

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

N°/SNV/2020

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Melle Mostefaoui Bakhta & Melle Mostefaoui Hadjira

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité: NUTRITION ET PATHOLOGIE

THÈME

*Essai de mise en évidence de l'effet des bactéries
probiotiques productrices de cobalamine sur la
démarche comportementale.*

Soutenu le 13/09/2020

DEVANT LE JURY

Président	Mme. Mokhtar Meriem	Maître de conférences A. Univ. Mosta.
Encadreur	Mme. Ziar H.	Maître de conférences A. Univ. Mosta.
Examineur	Mr. Zabouri Y.	Maître assistant A. Univ. Mosta.

Année universitaire :

2019/2020.

Résumé

Il est maintenant clairement établi que la vitamine B12 (cobalamine) joue un rôle important dans l'efficacité des fonctions cognitives. Pour comprendre comment le microbiote intestinal sain protège la carence en cobalamine dans le système nerveux central, nous proposons l'apport probiotique comme solution aux déficits neurologiques fonctionnels en rapport avec cette vitamine. Dans ce mémoire, nous avons continué l'identification des bactéries isolées par **Abbassa et Moussa (2018)** reconnues pour leur bonne production de cobalamine. L'identification portait sur le Gram et les caractères physico-chimiques, ainsi la fermentation des différents sucres permettant de cerner l'espèce bactérienne. L'étude *in vivo* (non réalisée) sur les souris (CD320 KO : génétiquement modifiées portant un déficit en gène codant le récepteur B12 ; comparées aux souches de souris sauvage) décrit les tests de Labyrinthe aquatique multi-T et de l'open field permettant de mettre en évidence le rôle neuro-fonctionnel de la vitamine B12. Nos résultats sur l'identification macroscopique indiquent que tous les isolats donnent des colonies rondes et blanchâtres avec un aspect lisse, leur taille est d'environ 1 à 2 mm de diamètre. Microscopiquement, le Gram est positif. Les isolats catalase et oxydases négatives ont été ensemencés sur les galeries Api 20A et le profil fermentaire examiné sur le site web Biomérieux a supposé l'appartenance des isolats de SL1 à SL10 à l'espèce *L. fermentum*, et les isolats SS1, SS2 et SS10 à l'espèce *L. brevis* en se basant sur le test de l'esculine. Dans l'étude *in vivo* conformément aux déficits comportementaux, le modèle knock-out montre une diminution de l'expression comportementale. Ses résultats ont montré que les souris KO (déficientes en B12 dans le cerveau) avaient une latence de sortie du labyrinthe plus longue comparées aux souris témoins WT. En utilisant un test de champs ouvert, **Mimoun (2017)** a montré que les souris KO présentaient essentiellement un niveau de stress plus faible puisqu'elles ont passé une partie significativement moins importante du temps à rester dans les zones non protégées par rapport aux souris témoins WT. L'étude du modèle CD320 KO pourrait permettre de mieux comprendre les effets de la carence en vitamine B12 observés chez l'homme. Un traitement palliatif basé sur l'apport probiotique pourrait probablement identifier des réponses potentielles aux différents troubles neurologiques associés.

Mots clés : Cobalamine, probiotique, isolats bactériens, identification, souris, comportement.

Abstract

It is now clearly established that vitamin B12 (cobalamin) plays an important role in the cognitive functions efficiency. To understand how the gut microbiota protects cobalamin deficiency in the central nervous system, we propose probiotic intake as a solution to neurological deficits related to this vitamin. In this work, we continued the identification of bacteria isolated by **Abbassa and Moussa (2018)** recognized for their good production of cobalamin. The identification focused on the Gram and the physicochemical characteristics, as well as the fermentation of the different sugars to identify the bacterial species. The *in vivo* study (not performed) on mice (CD320 KO: genetically modified carrying a gene deficiency encoding the B12 receptor; compared to strains of wild mice) describes the multi-T aquatic Labyrinthe and the open field tests highlighting the neuro-functional role of vitamin B12 . Our macroscopic identification results indicate that all isolates give round, whitish colonies with a smooth appearance, their size is approximately 1 to 2 mm in diameter. Microscopically, the Gram is positive. The catalase and negative oxidase isolates were inoculated on the Api 20A galleries and the fermentation profile examined on the Biomérieux website assumed that the isolates of SL1 to SL10 belonged to the species *L. fermentum*, and the isolates SS1, SS2 and SS10 to the species *L. brevis* based on the esculin test. In the *in vivo* study and in accordance with the behavioral deficits, the knockout model shows a decrease in behavioral expression. His results showed that KO mice (deficient in B12 in the brain) had a longer labyrinth exit latency compared to control WT mice. Using an open field test, **Mimoun (2017)** showed that KO mice essentially exhibited a lower stress level since they spent, significantly, a less time staying in unprotected areas compared to control WT mice. The study of the CD320 KO mouse model could provide a better understanding of the effects of vitamin B12 deficiency observed in humans. Palliative treatment based on probiotic intake could probably identify potential responses to various associated neurological disorders.

Keywords : Cobalamin, probiotic, bacterial isolates, identification, mouse, behavior.

Remerciements

Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail. Dieu merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Notre promotrice Dr. H. ZIAR (Maître de conférences A, univ. Mostaganem), nous ne pourrions jamais assez vous remercier pour tout le temps que vous nous aviez consacré, votre gentillesse, votre disponibilité et vos précieux conseils nous auront été d'une aide inestimable tout au long de la rédaction de ce projet. Veuillez accepter nos remerciements les plus sincères pour votre investissement dans un mémoire qui nous tenait particulièrement à cœur, et que vous avez personnellement inspiré.

Nous vous disons merci pour tous les moments que nous avons passé avec vous, ils sont gravés à jamais.

Nos plus vifs remerciements vont aussi aux membres du jury :

Dr. Mokhtar M. (Maître de conférences A, univ. Mostaganem), merci madame de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury, et un grand merci pour votre disponibilité.

Mr. Zabouri Y. (Maître assistant A, univ. Mostaganem), merci monsieur d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail et de contribuer à améliorer sa qualité.

On exprime aussi notre profonde reconnaissance à Mme Djahira pour son aide et les moyens humains et matériels qu'elle nous a apporté pour réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

❖ *Mes très chers parents pour l'amour, les sacrifices et les encouragements qu'ils m'ont donnés dans l'espoir de me voir réussir :*

ma chère mère AMINA DJELLALI

mon cher père MOSTEFAOUI AHMED

❖ *A mon petit frère ADAM et ma chère sœur HADJIRA.*

❖ *Ma promotrice : Madame H. ZIAR pour sa disponibilité et ses orientations, ses conseils et son aide durant toute la période du travail.*

❖ *Tous les amis : AMINA, ZINEB, MAMI, SOUHILA, SIHEM, ILHEMR, ROQAYAH.*

❖ *A mes tantes, mes oncles surtout : NOURA, MENAWER, HABIBE, KADER, IMENE.*

❖ *A mes Cousins AMEL ET ROUMAÏSSA.*

❖ *A mes amies de la spécialité master nutrition et pathologies ; avec qui j'ai partagées tous les moments et les souvenirs.*

❖ *Ainsi qu'à tous ceux que j'aime et qui m'aiment.*

Dédicace

Je tiens vivement à dédier ce modeste travail :

- ✓ *A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour ;*
- ✓ *A ceux qui m'ont aidé, encouragé et soutenu dans les moments*

Les plus difficiles et ceux à qui je dois tant :

Mes très chers parents AHMED et AMINA pour leur amour, tendresse et leur soutien continu ; qu'ils trouvent dans ce travail la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour.

- ✓ *A mon petit chère frère ADAM Mohamed amine, et ma sœur ROUMAISS .*

- ✓ *A tous mes amis, à mes copines BOUCHRA , ISMAHEL et HAFIDA.*

- ✓ *A toute mes amies de la spécialité master nutrition et pathologies.*

HADJIRA

Listes des tableaux et des figures

1. La liste des tableaux

Chapitre I : LES PROBIOTIQUES

Tableau 1 : Liste des principales souches microbiennes considérées comme probiotiques
Adapté de (**Holzappel et al. 2001**).....4

Tableau 2 : Critères de sélection des probiotiques destinés à l'Homme (**FAO/OMS, 2002**)
.....15

Tableau 3 : Exemples de souches probiotiques industrielles (**WGO, 2008**).....23

Chapitre II : VITAMINE B12 : ETHIOLOGIE ET ETUDE.

Tableau 4 : Apports nutritionnels journaliers conseillés pour la vitamine B12 ($\mu\text{g}/\text{jour}$)
(**AFSSA, 2001**).....26

Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 5 : Résumé de l'observation macroscopique des souches étudiées.....37

Tableau 6 : Résumé du test de croissance à différentes températures.....43

2. La liste des figures

Chapitre I : LES PROBIOTIQUES.

