficacité de ces différents protocoles a été vérifiée par FCM en utilisant un fluorochrome libre non spécifique, le bromure d'éthidium. La fluorescence orange émise par celui-ci, a été détectée par le détecteur approprié FL3 (Fig. 19). L'intensité moyenne de la fluorescence (IMF) est proportionnelle à l'intercalation du bromure d'éthidium entre les molécules d'ADN et a été mesuré suivant les différents protocoles. Les signaux de fluorescence ont été enregistrés à partir d'une région définie lors de l'acquisition au cytomètre et qui reste constante pour toutes les expériences réalisées. Cette région est représentée par la région R1 (Fig. 19A). L'histogramme des signaux de fluorescence présente la distribution des événements analysés selon l'émission de fluorescence enregistrée pour chacun des événements. Les histogrammes des signaux de fluorescence obtenus par les différents protocoles testés à l'aide du cytomètre de flux et différenciés en couleur sont présentés à la figure 19B. L'histogramme en blanc correspond à l'autofluorescence des cellules tandis que l'histogramme des signaux de fluorescence des cellules non perméabilisées est présenté en noir. Les histogrammes en rouge, vert, bleu et violet correspondent respectivement aux protocoles 1, 2, 3 et 4. L'IMF est passée effectivement de 65,2 pour les cellules non perméabilisées à 181.4, 423.7, 452.3 et 617.9 pour les cellules traitées respectivement suivant le premier, deuxième, quatrième et troisième protocole (Tableau XIV). Ce qui reflète l'effet de l'éthanol ainsi que le temps d'incubation dans la paraformaldéhyde. Donc, l'IMF la plus élevée a été obtenue par le troisième protocole de fixation avec la paraformaldéhyde pendant 16 heures et de perméabilisation avec l'éthanol. L'autofluorescence présente une intensité moyenne de fluorescence de 1.5 (Fig. 19B). Cette valeur indique le niveau de fluorescence de base de la suspension cellulaire après les manipulations nécessaires à la technique et ainsi démontrer l'effet du contact avec le bromure d'éthidium.

**Figure 19:** Profil de dispersion (A) des signaux de fluorescence (avec le bromure d'éthidium) obtenus par les différents protocoles testés et de l'autofluorescence des cellules *L. johnsonii* (B)

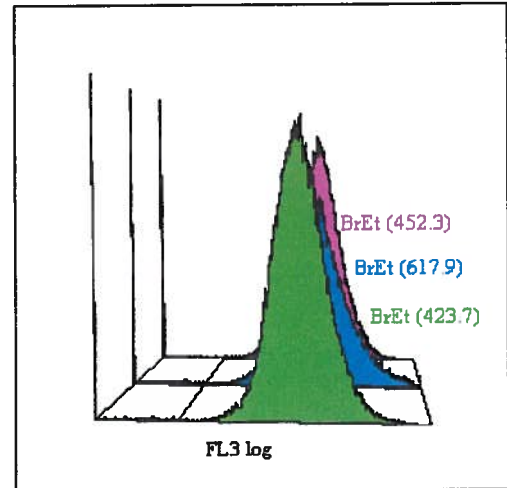
**A** Profil de dispersion



**B** Signaux de fluorescence



Les signaux de fluorescence ont été mesurés à partir de la région d'acquisition R1. Les nombres entre parenthèses représentent les intensités moyennes de fluorescence, IMF.



**Tableau XIV: Variation de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) détectée par FL3 en fonction du protocole utilisé pour traiter la culture de *L. johnsonii* ATCC 332, en utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre**

<b>Essai</b>	<b>Protocole</b>	<b>IMF</b>
0	Témoin : cellules non perméabilisées	65.2
1	Paraformaldéhyde 1h + lysozyme	181.4
2	Paraformaldéhyde 1h + éthanol	423.7
3	Paraformaldéhyde 16h + éthanol	617.9
4	Paraformaldéhyde 30h + éthanol	452.3

### **3.2.1.2 Optimisation de l'étape de fixation/perméabilisation pour *B. adolescentis* ATCC 15703**

Les quatre protocoles de fixation/perméabilisation décrits à la section précédente, ont également été appliqués sur une culture pure de *B. adolescentis*. La région définie lors de l'acquisition au cytomètre avec la souche *B. adolescentis* est représentée par la région R2 (Fig. 20A). Les histogrammes de fluorescence obtenus par cytométrie sont présentés à la figure 20B avec la même distribution des couleurs à la figure 19B. Les meilleurs résultats ont été obtenus toujours avec une fixation à la paraformaldéhyde pendant 1 heure et une perméabilisation à l'éthanol. Ces résultats révèlent un déplacement significatif de la population en cas des cellules traitées par les quatre protocoles testés (IMF=1576.6, 1794.5, 1641.6 et 1436.2 respectivement pour les protocoles 1, 2, 3 et 4) par rapport aux cellules non perméabilisées (IMF=239,2) (Tableau XV, Fig. 20B). L'IMF de l'autofluorescence était de 4,7 (Fig. 20B).

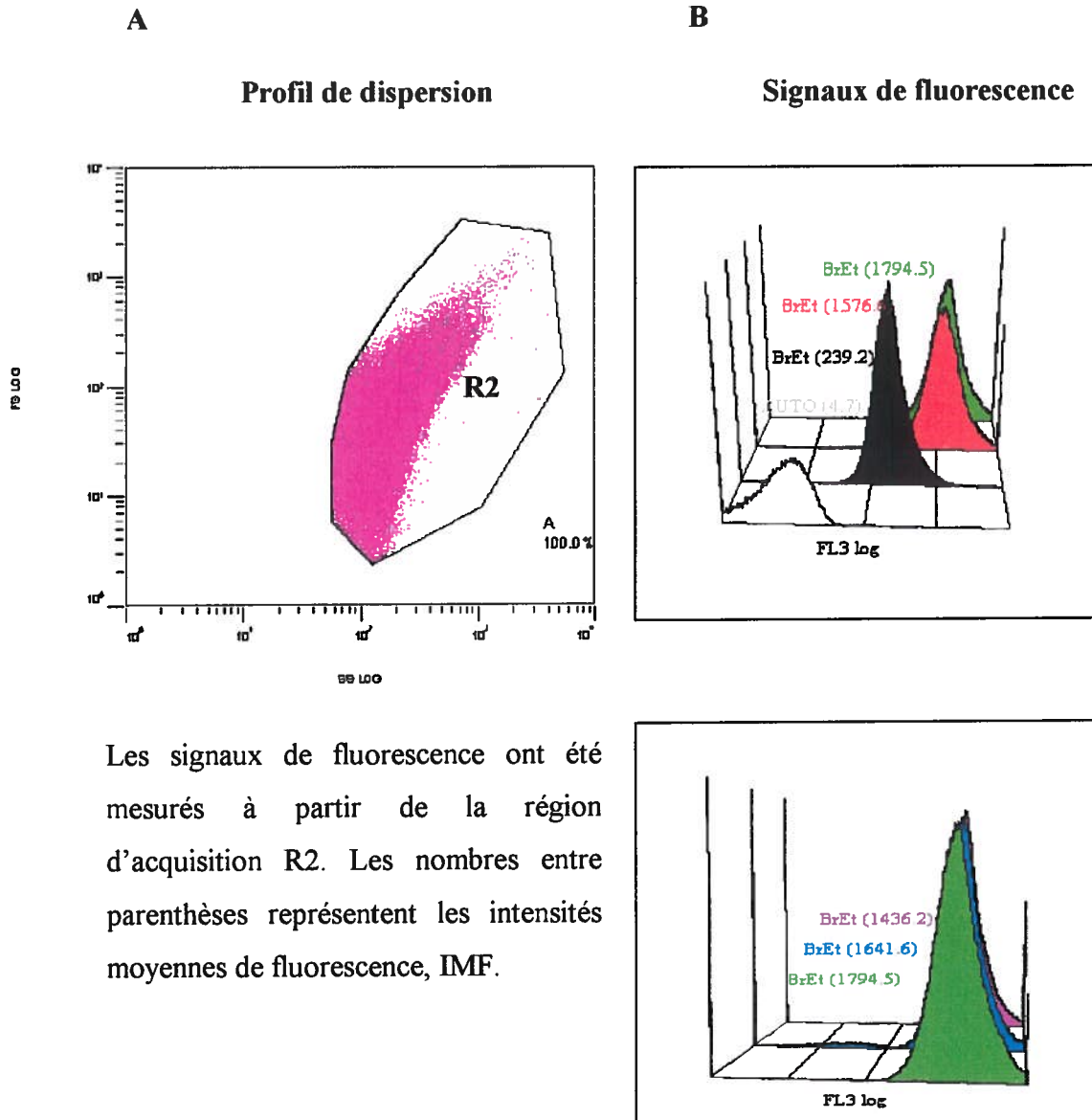
### **3.2.2 Optimisation de l'étape d'hybridation *in situ* des sondes fluorescentes (FISH)**

Afin d'optimiser la technique d'hybridation *in situ* et trouver un protocole simple et commun pour les deux souches étudiées, l'étape fixation/perméabilisation, qui est l'étape cruciale a été optimisée à la section 3.2.1 de ce chapitre. Dans la présente section, l'étape d'hybridation *in situ* des sondes universelles et spécifiques couplées à la fluorescéine doit être par la suite optimisée.

D'abord, les résultats obtenus pour l'étape de fixation/perméabilisation et détaillés à la section précédente (section 3.2.1), nous ont permis de choisir les deux meilleurs protocoles pour les deux souches afin de réaliser l'hybridation *in situ*. Donc, les traitements consécutifs à la paraformaldéhyde pendant 1 heure et 16 heures puis à l'éthanol ont été choisis pour comparer l'histogramme de fluorescence ainsi que les intensités moyennes de fluorescence (IMF) obtenus par chacun d'eux.



**Figure 20: Profil de dispersion (A) des signaux de fluorescence (avec le bromure d'éthidium) obtenus par les différents protocoles testés et de l'auto fluorescence des cellules *B. adolescentis* (B)**



**Tableau XV: Variation de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) détectée par FL3 en fonction du protocole utilisé pour traiter la culture de *B. adolescentis* ATCC 15703, en utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre**

<b>Essai</b>	<b>Protocole</b>	<b>IMF</b>
0	Témoin : cellules non perméabilisées	239.2
1	Paraformaldéhyde 1h + lysozyme	1576.6
2	Paraformaldéhyde 1h + éthanol	1794.5
3	Paraformaldéhyde 16h + éthanol	1641.6
4	Paraformaldéhyde 30h + éthanol	1436.2

### 3.2.2.1 Optimisation de l'étape d'hybridation *in situ* pour *L. johnsonii*

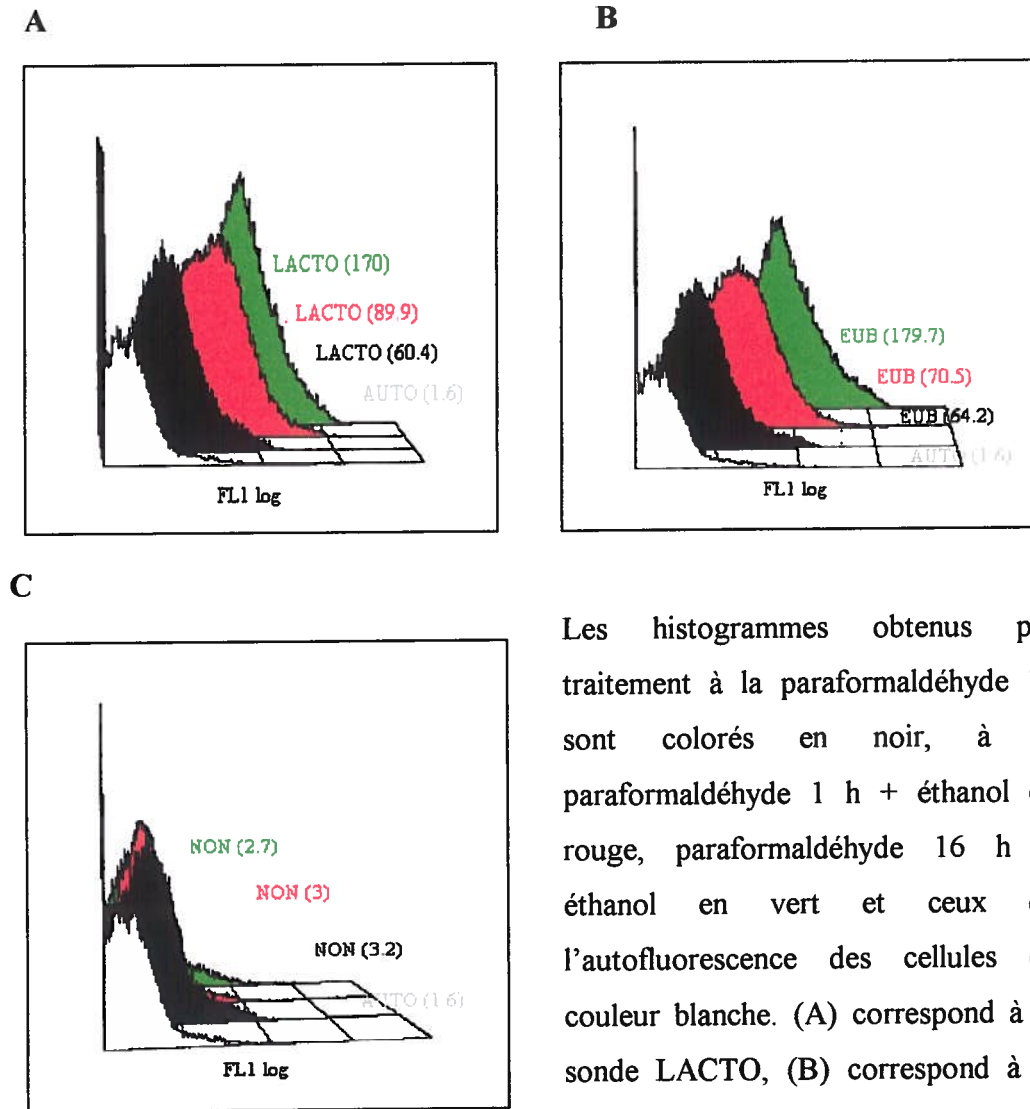
Les cellules perméabilisées selon les deux protocoles choisis ont été utilisées pour l'hybridation avec les sondes EUB pour les eubactéries (Marteau *et al.*, 2001), NON (control négatif) qui n'hybride à aucune séquence ribosomale (Amann *et al.*, 1990) et LACTO spécifique aux espèces du genre *Lactobacillus* (Sghir *et al.*, 2000). FL1 était le détecteur approprié selon le fluorochrome couplé aux sondes, la fluorescéine dans ce cas. La figure 21 et le tableau XVI présentent les résultats obtenus. Une augmentation significative de la fluorescence des sondes universelle et spécifique par fixation 16 heures à la paraformaldéhyde (IMF=179.7 et 170.0 respectivement) par rapport à la fixation 1 heure (IMF=70.5 et 89.9 respectivement) à la paraformaldéhyde. Pas de différence significative entre les valeurs de l'IMF avec les sondes EUB et LACTO. L'IMF de l'hybridation des cellules fixées 1 heure avec la sonde NON est de 3 et 2,7 pour les cellules fixées 16 heures. Un protocole témoin où la paraformaldéhyde a été utilisée comme le seul agent de fixation et de perméabilisation par comparaison avec les deux autres. Ce protocole a montré l'importance de l'éthanol lors de la technique d'hybridation *in situ*. L'IMF de l'hybridation des cellules traitées selon le protocole témoin avec la sonde EUB est de 64,2, 3,2 avec la sonde NON et 60,4 avec la sonde LACTO. L'IMF de l'autofluorescence est de 1,6 (Fig. 21).

Ces résultats démontrent que les IMF les plus élevées avec les sondes EUB et LACTO ont été obtenues par fixation 16 heures à la paraformaldéhyde puis par perméabilisation à l'éthanol.

### 3.2.2.2 Optimisation de l'étape d'hybridation *in situ* pour *B. adolescentis*

Les mêmes conditions ont été utilisées avec la souche *B. adolescentis*, fixation 1 heure à la paraformaldéhyde puis perméabilisation à l'éthanol et fixation 16 heures à la paraformaldéhyde puis perméabilisation à l'éthanol. Une augmentation légère de la fluorescence par fixation des cellules 16 heures par rapport à la fixation 1 heure. Donc,

**Figure 21: Signaux de fluorescence des sondes spécifique (LACTO), universelle (EUB), non spécifique (NON) obtenus par les différents protocoles testés pour la souche *L. johnsonii* en culture pure**



Les histogrammes obtenus par traitement à la paraformaldéhyde 1h sont colorés en noir, à la paraformaldéhyde 1 h + éthanol en rouge, paraformaldéhyde 16 h + éthanol en vert et ceux de l'autofluorescence des cellules de couleur blanche. (A) correspond à la sonde LACTO, (B) correspond à la sonde EUB et (C) correspond à la sonde NON. Les nombres entre parenthèses représentent les IMF.

**Tableau XVI: Variation de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) détectée par FL1 en fonction du protocole utilisé pour traiter la culture de *L. johnsonii* ATCC 332, en utilisant les sondes fluorescentes LACTO, EUB et NON**

Essai	Protocole	IMF		
		LACTO	EUB	NON
0	Paraformaldéhyde 1h	60.4	64.2	3.2
2	Paraformaldéhyde 1h + éthanol	89.9	70.5	3
3	Paraformaldéhyde 16h + éthanol	170	179.7	2.7

les IMF les plus élevées avec les sondes EUB et BIF (spécifique aux espèces du genre *Bifidobacterium*) (Langendijk *et al.*, 1995) ont été obtenues par fixation 16 heures à la paraformaldéhyde suivie d'une perméabilisation à l'éthanol (Fig. 22 et Tableau XVII).

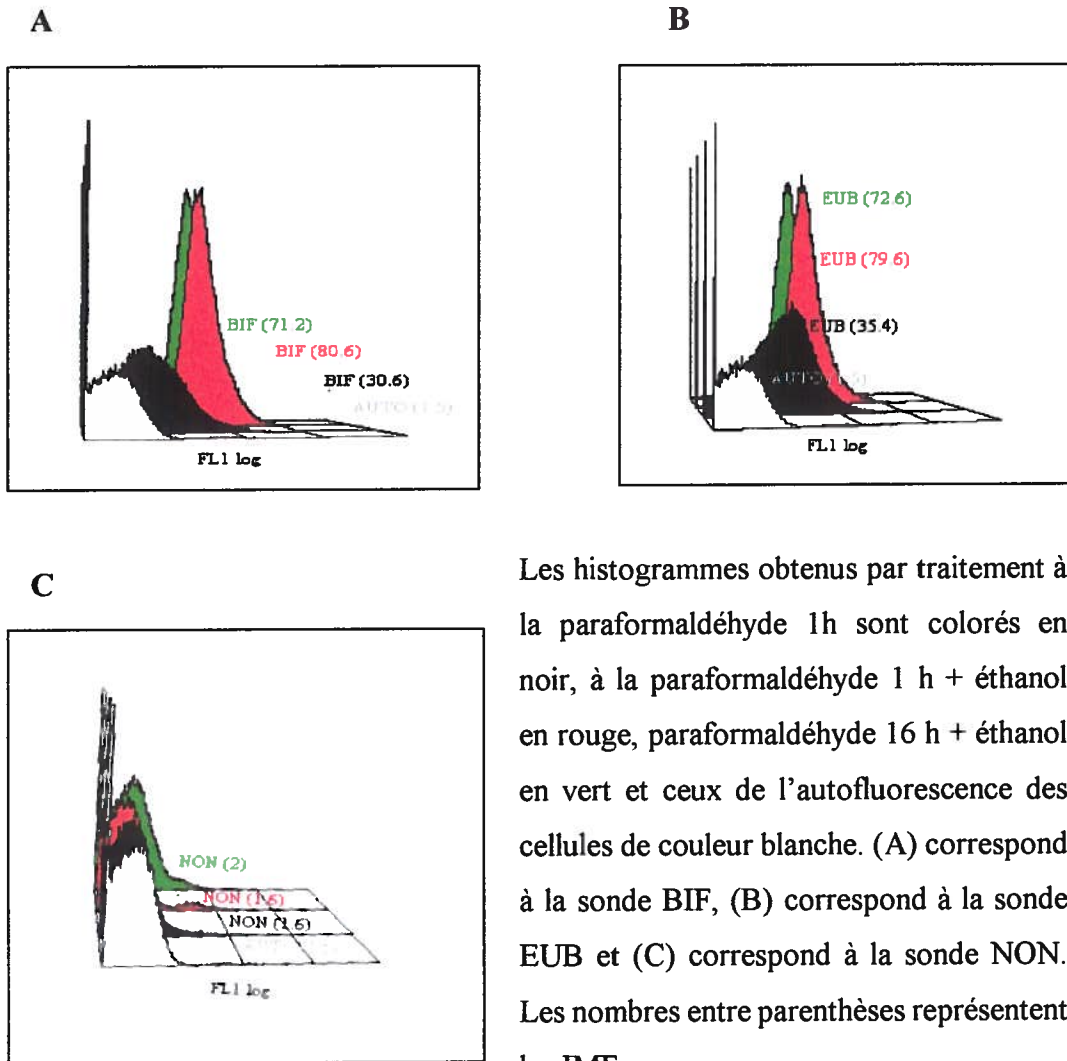
Suite à la fixation 1 heure à la paraformaldéhyde, les IMF de l'hybridation *in situ* avec les sondes EUB, NON et BIF étaient respectivement 35.4, 1.6 et 30.6. Par fixation 16 heures à la paraformaldéhyde suivie d'une perméabilisation à l'éthanol, les IMF de l'hybridation *in situ* avec les sondes EUB, NON et BIF sont respectivement 79.6, 1.6 et 80.6 (Fig. 22A, B, C) (Tableau XVII). Par traitement consécutif à la paraformaldéhyde pendant 1 heure puis à l'éthanol, les IMF de l'hybridation *in situ* avec les sondes EUB, NON et BIF sont respectivement 72.6, 2, et 71.2 (Fig. 22A, B, C). Ces résultats révèlent un déplacement significatif de la population lors de la mise en contact avec la sonde spécifique BIF par rapport à l'hybridation non spécifique avec la sonde NON. L'IMF de l'autofluorescence était de 1,5 (Tableau XVII). Sa valeur est approximativement égale à celles obtenues par l'hybridation non spécifique. De même, les IMF de l'hybridation spécifique (avec la sonde BIF) et universelle (avec la sonde EUB) étaient approximativement égales.

Finalement, et à la suite des résultats présentés à la section 3.2.2 avec les deux souches *L. johnsonii* et *B. adolescentis*, le traitement des cellules par fixation 16 heures à la paraformaldéhyde suivie d'une perméabilisation à l'éthanol a été choisi comme le protocole de la technique FISH-FCM le plus simple et commun pour suivre les deux souches étudiées.

### 3.2.3 Optimisation de la dispersion des cellules

Le protocole d'hybridation *in situ* déjà établi a été appliqué sur des cultures pures de *L. johnsonii* et *B. adolescentis*. Puisque, l'agglutination est le problème habituellement rencontré dans la littérature (Lipoglavsek et Avguštin, 2001; Thomas *et al.*, 1997; Pinder *et al.*, 1990), il faut donc s'assurer de la dispersion des cellules après les étapes de perméabilisation et d'hybridation et par suite lors de la lecture par FCM car chaque

**Figure 22: Signaux de fluorescence des sondes spécifique (BIF), universelle (EUB), non spécifique (NON) obtenus par les différents protocoles testés pour la souche *B. adolescentis* en culture pure**



Les histogrammes obtenus par traitement à la paraformaldéhyde 1h sont colorés en noir, à la paraformaldéhyde 1 h + éthanol en rouge, paraformaldéhyde 16 h + éthanol en vert et ceux de l'autofluorescence des cellules de couleur blanche. (A) correspond à la sonde BIF, (B) correspond à la sonde EUB et (C) correspond à la sonde NON. Les nombres entre parenthèses représentent les IMF.

**Tableau XVII :Variation de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) détectée par FL1 en fonction du protocole utilisé pour traiter la culture de *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703, en utilisant les sondes fluorescentes BIF, EUB et NON**

Essai	Protocole	IMF		
		BIF	EUB	NON
0	Paraformaldéhyde 1h	30.6	35.4	1.6
1	Paraformaldéhyde 1h + éthanol	80.6	79.6	1.6
2	Paraformaldéhyde16h + éthanol	71.2	72.6	2



particule ou ensemble de particules agglutinées qui passe devant le faisceau laser, est compté comme un seul événement. Donc, l'agglutination peut diminuer les comptes obtenus par FCM.

### **3.2.3.1 Détection de l'état de dispersion des cellules après hybridation par microscope à épifluorescence**

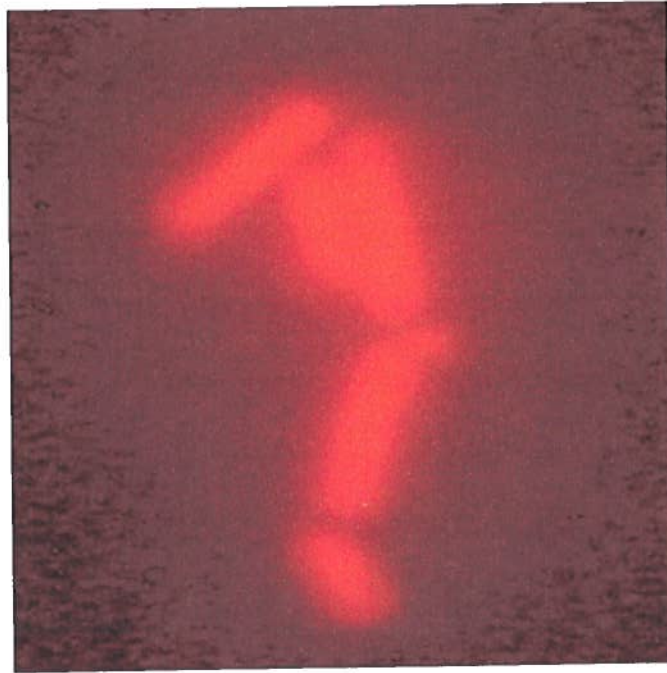
Le problème d'agglutination est toujours présent pour les deux souches étudiées en cultures pures. Ce problème a été confirmé sous le microscope à épifluorescence. Les cellules de la souche *L. johnsonii* auraient tendance à s'agglutiner naturellement et visiblement entre elles, tandis que celles de la souche *B. adolescentis* indiqueraient une moins forte agglutination. Une photographie prise à partir du microscope à épifluorescence révèle la souche *L. johnsonii* en culture pure (grossissement de 1000X) après l'application du protocole (fixation à la paraformaldéhyde pendant 16 heures suivie d'une perméabilisation à l'éthanol) en utilisant le bromure d'éthidium est présentée à la figure 23A. Plusieurs bactéries forment entre elles une longue chaînette en comparaison avec les cellules de *B. adolescentis*, présentée à la figure 23B. Ce groupe de bactéries était considéré comme une seule bactérie lors du défilement dans la veine d'entraînement du cytomètre, entraînant alors une diminution du nombre total d'événements.

### **3.2.3.2 Effet de l'hybridation sur le profil de dispersion et le compte cellulaire obtenus par cytométrie de flux (FCM): Exemple de la souche *L. johnsonii***

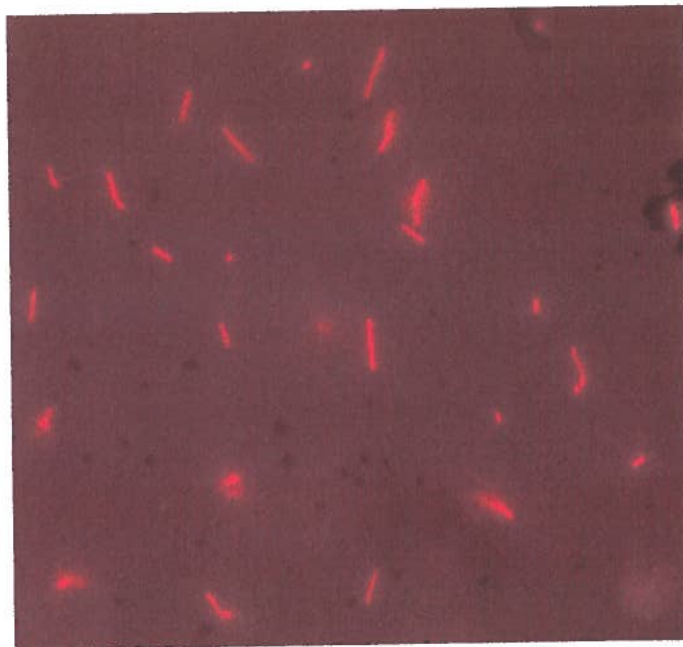
En ce qui concerne l'hybridation et l'agglutination, la souche *L. johnsonii* a été prise comme exemple pour comparer les profils de dispersion ainsi que le nombre des événements avant et après hybridation en utilisant le bromure d'éthidium et enfin pour évaluer l'effet des étapes d'hybridation sur la dispersion des cellules et le compte par FCM.

**Figure 23:** Souches *L. johnsonii* (A) et *B. adolescentis* (B) en culture pure après l'étape d'hybridation et addition du bromure d'éthidium et observées par microscopie à épifluorescence (grossissement 1000X pour *L. johnsonii* et 400X pour *B. adolescentis*)

**A**



**B**



En utilisant l'histogramme du profil de dispersion, il est possible d'observer les événements analysés distribués selon la morphologie des événements (*Forward Scatter* ou FS) et leur granulosité (*Side Scatter* ou SS). Après l'hybridation, le profil de dispersion montre des bactéries qui s'agglutinaient entre elles en formant une longue traînée d'événements en comparaison avec le profil avant hybridation (Fig. 24A, C). Les cellules individuelles au centre présentent un profil en forme de comète, alors que les cellules agglutinées correspondent à une traînée qui s'allonge vers l'extérieur. Allant du centre de la comète vers l'extérieur, les cellules deviennent de plus en plus agglutinées. En 3 dimensions, ce profil de dispersion est moins compact, suggérant une forte agglutination des cellules (Fig. 24B, D).

Également, le nombre de cellules diminuait de 50 000 événements après l'hybridation pour le même échantillon (Tableau XVIII).

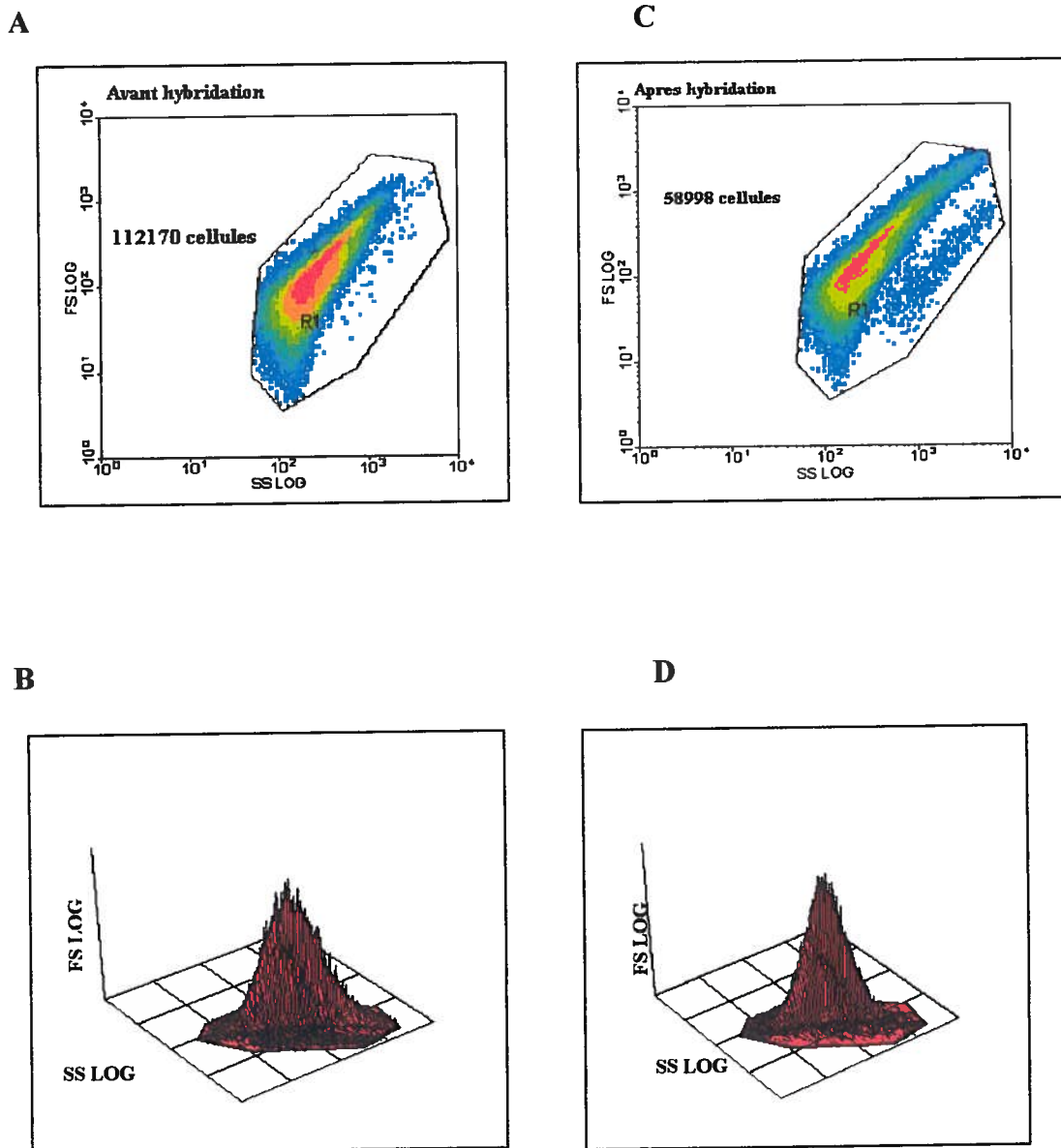
### **3.2.3.3 Effet de sonication sur l'agglutination des cellules des souches *L. johnsonii* et *B. adolescentis***

La sonication a été appliquée pour résoudre le problème d'agglutination des cellules (Lipoglavesk et Avguštin, 2001). Ce traitement permet aux cellules de se disperser et de passer individuellement devant le rayon laser, donnant ainsi un compte cellulaire plus réel.

#### **Sonication des cellules de la souche *L. johnsonii* ATCC 332**

La sonication a été appliquée sur un échantillon d'une culture pure de la souche *L. johnsonii* traité suivant le protocole d'hybridation *in situ*, avant et après l'étape d'hybridation. La sonication a été effectuée par coups successifs pour 2 minutes chacun. L'évolution du profil de dispersion ainsi que la variation du nombre d'événements en fonction du temps de la sonication sont présentées dans les figures 25 et 26. Le profil de dispersion devient moins étendu successivement avec le temps de

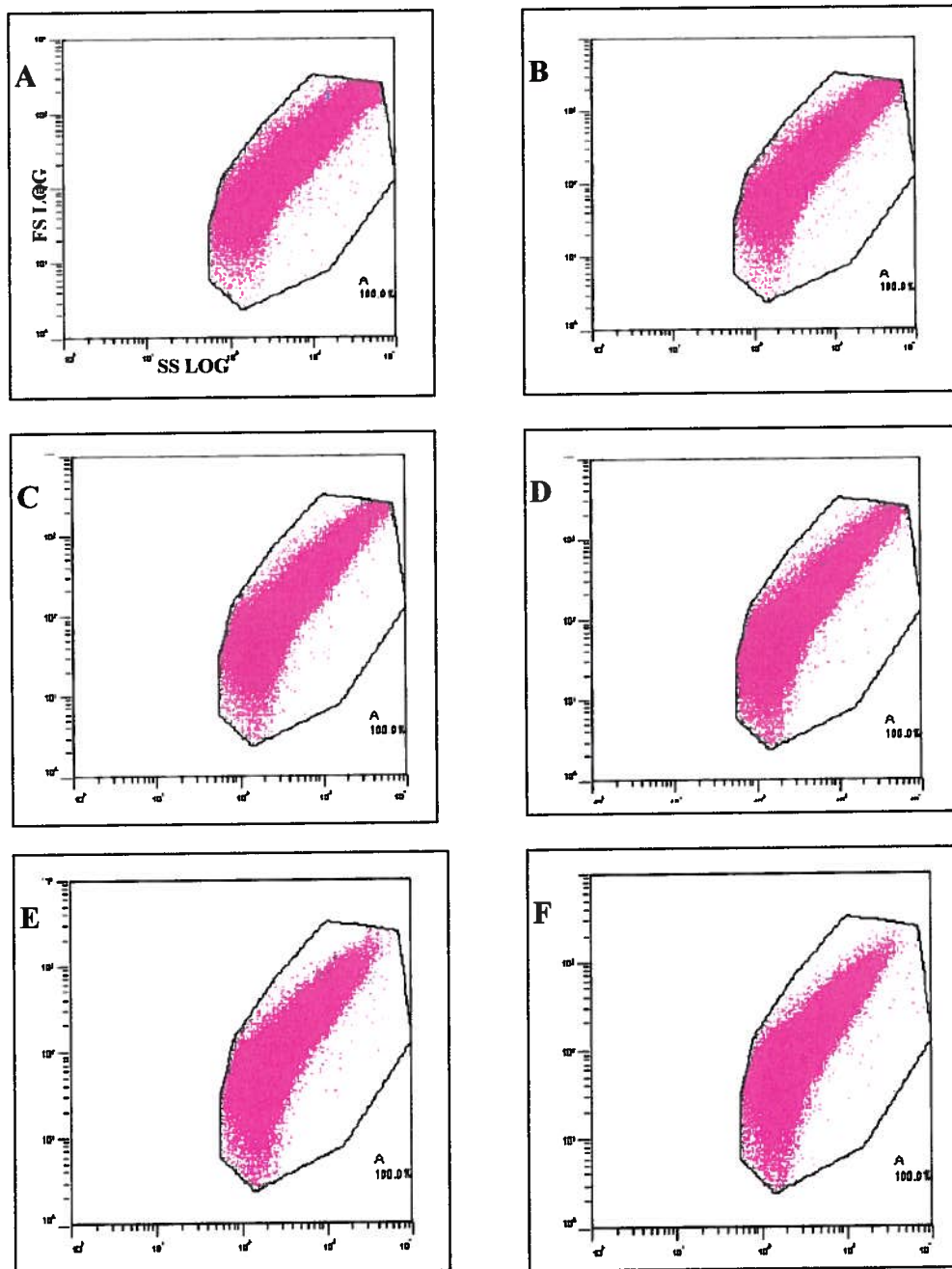
**Figure 24:** Profils de dispersion avant l'étape d'hybridation (A), présenté en 3 dimensions (B), et après l'étape d'hybridation (C), en 3 dimensions (D) pour la souche *L. johnsonii* ATCC 332