Figure 1 : Souche de bifidobactérie vue en microscopie électronique à balayage (**Rouvet, 2004**).....5

Figure 2 : Structure et conditions physicochimiques du tractus digestif (**Walter et Ley 2011**).....8

Figure 3 : Quantité et répartition des micro-organismes le long du tractus digestif (**Walter et Ley, 2011; Wilson, 2008**).....10

Figure 4 : Mécanismes d'action des probiotiques (**Kaur et al., 2002**).....17

Figure 5 : Chronologie de mise en place des bactéries chez l'humain (**Robin et Rouchy, 2011**).....21

Chapitre II : VITAMINE B12 : ETHIOLOGIE ET ETUDE.

Figure 6: Structure de la vitamine B12 (cobalamine). (**Brown, 2005**).....25

Chapitre III : MATERIELS ET METHODES

Figure 7 : Schéma d'une galerie Api 20A.....33

Figure 8 : Tableau de lecture tel qu'il est indiqué dans la fiche technique de l'Api 20A Biomérieux.....34

Figure 9 : Représentation schématique du Protocole expérimental à suivre.....35

Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Figure 10 : Observation macroscopique de la souche SL1 cultivée sur milieu MRS-cys...38

Figure 11: Observation macroscopique de la souche SS1 cultivée sur milieu MRS-cys....38

Figure 12 : Observation microscopiques (Objectif X100) des isolats lactiques après coloration de Gram.....40

Figure 13: Toutes les souches sont catalases négatives.....41

Figure 14: Résultat du test de nitrate réductase.42

Figure 15 : Résultats des profils obtenus après 24 h d'incubation, restant inchangés après 48 h de nos isolats bactériens sur Api 20A.44

Figure 16 : Principaux paramètres obtenus dans le test du labyrinthe aquatique pour les souris wild-type (WT) et knock-out CD320 (KO) (A, B) (**Quadros et al., 2010 ; Mimoun, 2017**).....46

Figure 17 : L'évaluation des indicateurs de stress. Le paramètre présence dans la zone la plus protégée (près des parois) du test de l'Open-field est présenté (panneau de gauche). Le nombre de fécès produits pendant les 5min du test est présenté (panneau du milieu) (**Mimoun, 2017**).....48

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ATP : Adénosine triphosphate.

B. : *Bifidobacterium*.

BL : bactéries lactiques.

CO₂ : Dioxyde de carbone.

En. : *Enterococcus*.

FAO : Food and Agriculture Organization.

GI : Gastro-Intestinal.

IF : facteur intrinsèque.

KCN : cyanure de potassium.

L : *Lactobacillus*.

mOsm/litre : milliosmoles par litre *13T*.

MRS : de Man-Rogosa et Sharp.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

SL : souche isolée du lait maternel.

sp : espèce indéterminée.

SS : souche isolée de selles de bébé.

UFC / ml : unité formant colonie par millilitre.

UFC : Unités Formant Colonie.

UNICEF : United Nations Children's Fund.

WGO : World Gastroenterology Organisation.

Sommaire

Résumé

Abstract

Remerciements

Dédicaces

La liste des tableaux et des figures

La liste des abréviations

Sommaire

Introduction1

Chapitre I : LES PROBIOTIQUES.

I.1. Historique et définition des probiotiques.....	3
I.2. Souches à fort potentiel probiotique.....	5
I.3. Les probiotiques et l'organisme humain.....	6
I.3.1. Le microbiote intestinal, un écosystème complexe.....	6
I.3.2. Organisation du tube digestif.....	7
I.3.3. Composition du microbiote.....	8
I.3.4. Microflore contaminant.....	11
I.3.4.1. Flore pathogène.....	11
I.3.4.2. Flore d'altération.....	11
I.3.5. Les facteurs influencent la microflore.....	12
I.4. Propriétés et Critères de sélection des souches probiotiques destinées à l'Homme.....	13
I.4.1. Les souches probiotiques utilisées en alimentation humaine et animal.....	16
I.4.2. Mécanisme d'action des lactobacilles probiotiques contre les germes pathogènes.....	16
I.5. Le lait source de probiotiques.....	18
I.5.1. Définition du lait.....	18
I.5.2. Caractères physico chimiques du lait.....	18
I.5.3. La valeur nutritive du lait.....	19
I.5.4. Microflore lactique du lait.....	19
I.6. La matière fécale source de probiotiques.....	22
I.7. Effets des probiotiques sur la santé	

Chapitre II : VITAMINE B12 : ETHIOLOGIE ET ETUDE.

II.1. Vitamine B12	24
II.1.1. Découverte de la vitamine B12.....	24
II.1.2. Structure de la vitamine B12.....	24
II.1.3. Sources alimentaires de vitamine B12.....	26
II.1.4. Les apports nutritionnels journaliers conseillés.....	26
II.1.5. Métabolisme de la vitamine B12.....	27
II.2. Etiologies de la carence en vitamine B12.....	27
II.2.1. Manifestations biologiques et cliniques du déficit en vit B12.....	28
a) Manifestations hématologiques.....	28
b) Signes neuropsychiatriques.....	28
II.3. La souris comme modèle génétique pour la carence en vitamine B12.....	29

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

III.1. Matériels	
III.1.1. Souches utilisées	30
III.1.2. Les milieux de culture utilisés	30
III.2. Méthodes	30
III.2.1. IN VITRO	30
1- Réactivation des souches bactérienne	31
2- Préparation de l'inoculum	31
3- Pré-Identification des bactéries lactiques	31
- Aspect macroscopiques des colonies	31
- Aspect microscopique des bactéries (coloration de Gram)	31
4- Caractères physico-chimiques	32
- Test de catalase	32
- Test oxydase	32
- Nitrate réductase	32
- Test de croissance à différentes températures (Larpen, 1996)	32
5- Etude du profil fermentaire	32
- Identification par la galerie Api 20 A	33
- Préparation des galeries Api 20 A	33
III.2.2. IN VIVO	33
1- Analyses comportementales	34
- LABYRINTHE AQUATIQUE MULTI-T	36
- LE TEST DE L'OPEN FIELD (L'ESPACE OUVERT)	36

CHAPITRE IV: RESULTATS ET DISCUSSION.

IV.1. Résultats d'identification des isolats	37
IV.1.1. Pré-identification des souches	37
- Caractères macroscopiques	37
- Caractères microscopiques	39
- Lecture de test coloration de Gram	40
- Lecture de test catalase	40
- Lecture de test oxydase	40
- Lecture de test Nitrate réductase	41
- Lecture de test Croissance à différentes températures	42
IV.1.2. Résultats de l'identification par les galeries Api 20A	43
IV.2. Résultats de la démarche comportementale des souris	44
Conclusion	49

Les références bibliographiques

Introduction

INTRODUCTION

L'Homme vit continuellement avec une population de microorganismes complexe et diversifiée habitant son tractus gastro-intestinal (GI) appelée microbiote. L'un des principaux effets bénéfiques de cette alliance est la protection et l'amélioration de la résistance aux maladies infectieuses de l'organisme hôte (**Hsieh et Versalovic, 2008**).

À la naissance, l'ensemble du tractus GI est stérile, mais il est rapidement colonisé par les bactéries apportées par la première alimentation. Après l'enfance, la composition de la microflore intestinale reste relativement constante jusqu'à la mort (**Quigely, 2011**).

Les lactobacilles sont des bactéries lactiques (BL) qui produisent par fermentation de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme énergétique. Ils sont représentatifs du microbiote intestinal bénéfique de l'Homme et par conséquent sont les microorganismes les plus en vue en tant que probiotiques (**Watson et al., 2008**).

Les probiotiques sont définis comme « des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantités adéquates, confèrent des effets bénéfiques pour l'hôte » (**FAO/OMS, 2001**).

Plusieurs allégations santé sont attribuées aux probiotiques. Parmi les effets bénéfiques, les mieux documentés des probiotiques, figurent leur rôle positif dans la prévention et/ou le traitement des diarrhées infectieuses. Plusieurs études cliniques ont démontré l'efficacité des probiotiques, en particulier les souches de lactobacilles dans les diarrhées infantiles d'origine microbienne (**Preidis et al., 2011**). Plus récemment, des études ont suggéré qu'en plus de ses fonctions métaboliques et immunitaires, le microbiote intestinal prendrait également part à la communication entre l'intestin et le cerveau et influencerait le fonctionnement cérébral. Et aujourd'hui, les chercheurs se penchent sur les liens possibles entre un déséquilibre du microbiote intestinal et certains troubles psychiques : stress, dépression mais aussi maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer...) (**Scheperjans et al., 2015**).

Le développement normal du cerveau nécessite la disponibilité de certains nutriments importants tels que les vitamines B9 et B12. Ces vitamines jouent un rôle dans la production de produits chimiques du cerveau qui affectent l'humeur et d'autres fonctions cérébrales. Par conséquent, de faibles niveaux de B12 et d'autres vitamines B telles que la vitamine B6 et l'acide folique peuvent affecter négativement la fonction cérébrale (**de Jager, 2014**). La carence en

donneur de méthyle a un impact sur le cerveau ainsi que sur le métabolisme révélé par les marqueurs du foie et du cœur (**Obeid, 2013**). Les données antérieures sur le fonctionnement du cerveau ont été attestées par des modifications comportementales (**Blaise et al., 2007**). Ainsi, afin d'étudier davantage les mécanismes pathophysiologiques liés à une carence en vitamine B12, dans ce mémoire, nous tentons à mettre en clair pour la première fois ; le rôle de la vitamine B12 produite par les bactéries probiotiques dans le bon fonctionnement comportemental médiatisé par le cerveau. Pour cela, des souches bactériennes productrices de cobalamine *in vitro*, préalablement isolées (**Abbassa et Moussa, 2018**) ont fait l'objet de notre démarche expérimentale.