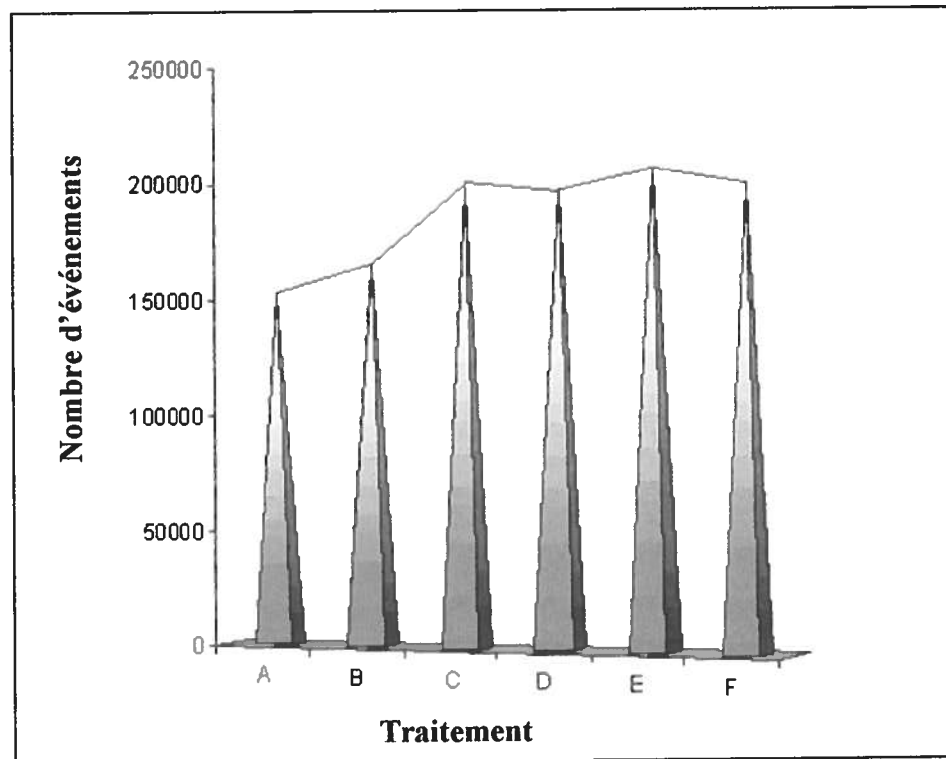
**Tableau XVIII: Comparaison des nombres d'événements de la souche *L. johnsonii* avant et après l'étape d'hybridation obtenus par cytométrie, en utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre**

<b>Nombre d'événements</b>	
<b>Avant hybridation</b>	<b>Après hybridation</b>
<b>112170</b>	<b>58998</b>

**Figure 25:** Profils de dispersion sans sonication (A), avec sonication avant l'étape d'hybridation (B), avec sonication 4 minutes (C), 6 minutes (D), 8 minutes (E) et 10 minutes (F) après l'étape d'hybridation de la souche *L. johnsonii* ATCC 332, en utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre



**Figure 26:** Variation du nombre d'événements en fonction du temps de la sonication de la souche *L. johnsonii* ATCC 332, en utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre



sonication, jusqu'au temps 8 minutes. De plus, le nombre des cellules atteint son maximum avec une sonication avant hybridation suivie d'une sonication 8 minutes après hybridation.

Le profil de dispersion présenté à la Figure 25A correspond à celui de l'échantillon sans sonication. Le même échantillon avec sonication pendant 2 minutes avant l'étape d'hybridation donne le profil de dispersion présenté à la Figure 25B. De même, les profils de dispersion présentés aux figures 25C, D, E et F représentent respectivement les profils de dispersion de l'échantillon avec sonication 4, 6, 8 et 10 minutes après l'étape d'hybridation. Le nombre d'événements dans 20 $\mu$ L de l'échantillon sans sonication était de 152097 événements (Tableau XIX). Avec une sonication 2 minutes avant l'étape d'hybridation, ce nombre est devenu 164796 événements. Après l'étape d'hybridation, le nombre d'événements s'est élevé progressivement. 199671 événements sont comptés avec sonication pour 4 minutes, 200152 événements pour 6 minutes, 210992 événements pour 8 minutes et 205555 événements pour 10 minutes. Le nombre d'événements atteint son maximal avec une sonication de 2 minutes avant hybridation suivi d'une sonication de 8 minutes après hybridation (Fig. 26).

Le profil de dispersion présenté en 3 dimensions devient progressivement plus compact avec le temps de sonication, jusqu'au temps de 8 minutes après l'étape d'hybridation (Fig. 27A-D).

### **Sonication des cellules de la souche *B. adolescentis* ATCC 15703**

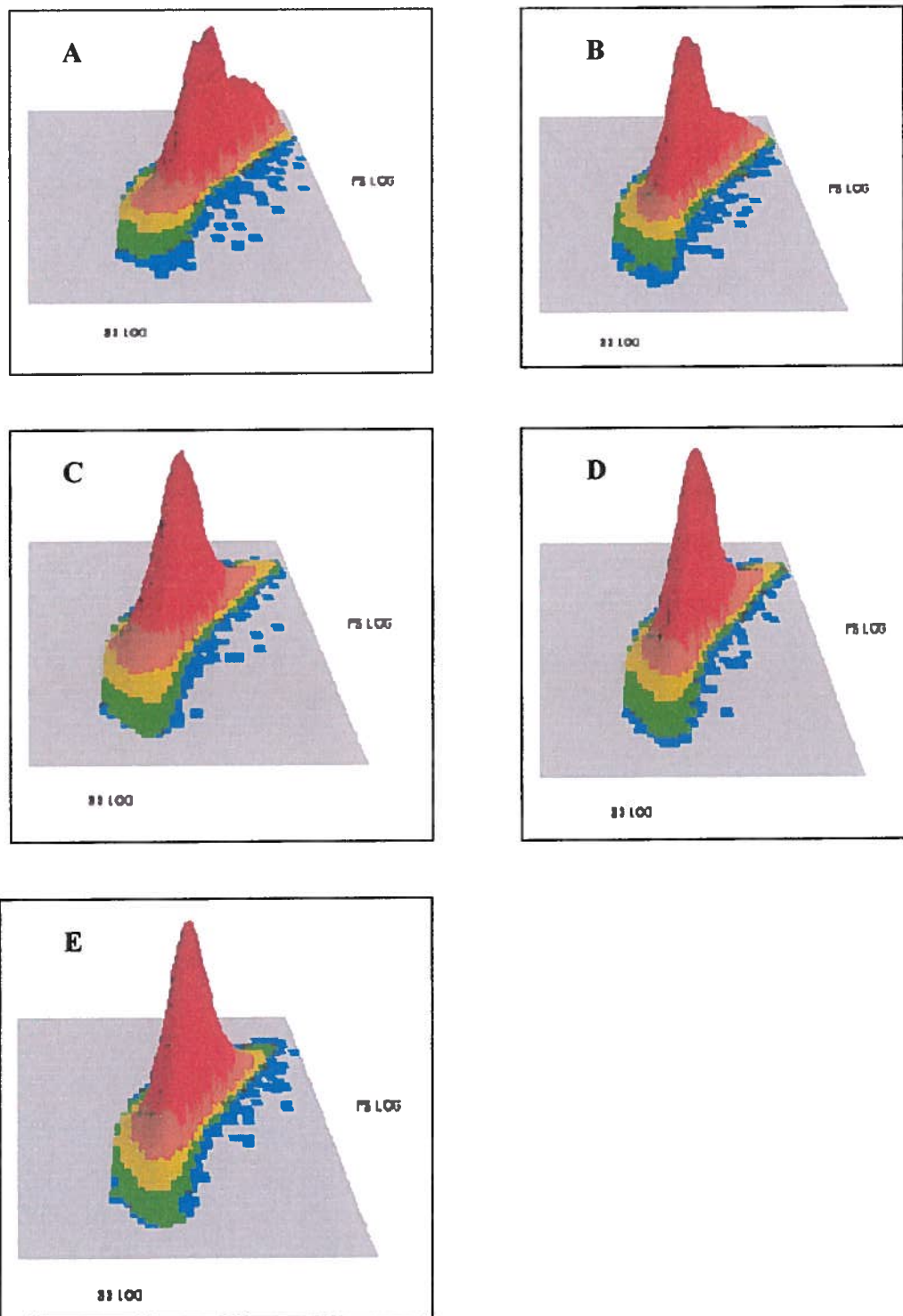
Le même protocole de traitement avec sonication a été appliqué pour *B. adolescentis* après 8 heures de culture. Les profils de dispersion de l'échantillon sans sonication, avec sonication avant hybridation pour 2 minutes, avec sonication après hybridation pour 2 minutes, pour 4 minutes et pour 6 minutes, ainsi que le nombre d'événements en fonction du temps de la sonication sont présentés à cette section. La Figure 28 montre que le profil de dispersion devient moins étendu avec le temps de sonication, jusqu'au temps 2 minutes



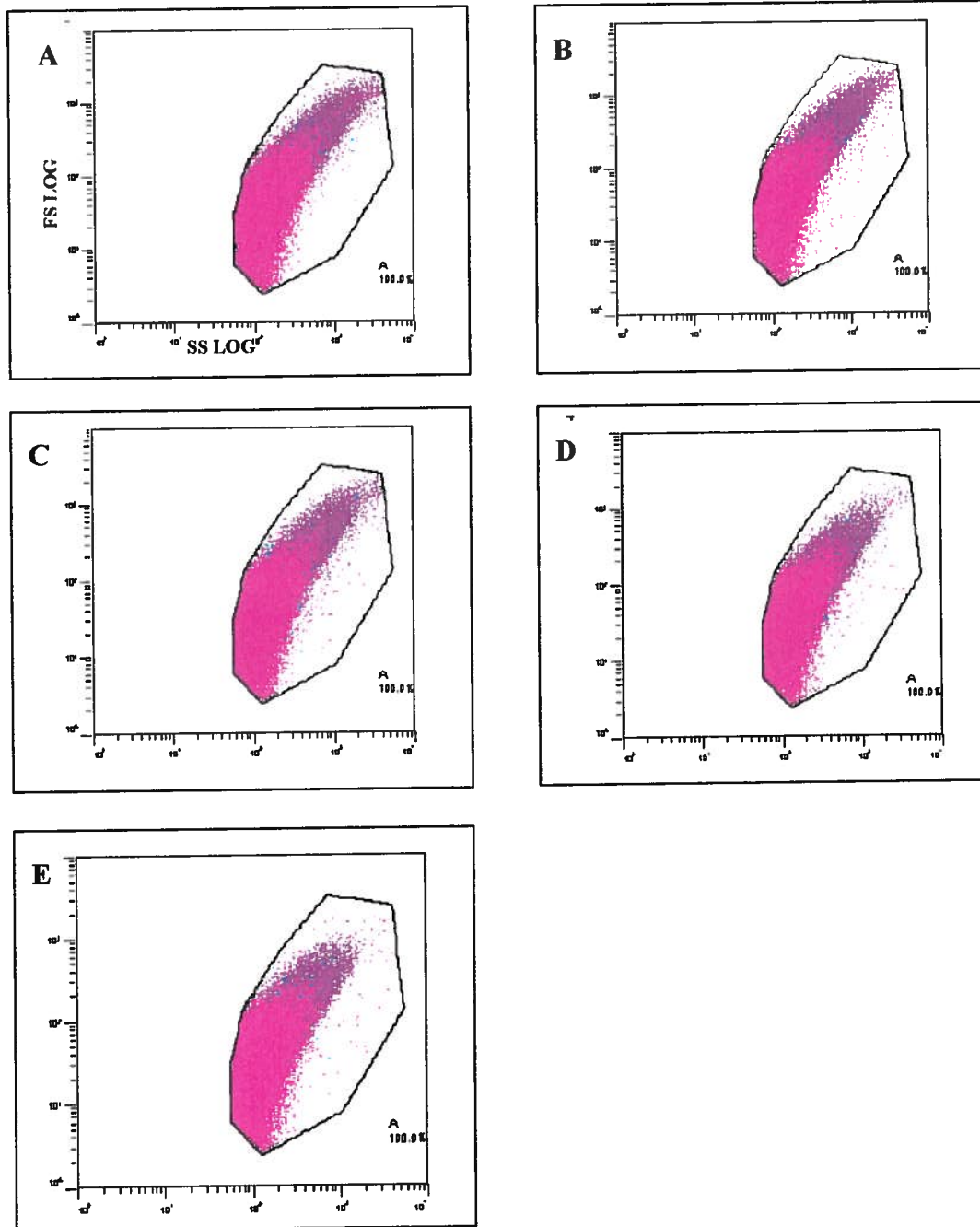
**Tableau XIX: Nombre d'événements en fonction du temps de la sonication de la souche *L. johnsonii* ATCC 332, en utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre**

<b>Traitement</b>	<b>Nombre d'événements</b>
A	152097
B	164796
C	199671
D	200152
E	210992
F	205555

**Figure 27: Profils de dispersion A, B, C, D et E en 3 dimensions de la souche *L. johnsonii* ATCC 332, en utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre**



**Figure 28:** Profils de dispersion sans sonication (A), avec sonication avant l'étape d'hybridation (B), avec sonication 2 minutes (C), 4 minutes (D) et 6 minutes (E) après l'étape d'hybridation de la souche *B. adolescentis* ATCC 15703, en utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre



après l'étape d'hybridation. De même le nombre d'événements atteint son maximum avec une sonication avant hybridation suivi d'une sonication 2 minutes après hybridation.

La figure 28A représente le profil de dispersion de l'échantillon sans sonication. Alors que, la figure 28B représente le profil de dispersion du même échantillon avec sonication avant l'étape d'hybridation. De même, les profils de dispersion C, D et E représentent respectivement les profils de dispersion de l'échantillon avec sonication 2, 4 et 6 minutes après l'étape d'hybridation (Fig. 28C, D et E). Le nombre d'événements de l'échantillon, présenté dans le tableau XX, était de 215345 événements sans sonication, et qui est devenu 223588 événements avec sonication avant l'étape d'hybridation. Après l'étape d'hybridation, le nombre d'événements avec sonication pour 2 minutes était de 226697 événements, pour 4 minutes était de 220250 événements et pour 6 minutes était de 211027 événements (Fig. 29).

La figure 30 montre que le profil de dispersion pour l'échantillon de *B. adolescentis* présenté en 3 dimensions devient progressivement plus compact avec le temps de sonication, jusqu'au temps de 2 minutes après l'étape d'hybridation. En conclusion, les cellules de la souche *B. adolescentis* étaient plus dispersées et plus sensibles à la sonication en comparaison avec les cellules de la souche *L. johnsonii*.

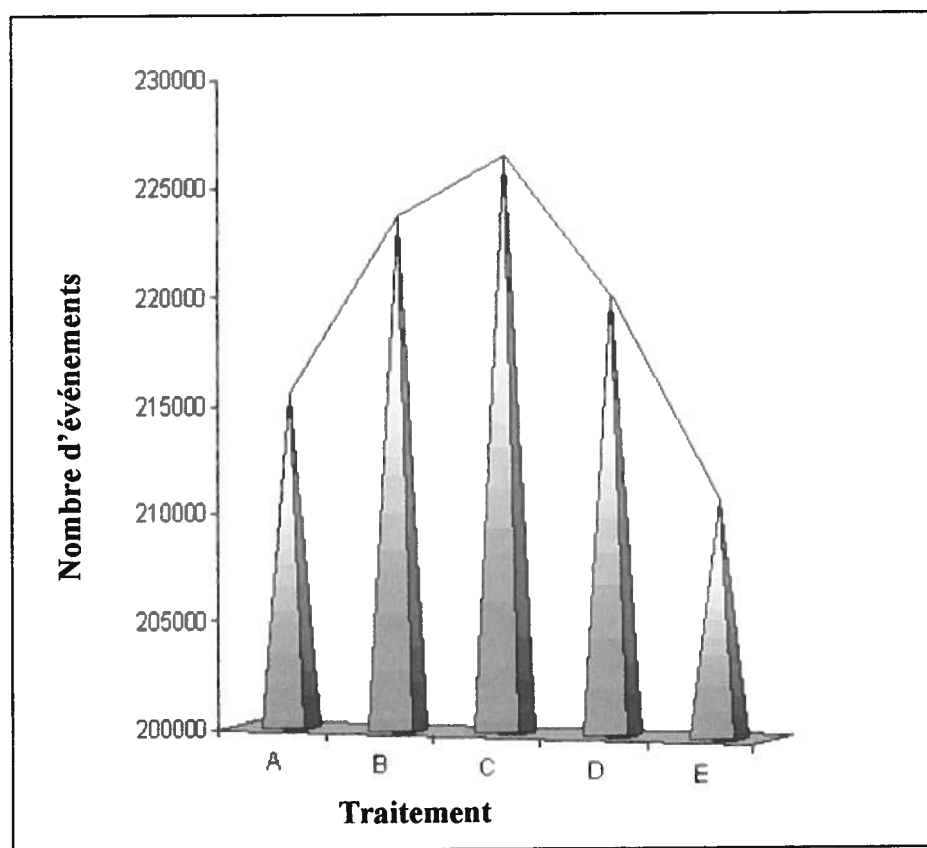
### **3.3 Vérification de l'état métabolique de cellules par FISH-FCM: Exemple de la souche *L. johnsonii* ATCC 332**

Il est reconnu qu'une relation claire existe entre la composition des cellules en macromolécules telles l'ARN, l'ADN et les protéines et la phase de croissance (Binder et Liu, 1998). Particulièrement le contenu en ARN ribosomal serait lié étroitement à l'évolution des cellules dans la phase de croissance et ainsi, l'intensité de la fluorescence par cellule varierait selon la phase de croissance (DeLong *et al.*, 1989). Plus l'intensité de la fluorescence est forte, plus il devrait y avoir de molécules d'ARNr cible par cellules. Le

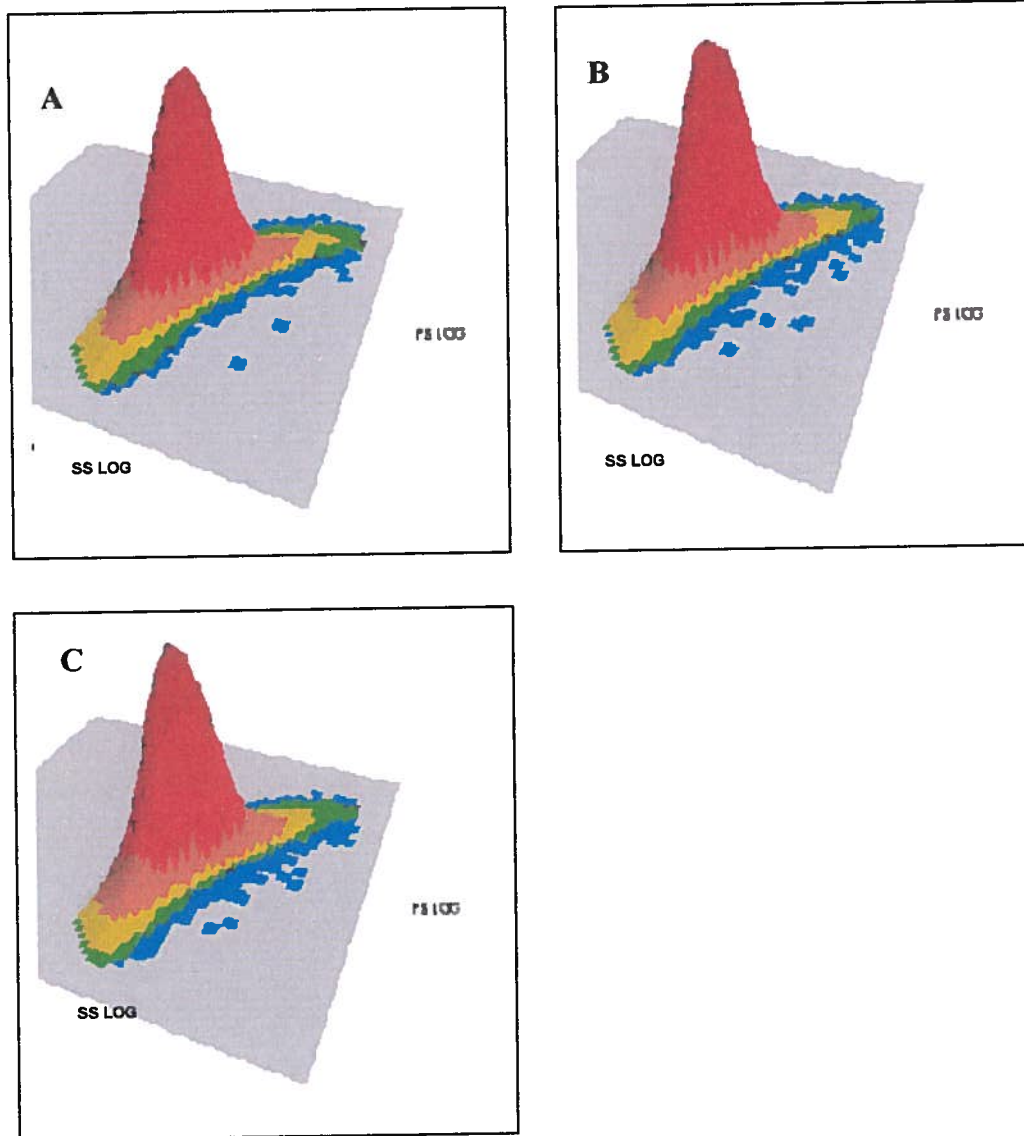
**Tableau XX: Variation du nombre d'événements en fonction du temps de la sonication de la souche *B. adolescentis* ATCC 15703, en utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre**

<b>Traitement</b>	<b>Nombre d'événements</b>
A	215345
B	223588
C	226697
D	220250
E	211027

**Figure 29:** Variation du nombre d'événements en fonction du temps de la sonication de la souche *B. adolescentis* ATCC 15703, en utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre



**Figure 30:** Profils de dispersion A, B et C en 3 dimensions de la souche *B. adolescentis* ATCC 15703, en utilisant le bromure d'éthidium comme fluorochrome libre



prochain paragraphe présente la variation de la fluorescence en fonction de l'état métabolique de la culture de *L. johnsonii*.

Deux hybridations successives dans le temps (8 heures : cellules en croissance exponentielle et 24 heures : cellules en phase stationnaire) ont été effectuées sur *L. johnsonii* comme exemple afin d'observer l'évolution du signal de fluorescence spécifique lors de l'application du protocole d'hybridation *in situ*. Les IMF des hybridations spécifiques (sonde LACTO), non spécifiques (sonde NON) et universelles (sonde EUB) sont présentées au tableau XXI et résume les données illustrées aux figures 31A, B et C. Les résultats obtenus montrent que l'intensité du signal de fluorescence pour les hybridations spécifiques avec la sonde LACTO et universelle avec la sonde EUB était plus élevée au temps 8 heures de croissance avec des valeurs respectives de 170 et 179,7. Elle était respectivement de 42,9 et 75,8 avec la même culture après 24 heures d'incubation. De plus, l'IMF pour l'hybridation non spécifique avec la sonde NON était de 5,3. Ces résultats démontrent que l'intensité de la fluorescence par cellule varie selon l'état métabolique de la cellule elle-même, et diminue quand les cellules ne sont pas en bon état métabolique (pendant la phase de croissance exponentielle).

#### **3.4 Suivi des 2 souches *L. johnsonii* et *B. adolescentis* mélangées après hybridation par FCM, utilisant des sondes spécifiques couplées à un même fluorochrome**

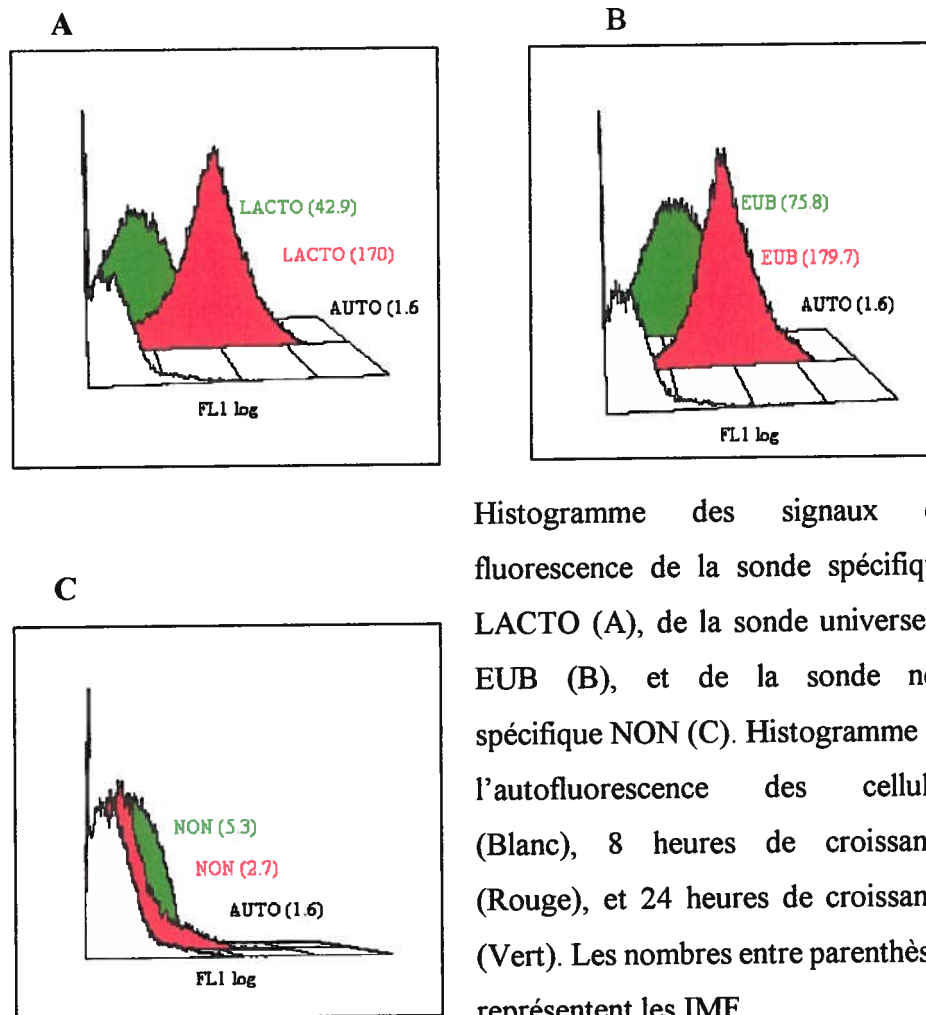
Après avoir étudié la technique d'hybridation *in situ* avec la culture pure de *L. johnsonii* et *B. adolescentis*, la prochaine étape de l'étude consistait à procéder à un essai de détection de celles-ci à l'intérieur d'un mélange des deux cultures traitées, donc mélangées après l'étape de l'hybridation. Ainsi, les deux souches ont été traitées après une période de 8 heures en culture pure. Elles sont mélangées en quantité égale de volume. Deux histogrammes du profil de dispersion ont été enregistrés, un pour l'autofluorescence (Fig. 32A) et l'autre pour l'hybridation spécifique avec les sondes LACTO et BIF couplées avec la fluorescéine (Fig. 32B). Théoriquement, les cellules se



**Tableau XXI: Comparaison des IMF obtenues par cytométrie de 8 heures et 24 heures de croissance de la souche *L. johnsonii*, en utilisant les sondes fluorescentes (EUB, NON et LACTO)**

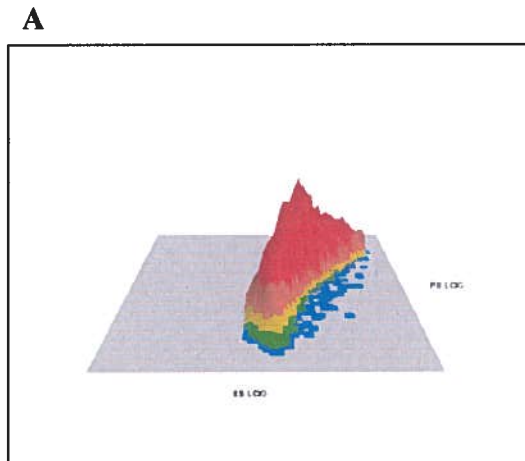
Temps de croissance/h	DO <sub>540</sub> de la culture	IMF (intensité moyenne de fluorescence)		
		Avec les sondes		
		EUB	NON	LACTO
8	0,86	179,7	2,7	170
24	2,25	75,8	5,3	42,9

**Figure 31:** Signaux de fluorescence des sondes spécifique, universelle, non spécifique obtenus par hybridation de culture de *L. johnsonii* après 8 heures et 24 heures de croissance, et de l'autofluorescence des cellules

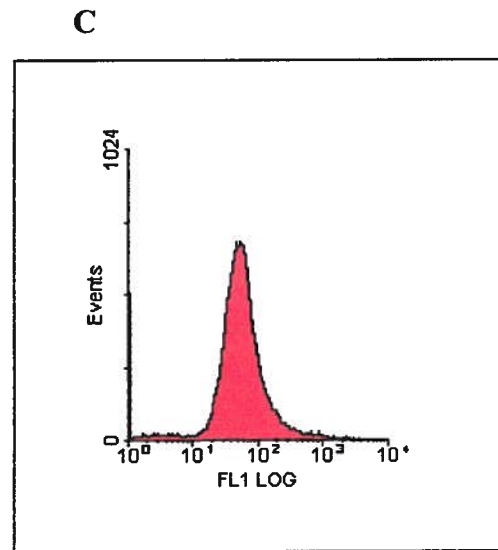
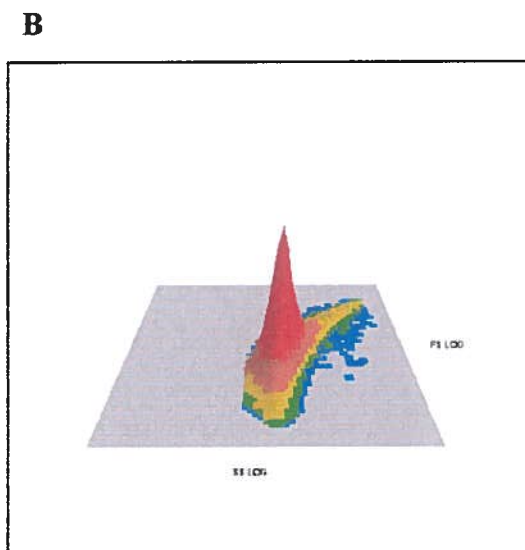


Histogramme des signaux de fluorescence de la sonde spécifique LACTO (A), de la sonde universelle EUB (B), et de la sonde non spécifique NON (C). Histogramme de l'autofluorescence des cellules (Blanc), 8 heures de croissance (Rouge), et 24 heures de croissance (Vert). Les nombres entre parenthèses représentent les IMF.

**Figure 32: Profils de dispersions des souches *L. johnsonii* et *B. adolescentis* en mélange, et du signal de fluorescence des sondes spécifiques (LACTO et BIF)**



A: Histogramme du profil de dispersion des souches *L. johnsonii* et *B. adolescentis* en mélange en absence d'hybridation, B: Histogramme du profil de dispersion du mélange hybridé avec les sondes LACTO et BIF, C: Histogramme du signal de fluorescence du mélange hybridé avec les sondes LACTO et BIF.



différencient selon leur taille et leur granulosité. Apparemment, les deux profils de dispersion présentés en 3 dimensions ont montré qu'il existe une seule population constituée d'une seule espèce bactérienne. Un seul pic a été observé lors de l'hybridation avec les deux sondes spécifiques dans l'histogramme de fluorescence (Fig. 32C). Cependant la séparation des signaux de fluorescence des deux populations était indéfinie. Ces résultats ont montré que la distinction entre les deux populations était impossible car elles se superposent.

## CHAPITRE 4: DISCUSSION

### 4.1 Développement des milieux de culture sélectif simple pour dénombrer les deux souches étudiées *L. johnsonii* et *B. adolescentis*

La première partie du travail présenté dans ce mémoire était ciblée au développement d'un milieu sélectif pour la souche *B. adolescentis*, utilisant trois milieux (MRS+, MRS+++ et MRSLC) ainsi que les méthodes qualitative et quantitative.

#### 4.1.1 Évaluation de la sélectivité du milieu MRSLC

Basé sur les résultats présentés au chapitre 3, on peut conclure que le milieu MRS+++ est un milieu électif qui permet la croissance de la souche *L. johnsonii* et la souche *B. adolescentis*. De plus, la croissance de deux souches sur le milieu MRS+ a été considérée comme réduite à irrégulière. Donc, le carbonate de sodium et le chlorure de calcium, les deux ingrédients ajoutés, gardent plus longtemps le potentiel redox du milieu. Il n'y a aucune littérature montrant cette hypothèse, mais les laboratoires d'Agriculture et Agro-Alimentaire Canada (R. Wheatcroft, communication personnelle) ont suggérés leur utilisation pour cette raison. La solution hydrochloride monohydraté de L-cystéine est un agent réducteur, utilisé dans plusieurs études pour dénombrer les bactéries lactiques et les bifidobactéries par les laboratoires industriels laitiers (Roy, 2001; Ventura *et al.*, 2001; Payne *et al.*, 1999; Dave et Shah, 1996; Sykes et Skinner, 1973). Le milieu MRSLC est sélectif pour la souche *B. adolescentis*. Il inhibe la croissance de la souche *L. johnsonii*. Ce milieu est simple, sa préparation est adaptée à l'emploi en analyse microbiologique de routine en comparaison avec d'autres milieux développés et publiés récemment (Roy, 2001). Le chlorure de lithium a été utilisé pour l'isolement sélectif des bifidobactéries dans d'autres études, mais jamais utilisé avec le milieu commercial MRS. Bien qu'il soit généralement employé en microbiologie, son mécanisme d'action sur les cellules bactériennes est encore mal compris. Teraguchi et son équipe ont proposé que le chlorure de lithium limite la croissance de *L. acidophilus* à une concentration de 3 g/L (Roy, 2001; Teraguchi *et al.*, 1978). Il reste à mentionner que la sélectivité du milieu MRSLC est dépendante des souches utilisées, *L. johnsonii* et

*B. adolescentis*. Ce milieu de culture devra donc être testé pour sa sélectivité envers les autres espèces des bifidobactéries provenant de produits laitiers ou de l'environnement.

#### **4.1.2 Évaluation de la productivité du milieu MRSLC**

La courbe obtenue pour le milieu MRSLC suit sensiblement la même tendance que celle obtenue pour MRS+++, l'écart est donc resté constant. Selon Reuter un milieu est productif si la concentration en micro-organismes recherchés obtenue sur le milieu sélectif est au maximum  $1 \lg \text{UFC.mL}^{-1}$  inférieure à celle obtenue sur un milieu électif (Reuter, 1970). La concentration en *B. adolescentis* obtenue sur MRSLC est  $1 \lg \text{UFC.mL}^{-1}$  inférieure à celle obtenue sur MRS+++. La productivité du milieu sélectif MRSLC, développé dans cette étude, est donc bonne envers la souche *B. adolescentis*. Ce milieu de culture devra donc être testé pour sa productivité envers les différentes souches du genre *Bifidobacterium*.

#### **4.2 Développement de protocole d'hybridation *in situ* pour le dénombrement des deux souches étudiées *L. johnsonii* et *B. adolescentis***

Plusieurs expériences sur des cultures pures de deux espèces bactériennes ont été effectuées. Les hybridations avec les cultures pures des souches *L. johnsonii* et *B. adolescentis* ont permis d'observer des résultats concluants et intéressants. Effectivement, les expériences d'hybridation *in situ* avec des bactéries de type Gram positif particulièrement des bactéries lactiques sont plus rares et moins concluantes dans la littérature que celles effectuées avec les bactéries de type Gram négatif, et cette situation a guidée en partie l'orientation du projet. De plus, l'hétérogénéité des parois cellulaires des bactéries de type Gram positif (Prescott *et al.*, 1995) permet d'expliquer les difficultés d'utiliser un traitement unique pour celles-ci. Parmi les propriétés de ces deux souches, rappelons, entre autres, qu'elles sont anaérobies et qu'aucun suivi ou expériences d'hybridation *in situ* (FISH) n'ont été effectués selon la littérature jusqu'à maintenant.

L'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* pour détecter et suivre une souche bactérienne présente plusieurs avantages. Premièrement, face aux méthodes de microbiologie traditionnelles, cette méthode ne nécessite pas une étape de culture des

micro-organismes d'intérêt pour pouvoir les étudier. Deuxièmement, la technique d'hybridation *in situ* permet de détecter les bactéries intactes et vivantes dans l'environnement ou dans des produits laitiers contrairement à d'autres méthodes telle que la PCR qui détecte les molécules d'acides nucléiques libres ou provenant de bactéries mortes. De plus la combinaison de la méthode d'hybridation *in situ* avec l'utilisation de la cytométrie de flux permet d'effectuer des analyses rapides, automatisées et quantitatives. Par contre, la technique possède aussi quelques limites. En effet, comme l'hybridation permet de détecter les cellules entières, il est nécessaire de s'assurer d'avoir une quantité minimale de cellules pour pouvoir les déceler au-delà de la limite de détection des outils disponibles tels que la cytométrie de flux. Il faut s'assurer que les micro-organismes représentent une grande partie de la population totale en cas de co-culture ou culture mixte. Si non, les seuils de détection restent à nouveau problématiques. De plus, les micro-organismes à croissance lente ainsi que ceux en état de latence ou de mortalité ne pourront être que difficilement détectés à cause de leur faible contenu en ARNr et donc par la faible possibilité d'hybridation des sondes.