Le travail a été suspendu au niveau de sa partie *in vivo* suite à la pandémie mondiale.

Chapitre I:

Les

Probiotiques.

CHAPITRE I: LES PROBIOTIQUES.

I.1. Historique et définition des probiotiques

Il y a un siècle, Elie Metchnikoff (microbiologiste russe, élève de Louis Pasteur et lauréat du prix Nobel) émit l'hypothèse que la bonne santé et la longévité de certaines populations de l'Europe de l'est seraient dues à leur consommation quotidienne de laits fermentés (Sanders, 2000). Il suggéra que "l'auto-intoxication intestinale" et que le vieillissement en résultant pouvait être supprimé en modifiant la flore microbienne de l'intestin et en remplaçant des microbes protéolytiques qui produisent des substances toxiques comme les phénols, les indoles et l'ammonium à partir des protéines de la digestion par des microbes utiles. Il développa un régime alimentaire avec du lait fermenté par une bactérie appelée "Bacille bulgare" (WGO, 2008).

Entretemps, plusieurs travaux se sont développés selon le concept que l'ingestion de microorganismes peut améliorer la santé de l'hôte. Ce fut Parker qui proposa pour la première fois en 1974 le terme « probiotique » qui signifie pour la vie afin de désigner les microorganismes et substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la microflore intestinale (Vasiljevic et Shah, 2008). Plus tard, Fuller (1991) a redéfini les probiotiques de la façon suivante:

« préparations microbiennes vivantes, utilisées comme additif alimentaire, ayant une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale ». Depuis, plusieurs définitions des probiotiques ont succédé sur la base des nouvelles connaissances de leurs modes d'actions et de leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. Actuellement, la définition la plus utilisée est celle proposée par Salminen et al. (1998). Elle a été validée par le groupe de travail conjoint mandaté par l'Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation (FAO) et par l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS). Ce groupe d'experts internationaux définit les probiotiques comme étant « des microorganismes vivants qui, administrés en quantités adéquates, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte » (FAO/OMS, 2001). Les principaux microorganismes probiotiques connus à ce jour sont des bactéries (lactobacilles, bifidobactéries, propionibactéries, *Escherichia coli* et entérocoques) et des levures (*Saccharomyces boulardii*) (Ouwehand et al., 2002).

Tableau 1 : Liste des principales souches microbiennes considérées comme probiotiquesAdapté de **Holzappel et al. (2001)**.

Lactobacilles	Bifidobactéries	Autres bactéries Lactiques	Autres micro- organismes non lactiques
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>E. coli</i> ('Nissle 1917')
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>faecium</i>	
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. breve</i>	<i>thermophilus</i>	<i>boulardii</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. infantis</i>		<i>Saccharomyces</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. lactis</i>		<i>cerevisiae</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

I.2. Souches à fort potentiel probiotique

Les principales souches reconnues en tant que probiotiques chez l'humain sont des bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* et des levures du genre *Saccharomyces*. Les espèces associées à chacun de ces groupes sont présentées au Tableau 1.

Parmi ces micro-organismes, les bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont les plus fréquemment utilisées avec le plus d'applications connues à ce jour chez l'humain. À titre d'exemples, les souches commerciales de lactobacilles ayant des propriétés fonctionnelles et des effets cliniques documentés incluent *L. rhamnosus* GG, *L. casei* DN-114 001, *L. casei* Shirota et *L. reuteri* comparativement aux bifidobactéries dont la principale souche, *B. lactis* Bb12, fait l'objet de plusieurs études (Pedone et al., 2000; Alvarez-Olmos et Oberhelman, 2001; Chouraqui et al., 2004). Néanmoins, le rôle non-négligeable de certaines autres souches de bifidobactéries dans la résistance de l'hôte aux infections a été récemment décrit dans la littérature (Leahy et al., 2005; Picard et al., 2005)

Les bifidobactéries sont des bâtonnets de morphologies variables dont la plus caractéristique est une forme en Y (Figure 1). Ce sont des bactéries à Gram-positif, non mobiles, catalases négatives et anaérobies strictes. Leurs conditions optimales de croissance se situent à des températures entre 37 et 41°C et à des pH compris entre 6,5 et 7,0. Les bifidobactéries sont hétérofermentaires et dégradent les hexoses en produisant de l'acide lactique et acétique dans un ratio molaire de 2:3 (Scardovi, 1986).

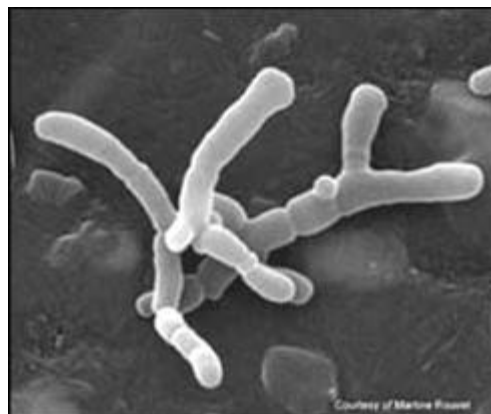


Figure 1: Souche de bifidobactérie vue en microscopie électronique à balayage (Rouvet, 2004).

Une approche multiphasique est souvent utilisée pour identifier des bifidobactéries. Cette approche comprend la présence d'une activité fructose-6-phosphoketolase (F6PPK), une enzyme clé du genre *Bifidobacterium* (Ventura et al., 2004). Elle fait également appel à l'identification par des techniques moléculaires via l'utilisation de sondes spécifiques à la région 16S ARNr de l'ADN du genre *Bifidobacterium* (Kaufmann et al., 1997; Ward et Roy, 2005). Pour l'identification de l'espèce, la technique d'homologie ADN-ADN demeure la méthode la plus fiable (Biavati et al., 2000).

I.3. Les probiotiques et l'organisme humain

I.3.1. Le microbiote intestinal, un écosystème complexe

Le tractus gastro-intestinal humain est un environnement riche au sein duquel 100 mille milliards de microbes (10¹⁴) cohabitent. La grande majorité de ces organismes se retrouve au niveau du colon (10¹¹-10¹²/mL), soit la plus grande concentration connue de microbes dans un écosystème (Ley et al., 2006a; Whitman et al., 1998). Ils contribuent à l'extraction de l'énergie des aliments ou au maintien de l'homéostasie intestinale. Par son rôle et sa complexité, ce microbiote est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière (Backhed et al., 2005; Zocco et al., 2007). Ainsi, une modification de profil du microbiote est souvent associée à des pathologies intestinales ou à l'obésité (Ley et al., 2006b). A l'heure actuelle, environ 80% des espèces bactériennes du colon ne sont pas cultivables en routine par les méthodes de microbiologie conventionnelle (Blaut et al., 2002; Charalampopoulos et Rastall, 2009; Duncan et al., 2007). Les estimations sur le nombre de micro-organismes varient entre 500 et 1000 espèces différentes, soit plus de 7000 souches dont la grande majorité fait partie des phylums des Firmicutes et des Bactéroïdes et environ 2000 gènes distincts (Charalampopoulos et Rastall, 2009; Hooper et Gordon 2001; Ley et al., 2006a). A l'origine, le tube digestif de l'enfant est stérile *in utero*. Les premières colonisations se font principalement par l'intermédiaire de la flore vaginale, intestinale et cutanée de la mère lors de l'accouchement (O'Hara et Shanahan, 2006). Il semble également que les conditions d'hygiène, différentes entre pays nordiques et méditerranéens par exemple, soient à l'origine de colonisations diverses (Adlerberth et Wold 2009; Lindberg et al., 2004). Avec les années, l'évolution de la composition du microbiote va être soumise à des facteurs génétiques (Zoetendal et al., 2001), environnementaux et alimentaires (Ley et al., 2006a; Turnbaugh et al., 2008; Turnbaugh et al., 2007). Par exemple, il a été observé sur des populations japonaises que leur flore intestinale a acquis de nouvelles capacités enzymatiques en intégrant un gène provenant de bactéries allochtones (Hehemann et al., 2010). De façon globale, trois

entérotypes différents sont identifiables chez l'homme, les « Bactéroides majoritaires », les « *Ruminococcus* majoritaires » et les « *Prevotella* majoritaires » (Arumugam et al., 2011; Wu et al., 2011). Cependant, malgré la présence d'espèces et de souches différentes, le microbiome inter-individu apparaît largement équivalent en terme de fonctionnalité (Qin et al., 2010; Turnbaugh et Gordon, 2009; Walter et Ley, 2011). L'organisation exacte de ce microbiote est encore majoritairement inconnue mais les études récentes montrent que la communauté microbienne intestinale se structure (Macfarlane et Dillon, 2007) et communique (Hughes et al., 2010). Enfin, chez l'individu sain, la composition de la flore intestinale est très stable au cours du temps même si des variations ponctuelles peuvent être observées (prise d'antibiotiques, hygiène, stress, changement de régime alimentaire...) (Sonnenburg et al., 2004; Walter, 2008).