L'application de la technique d'hybridation *in situ* sur des cultures pures est essentielle à réaliser avant de penser d'appliquer la technique directement sur des milieux plus complexes tels que les produits laitiers et les matières fécales.

#### **4.3 Optimisation de la technique d'hybridation *in situ* pour le dénombrement des deux souches étudiées *L. johnsonii* et *B. adolescentis***

Les conditions optimales pour l'application de l'hybridation *in situ* avec les deux souches étudiées ont consisté en une fixation et perméabilisation à la paraformaldéhyde pendant 16 heures suivi de l'éthanol. L'utilisation de paraformaldéhyde pendant 1 heure n'étant pas efficace pour une meilleure perméabilisation, alors que son utilisation pendant 30 heures rendant la membrane cellulaire plus rigide et plus difficile à perforer. L'utilisation du lysozyme pour la perméabilisation de la membrane cellulaire au lieu de l'éthanol conduit à la destruction de la cellule toute entière.

L'optimisation de la technique d'hybridation *in situ* avec les souches *L. johnsonii* et *B. adolescentis* s'est effectuée en plusieurs tentatives. Cependant, la perméabilisation est une étape critique de la technique d'hybridation *in situ* car il faut modifier la membrane suffisamment pour permettre aux sondes fluorescentes de pénétrer, tout en gardant les constituants cellulaires à l'intérieur et l'intégrité cellulaire pour la détection par cytométrie de flux. Cependant l'utilisation des molécules qui s'attaquent à la paroi cellulaire telles que le lysozyme, entraîne une perméabilisation plus difficile car ces molécules à haut poids moléculaire augmentent de 6000 à 50 000 fois le poids moléculaire total d'une sonde marquée par un seul fluorochrome (Amann *et al.*, 1992). En effet, la limite entre la lyse cellulaire et l'accessibilité des molécules visées se rétrécit dangereusement. L'utilisation combinée de paraformaldéhyde ainsi que de l'éthanol permet une perméabilisation efficace de la membrane cellulaire dans le cas des deux souches *L. johnsonii* et *B. adolescentis*. Ces deux agents permettent aussi des liaisons croisées entre les molécules à l'intérieur de la cellule. Différents temps de fixation à la paraformaldéhyde ont été essayés, tels que 1 heure, 16 heures et 30 heures.

La sélection de sondes, visant les séquences de l'ARNr 16S, a permis une amélioration du protocole. La composition et l'évaluation de sonde spécifique du groupe *Lactobacillus* ciblant l'ARN 16S ribosomal ont été réalisées par Sghir et son équipe en 1998. La sonde LACTO722 a été choisie comme sonde spécifique du groupe *Lactobacillus* (LGP). La séquence nucléotidique de la région ciblée par la sonde LACTO722 était unique au groupe phylogénétique *Lactobacillus-Pediococcus-Leuconostoc*. Cette région est différente chez les autres bactéries lactiques *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Bifidobacterium* (Sghir *et al.*, 2000; Sghir *et al.*, 1998). L'ARNr possède une structure tridimensionnelle où plusieurs séquences hybrident ou interagissent entre elles mais aussi avec les protéines des ribosomes. Ces structures peuvent ainsi cacher les sites d'hybridation des sondes choisies. Une étude de Langendijk *et al.*, (1995) a démontré par hybridation *in situ* les différences d'accessibilité de sondes visant différents sites de l'ARN 16S des espèces du genre *Bifidobacterium*. Les bifidobactéries forment un faisceau monophylétique sur la base des séquences d'ARNr 16S. Trois sondes ont été développées et examinées pour la détection genre-spécifique des espèces de *Bifidobacterium* dans la flore fécale humaine



(Langendijk *et al.*, 1995). Les sondes oligonucléotidiques BIF164 et BIF662 sont complémentaires à des séquences dans les régions variables V2 et V4, respectivement. Une troisième sonde, BIF1278, dirigée contre une séquence dans la région V8, a été suggérée par Frothingham *et al.* (1993). La sonde universelle UNI219 a été utilisée comme témoin positif. Les sondes ont été marquées avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) à l'extrémité 5'. Les signaux de fluorescence pour toutes les espèces de *Bifidobacterium* ayant hybridé avec les sondes BIF164, BIF 662, BIF 1278, UNI519, et le contrôle négatif étaient  $1.381 \pm 0.182$ ,  $0.866 \pm 0.199$ ,  $0.215 \pm 0.029$ ,  $0.919 \pm 0.098$ , et  $0.075 \pm 0.011$ , respectivement. Les pourcentages d'hybridation offrent une mesure plus objective pour l'analyse de la spécificité des sondes. Les pourcentages d'hybridation avec la sonde BIF164 étaient sensiblement plus hauts qu'avec les sondes BIF662 et BIF1278 et semblables à ceux obtenues avec UNI519. L'hybridation faible de la sonde BIF1278 peut résulter de la présence d'un site de liaison intramoléculaire dans la région variable V8 de l'ARNr 16S, comme décrit pour *Escherichia coli* (Brimacombe *et al.*, 1990). De tels sites peuvent interférer la liaison de sonde. Suivant les résultats obtenus dans la littérature, la sonde BIF164 a été employée dans ce projet comme la meilleure sonde spécifique du genre *Bifidobacterium*.

L'agglutination des cellules a causé un problème important lors du défilement des cellules dans la veine d'entraînement du cytomètre, diminuant alors la valeur des comptes observés par cytométrie. Effectivement, les cellules passeraient en groupe, au lieu d'une par une, variant de quelques-unes (*B. adolescentis*) à possiblement plus d'une dizaine (*L. johnsonii*). Dans les différents histogrammes de profil de dispersion des souches *L. johnsonii* et *B. adolescentis* en culture pure présentés dans la section Résultats, nous avons observé que les profils étaient en effet assez étendus, en forme de poire, et terminés avec une longue extrémité représentant les événements les plus gros et granuleux, possiblement des groupes de plusieurs bactéries. Bien que le tampon utilisé tout au long de l'expérience possédait du pyrophosphate, reconnu pour favoriser la dispersion d'agrégats (Manz *et al.*, 1994), et que les cellules avaient subi une vive agitation mécanique, des efforts supplémentaires ont été orientés vers la séparation des agrégats par une méthode physique (la sonication) sans pour autant empêcher l'accessibilité des sondes jusqu'à leur cible (sonication avant hybridation) et la

visualisation des cellules et de leur fluorescence (sonication après hybridation). Lipoglavsek et Avguštin sont deux chercheurs qui utilisaient la cytométrie de flux pour l'énumération des bactéries du rumen. Ils pouvaient également séparer par sonication les cellules bactériennes des particules inorganiques qui forment des agrégats (Lipoglavsek et Avguštin, 2001).

#### **4.4 Vérification de l'état métabolique de cellules par FISH-FCM**

L'intensité de la fluorescence varie en fonction du contenu cellulaire en ARN ribosomal cible. Cependant, le contenu en ARNr diminue en relation avec le taux de croissance et par conséquent, l'intensité de fluorescence par cellule varierait selon la phase de croissance. Cette relation a été testée avec la souche *L. johnsonii* à différents temps de croissance. Le temps 8 heures se situe dans la phase exponentielle ou logarithmique de croissance pendant laquelle, la souche *L. johnsonii* se divise à la vitesse maximale. C'est dans cette phase où l'on retrouve le plus grand nombre de macromolécules dont l'ARNr. Le temps 24 heures de croissance se situe dans la phase stationnaire pendant laquelle un équilibre survient entre la division et la mort cellulaire. Une grande différence de fluorescence a été obtenue aux temps 8 heures et 24 heures de croissance. Ce test simple était considéré comme une introduction au suivi de la souche *L. johnsonii* et la détermination de la phase de croissance par FISH-FCM et par la suite, la comparaison des comptes obtenus par étalement et par cytométrie de flux. C'est un exemple qui peut être appliqué à n'importe quelle souche bactérienne. Notons que les courbes de croissance varient selon les espèces de même que par la nature et la composition du milieu dans lequel les micro-organismes sont. La courbe de croissance peut aussi dépendre de la quantité de l'inoculum et sa qualité (par exemple provenant d'une culture âgée ou refroidie) (Prescott *et al.*, 1995).

#### **4.5 Suivi des 2 souches *L. johnsonii* et *B. adolescentis* mélangées après hybridation par cytométrie, utilisant des sondes spécifiques couplées à un même fluorochrome**

La détection des deux souches *L. johnsonii* et *B. adolescentis* en culture pure par hybridation *in situ* couplée à la cytométrie a permis quelques observations. Tout d'abord, les histogrammes de profil de dispersion de chacune des deux souches ont tombé

approximativement sur la même région. Une estimation de la distinction entre les deux souches en mélange, en co-culture ou en culture mixte a pu être tentée. La distinction entre les deux souches n'a été possible en autant qu'un seul fluorochrome a été utilisé. Effectivement, l'essai de détecter les deux souches mélangées par utilisation des sondes spécifiques couplées à un même fluorochrome a confirmé cette estimation. C'est pour cette raison que l'utilisation simultanée des deux fluorochromes différents couplant les deux sondes spécifiques, un pour chaque souche, serait nécessaire. Ces deux fluorochromes choisis doivent être compatibles avec la source lumineuse utilisée. De plus, ils doivent être choisis de façon à être distingués les uns des autres (spectres d'émission différents) mais si possible pouvoir être excités par la même source lumineuse (spectres d'absorption proches). Une autre solution pouvant être efficace mais qui va doubler le travail consiste à utiliser chaque sonde spécifique à part de sorte que les deux sondes soient couplées à un même fluorochrome.

#### 4.6 Perspectives

L'importance sur le marché des laits fermentés aux vertus présumées probiotiques augmente régulièrement. La flore bactérienne dans le produit est souvent dominée par *Streptococcus (S.) thermophilus*, *Lactobacillus (L.) delbrueckii ssp. bulgaricus* et *L. acidophilus*, alors que les bifidobactéries ne sont présentes qu'en faible concentration. Également, les bifidobactéries sont utilisées comme indicateurs de contamination fécale dans les aliments. Leur besoin complexe en nutriment et leur croissance en anaérobiose stricte en font des bactéries difficiles à cultiver. Leur dénombrement nécessite donc l'utilisation d'un milieu sélectif. La disponibilité des méthodes faciles et peu coûteuses pour la détection, l'identification et l'énumération des bifidobactéries sont par conséquent importantes en microbiologie environnementale et alimentaire.

Il n'existe à ce jour aucune méthode standard de dénombrement des bifidobactéries, basée sur un milieu de culture simple. Le milieu sélectif simple MRSLC développé dans cette étude a été testé pour une seule souche de *Bifidobacterium*, *B. adolescentis*. Prochainement, des expériences vont être faites dans notre laboratoire, afin de suivre la croissance des différentes souches du genre *Bifidobacterium* sur le milieu

MRS LC et également tester sa capacité d'inhibition de la croissance des espèces bactériennes qui sont en relation physiologique et écologique au *Bifidobacterium* (*Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* et *Lactobacillus*). La réussite de ces expériences permettra de lancer un nouveau milieu simple de sélection des *Bifidobacterium* et de l'utiliser dans le cadre d'analyses de routine effectuées dans les différents laboratoires.

Les expériences d'hybridation *in situ* en combinaison avec la cytométrie de flux sur les deux souches bactériennes en culture pure ont permis d'orienter les perspectives futures. Celles-ci peuvent donc être portées sur le développement et la mise au point de la technique FISH-FCM afin d'effectuer le suivi des deux souches dans différentes cultures mixtes plus complexes et ce, particulièrement à cause des résultats encourageants obtenus pendant le projet et des caractéristiques particulières des deux souches. Parmi ces propriétés, rappelons, entre autres, qu'elles sont des bactéries endogènes et dominantes de la microflore intestinale, de type Gram positif et anaérobies facultatives ou strictes et qu'aucun suivi et expériences de FISH-FCM n'ont été effectués dans la littérature. De plus, elles sont des bactéries potentiellement probiotiques, assez utilisées dans les produits pharmaceutiques, les yogourts et les aliments fermentés. L'utilisation de cette technique moderne pour suivre ces deux bactéries dans les matières fécales et les aliments fermentés permettrait de détecter un état pathologique plus tôt, d'évaluer les effets des maladies de l'intestin sur la population de la microflore gastro-intestinale endogène, d'évaluer les effets cliniques d'une probiothérapie dans diverses maladies, et enfin de quantifier et d'indiquer la viabilité de ces deux bactéries dans les aliments fermentés et par suite donner aux consommateurs les ingrédients des produits administrés par des analyses rapides et automatisées.

## CONCLUSION

*Lactobacillus johnsonii* et *Bifidobacterium adolescentis* sont deux bactéries symbiotiques de la microflore gastro-intestinale endogène de l'Homme. La colonisation de l'intestin s'effectue dans les heures qui suivent la naissance, et se poursuit toute la vie. Elles sont présentes en grandes quantités (entre  $10^8$  et  $10^{11}$  bactéries/g de matière colique) et sont considérées comme dominantes parmi plus de 400 espèces bactériennes qui composent la microflore du côlon. Ces deux bactéries jouent un rôle très important pour la santé humaine en aidant notamment à la digestion des aliments, en synthétisant des vitamines essentielles et en prévenant la prolifération des pathogènes. Elles ont également plusieurs vertus probiotiques potentielles, en particulier des effets antimicrobiens, immunomodulateurs, de réduction du risque de cancer, et elles influencent l'équilibre de la microflore intestinale une fois ingérées en quantité suffisante. Les lactobacilles et les bifidobactéries sont les plus utilisées comme probiotiques dans les aliments fonctionnels à cause de leur capacité de survie élevée durant leur passage le long du tube digestif. De plus, ce sont des bactéries lactiques qui sont utilisées en alimentation humaine et sont à la base de la fabrication des produits laitiers, carnés, végétaux et de la pêche. Elles sont également utilisées comme perspectives biofonctionnelles dans les produits pharmaceutiques pour une thérapie probiotique. Afin d'estimer les variations des populations de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* avec l'état sanitaire de l'Homme et de connaître quels sont les dosages de probiotiques les mieux adaptés à chacune des pathologies, le dénombrement de ces bactéries se révèle comme un paramètre important à étudier.

Les objectifs de ce travail étaient en premier lieu de développer un milieu de culture sélectif simple qui favorise la croissance de *Bifidobacterium adolescentis* et inhibe la croissance de *Lactobacillus johnsonii*, et d'en effectuer une étude comparative de la croissance sur d'autres milieux électifs; en second lieu de détecter et dénombrer ces deux souches bactériennes de type Gram positif par hybridation *in situ* en combinaison avec la cytométrie de flux (FISH-FCM).

Un milieu de culture MRSLC sélectif et reproductif pour *Bifidobacterium adolescentis* a été développé dans cette étude. Ce milieu est simple en comparaison avec les autres milieux publiés dans la littérature. La croissance de la souche *Bifidobacterium adolescentis* sur MRSLC a été comparée avec sa croissance sur un autre milieu électif MRS+++ . L'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* combinée à la cytométrie de flux a permis de détecter avantageusement les deux bactéries de type Gram positif *Lactobacillus johnsonii* et *Bifidobacterium adolescentis* en culture pure. De plus, l'utilisation de la cytométrie de flux a permis d'effectuer des analyses rapides et automatisées. Par contre, bien que la technique ait réussi à détecter les deux souches en culture pure, elle a aussi confirmé une importante corrélation de la réussite de la technique avec la dispersion des cellules et la phase de croissance de culture.

## REMERCIEMENTS

Ce travail sous la direction de Pr. Darakhshan Ahmad a été effectué au Laboratoire de Microbiologie et Biotechnologie, INRS-Institut Armand-Frappier, Pointe-Claire.

En premier lieu, je tiens à exprimer tout particulièrement ma gratitude à D. Ahmad, professeur à l'INRS, pour son accueil au sein de son équipe, ses conseils avisés, l'ambiance amicale et la relecture minutieuse des affichages qui sont nés de ce mémoire.

Mon plus grand remerciement est réservé à Dr. Benoit Ochietti pour sa patience. C'est lui qui m'a aidé à corriger la plupart des fautes de français de ma thèse. Je voudrais remercier également Mayada Mousawi pour l'aide qu'elle m'a apportée.

Un grand merci aussi à toute la tribu d'amis qui se sont intéressés à mon travail. Ensuite, je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire: D. Ahmad pour m'avoir accueilli au sein du labo, pour m'avoir guidé et conseillé ; merci au Dr. Mohamad Labidi pour ses précieux conseils sans lesquels je n'aurais pas pu commencer ce travail. Merci également aux étudiants du labo (Bruno Calveyrac) ainsi qu'à ceux des labos voisins (Marc, Julie) pour nos multiples échanges. Je veux aussi remercier les différentes personnes que j'ai rencontrées tout au long de ces années et qui ont pu m'aider par leurs connaissances, leurs conseils. Cette liste n'est pas exhaustive mais je tiens à citer Louis Racine pour la réduction du milieu de culture; biensur Marcel Desrosiers et Mohamad Hinedi pour la cytométrie, qui ont toujours trouvé du temps à me consacrer; l'équipe du labo de Dr Wheatcroft pour la souche de *Bifidobacterium adolescentis* et plein d'autres personnes...

J'aimerais remercier du fond du cœur mes parents qui m'ont soutenue, dans tous les sens du terme, pour que je concrétise ce travail. Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance. Que tous mes proches, mon frère et mes sœurs en particulier, reçoivent une avalanche de bisous en remerciement de toute l'attention qu'ils ont portée pour mon bébé.

À mon conjoint, Wassim, je voudrais rappeler mon amour et ma reconnaissance pour sa compréhension, sa présence affectueuse à mes côtés aux moments opportuns et le plus beau cadeau de ma vie, notre fils Ahmad.

Enfin, que mon Dieu reçoive et accepte ce travail parmi les travaux bons et bénéfiques.



## BIBLIOGRAPHIE

- AATTOURI N. et Lemonnier D. 1997. «Production of interferon induced by *Streptococcus thermophilus*: role of CD4+ and CD8+ lymphocytes». Journal of Nutritional Biochemistry, vol. 8, p. 25-31.
- ADLERBERTH I., Carlsson B., de Man P., Jalil F., Khan S. R., Larsson P., Mellander L., Svanborg C., Wold A. E., et Hansson L. Å. 1991. «Intestinal colonization of enterobacteriaceae in Pakistani and Swedish hospital delivered children». Acta Paediatrica Scandinavica, vol. 80, p. 602-610.
- AHRTLEY D. L. et Denariatz G. 1993. «The role of lactic acid bacteria in yogurt fermentation ». International Journal of Immunotherapy, vol. 9, p. 3-18.
- ALM J. S., Swartz J., Lilja G., Scheynius A. et Pershagen G. 1999. «Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle». Lancet, vol. 353, p. 1485-1488.
- AMANN R. I., Ludwig W. et Schleifer K.-H. 1995. «Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation». Microbiological Reviews, vol. 59, p. 143-169.
- AMANN R. I., Zarda B., Stahl D. A. et Schleifer K. H. 1992. «Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes». Applied and Environmental Microbiology, vol. 58, p. 3007-3011.
- AMANN R. I., Krumholz L., et Stahl D. A. 1990. «Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology». Journal of Bacteriology, vol. 2, p. 762-770.
- ANDRIEUX C., Pires R., Moreau M.C. et Bouvet J.P. 1998. «Release of the soluble co-receptor (protein Fv) of secretory immunoglobulins after colonization of axenic rats by human gut microflora». Scandinavian Journal of Immunology, vol. 48, p. 192-195.
- ARANKI A. et Freter R. 1972. «Use of anaerobic glove boxes for the cultivation of strictly anaerobic bacteria». The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 25, p. 1329-1334.
- ARROYO L., Cotton L. N. et Martin J. H. 1995. «AMC agar: a composite medium for selective enumeration of *Bifidobacterium longum*». Cultured Dairy Products Journal, vol. 30, p. 12-15.
- ARROYO L., Cotton L. N. et Martin J. H. 1994. «Evaluation of media for enumeration of *Bifidobacterium adolescentis*, *B. infantis* and *B. longum* from pure culture». Cultured Dairy Products Journal, vol. 29, p. 20-24.
- BABA E., Nagaishi S., Fukata T. et Arakawa A. 1991. «The role of intestinal microflora on the prevention of *Salmonella* colonization in gnotobiotic chickens». Poultry Science, vol. 70, p. 1902-1907.

- BARBE K. P., Mühlemann K. et Pittet D. 2001. «Une infection nosocomiale néonatale : l'entérocolite nécrosante». Swiss-NOSO, vol. 8, p. 4-6.
- BEERENS H. 1991. «Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent». Applied and Environmental Microbiology, vol. 57, p. 2418-2419.
- BEERENS H. 1990. «An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium spp*». Letters in Applied Microbiology, vol. 11, p. 155-157.
- BEN AMOR K., Breeuwer P., Verbaarschot P., Rombouts F. M., Akkermans Antoon D. L., De Vos Willem M. et Abee T. 2002. «Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead *Bifidobacterium* cells during bile salt stress». Applied and Environmental Microbiology, vol. 68, p. 5209-5216.
- BENNET R. et Nord C. E. 1989. «The intestinal microflora during the first week of life: normal development and changes induced by caesarean section, preterm birth and antimicrobial treatment» In Grubb R., Midtvedt T., Norin E., eds. The Regulatory and Protective Role of the Normal Microflora. London: Macmillan Press, p. 19-34.
- BENNET R., Eriksson M., Nord C. E. et Zetterström R. 1986. «Fecal bacterial microflora of newborn infants during intensive care management and treatment with five antibiotic regimens». Pediatric Infectious Disease, vol. 5, p. 533-539.
- BENNET R., Eriksson M., Nord C. E. et Zetterström R. 1982. «Suppression of aerobic and anaerobic faecal flora in newborns receiving parenteral gentamicin and ampicillin». Acta Paediatrica Scandinavica, vol. 71, p. 559-562.
- BERG R. D. 1996. «The indigenous gastrointestinal microflora». Trends in Microbiology, vol. 4, p. 430-435.
- BERNHARD A. E. et Field K. G. 2000. «Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes». Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, p. 1587-1594.
- BERNET M. F., Brassart D., Neeser J. R. et Servin A. L.. 1994. «*Lactobacillus acidophilus* LA1 binds cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria». Gut, vol. 35, p. 483-489.
- BETTELHEIM K. A., Breardon A., Faiers M. C. et O'Farrell S. M. 1974. «The origin of O serotypes of *Escherichia coli* in babies after normal delivery». The Journal of Hygiene, vol. 72, p. 67-70.
- BEZKOROVAINY A. 2001. «Probiotics: determinants of survival and growth in the gut». The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 73, p. 399S-405S.
- BIANCONE L. et Pallone F. 1999. «Current treatment modalities in active Crohn's disease». Italian Journal of Gastroenterology and Hepatology, vol. 31, p. 508-514.

- BINDER B. J. et Liu Y. C. 1998. «Growth rate regulation of rRNA content of a marine synechococcus (*Cyanobacterium*) strain». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, p. 3346-3351.
- BLEICHNER G., Blehaut H., Mentec H. et Moyses D. 1997. «*Saccharomyces boulardii* prevents diarrhea in critically ill tube-fed patients. A multicenter, randomized, double-blind placebo-controlled trial». Intensive Care Medicine, vol. 23, p. 517-523.
- BONAPARTE C., Klein G., Kneifel W. et Reuter G. 2001. «Development of a selective culture medium for the enumeration of bifidobacteria in fermented milks». Lait, vol. 81, p. 227-235.
- Borriello S. P. 1984. «Bacteria and gastrointestinal secretion and motility». Scandinavian Journal of Gastroenterology, vol. 93, p. 115-121.
- BOTTCHER M. F., Norin E. K., Sandin A., Midtvedt T. et Bjorksten B. 1999. «Microflora-associated characteristics in faeces from allergic and non-allergic children». XIII International Symposium on Gnotobiology, Stockholm, p. 19-24.
- BOUHNİK Y., Flourie B., Riottot M., Bisetti N., Gailing M. F., Guibert A., Bornet F. et Rambaud J. C. 1996. «Effects of fructo-oligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans». Nutrition and Cancer, vol. 26, p. 21-9.
- BOURLIOUX P. 1998. «Composition et rôles de la flore intestinale: Mieux connaître son importance». Objectif Nutrition, La Lettre de l'Institut Danone. France, N° 41, p. 3-9.
- BRACQUART P. 1981. «An agar medium for the differential of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt». The Journal of Applied Bacteriology, vol. 51, p. 303-305.
- BRAEGGER C. 2002. «Probiotiques et gastro-entérite : Probiotics in the prevention and treatment of acute infectious diarrhea in children». Monatsschrift Kinderheilkunde, vol. 150, p. 824-828.
- BRAUN-HOWLAND E. B., Danielsen S. A. et Nierzwicki-Bauer S. A. 1992. «Development of a rapid method for detection bacterial cells *in situ* using 16S rRNA-targeted probes». Biotechniques, vol. 13, p. 928-933.
- BRIMACOMBE R., Greuer B., Mitchell D., Osswald M., Rinke-Appel J., Schuler D. et Stade K. 1990. «Three-dimensional structure and function of *E. coli* 16S and 23S rRNA as studied by cross-linking techniques», p. 93-106. In W. E. Hill et al. (ed.), The Ribosome: Structure, Function and Evolution. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- BROCKMAN F. J. 1995. «Nucleic-acid-based methods for monitoring the performance of *in situ* bioremediation». Molecular Ecology, vol. 4, p. 567-578.

- BROOK I., Baret C., Brinkman C., Martin W. et Finegold S. 1979. «Aerobic and anaerobic bacterial flora of the maternal cervix and newborn gastric fluid and conjunctiva: a prospective study». Pediatrics, vol. 63, p. 451–455.
- BRY L., Falk P. G., Midtvedt T. et Gordon J. I. 1996. «A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem». Science, 273 : 1380-1383.
- BULLEN C. L., Tearle P. V. et Willis A. T. 1976. «Bifidobacteria in the intestinal tract of infants: an in vivo study». Journal of Medical Microbiology, vol. 9, p. 325–333.
- BUNTHOF C. J., Bloemen K., Breeuwer P., Rombouts F. M. et Abee T. 2001. «Flow Cytometric Assessment of Viability of Lactic Acid Bacteria». Applied and Environmental Microbiology, vol. 67, p. 2326-2335.
- CHAGNAUD P., Machinis K., Coutte L. A., Marecat A. et Mercenier A. 2001. «Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common Lactobacillus species». Journal of Microbiological Methods, vol. 44, p. 139-48.
- CHARTERIS W. P., Kelly P. M., Morelli L. et Collins J. K. 1997. «Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations». International Journal of Food Microbiology, vol. 35, p. 1-27.
- CHAUVIÈRE G., Coconnier M. H., Kerneis S., Darfeuille-Michaud A., Joly B. et Servin A. L. 1992. «Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (EPEC) from human enterocyte-like Caco-2 cells by heat killed *Lactobacillus*». FEMS Microbiology Letters, vol. 70, p. 213-217.
- CHRISTENSEN H., Hansen M. et Sorensen J. 1999. «Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence *in situ* hybridization with an rRNA oligonucleotide probe». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, p. 1753-1761.
- COLLINS M. D. et Gibson G. R. 1999. «Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut». The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 69, p. 1052S–1057S.
- CONWAY P. 1997. «Development of intestinal microbiota» In Mackie R. I., White B. A., Isaacson R. E., eds. Gastrointestinal Microbiology. New York: Chapman and Hall, vol 2, p. 3–38.
- CONWAY P. 1995. «Microbial ecology of the human large intestine» In Gibson G. R. et Macfarlane G. T., eds, Human Colonic Bacteria : Role in Nutrition, Physiology, and Pathology. CRC Press Boca Raton, p. 1-24.
- CRABBE P. A., Bazin H., Eysen H. et Heremans J. F. 1968. «The normal microbial flora as a major stimulus for proliferation of plasma cells synthesizing IgA in the gut - the germ-free intestinal tract». International Archives of Allergy and Applied Immunology, vol. 34, p. 362-375.

- CZERUCKA D., Dahan S., Mograbi B., Rossi B. et Rampal P. 2000. «*Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells». Infection and Immunity, vol. 68, p. 5998-6004.
- DAVE R. I. et Shah N. P. 1996. «Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *bifidobacteria*». Journal of Dairy Science, vol. 79, p. 1529-1536.
- DAVEY H. M. et Kell D. B. 1996. «Flow cytometric and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses». Microbiological Reviews, vol. 60, p. 641-696.
- DE KRUIF et Paul H. 1926. «Microbe hunters». Blue Ribbon Books. New York, N.Y.
- DELONG E. F., Wickham G. S. et Pace N. R. 1989. «Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells». Science, vol. 243, p. 1360-1363.
- DE SIMONE C., Bianchi-Salvadori B., Jirillo E., Baldinelli L., Bitonti F. et Vesely R. 1989. «Modulation of immune activities in humans and animals by dietary lactic acid bacteria» In Chandan RC, ed. Yoghurt:nutritional and health properties. McLean.VA: Kirby. Lithographics, p. 201-214.
- DE SIMONE C., Bianchi-Salvadori B., Negri M., Ferrazzi M., Baldinelli L. et Vesely R. «The adjuvant effect of yoghurt on production of gamma-interferon by Con A stimulated human peripheral blood lymphocytes».1986. Nutrition Reports International, vol. 33, p. 419-433.
- DIPLOCK A. T., Aggett P. J., Ashwell M., Bornet F., Fern E. B. et Roberfroid M. B. 1998. «Scientific concepts of functional foods in Europe, consensus document». (FF-27-de 98) Bruxelles : ILSI Europe, p.17.
- DORÉ J. 1997. «Etude de l'écosystème digestif à l'aide de nouveaux outils». Bulletin de la Société Microbiologique de France, vol. 12, p. 32-37.
- DRASAR B. S. et Barrow P. A. 1985. «Intestinal Microbiology». American Society for Microbiology, Washington DC.
- DUCLUZEAU R. 2001. «Viabilité ou implantation des bactéries lactiques dans le tube digestif : deux caractéristiques à ne pas confondre». Yaourts & Laits fermentés, vol. 5, p. 1-6.
- DUCLUZEAU R. 2000. «Les animaux gnotoxéniques un modèle d'étude des interactions entre la flore intestinale et l'hôte». Danone World Newsletter, N°21.
- DUCLUZEAU R. 1998. «Ecosystème microbien du tube digestif» In Encyclopedie Medico-Chirurgicale.Gastro-enterologie. Elsevier; Paris (FRA), N° 9-000-B-20, 7 p.
- DUCLUZEAU R. 1997. «Personal communication», Le Plessis-Robinson, France.

- DUCLUZEAU R. 1994. «Écologie microbienne du tube digestif et flores de barrière». Cahier de Nutrition et de Diététique, vol. 29, p. 351-356.
- DUCLUZEAU R. 1993. «Installation, équilibre et rôle de la flore microbienne chez le nouveau-né». Annales de Pédiatrie, vol. 40, p. 13-22.
- ESCHERICH T. 1885. «The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant». Fortschritte der Medizin, vol. 3. Featured In Reviews of Infectious Diseases, vol. 10, p. 1220-1225, 1988.
- FALK P. G., Hooper L. V., Midtvedt T. et Gordon J. I. 1998. «Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology». Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 62, p. 1157-1170.
- FAVIER C. F., Vaughan E. E., De Vos W. M. et Akkermans A. D. 2002. «Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates». Applied and Environmental Microbiology, vol. 68, p. 219-226.
- FLANDROIS J. P. 1997. «Bactériologie médicale». Collection Azay / Presses Universitaires de Lyon, p.289.
- FONS M., Gomez A. et Karjalainen T. 2000. «Mechanisms of colonization and colonisation resistance of the digestive tract». Microbial Ecology in Health and Disease, vol. 2, p. 240-246.
- FRANKS A. H., Harmsen H. J., Raangs G. C., Jansen G. J., Schut F. et Welling G. W. 1998. «Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, p. 3336-3345.
- FREITAS M. et Cayuela C. 2000. «Microbial modulation of host intestinal glycosylation patterns». Microbial Ecology in Health and Disease, vol. 2, p. 165-178.
- FROTHINGHAM R., Duncan A. J. et Wilson K. H. 1993. «Ribosomal DNA sequences of bifidobacteria: implications for sequence-based identification of the human colonic flora». Microbial Ecology in Health and Disease, vol. 6, p. 23-27.
- FUJISAWA T., Benno Y., Yaeshima T. et Mitsuoka T. 1992. «Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson *et al.* 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981)». International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 42, p. 487-491.
- FULLER R. 1992. «History and development of probiotics» In R. Fuller, ed. Probiotics: the Scientific Basis, Chapter 1. London, New York: Chapman and Hall, p. 1-8.
- FULLER R. 1991. «Probiotics in human medicine». Gut, vol. 32, p. 439-442.
- FULLER R. 1989. «Probiotics in man and animals». The Journal of Applied Bacteriology, vol. 66, p. 365-378. Review.

- FUCHS B. M., Glockner F. O., Wulf J. et Amann R. 2000. «Unlabeled helper oligonucleotides increase the *in situ* accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, p. 3603-3607.
- GALLAHER D. D., et Khil J. 1999. «The effect of synbiotics on colon carcinogenesis in rats». The Journal of Nutrition, vol. 129, p. 1483S-1487S.
- GARVIE E. I., Cole C. B., Fuller R. et Hewitt D. 1984. «The effect of yoghurt on some components of the gut microflora and on the metabolism of lactose in the rat». The Journal of Applied Bacteriology, vol. 56, p. 237-245.
- GAVINI F., Cayuela C., Antoine J. M., Lecoq C., Lefebvre B., Membré J. M. C. et Neut C. 2001. «Differences in the distribution of bifidobacterial and enterobacterial species in human faecal microflora of the different (children, adults, elderly) age groups». Microbial Ecology in Health and Disease, vol. 13, p. 40-45.
- GHODDUSI H. B. et Robinson R. K. 1996. «Enumeration of starter cultures in fermented milks». The Journal of Dairy Research, vol. 63, p. 151-158.
- GIBSON G. R., Beatty E. R., Wang X. et Cummings J. H. 1995. «Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin». Gastroenterology, vol. 108, p. 975-982.
- GIBSON G. R. et Roberfroid M. B. 1995. «Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics». The Journal of Nutrition, vol. 125, p. 1401-1412.
- GIONCHETTI P., Rizzello F., Venturi A., Brigidi P., Matteuzzi D., Bazzocchi G., Poggioli G., Miglioli M. et Campieri M. 2000. «Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial». Gastroenterology, vol. 119, p. 305-309.
- GOLDIN B. R. et Gorbach S. L. 1977. «Alterations in faecal microflora enzymes related to diet, age, *Lactobacillus* supplements and dimethylhydrazine». Cancer, vol. 40, p. 2421-2426.
- GOMEZ A., Ladire M., Nardi M., Marcille F., Dabard J. et Fons M. 1999. «Molecular characterization of genes involved in the biosynthesis of antibiotic ruminococcin A by a *Ruminococcus gnavus* strain isolated from human intestinal flora: evidence for trypsin-mediated transcriptional regulation». Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology, vol. 99, p. 358-359.
- GOODENOUGH E. R. et Kleyn D. H. 1976. «Influence of viable yogurt microflora on digestion of lactose by the rat». Journal of Dairy Science, vol. 59, p. 601-606.
- GORDON H. A. et Pesti L. 1971. «The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships». Bacteriological Reviews, vol. 35, p. 390-429.

- GRILL J. -P., Crociani J. et Ballongue J. 1995. «Effect of *Bifidobacteria* on nitrites and nitrosamines». Letters in Applied Microbiology, vol. 20, p. 328-330.
- GRIMAUD J. C., Bouvier J. G., Bertolino J. G., Salducci J., Chiarelli P. et Bouley C. 1993. «Effets du lait fermenté contenant du *Bifidobacterium* sur le temps de transit colique». Gastroenterologie clinique et biologique, vol. 17, A127 (Abstract).
- GUARINO A., Canani R. B., Spagnuolo M. I., Albano F. et Di Benedetto L. 1997. «Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea». Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, vol. 25, p. 516-519.
- GUÉRIN C., Andrieux C., Popot F., Charpilienne A., Vaissade P., Gaudichon C., Pedone C., Bouley C. et Szylit O. 1997. «Metabolism and composition of fecal microflora in healthy infants from 10 to 18 months old from day center». Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, vol. 25, p. 281-289.
- GUNASEKERA T. S., Attfield P. V. et Veal D. A. 2000. «A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk». Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, p. 1228-1232.
- GUPTA D., Kirkland T. N., Viriyakosol S. et Dziarski R. 1996. «CD14 is a cell-activating receptor for bacterial peptidoglycan». The Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 23310-23316.
- HAMMES W. P. et Vogel R. F. 1995. «The genus *Lactobacillus*» In The lactic acid bacteria. The genera of lactic acid bacteria, ed Wood B. J. B. et Holzapfel W. H. Glasgow: Blackie Academic and Professional, vol. 2, p. 19-53.
- HE F., Tuomola E., Arvilommi H. et Salminen S. 2000. «Modulation of humoral immune response through probiotic intake». FEMS Immunology and Medical Microbiology, vol. 29, p. 47-52.
- HEINIG M. J. et Dewey K. G. 1996. «Health advantages of breast feeding for infants: a critical review». Nutrition Research Reviews, vol. 9, p. 89-110
- HERIAS M. V., Midtvedt T., Hanson L. A. et Wold A. E. 1998. «Increased antibody production against gut-colonizing *Escherichia coli* in the presence of the anaerobic bacterium *Peptostreptococcus*». Scandinavian Journal of Immunology, vol. 48, p. 277-282.
- HERIGSTAD B., Hamilton M. et Heersink J. 2001. «How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria». Journal of Microbiological Methods, vol. 44, p. 121-129.
- HILLIAM M. 1998. «The market for functional food». International of Dairy Journal, vol. 8, p. 349-353.