I.3.2. Organisation du tube digestif

Le système digestif est divisé en sections distinctes, comportant chacune une flore microbienne spécifiquement adaptée aux conditions physico-chimiques.

Ainsi, le tube digestif est composé de la cavité buccale, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), du gros intestin (côlon ascendant, côlon transversal et côlon descendant) puis du rectum et de l'anus (Figure 2).

Le premier compartiment, l'estomac, est un réservoir (~1,3 L) dans lequel le chyme alimentaire est brassé et imprégné par les sucs gastriques. Le jus stomacal est constitué de mucus, de pepsinogène (converti en pepsine), d'acide chlorhydrique, de facteur intrinsèque et de gastrine (Wilson, 2008). Le chyme passe ensuite dans l'intestin grêle. Ce dernier mesure entre 4 et 7 mètres chez l'homme et comprend le duodénum (~0,25 m), le jéjunum (~2,5 m) et l'iléon (~3,5 m). Les parois mesurent 20 µm d'épaisseur (Ismail et Hooper, 2005) et sont recouvertes de villosités et de microvillosités formant une bordure en brosse. Les sécrétions intestinales maintiennent un pH légèrement basique ($7 < \text{pH} < 8$) et la quantité d'oxygène diminue. C'est au niveau de l'intestin grêle que les composés alimentaires sont dégradés en sucres simples, acides aminés et acides gras qui vont être absorbés. Les sels biliaires, le suc pancréatique et les enzymes (protéases, lipases et amylases) permettent la digestion du chyme alors que les composés non digérés (fibres, amidon résistant, quelques peptides et lipides) passent dans le gros intestin (Walter et Ley 2011). L'iléon comporte, dans sa partie distale, des agrégats de follicules lymphoïdes appelés « plaques de Peyer ». Ces follicules sont composés de cellules particulières qui échantillonnent le contenu luminal, les « cellules M »,

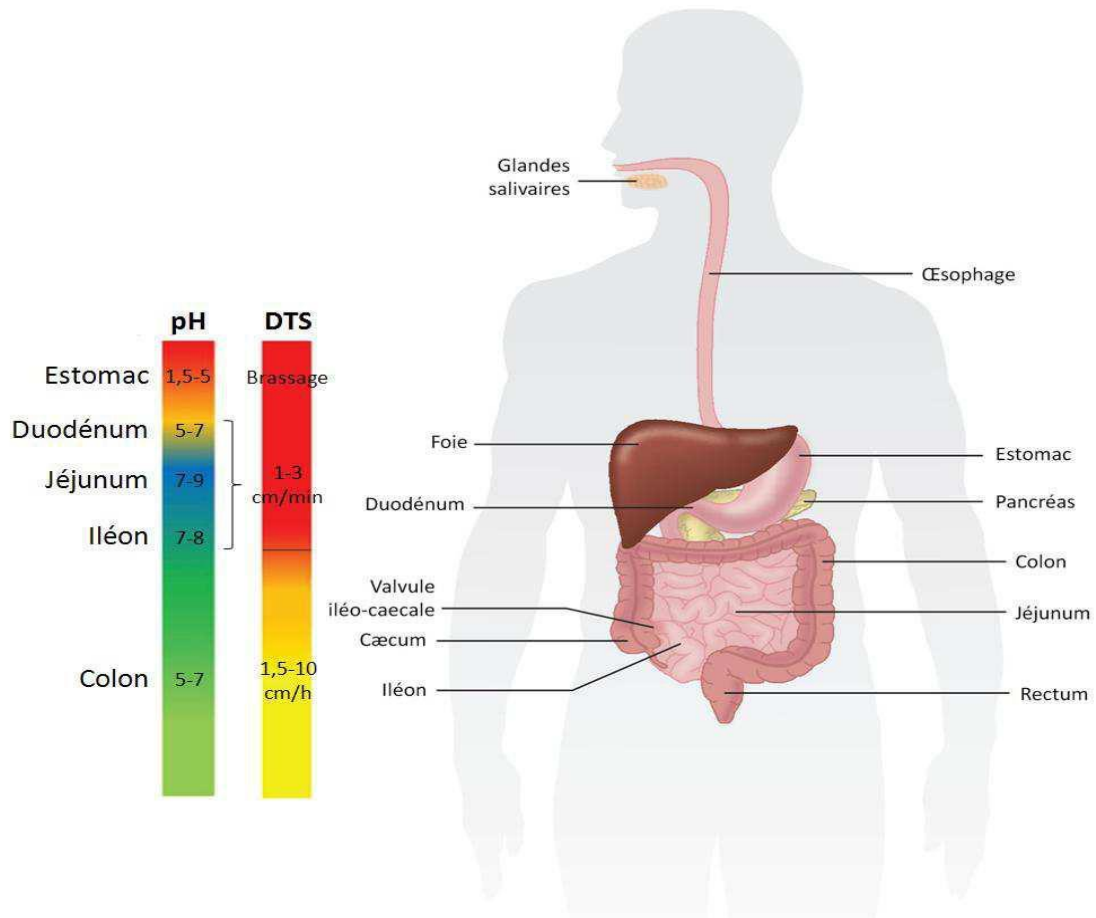


Figure 2: Structure et conditions physicochimiques du tractus digestif (Walter et Ley 2011).

et représentent l'un des sites d'induction de la réponse immunitaire de l'intestin (GALT) (**Walter et Ley 2011**).

Les valeurs indiquées de pH et de distribution de temps de séjour (DTS) représentent des valeurs moyennes par section.

Enfin, le gros intestin est beaucoup plus court que le grêle (~1,5 m) mais le temps de transit y est largement supérieur (**Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007**). Il comprend le cæcum, le colon (ascendant, transverse, descendant et enfin, sigmoïde). Le pH est légèrement acide dans la partie proximale du gros intestin et augmente progressivement jusqu'à la neutralité, le Péristaltisme ralentit et le potentiel d'oxydoréduction diminue fortement. De plus, la forte concentration de micro-organismes entraîne la production de gaz (H₂, CO₂, H₂S, CH₄). Le colon ascendant peut être assimilé à un fermenteur semi-continu et le colon descendant à un système batch (**Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007**). A la différence de l'intestin grêle, le colon ne contient pas de villosités mais un épithélium de surface.

I.3.3. Composition du microbiote

Les régions distinctes du tube digestif créent des habitats uniques au sein desquels les espèces autochtones occupent des niches écologiques et forment des populations stables dans le temps (**Savage, 1977; Walter et Ley, 2011**). Chaque jour, environ 10¹⁰ micro-organismes transitent par l'estomac et se retrouvent dans un environnement hostile (acidité, O₂...), en présence de souches acidotolérantes. La quantité de bactéries résidentes de l'estomac est d'environ 10²-10³ par mL (Figure 3), dont 50 % font partie du phylum des Proteobacteria (surtout des Enterobacter et *Helicobacter pylori*) (**Wilson, 2008**). On retrouve également des levures du genre Candida. Dans l'intestin grêle, la densité cellulaire passe de 10³-10⁴ cellules/mL au niveau du duodénum à 10⁸ cellules/mL dans l'iléon (**Walter et Ley, 2011**). Ce sont surtout des Firmicutes. Malgré la présence de composés antimicrobiens (sécrétions biliaires et pancréatiques) la quantité de micro-organisme est multipliée par un chiffre compris entre 10 000 et 100 000 entre le duodénum et l'iléon.

Au niveau du gros intestin, la quantité de micro-organismes croît fortement (**Wilson, 2008**), allant jusqu'à représenter 50 % du volume du contenu (**Cummings, 1998**). Parmi les 10¹³-10¹⁴ micro-organismes présents, la grande majorité sont des bactéries anaérobies strictes