- HILL M. J. 1997. «Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis». European Journal of Cancer Prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP), vol. 6, p. S43–S45.
- HIRAYAMA K., Itoh K., Takahashi E. et Mitsuoka T. 1995. «Comparison of composition of fecal microbiota and metabolism of fecal bacteria among human-flora-associated mice inoculated with feces from 6 different human donors». Microbial Ecology in Health and Disease, vol. 9, p. 199-211.
- HIRTZMANN M. et Reuter G. 1963. «Klinische Erfahrungen mit einer neuen, automatisch gesteuerten Kapsel zur Gewinnung von Darminhalt und bakteriologische Untersuchungen des Inhalts höherer Darmabschnitte». Medizinische Klinik (Munich), vol. 58, p. 1408-1411.
- HOLDEMAN L. V. et Moore W. E. C. 1972. «Roll-tube technique for anaerobic bacteria». The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 25, p. 1314–1317.
- HOLLINGSWORTH M., Strawhecker T., Caffrey T. et Mack D. 1994. «Expression of MUC1, MUC2, MUC3 and MUC4 mucin mRNAs in human pancreatic and intestinal tumor cell lines. International Journal of Cancer, vol.57, p. 198-203.
- HOLZAPFEL W. H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. et Huis in't Veld J. H. 1998. «Overview of gut flora and probiotics». International Journal of Food Microbiology, vol. 41, p. 85-101.
- HOOPER L. V., Bry L., Falk P. G. et Gordon J. I. 1998. «Transfert de la flore microbienne fécale de porcelets et de porcs adultes holoxéniques à des souris adultes et des porcelets axéniques: effet de l'animal hôte et du régime alimentaire sur le faciès microbien du tube digestif des divers animaux». Annales de l'Institut Pasteur. Microbiologie, vol. 129 B, p. 597-612.
- HOVERSTAD T. 1989. «The normal microflora and short chain fatty acids» In Grubb R., Midtvedt T. et Norin E. (ed.), The regulatory and protective role of the normal microflora, p. 89-108. Macmillan Press, London, England.
- HOYOS A. B. 1999. «Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit». International Journal of Infectious Diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases, vol. 3, p. 197-202.
- HUNGATE R. E. 1966. «The Rumen and its Microbes». Academic Press, New York, p. 533.
- IDF. 1999. «proposed draft standard for fermented milks (A-11) step». International Dairy Federation, Brussels, p. 15-18.

JOHNSON L. D. 1996. «Introduction to fluorescence techniques» In Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Spense, M. T. Z., Ed. Molecular Probes, Leiden, p. 1-6.

JOHNSON J. L., Phelps C. F., Cummings C. S. et London L. 1980. «Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group». International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 30, p. 53-68.

KANDLER O. et Weiss N. 1986. «Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212<sup>AL</sup>» In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharp, and J. G. Holt (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, p. 1209– 1220. Williams & Wilkins, Baltimore.

KAUFMANN P., Pfefferkorn A., Teuber M. et Meile L. 1997. «Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR». Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, p. 1268-1273.

KHAN A. A., Nawaz M. S., Robertson L., Khan S. A. et Cerniglia C. E. 2001. «Identification of predominant human and animal anaerobic intestinal bacterial species by terminal restriction fragment patterns (TRFPs): a rapid, PCR-based method». Molecular and Cellular Probes, vol. 15, p. 349-355.

KEPNER R. L. Jr. et Pratt J. R. 1994. «Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present». Microbiological Reviews, vol. 58, p. 603-615.

KIM H. S. et Gilliland S. E. 1983. «*Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans». Journal of Dairy Science, vol. 66, p. 959-966.

KIMURA K., McCartney A. L., McConnell M. A. et Tannock G. W. 1997. «Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains». Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, p. 3394-3398.

KIRCHHELLE A., Fruhwein N. et Toburen D. 1996. «Treatment of persistent diarrhea with *S. boulardii* in returning travelers. Results of a prospective study». Fortschritte der Medizin, vol. 114, p. 136-140.

KIRJAVAINEN P., El-Nezami H., Salminen S., Ahokas J. et Wright P. 1999. «The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation». FEMS Immunology and Medical Microbiology, vol. 26, p. 131-135.

KLEESSEN B., Bunke H., Tovar K., Noack J et Sawatzki G. 1995. «Influence of two infant formulas and human milk on the development of the faecal flora in newborn infants». Acta Paediatrica, vol. 84, p. 1347-1356.

KNEIFEL W. et Bonaparte C. 1998. «Neue Trends bei gesundheitlich relevanten Lebensmitteln: 1. Probiotica». Ernährung/Nutrition, vol. 22, p. 357-363.

- KNEIFEL W., Jaros D. et Erhard F. 1993. «Microflora and acidification properties of yogurt and yogurt-related products fermented with commercially available starter cultures». International Journal of Food Microbiology, vol. 18, p. 179-189.
- KNEIFEL W. et Pacher B. 1993. «An X-Glu based agar medium for enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt-related milk products». International of Dairy Journal, vol. 3, p. 277-291.
- KOBASHI K. 1998. «Glycosides are natural prodrugs - evidence using germ-free and gnotobiotic rats associated with a human intestinal bacterium». Journal of Traditional Medicine, vol. 15, p. 1-13.
- KOK R. G., de Waal A., Schut F., Welling G. W., Weenk G. et Hellingwerf K. J. 1996. «Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces». Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, p. 3668-3672.
- KRUIS W., Schutz E., Fric P., Fixa B., Judmaier G. et Stolte M. 1997. «Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis». Alimentary Pharmacology & Therapeutics, vol. 11, p. 853-858.
- KVASNIKOV E., Grigorov I., Kovalenko N. K., Medovar B., Shishlevskaia T., Palekha S et Kozlovskaja S. M. 1984. «*Lactobacillus* in the digestive tract and food of long-lived persons in Abkhazia». Mikrobiologicheskii Zhurnal (USSR), vol. 46, p. 11-18.
- LANGENDIJK P. S., Schut F., Jansen G. J., Raangs G. C., Kamphuis G. R., Wilkinson M. H. et Welling G. W. 1995. «Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Bifidobacterium spp.* with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples». Applied and Environmental Microbiology, vol. 8, p. 3069-3075.
- LAPIERRE L., Undeland P. et Cox L. J. 1992. «Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products». Journal of Dairy Science, vol. 75, p. 1192-1196.
- LAPIERRE L. 1990. «Growth of *Lactobacillus acidophilus* isolated from fermented dairy products on different selective media», Research Paper. Nestec, Research Centre, Lausanne, Switzerland.
- LAUER E., Helming C. et Kandler O. 1980. «Heterogeneity of the species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Moquot as revealed by biochemical characteristics and DNA/DNA hybridization». Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale C, vol. 1, p. 150-168.
- LERCHE M. et Reuter G. 1962. «Das vorkommen aerob wachsender grampositiver stäbchen des genus *Lactobacillus* beijerinck im darminhalt erwachsener menschen». Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite naturwissenschaftliche Abt.: Allgemeine, landwirtschaftliche und technische Mikrobiologie, vol. 185, p. 446-481.

- LEWIS S. J. et Freedman A. R. 1998. Review article: «The use of biotherapeutic agents in the prevention and treatment of gastrointestinal disease». Alimentary Pharmacology & Therapeutics, vol. 12, p. 807-822.
- LINK-AMSTER H., Rochat F., Saudan K. Y., Mignot O. et Aeschlimann J. M. 1994. «Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake». FEMS Immunology and Medical Microbiology, vol. 10, p. 55- 64.
- LIPOGLAVSEK L. et Avgustin G. 2001. «Application of flow cytometry for ecological monitoring of the rumen microbial ecosystem». Folia Microbiologica, vol. 46, p. 53-55.
- LODISH H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S., Matsudaira P. et Darnell J. 1995. «Microscopy» In Molecular Cell Biology, 3e édition, Scientific American Books Inc. New York.
- LOGE F. J., Emerick R. W., Thompson D. E., Nelson D. C. et Darby J. L. 1999. «Development of a fluorescent 16S rRNA oligonucleotide probe specific to the family *Enterobacteriaceae*». Water Environmental Research, vol. 71, p. 75-83.
- LUCKEY T. D. et Floch M. H. 1972. «Introduction to intestinal microecology». The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 25, p. 1291-1295.
- MACK D. R., Michail S., Wei S., McDougall L. et Hollingsworth M. A. 1999. «Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression». The American Journal of Physiology, vol. 276, p. G941-G950.
- MACKIE R. I., Sghri A. et Gaskins H. R. 1999. «Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract». The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 69, p. 1035S–1045S.
- MACNAUGHTON S. J., O'Donnell A. G. et Embley T. M. 1994. «Permeabilization of mycolic-acid containing actinomycetes for *in situ* hybridization with oligonucleotide fluorescently labelled probes». Microbiology, vol. 140, p. 2859-2865.
- MADSEN K., Cornish A., Soper P., McKaigney C., Jijon H., Yachimec C., Doyle J., Jewell L. et De Simone C. 2001. «Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function». Gastroenterology (Glendale, Calif.), vol. 121, p. 580-591.
- MADSEN K., Doyle J., Jewell L., Tavernini M. et Fedorak R. 1999. «*Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice». Gastroenterology (Glendale, Calif.), vol. 116, p. 1107-1114.
- MAHIDA Y. R., Rose F. et Chan W. C. 1997. «Antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract». Gut, vol. 40, p. 161-163.
- MAJAMAA H. et Isolauri E. 1997. Probiotics: «a novel approach in the management of food allergy». The Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 99, p. 179-185.

MALLET A. K., Bearne C. A. et Rowland I. R. 1989. «The influence of incubation pH on the activity of rat and human gut flora enzymes». The Journal of Applied Bacteriology, vol. 66, p. 2031-2035.

MANZ W., Wagner M., Amann R. et Schleifer K.-H. 1994. «*In situ* Characterization of the Microbial Consortia Active in two Wastewater Treatment Plants». Water Research, vol. 28, p. 1715-1723.

MARTEAU P., Pochart P., Dore J., Bera-Maillet C., Bernalier A. et Corthier G. 2001. «Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota». Applied and Environmental Microbiology, vol. 67, p. 4939-4942.

MARTEAU P. et RAMB J. C. 1998. «Probiotiques en gastroenterologie bases rationnelles, effets démontrés et perspectives». HEPATO-GASTRO, vol. 5, N° 4.

MARTEAU P. et Vesa T. 1998. «Pharmacokinetics of probiotics and biotherapeutic agents». Humans Bioscience Microflora, vol.17, p. 1-6.

MARTEAU P., Vaerman J. P., Dehennin J. P., Bord S., Brassart D., Pochart P., Desjeux J. F. et Rambaud J. C. 1997. «Effects of intrajejunal perfusion and chronic ingestion of *Lactobacillus johnsonii* strain La1 on serum concentrations and jejunal secretions of immunoglobulins and serum proteins in healthy humans». Gastroenterologie Clinique et Biologique, vol. 21, p. 293-298.

MARTEAU P., Pochart P., Bouhnik Y. et Rambaud J. C. 1993. «The fate and effects of transiting, nonpathogenic microorganisms in the human intestine» In World Review of Nutrition and Dietetics. Intestinal Flora, Immunity, Nutrition and Health, ed AP. Simopoulos T. Corring & A. Rérat. Paris : Karger, p. 1-21.

MARTEAU P., Pochart P., Flourié B., Pellier P., Santos L., Desjeux J-F. et Rambaud J-C. 1990. «Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans». The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 52, p. 685-688.

MARTINEAU B. 1999. «Comparison of four media for the selection of bifidobacteria in fecal samples». Anaerobes, vol. 5, p. 123-127.

MATA L. J. et Urrutia J. J. 1971. «Intestinal colonization of breast-fed children in a rural area of low socioeconomic level». Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 176, p. 93-108.

MATSUKI T., Watanabe K., Tanaka R., Fukuda M. et Oyaizu H. 1999. «Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S r RNA-gene targeted species-specific primers». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, p. 4506-4512.

MATTE-TAILLIEZ O., Quénéé P., Van Opstal J., Dessevre F., Firmesse O. et Tailliez P. 2001. «Detection and identification of lactic acid bacteria in milk and industrial

- starter culture with fluorescently labelled rRNA-targeted peptide nucleic acid probes». Le Lait, vol. 81, p. 237-248.
- MCCARTNEY A. L., Wenzhi W et Tannock G. W. 1996. «Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans». Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, p. 4600-4613.
- MCFARLAND L. V., Surawicz C. M., Greenberg R. N., Fekety R., Elmer G. W., Moyer K. A., Melcher S. A., Bowen K. E., Cox J. L., Noorani Z. 1994. «A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease». JAMA : the Journal of the American Medical Association, vol. 271, p. 1913-1918.
- MCINTOSH G. H. 1996. «Probiotics and colon cancer prevention». Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, vol. 5, p.48-52.
- METCHNIKOFF E. 1908. «Études sur la flore intestinale». Annales de l'Institut Pasteur, vol. 22, p. 929-955.
- METCHNIKOFF E. 1910. «Études sur la flore intestinale—Deuxième mémoire». Annales de l'Institut Pasteur, vol. 24, p. 755-770.
- MÉTÉZEAU Ph., Miglierina R. et Ratinaud M. H. 1994. «La cytométrie en flux : guide pratique de la préparation à l'analyse des cellules» In Presses universitaires de Limoges. Limoges.
- MÉTÉZEAU Ph. et Delamare G. 1988. «Les principes techniques» In La cytométrie en flux, vol. 1, p. 15-30, eds. P. Métézeau, X. Ronot, G. Le Noan, M.H. Ratinaud. Medsi/McGraw-Hill, Paris.
- MEYDANI S. et Ha W. 2000. «Immunologic effects of yoghurt». The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 71, p. 861-872.
- MIDTVEDT T. 1999. «Microbial functional activities» In Nestlé Nutrition Workshop series : Probiotics, other nutritional factors and intestinal flora. Series 42, p. 79-96. Hanson LA., Yolken RH. Eds.
- MIDTVEDT T. 1997. «Germfree animals and carcinogenesis». Bioscience and Microflora, vol. 16, p. 9-12.
- MIDTVEDT T. 1974. «Microbial bile acid transformation». The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 27, p. 1341-1347.
- MIETTINEN M., Lehtonen A., Junkunen I. et Matikainen S. 2000. «*Lactobacilli* and *Streptococci* activate NF- $\kappa$ B and STAT signaling pathways in human macrophages». Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950), vol. 164, p. 3733-3740.
- MIKELSAAR M. et Mändar R. 1993. «Development of individual lactic acid microflora in the human microbial ecosystem» In Lactic Acid Bacteria, ed S. Salminen et A. Von Wright. New York : Marcel Dekker Inc., p. 237-293.

- MITSUOKA T. 1996. «Intestinal flora and human health». Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, vol. 5, p. 2-9.
- MITSUOKA T. 1992. «Intestinal flora and aging». Nutrition Reviews, vol. 50, p. 438-446. Review.
- MITSUOKA T. 1990. «Bifidobacteria and their role in human health». Journal of Industrial Microbiology, vol. 6, p. 263-268.
- MITSUOKA T. et Hayawakawa K. 1972. «The fecal flora of man. I. Communication : the composition of the fecal flora of different age groups». Zentralblatt fur Bakteriologie und Hygiene, vol. 223, p. 333-342.
- MITSUOKA T., Sega T. et Yamamoto S. 1965. «Eine verbesserte methodik der qualitativen und quantitativen analyse der darmflora von menschen an tieren». Zentralblatt fur Bakteriologie. 1. Abt. Originale. A, vol. 195, p. 455-469.
- MOLIN G., Jeppsson B., Johansson M. L., Ahrne S., Nobaek S., Stahl M. et Bengmark S. 1993. «Numerical taxonomy of *Lactobacillus spp* associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines». The Journal of Applied Bacteriology, vol. 74, p. 314-323.
- MOORE W. E. C., Cato E. P. et Holdeman L. V. 1978. «Some current concepts in intestinal bacteriology». The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 31, p. S33-S42.
- MOORE W. E. C. et Holdeman L. V. 1974. «Special problems associated with the isolation and identification of intestinal bacteria in fecal flora studies». The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 27, p. 1450-1455.
- MOREAU M. C., Nuyts V. et Raibaud P. 1994. «Effet de l'ingestion d'un lait fermenté sur la stimulation de l'immunité chez la souris axénique». Cahiers de Nutrition et de Diététique, vol. 29, p. 341-347.
- MOREAU M. C. 1986. «Influence de l'état axénique et de la microflore intestinale sur la réponse immunitaire chez la souris». Sciences et Techniques de l'Animal de Laboratoire, vol. 11, p. 29-36.
- MOREL G. et Cavalier A. 1998. «Hybridation *in situ* en microscopie photonique» In Polytechnica. Série techniques de visualisation du genome. Paris, p. 105.
- MOSSEL D. A. A. 1985. «Introduction and prospective, quality assurance and quality control of microbiological culture media», International Journal of Food Microbiology, vol. 2, p. 1-7.
- MOUGHAN P. J., Birtles M. J., Cranwell P. D., Smith W. C. et Pedraza M. 1992. «The piglet as a model animal for studying aspects of digestion and absorption in milk-fed human infants». In Simopoulos AP, ed. Nutritional Triggers for Health and in Disease. Basel, Switzerland: Karger, p. 40-113.

- MUTAI M. et Kawai Y. 1981. «Factors influencing bacterial colonization». In Recent Advances in Germfree Research, Proceedings of the 7th International Symposium on Gnotobiology. Tokyo, Japan : Tokai University Press, p. 149- 157.
- MUYZER G. et Smalla K. 1998. «Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology». Antonie van Leeuwenhoek, vol. 73, p. 127–141.
- NAGAFUCHI S., Takahashi T., Yajima T., Kuwata T., Hirayama K. et Itoh K. 1999. «Strain dependency of the immunopotentiating activity of *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*». Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, vol. 63, p. 474-479.
- NEBRA Y. et Blanch A. R. 1999. «A new selective medium for *Bifidobacterium spp*». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, p. 5173-5176.
- NEEFS J. M., van de Peer Y., de Rijk P., Chapelle S. et de Wachter R. 1993. «Compilation of small ribosomal subunit RNA structures». Nucleic Acids Research vol. 21, p. 3025–3049.
- NEISH A. S., Gewirtz A. T., Zeng H., Young A. N., Hobert M. E., Karmali V., Rao A. S. et Madara J. L. 2000 «Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination». Science, vol. 289, p. 1560-1563.
- NEMCOVA R. 1997. «Selection criteria of lactobacilli for probiotic use». Veterinary Medicine (Czechoslovak), vol. 42, p. 19-27.
- OGIHARA H., Sato K. et Haruta M. 1983. «The applicability of BCP plate count agar for the detection and enumeration of lactic acid bacteria in fermented milk and lactic beverages. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, vol. 24, p. 230-233.
- O’SULLIVAN D. J. 2001. «Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria». Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 49, p. 1751 – 1760.
- O’SULLIVAN D. J. 1999. «Methods of analysis of the intestinal microflora» In Tannock G. W. (Ed) Probiotics: a Critical Review, p. 23–44. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- PACHER B. et Kneifel W. 1996. «Development of a culture medium for the detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products». International of Dairy Journal, vol. 6, p. 43-64.
- PASTER B. J., Boches S. K., Galvin J. L., Ericson R. E., Lau C. N., Levanos V. A., Sahasrabudhe A. et Dewhirst F. E. 2001. «Bacterial diversity in human subgingival plaque». Journal of Bacteriology, vol. 183, p. 3770-3783.
- PASTEUR L. 1885. «Observations relatives à la note précédente de M. Duclaux». Comptes Rendues Hebdomadaires de l’Academies des Sciences (Paris), vol. 100, p. 68.