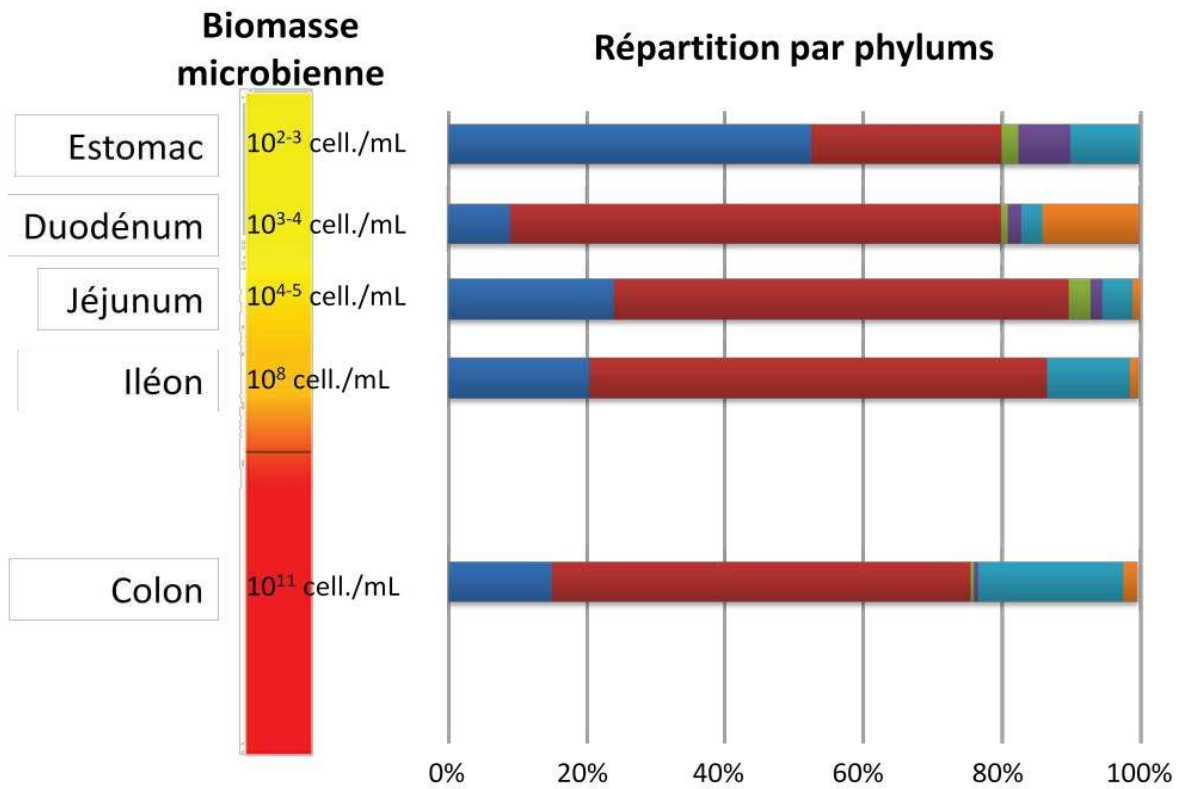


Figure 3: Quantité et répartition des micro-organismes le long du tractus digestif (Walter et Ley, 2011; Wilson, 2008).

Proteobacteria (■), Firmicutes (■), Fusobacteria (■), Actinobacteria (■), Bacteroidetes (■), Autres (■)

du phylum des Firmicutes, des Bacteroidetes (*Bacteroides* sp, *Clostridium* sp) ou des Actinobacteria (*Bifidobacterium* sp, *Atopobium* sp) même si des bactéries anaérobies facultatives sont également présentes (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*). On note la présence de Proteobacteria (*Escherichia coli*). Enfin, en dehors de cette flore majoritaire, on retrouve également, en quantité moindre, des archées, des protozoaires et des champignons (Walter et Ley, 2011).

I.3.4. Microflore contaminant

Elle est composée de la flore pathogène et de la flore d'altération.

I.3.4.1. Flore pathogène

Elle fait partie de la flore contaminant du lait. Les bactéries pathogènes pour l'homme peuvent être présentes dans le lait cru, ou dans les produits laitiers qui en dérivent. Elles sont capables de provoquer des malaises chez les personnes qui consomment ces produits. Les bactéries les plus importantes de cette flore pathogène sont le plus souvent mésophiles et les principaux microorganismes pathogènes associés aux produits laitiers sont : *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella sonnei* et certaines moisissures (Vignola, 2002).

I.3.4.2. Flore d'altération

Incluse dans la flore contaminant, la flore d'altération causera des défauts sensoriels de goût, d'arômes, d'apparence ou de texture et réduira durée de vie du produit laitier. Parfois, certains microorganismes nuisibles peuvent aussi être pathogènes. L'un n'exclut pas l'autre. Les principaux genres identifiés comme flore d'altération sont : *Pseudomonas* sp, *Proteus* sp, les coliformes soit principalement les genres : *Escherichia* et *Enterobacter*, les sporulées telles que *Bacillus* sp, *Clostridium* sp et certaines levures et moisissures (Vignola, 2002 et Richard, 1990).

L'hôte joue un rôle et on conçoit un dialogue entre l'épithélium intestinal et la microflore (Gordon et al., 1992). La distribution des espèces bactériennes de cette microflore diffère dans les compartiments du tube digestif. Une population moins dense est observée dans l'estomac et le duodénum en raison des conditions acides, alors qu'une population plus

diversifiée et plus dense est observée dans le jéjunum et l'iléum. Le côlon est la partie la plus colonisée du tractus digestif (**Salminen et al., 1998**).

Après une colonisation complète, la microflore intestinale est considérée comme un organe acquis après la naissance. Il est constitué d'une grande diversité d'espèces microbiennes assurant différentes fonctions pour l'hôte. La microflore du tractus gastro-intestinal a été estimée à près de 10^{13} à 10^{14} cellules microbiennes représentant 400 à 600 espèces et sous espèces (**Bäckhed et al., 2004**). C'est au niveau du côlon que la population est la plus abondante, avec environ 10^{11} bactéries/g de contenu, constitué de façon dominante de genres anaérobies stricts. Les fonctions de la flore sont multiples. Une des fonctions majeures est son rôle métabolique par la fermentation au niveau colique des substrats d'origine endogène ou exogène et non absorbés dans l'intestin grêle (**Bernalier et al., 2004**).

Cette microflore représente environ 10 fois le nombre total de cellules du corps humain. La prévalence des bactéries dans le tractus gastro-intestinal dépend des conditions régnant dans le compartiment du tractus. Deux catégories de bactéries ont été identifiées : les bactéries autochtones ou indigènes se trouvant dans des niches particulières, et les bactéries allochtones ou transitoires (comme les probiotiques) rencontrées dans d'autres habitats du tractus après une colonisation complète.

A côté de ce rôle métabolique, la microflore intestinale joue un rôle majeur dans la résistance à la colonisation des bactéries exogènes qu'elles soient à potentialité pathogène ou non. Cette fonction de barrière est essentielle car elle maintient un équilibre relativement stable dans la microflore du tube digestif (**Moreau et al., 2004 ; Forchielli et al., 2005**).

La microflore joue aussi un rôle de protection contre les bactéries potentiellement pathogènes par un effet barrière, en empêchant leur passage dans la circulation sanguine, en inhibant leur prolifération (production de substance antimicrobiennes) et en empêchant leur implantation dans le tractus digestif (compétition pour les nutriments et les sites d'adhésion) (**Liévin et Servin, 2006**). C'est parmi cette flore bénéfique autochtone de sujets sains que nous pouvons isoler des souches bactériennes potentiellement probiotiques adaptées aux conditions gastro-intestinales et qui se trouvent dans la matière fécale (**Vaughanet al., 1999 ; FAO/OMS, 2002**).

I.3.5. Les facteurs influencent la microflore

Facteurs influençant la cinétique cette d'implantation de la fore digestive du nouveau-né. De nombreux éléments vont influencé cette cinétique d'implantation et la composition de la flore intestinale du nouveau-né parmi lesquels le monde d'accouchement l'environnement, le types d'alimentation, l'âge gestationnel et l'antibiothérapie (**Mailys et al., 2010**).

A la naissance, le tube digestif du nouveau-né est stérile, c'est-à-dire dépourvu de bactérie. La formation de cet écosystème débute rapidement dès la rupture des membranes fœtales et se poursuit pendant plusieurs mois. En effet, en l'absence d'un système immunitaire mature, le tube digestif du nouveau-né est particulièrement permissif. La symbiose "hôte-microbiote" se met en place progressivement principalement par contact avec la communauté microbienne provenant de la mère (flores vaginale, fécale, buccale) et de l'environnement (bactéries véhiculées par le personnel soignant, l'entourage, etc...) (**Gras et al., 2011**).

Le nouveau-né, stérile in utéro, est rapidement colonisé dès sa naissance. Cette toute nouvelle flore est constituée de bactéries provenant de la flore fécale de la mère, principalement des entérobactéries et des *bifidobactéries* ; et de la flore vaginale de la mère, principalement des lactobacilles (accouchement par voie basse) ; et/ou de la flore provenant de l'environnement proche incluant l'air et le personnel soignant (accouchement par césarienne) (**Campeotto et al., 2007 ; Grosdidier, 2010**).

Même si les facteurs bactériens, permettant l'implantation d'une souche donnée au niveau de la flore, sont encore peu connus, la colonisation suit néanmoins un schéma relativement organisé sous la dépendance de facteurs endogènes et exogènes qui vont influencer la composition de ce microbiote (**Doré et al., 2010**).

I.4. Propriétés et Critères de sélection des souches probiotiques destinées à l'Homme

Les propriétés des probiotiques varient selon l'espèce et la souche microbienne. Les souches probiotiques destinées pour l'alimentation humaine doivent avoir:

- une origine humaine ou animale,
- une bonne résistance à l'acidité gastrique et aux els biliaires,
- une bonne adhérence au mucus et aux cellules épithéliales,

- une non toxicité,
- une activité antimicrobienne contre les bactéries potentiellement pathogènes,
- de bonnes propriétés technologiques et des effets bénéfiques sur la santé **(Ouwehand et al. 1999 ; Ishibashi et Yamazaki, 2001).**

Pour exercer leur effet bénéfique sur la santé, les probiotiques doivent survivre en grand nombre durant le traitement technologique lors de la fabrication, à la lyophilisation éventuelle, à l'entreposage et au stockage. Il est en effet généralement admis qu'un nombre minimal de 10^7 cellules viables par gramme de produit est nécessaires pour exercer un effet probiotique **(Ishibashi et Shimamura, 1993).**

Cependant, la stabilité physique et génétique des cellules ainsi que toutes les propriétés nécessaires pour exercer leurs bienfaits sur la santé doit également être assurée (résistance aux phages). De plus, ces souches devraient être viables sans se multiplier pour ne pas provoquer d'effet indésirable sur le goût ou l'arôme du produit ni augmenter l'acidité **(Mattila-Sandholm et al., 2002).**

Toutefois, certains de ces critères sont maintenant remis en question, comme la notion de viabilité, des études ont démontré que même des chéssou non viables sont capables d'exercer certains effets positifs sur la santé **(Apostolou et al., 2001b; Melmed et al., 2003).**

Pour être sélectionnées en tant que probiotiques chez l'Homme, les souches microbiennes doivent posséder certaines propriétés fonctionnelles, sécuritaires et technologiques **(FAO/OMS, 2002 ; Tannock, 2003 ; WGO, 2008 ; Vasiljevic et Shah, 2008).**

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

Tableau 2 : Critères de sélection des probiotiques destinés à l'Homme (FAO/OMS, 2002).

<p>CRITERES FONCTIONNELS</p>	<ul style="list-style-type: none"> - tolérance à l'acidité et aux enzymes gastriques. - tolérance à la bile et aux enzymes digestives. - adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus gastrointestinal. - production de substances antimicrobiennes et antagonisme vis-à-vis des pathogènes. - effets sur la santé documentés.
<p>CRITERES DE SECURITE</p>	<ul style="list-style-type: none"> - souche pour l'usage humain d'origine humaine (isolée du tractus intestinal d'un Homme sain) ou alimentaire (utilisée dans les produits fermentés). - souche déposée dans une collection de cultures reconnue internationalement. - souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques. - historique de non pathogénicité. - pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques.
<p>CRITERES TECHNOLOGIQUES</p>	<ul style="list-style-type: none"> - stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini. - conservation des propriétés probiotiques après production.

I.4.1. Les souches probiotiques utilisées en alimentation humaine et animal

Les souches ou espèces probiotiques sont des composants normaux de la flore Intestinale (Dunne et al., 2001). En alimentation humaine, les genres microbiens les plus utilisés comme probiotiques sont *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* (Berg, 1998). Par contre, en alimentation animale de nombreux genres bactériens et fongiques sont utilisés, comme : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* et *Torulopsis* (Tannock, 1997).

En général, les souches probiotiques sont sélectionnées prioritairement pour leurs effets bénéfiques et leur sécurité d'utilisation (innocuité). Cependant, l'aptitude des souches bactériennes à stimuler la fonction immunitaire est très variable, seulement certaines souches sont reconnues capables d'exercer des effets immunomodulateurs sur l'organisme-hôte (Gill et al., 2000 et Amroche, 2005).

Il est à noter que les bactéries du genre *Bifidobacterium* sont de plus en plus utilisées dans les produits probiotiques à cause des nombreux effets bénéfiques sur la santé associés à leur consommation (Kimura et al., 1998). Pour obtenir certains effets positifs sur la santé (réduction des infections intestinales, digestion du lactose, réduction du cholestérol...), une souche probiotique doit atteindre le gros intestin à une concentration d'environ 10^7 cellules viables/gramme (Stanton et al., 2001). De ce fait, la concentration d'un probiotique dans un aliment doit tenir compte de cette contrainte pour permettre d'atteindre les concentrations ciblées dans le colon. Cette concentration dépend évidemment de la nature de l'aliment utilisé et de la quantité journalière consommée.

I.4.2. Mécanisme d'action des lactobacilles probiotiques contre les germes pathogènes

Des mécanismes basés sur des études *in vivo* et *in vitro* ont été proposés pour expliquer les modes d'action majeurs associés aux probiotiques, entre autres les lactobacilles, pour prévenir la colonisation et la croissance des germes pathogènes (Kaur et al., 2002) (Figure 4).

Les mécanismes d'action des lactobacilles probiotiques se résument comme suit : stabilisation de la flore intestinale par compétition avec des bactéries pathogènes au niveau de la fixation aux récepteurs (adhésion),

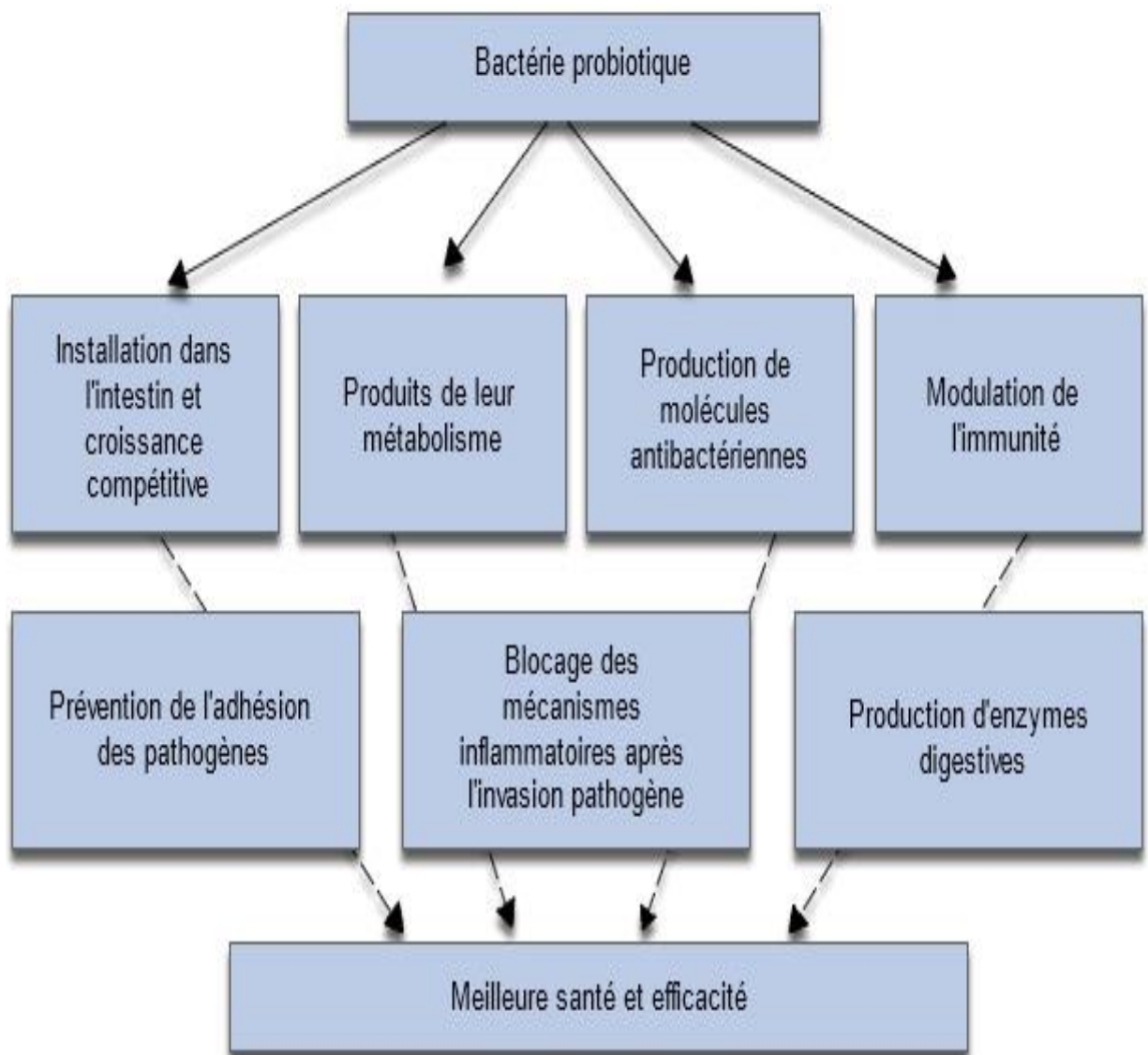


Figure 4 : Mécanismes d'action des probiotiques (Kaur et al., 2002).

- inhibition des germes pathogènes ou indésirables par production de métabolites tels que les acides organiques (diminution de pH), peroxyde d'hydrogène et production de substances antibactériennes comme les bactériocines,
- stimulation du système immunitaire intestinale de l'hôte,
- neutralisation de produits toxiques (ammoniac, amines et indoles) et diminution des biotransformations des sels biliaires et des acides gras en substances toxiques (**Matilla-Sandholm et al., 2002; Isalouri et al., 2004 ; Patel et Lin, 2010 ; Quigley, 2011**).

I.5. Le lait source de probiotiques

I.5.1. Définition du lait

Le lait a été défini en **1908**, au cours du **Congrès International de la Répression des Fraudes** à Genève comme étant : « Le produit intégral de la traite et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum » (**Alais, 1975**).