- PAYNE J. F., Morris A. E. et Beers P. 1999. «Note: evaluation of selective media for the enumeration of Bifidobacterium sp. in milk». Journal of Applied Microbiology, vol. 86, p. 353-358.
- PEDERSEN L. W. 1993. «Proposed methods for counting and discriminating between: *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *S. thermophilus* and bifidobacteria». Chr. Hansen's Laboratory Research Paper.
- PEDROSA M. C., Golner B. B., Goldin B. R., Barakat S., Dallal G. E. et Russell R. M. 1995. «Survival of yogurt-containing organisms and *Lactobacillus gasseri* (ADH) and their effect on bacterial enzyme activity in the gastrointestinal tract of healthy and hypochlorhydric elderly subjects». The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 61, p. 353-359.
- PELTO L., Isolauri E., Lilius E. M., Nuutila J. et Salminen S. 1998. «Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects». Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology, vol. 28, p. 1474-1479.
- PESSI T., Sutas Y., Hurme M. et Isolauri E. 2000. «Interleukin- 10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG». Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology, vol. 30, p. 1804-1808.
- PINDER A. C., Purdy P. W., Poulter S. A. et Clark D. C. 1990. «Validation of flow cytometry for rapid enumeration of bacterial concentrations in pure cultures». The Journal of Applied Bacteriology, vol. 69, p. 92-100.
- PORTER J., Deere D., Pickup R. et Edwards C. 1996. «Fluorescent probes and flow cytometry : new insights into environmental bacteriology». Cytometry, vol. 23, p. 91-96.
- PRESCOTT L., Harley J. P. et Klein D. A. 1995. «Introduction à la microbiologie» In Microbiologie, W.C. Brown Publishers, Ed., De Boeck-Wesmael S.A, Bruxelles, pp. 4-68 ; p. 972.
- RAIBAUD P., Ducluzeau R. et Tancrède C. 1977. «L'effet de barrière microbien dans le tube digestif : moyen de défense de l'hôte contre les bactéries exogènes». Medecine et Maladies Infectieuses, vol. 7, p. 130-134.
- RAMOTAR K., Conly J. M., Chubb H. et Louie T. J. 1984. «Production of menaquinones by intestinal anaerobes». The Journal of Infectious Diseases, vol. 150, p. 213-218.
- RANG C., Licht T. R., Midtvedt T., Conway P. L., Chao L., Krogfelt K. A., Cohen P. S. et Molin S. 1999. «Estimation of growth rates of *Escherichia coli* BJ4 in streptomycin-treated and previously germfree mice by *in situ* rRNA hybridization». Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, vol. 6, p. 434-436.

- RAO A. V. 2002. «Prébiotiques et probiotiques : nouvelles théories en matière de nutrition et de santé». Institut de nutrition pour bébés Heinz, vol. 19, p. 1-3.
- REDDY B. S. 1998. «Prevention of colon cancer by pre- and probiotics: evidence from laboratory studies». The British Journal of Nutrition, vol. 80, p. S219-S223.
- REILLY K. et Attwood G. T. 1998. «Detection of *Clostridium proteoclasticum* and closely related strains in the rumen by competitive PCR». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, p. 907-913.
- REMBACKEN B. J., Snelling A. M., Hawkey P. M., Chalmers D. M. et Axon A. T. 1999. «Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial». Lancet, vol. 354, p. 635-639.
- RESNICK I. G. et Levin M. A. 1981. «Quantitative procedure for enumeration of bifidobacteria». Applied and Environmental Microbiology, vol. 42, p. 427-432.
- RETTGER L. F., Levy M. N., Weinstein L. et Weiss J. E. 1935. «Lactobacillus acidophilus and its Therapeutic Application». Yale University Press, New Haven, USA.
- REUTER G. 1997. «Present and future of probiotics in Germany and in Central Europe». Bioscience Microflora, vol. 16, p. 43-51.
- REUTER G. 1990. «Bifidobacteria cultures as components of yogurt-like products». Bifidobacteria Microflora, vol. 9, p. 107-118.
- REYSENBACH A. -L., Giver L. J., Wickham G. S. et Pace N. R. 1992. «Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction». Applied and Environmental Microbiology, vol. 58, p. 3417-3418.
- RICHARDSON D. 1996. «Probiotics and product innovation». Nutrition and Food Science, vol. 4, p. 27-33.
- ROBERFROID M. 2000. «Les aliments fonctionnels: un défi pour le XXIe siècle». NAFAS Science, vol. 1, p. 3-9.
- ROBERFROID M. B., Bornet F., Bouley C. et Cummings J. H. 1995. «Colonic microflora: nutrition and health». Nutrition Reviews, vol. 53, p. 127-130.
- ROSENBAUM V. et Riesner D. 1987. «Temperature-gradient gel electrophoresis. Thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts». Biophysical Chemistry, vol. 26, p. 235-246.
- ROY D. 2001. «Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products». International Journal of Food Microbiology, vol. 69, p. 167-82.
- RUMNEY C. J. et Rowland I. R. 1992. «*In vivo* and *in vitro* models of the human colonis flora». Critical Reviews in Food Science and Nutrition, vol. 31, p. 299-331.
- RUSELER-VAN EMBDEN J. G., van Lieshout L. M., Gosselink M. J. et Marteau P. 1995. «Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *Lactobacillus acidophilus*, and

*Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins». Scandinavian Journal of Gastroenterology, vol. 30, p. 675-680.

SAAVEDRA J. M., Bauman N. A., Oung I., Perman J. A. et Yolken R. H. 1994. «Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus ». Lancet, vol. 344, p. 1046-1049.

SADZIKOWSKI M. R., Sperry J. F. et Wilkins T. D. 1977. «Cholesterol reducing bacterium from human feces». Applied and Environmental Microbiology, vol. 34, p. 355-362.

SALMINEN S., Isolauri E. et Onnela T. 1995. «Gut flora in normal and disordered states». Chemotherapy, vol. 41, p. 5-15.

SALOFF-COSTE C. J. 1997. «Microflore gastro-intestinale et laits fermentés». Danone World Newsletter N°14.

SALYERS A. A., West S. E., Vercellotti J. R. et Wilkins T. D. 1977. «Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon». Applied and Environmental Microbiology, vol. 34, p. 529-533.

SAMONA A. et Robinson R. K. 1991. «Enumeration of bifidobacteria in dairy products». Journal of the Society of Dairy Technology, vol. 44, p. 64-66.

SATOKARI R. M., Vaughan E. E., Akkermans A. D., Saarela M. et de Vos W. M. 2001. «Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis». Applied and Environmental Microbiology, vol. 67, p. 504-513.

SATOKARI R. M., Vaughan E. E., Akkermans A. D., Saarela M. et De Vos W. M. 2001. «Polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis monitoring of fecal bifidobacterium populations in a prebiotic and probiotic feeding trial». Systematic and Applied Microbiology, vol. 24, p. 227-231.

SAVAGE D. S. 1977. «Microbial ecology of the gastrointestinal tract». Annual Review of Microbiology, vol. 31, p. 107-133.

SCARDOVI V. 1986. «Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, 472<sup>AL</sup>» In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharp, and J. G. Holt (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, p. 1418-1434. Williams & Wilkins, Baltimore.

SCHAAFSSMA G. 1996. «State of the art concerning probiotic strains in milk products». IDF Nutrition Newsletter, vol. 5, p. 23-24.

SCHIFFRIN E. J., Rochat F., Link-Amster H., Aeschlimann J. M. et Donnet-Hughes A. 1995. «Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria». Journal of Dairy Science, vol. 78, p. 491-497.

- SCHMIDT T. M., DeLong E. F. et Pace N. R. 1991. «Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing». Journal of Bacteriology, vol. 173, p. 4371–4378.
- SCHNEEGURT M. A. et Kulpa C. F. 1998. «The application of molecular techniques in environmental biotechnology for monitoring microbial systems». Biotechnology and Applied Biochemistry, vol. 27, p. 73-79.
- SCHNEIDER F. 2000. «Probiotiques et prébiotiques». In Le colloque "Le Lait : Aliment santé". Abstracts of the annual meeting of ENSAIA (Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires), INPL. Nancy, France.
- SCHOTTELIUS M. 1902. «Die Bedeutung der Darmbakterien für die Ernährung». II. Archiv für Hygiene, vol. 42, p. 48–70.
- SEARS M. R., Greene J. M., Willan A. R., Taylor D. R., Flannery E. M., Cowan J. O., Herbison G. P. et Poulton R. 2002. «Long-term relation between breastfeeding and development of atopy and asthma in children and young adults: a longitudinal study». Lancet, vol. 360, p. 901-907.
- SELSTED M. E., Miller S. I., Henschen A. H. et Ouellette A. J. 1992. «Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense». The Journal of Cell Biology, vol. 118, p. 929-936.
- SHANAHAN F. 2000. «Immunological and genetic links in Crohn's disease». Gut, vol. 46, p. 6-7.
- SHAPIRO H. M. 1995. «Microbiology, parasitology and marine biology». In Practical Flow Cytometry, Shapiro H. M. Ed., John Wiley & Sons, New York, p. 412-425.
- SGHIR A., Gramet G., Suau A., Rochet V., Pochart P. et Dore J. 2000. «Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization». Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, p. 2263-2266.
- SGHIR A., Chow J. M. et Mackie R. I. 1998. «Continuous culture selection of bifidobacteria and lactobacilli from human faecal samples using fructooligosaccharide as selective substrate». Journal of Applied Microbiology, vol. 85, p. 769-777.
- SMITH H. W. et Crabb W. E. 1961. «The faecal bacterial flora of animals and man: its development in the young». The Journal of Pathology and Bacteriology, vol. 82, p. 53–66.
- SOLIS-PEREYRA B. et Lemonnier D. 1993. «Induction of human cytokines by bacteria used in dairy foods». Nutrition Research (New York, N.Y.), vol. 13, p. 1127-1140.
- SOZZI T., Brigidi P., Mignot O. et Matteuzzi D. 1990. «Use of dicloxacillin for the isolation and counting of Bifidobacteria from dairy products». Lait, vol. 70, p. 357–361.

SREEKUMAR O. et Hosono A. 2000. «Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and faecal enzymes of rats and the in vitro inhibition of *Escherichia coli* coculture». Journal of Dairy Science, vol. 83, p. 931- 939.

STACKEBRANDT E. et Rainey F. A. 1995. «Partial and complete 16S rDNA sequences, their use in generation of 16S phylogenetic trees and their implications in molecular ecological studies» In Akkermans D. L., van Elsas J. D. et de Bruijn F. J. (Eds) Molecular Microbial Ecology Manual, p. 1–17. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands

SUAU A., Bonnet R., Sutren M., Godon J. J., Gibson G. R., Collins M. D. et Dore J. 1999. «Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, p. 4799–4807.

SUMMANEN P., Baron E. J., Citron D. M., Strong C., Wexler H. M. et Finegold S. M. 1993. «Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual». Star Publishing Company, Belmont, USA.

SURAWICZ C. M., Elmer G. W., Speelman P., McFarland L. V., Chinn J. et van Belle G. 1989. «Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study». Gastroenterology, vol. 96, p. 981-988.

SYKES G. et Skinner F. A. 1973. «Techniques for the isolation and characterization of *Actinomyces* and *Bifidobacterium* species, report of a panel discussion». Society for Applied Bacteriology Symposium Series. No. 2. Academic Press, New York, p. 327-333.

TAHRI K., Grill J. P. et Schneider F. 1997. «Involvement of trihydroxyconjugated bile salts in cholesterol assimilation by bifidobacteria». Current Microbiology, vol. 34, p. 79-84.

TAKIGUCHI R., Miyamoto M., Ohe M., Toyoda S., Nakajima I. et Benno Y. 1996. «Effects of fermented milk administration on fecal microflora and putrefactive metabolites of healthy adults and healthy elderly persons». Bifidus - Flores, Fructus et Semina, vol. 9, p. 135- 140.

TAMIME A. Y., Marshall V. M. et Robinson R. K. 1995. «Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. The Journal of Dairy Research, vol. 62, p. 151-187.

TANAKA R., Takayama H., Morotomi M., Kuroshima T., Ueyama S., Matsumoto K., Kuroda A. et Mutai M. 1983. «Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on human fecal flora». Bifidobacteria Microflora, vol. 2, p. 17–24.

TANI K., Yamaguchi N. et Nasu M. 1997. «Rapid detection of specific microbial cells by fluorescent staining techniques». Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health, vol. 43, p. 145-154.

- TANNOCK G. W. 2001. «Molecular assessment of intestinal microflora». The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 7, p. 410S-414S.
- TANNOCK G. W. 1999. «Analysis of the intestinal microflora: a renaissance». Antonie Van Leeuwenhoek, vol. 76, p. 265–278.
- TANNOCK G. W. 1994. «The acquisition of the normal microflora of the gastrointestinal tract» In Gibson SAW, ed. Human Health: The Contribution of Microorganisms. London: Springer-Verlag, p. 1–16.
- TANNOCK G. W. 1988. «The normal microflora: new concepts in health promotion». Microbiological Sciences, vol. 5, p. 4-8.
- TANNOCK G. W. 1984. «Control of gastrointestinal pathogens by normal flora» In Klug MJ, Reddy CA, eds. Current perspectives in Microbial Ecology. Washington DC: American Society for Microbiology, p. 374-382.
- TANNOCK G. W. 1983. «Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of Tannock GW. Effect of dietary and environmental stress on the gastrointestinal tract» In Hentges DJ, ed. Human Intestinal Microflora in Health and Disease. New York: Academic Press, p. 517–539.
- TANNOCK G. W., Szylit O., Duval Y. et Raibaud P. 1982. «Colonization of tissue surfaces in the gastrointestinal tract of gnotobiotics animals by *Lactobacillus* strains». Canadian Journal of Microbiology, vol. 28, p. 1196-1198.
- TERAGUCHI S., Uehara M., Ogasa K. et Mitsuoka T. 1978. «Enumeration of bifidobacteria in dairy products (author's transl)». Nippon Saikingaku Zasshi, vol. 33, p. 753-761.
- TISSIER M. H. 1899. «La réaction chromophile d'Escherich et le Bacterium coli». Comptes Rendus de la Societe de Biologie, vol. 51, p. 645-943.
- THOMAS J.-C., Desrosiers M., St-Pierre Y., Lirette P., Bisailon J.-G., Beudet R. et Villemur R. 1997. «Quantitative flow cytometry detection of specific microorganisms in soil samples using rRNA targeted fluorescent probes and ethidium bromide». Cytometry, vol. 27, p. 224-232.
- THOREUX K. et Schmucker D. 2001. «Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats». The Journal of Nutrition, vol. 131, p. 807-812.
- VANDERHOOF J.A., Whitney D. B., Antonson D. L., Hanner T. L., Lupo J. V. et Young R. J. 1999. «*Lactobacillus GG* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children». The Journal of Pediatrics, vol. 135, p. 564-568.
- VAN DER WAAIJ L. A., Mesander G., Limburg P. C. et van der Waaij D. 1994. «Direct flow cytometry of anaerobic bacteria in human feces». Cytometry, vol. 16, p. 270-279.

- VENTURA M., Reniero R. et Zink R. 2001. «Specific identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by a combined multiplex-PCR approach». Applied and Environmental Microbiology, vol. 67, p. 2760-2765.
- VENTURI A., Gionchetti P., Rizzello F., Johansson R., Zucconi E., Brigidi P., Matteuzzi D. et Campieri M. 1999 «Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis». Alimentary Pharmacology & Therapeutics, vol. 13, p. 1103-1108.
- VERDÙ E. F., Bercik P., Cukrowska B., Farre-Castany M. A., Bouzourene H., Saraga E., Blum A. L., Corthesy-Theulaz I., Tlaskalova-Hogenova H. et Michetti P. 2000. «Oral administration of intestinal flora antigens consisting of anaerobes reduces the severity of experimental acute colitis in BALB/c mice». Clinical and Experimental Immunology, vol. 120, p. 46-50.
- VITINI E., Alvarez S., Median M., Medici M., Budeguer M. et Perdigon G. 2001 «Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria». Biocell, vol. 24, p. 223-232.
- VON HUNGER W. 1986. «Asculin-Cellobiose-Agar für die Keimzahlbestimmung von *Lactobacillus acidophilus*». Milchwissenschaft, vol. 41, p. 283-285.
- VON WRIGHT A. et Salminen S. 1999. «Probiotics: established effects and open questions». European Journal of Gastroenterology & Hepatology, vol. 11, p. 1195-1198.
- WAGNER M., Noguera D. R., Juretschko S., Rath G., Koops H.-P. et Schleifer K.-H. 1998. «Combining fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with cultivation and mathematical modeling to study population structure and function of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge». Water Science and Technology, vol. 37, p. 441-449.
- WALLNER G., Fuchs B., Spring S., Beisker W. et Amann R. 1997. «Flow sorting of microorganisms for molecular analysis». Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, p. 4223-4231.
- WANG R. F., Cao W. W. et Cerniglia C. E. 1996. «PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples». Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, p. 1242-1247.
- WELLING G. W., Elfferich P., Raangs G. C., Wildeboer-Veloo A. C., Jansen G. J., Degener J. E. 1997. «16S ribosomal RNA-targeted oligonucleotide probes for monitoring of intestinal tract bacteria». Scandinavian Journal of Gastroenterology Supplement, vol. 222, p. 17-19.
- WILSON K. H. et Blichington R. B. 1996. «Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis». Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, p. 2273-2278.

WOOD J. B. 1992. «The lactic acid bacteria in health and disease». Elsevier Applied Science, London, England.

YENTSCH C. M. et Yentsch C. S. 1984. «Emergence of Optical Instrumentation for Measuring Biological Properties». Oceanography and Marine Biology, an Annual Review, vol. 22, p. 55-98.

ZETTERSTRÖM R., Bennet R. et Nord K-E. 1994. «Early infant feeding and microecology of the gut». Acta Paediatrica Japonica, vol. 36, p. 562-571.

ZOETENDAL E. G., Ben-Amor K., Harmsen H. J., Schut F., Akkermans A. D., de Vos W. M. 2002. «Quantification of uncultured *Ruminococcus obeum*-like bacteria in human fecal samples by fluorescent *in situ* hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes». Applied and Environmental Microbiology, vol. 68, p. 4225-4232.

ZOETENDAL E. G., Akkermans A. D. L. et de Vos W. M. 1998. «Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, p. 3854–3859.

ZÚÑIGA M., Pardo I. et Ferrer S. 1993. «An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria». International Journal of Food Microbiology, vol. 18, p. 37-42.