L'allaitement maternel a constitué depuis toujours le mode alimentaire naturel et, jusqu'à récemment, quasi exclusif des nouveau-nés et nourrissons. Avec le **XXe** siècle, l'alimentation artificielle, basée essentiellement mais non exclusivement sur l'emploi du lait de vache, a pris un réel essor dans les pays industrialisés où ce changement de comportement a répondu à un besoin social (**Vis et Hennart, 1978**).

Le lait maternel, ce n'est pas qu'un aliment. Ce n'est pas que l'addition de lipides, de glucides, de protides, de vitamines, d'oligo-éléments destinés à faire grandir et grossir les petits humains, mais il est parfaitement adaptés à leur métabolisme. Le lait maternel, c'est aussi plein de facteurs de protection : anticorps, lactoferrine, lysozyme, caséine, fibronectine, protectine, protéines du complément, lymphocytes, cytokines, enzymes comme la catalase, oligosaccharides, etc. (**Cleary, 2004**).

I.5.2. Caractères physico chimiques du lait

Le lait est un liquide opaque blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur de la matière grasse en bêta carotène (**Bourgeois et al., 1996**).

Le lait humain contient environ 87 pourcent d'eau et son osmolarité, voisine de 290 mOsm/litre, est proche de celle du plasma (de 250 à 290 mOsm/litre). La densité spécifique

du lait maternel varie de 1,026 à 1,037 et le poids des matières sèches varie de 100 à 175 g/litre. Plus de la moitié de cette masse est constituée de lactose (de 70 à 80 g/litre), un quart environ de lipides (de 35 à 40 g/litre) et une part bien moindre de protéines (1 g/litre environ) et de minéraux (2 g/litre).

I.5.3. La valeur nutritive du lait

Le lait un substrat très fournissant à l'homme et aux jeunes mammifères un aliment presque complet, protides, glucides, lipides, sels minéraux et vitamines sont présents à des concentrations tout à fait satisfaisantes pour la croissance et la multiplication cellulaire (**Bourgeois et al., 1996**).

I.5.4. Microflore lactique du lait

Les chercheurs ont mené des analyses génétiques auprès de sept mamans et leur bébé. Ils ont été surpris de constater que les bonnes bactéries (probiotiques) se retrouvant dans le lait maternel puis dans les selles des nourrissons étaient identiques à celles provenant des intestins des mamans.

Selon leur hypothèse, par un mécanisme encore inconnu, les probiotiques de la flore intestinale maternelle parviendraient donc à se frayer un chemin jusqu'aux glandes mammaires. Et de là, elles s'installeraient dans le système digestif du nourrisson.

La présence de ces micro-organismes dans l'intestin des bébés n'étonne cependant pas les chercheurs. Les intestins des enfants logent naturellement plusieurs centaines d'espèces de bonnes bactéries qui favorisent le bon fonctionnement de leurs systèmes digestif et immunitaire (**Anonyme 1, 2013**).

Elle fait partie de la flore normale du lait et se caractérise par son aptitude à fermenter le lactose avec production d'acide lactique et donc, abaissement du pH. Les ferments lactiques laitiers constituent un groupe diversifié de bactéries qui ont néanmoins un certain nombre de caractéristiques communes : elles sont à Gram positifs, catalase négatifs, anaérobies facultatifs ou micro-aérophiles et hétérotrophes (**Aiais, 1984 ; Claude et Champagne, 1998**). L'ensemble de ces caractères précieux permet aux bactéries lactiques un développement plus rapide que les espèces considérées comme nuisibles (**Saiedkouda et Boudabous, 1994**).

Le lait maternel est composé d'une flore bactérienne abondante et très diverse et notamment de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium* (**Jean, 2017**).

Le lait maternel n'est pas stérile, mais contient moins de 600 espèces différentes de bactéries différentes, y compris *Bifidobacterium breve*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. bifidum* et *B. dentium* (Salminen et al., 2012). Ces bactéries peuvent provenir de la bouche du bébé, mais plus ils peuvent aussi intrigant venir de l'intestin de la mère. Une étude a montré que, dans un jour âgé de nouveau-nés *Enterococcus* et *Staphylococcus* sont les micro-organismes les plus fréquemment isolés (Solis et al., 2010). A partir de 10 jours jusqu'à l'âge de 3 mois, bifidobactéries devenir le groupe prédominant. Lactobacilles et bifidobactéries se trouvent dans le lait maternel et peut contribuer à la mise en place initiale du microbiote dans les quelques-uns des bactéries les plus courantes nouveau née (Olivares et al., 2006).

Les nouveau-nés qui ont reçu du lait maternel ont également un microbiote intestinal plus favorable que ceux nourris au lait maternisé (Harmsen et al., 2000), ce qui est probablement dû à la présence de bactéries lactiques dans le lait maternel (Rudloff et al., 1993). Il a été suggéré que ces différences dans le microbiote intestinal pourraient être responsables de certains des effets bénéfiques observés chez les nourrissons allaités. On sait depuis plusieurs décennies que les *lactobacilles* et les biofobactéries inhibent la croissance de micro-organismes pathogènes tels que *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* et *Clostridium perfringens* (Gilliland et al., 1977).

I.6. La matière fécale source de probiotiques

La composition de la microflore intestinale est spécifique de chaque espèce animale ; voir même de l'individu (Ducluzeau et Raibaud, 1979). La matière fécale constitue une meilleure source d'isolement des bactéries probiotiques. Pour être sélectionnées, les souches probiotiques doivent remplir certains critères, *in vitro*, comprenant, la résistance aux conditions gastriques et intestinales, la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte et l'origine humaine pour un emploi chez l'Homme (FAO / OMS, 2001).

Le mode d'alimentation du bébé joue aussi un rôle important dans l'établissement de la flore digestive. Le lait maternel contient des oligosaccharides bifidogènes qui vont permettre le développement des bifidobactéries. Un enfant allaité plus de 4 mois présente moins de risque d'infections (diarrhées aiguës 70%, otites 30%, infections respiratoires sévères 12%). Les laits industriels vont favoriser l'implantation d'une plus grande diversité de bactéries mais moins protectrices.

L'analyse comparative de composition de la flore fécale des nouveau-nés allaités au sein ou avec une préparation pour nourrisson révèle des taux variables des bifidobactéries, *Escherichia coli* et Bactéroïdes jusqu'à trois jours après la naissance. Au septième jour, chez les bébés recevant le lait maternel, les bactéries type Bactéroïdes, Lactobacilles et bifidobactéries représentent un grand pourcentage de la flore totale. Chez les bébés nourris avec une préparation pour nourrisson, ce sont plutôt les genres Bactéroïdes, Clostridies et Entérobactéries qui deviennent dominants. Ces derniers sont des marqueurs prédictifs de l'absence de lait maternel dans l'alimentation du nouveau-né. Apparemment le lait maternel semble retarder l'apparition en dominance d'une flore diversifiée et composée des genres Clostridies et apparentés (Cibik et al., 2004).

Dès que l'alimentation commence à se diversifier (figure 5), la différence entre les enfants nourris au sein et celle des enfants nourris avec des laits infantiles s'estompe (Robin et Rouchy, 2011).

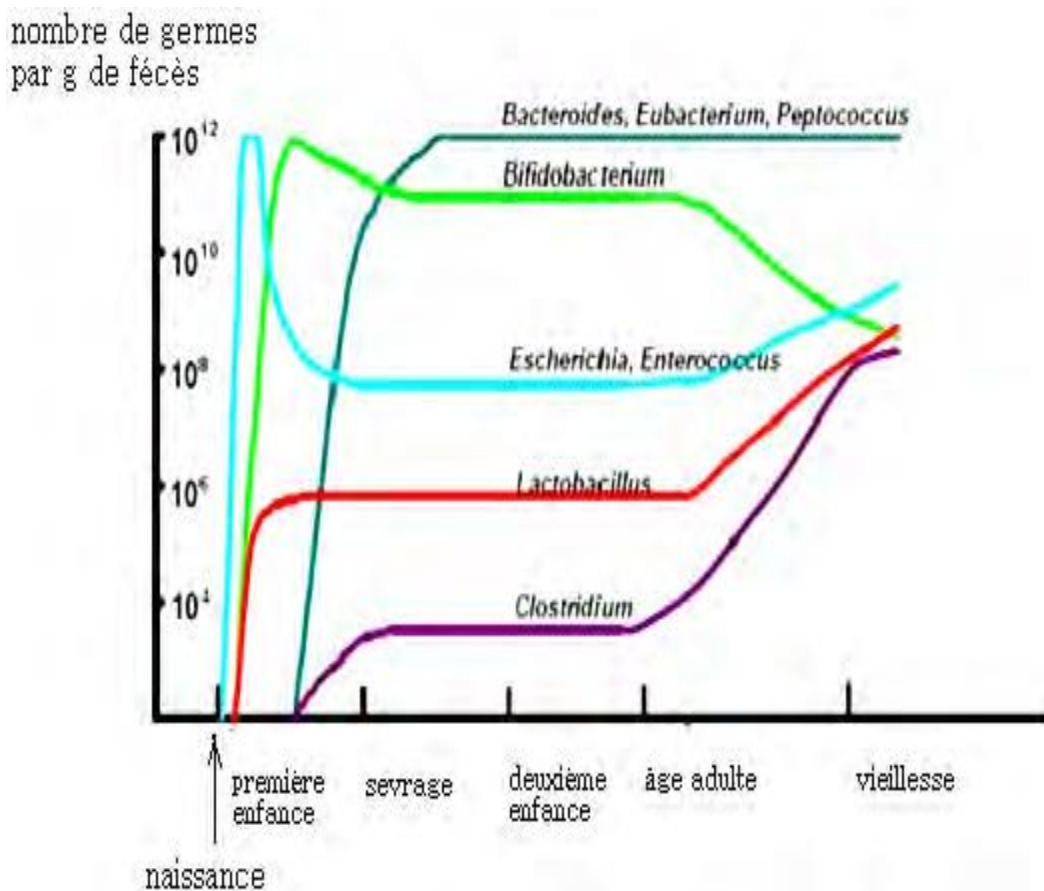


Figure 5 : Chronologie de mise en place des bactéries chez l'humain (Robin et Rouchy, 2011).

Un équilibre va s'installer entre les bactéries et l'hôte. On considère qu'à l'âge de deux ans, la flore intestinale quasi définitive est constituée.

I.7. Effets des probiotiques sur la santé

Les souches probiotiques citées dans le tableau 3 présentent différents effets positifs :

- La protection contre la diarrhée: la diminution du risque de diarrhées infectieuses causées soit, par les rotavirus chez les enfants, soit associées aux voyages (diarrhées du voyageur) **(Roberfroid, 2008)**.
- La réduction du taux de cholestérol : les probiotiques présentent une activité hypocholestérolémiant par l'assimilation du cholestérol et la déconjugaison des sels biliaires. L'équipe de *Taranto* en 1998 ont mis en évidence l'effet hypocholestérolémiant de *L. reuteri* CRL1098 consommé à 10^4 cellules par jour pendant 7 jours chez des souris hypercholestérolémiques dont la teneur totale en cholestérol a diminué de 40 % à la fin du traitement **(Rousseau, 2004)**.
- Amélioration des symptômes de malabsorption du lactose : L'activité de l'enzyme β -galactosidase chez certaines bactéries lactiques, assure l'hydrolyse du lactose dans les produits fermentés qui sont donc mieux tolérés que le lait **(Rousseau, 2004)**. *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* améliorent la digestion du lactose et réduisent les symptômes liés à l'intolérance au lactose. Ceci a été confirmé par un grand nombre d'études contrôlées portant sur des individus consommant des yaourts avec des cultures vivantes **(WGO, 2008)**.
- Effet immunomodulateur: les bactéries présentes dans la lumière intestinale sont capables d'adhérer aux cellules épithéliales, de libérer des composés dans la lumière intestinale et qui seront, ensuite, susceptibles d'être absorbés par l'épithélium intestinal et d'agir sur les cellules immunitaires **(Eckmann et al., 1995 ; cités par Ait Belgnaoui, 2006)**.
 - Amélioration de la valeur nutritionnelle des aliments : comme, par exemple, la libération des acides aminés ou la synthèse des vitamines **(Reddy et al., 1973; Fernandes et al., 1987; Gilliland 1990; O'Sullivan et al., 1992 ; cités par Parvez et al., 2006)**.

Tableau3 : Exemples de souches probiotiques industrielles (WGO, 2008).

Souches (désignations alternatives)	Nom commercial	Fabriquant
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN 173 010	Activia	Danone/Dannon
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12		Chr. Hansen
<i>Bifidobacterium breve</i> Yakult	Bifiene	Yakult
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	Align	Procter & Gamble
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 (DR10)	Howaru™ Bifido	Danisco
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536		Morinaga Milk Industry
<i>Enterococcus</i> LAB SF 68	Bioflorin	Cerbios-Pharma
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Mutaflor	Ardeypharm
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM		Danisco
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	Actimel, DanActive	Danone/Dannon
<i>Lactobacillus casei</i> CRL431		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus casei</i> F19	Cultura	Arla Foods
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult	Yakult
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 (Lj1)	LC1	Nestlé
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	Norrmejerier	
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299V	GoodBelly, ProViva	NextFoods Probi
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATTC 55730	Retueri	BioGaia Biologics
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53013 (LGG)	Vifit et autres	Valio
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21	Verum	Norrmejerier
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (boulardii) Iyo	DiarSafe, Ultralevure et autres	Wren Laboratories, Biocodex, and others
Testé comme mélange: <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285 & <i>Lactobacillus casei</i> Lbc80r	Bio K+	Bio K+ International
Testé comme mélange: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 & <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14	FemDophilus	Chr. Hansen
Testé comme mélange: VSL#3 (mélange d'une souche de <i>Streptococcus thermophilus</i> , quatre de <i>Lactobacillus</i> spp & trois de <i>Bifidobacterium</i> spp)	VSL#3	Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.
Testé comme mélange: <i>Lactobacillus acidophilus</i> CUL60 & <i>Bifidobacterium bifidum</i> CUL 20		
Testé comme mélange: <i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 & <i>Lactobacillus rhamnosus</i> R0011	A'Biotica et autres	Institut Rosell
Testé comme mélange: <i>Bacillus clausii</i> strains O/C, NR, SIN, et T	Enterogermina	Sanofi-Aventis

Chapitre II:

La vitamine

B12 :

Ethiologie et

Etude.

Chapitre II : VITAMINE B12 : ETHIOLOGIE ET ETUDE.

II.1. Vitamine B12

II.1.1. Découverte de la vitamine B12

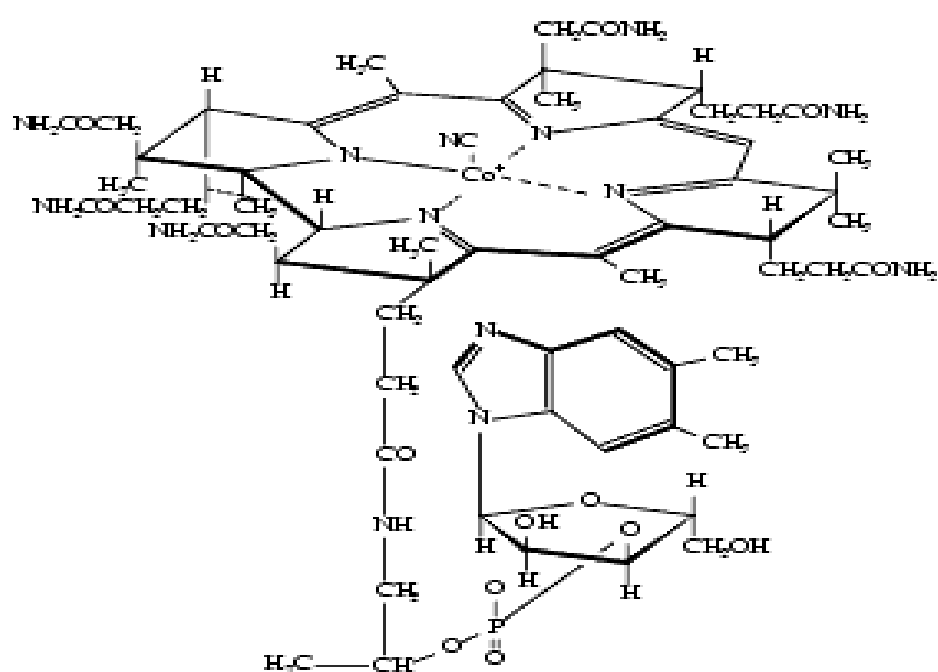
L'histoire de la découverte de cette vitamine est en relation avec les efforts pour traiter l'anémie pernicieuse. Selon Combe en 1822, cette maladie mortelle est liée à un dysfonctionnement du système digestif. Plus tard en 1849, Combe et Addison décrivaient les symptômes cliniques d'anémie pernicieuse. Jusqu'au début du XXe siècle, cette maladie était incurable. Bien que la vitamine B12 n'ait pas fait l'objet d'une attention particulière pendant le début du XXe siècle, au milieu des années 20, George Whipple (pathologiste et chercheur biomédical américain) a effectué des expériences sur des chiens atteints par l'anémie. Il a découvert qu'un régime contenant du foie cru ou d'autres tissus animaux pouvait conduire à la guérison de l'anémie. En 1926, George Minot et William Murphy ont montré que les patients souffrant d'anémie pernicieuse voyaient des améliorations remarquables quand ils adoptaient le régime du foie cru. Minot, Murphy et Whipple ont reçu le Prix Nobel de physiologie et de médecine en 1934 pour la découverte du facteur antipernicieux (**Ball, 1998**). En 1948, Karl Folkers et ses collègues ont isolé un composé cristallin rouge du foie et ont nommé ce composé, la vitamine B12. Ainsi, la vitamine B12 fut largement étudiée durant les décennies suivantes. En 1956, la structure chimique tridimensionnelle de l'adénosyl-vitamine B12 a été élucidée par Hodgkin et collaborateurs. Il a reçu le prix Nobel de chimie en 1964 (**Gray, 1955**).

II.1.2. Structure de la vitamine B12

La vitamine B12, également connue sous le nom de cobalamine (Cbl), est une molécule organométallique hydrosoluble ayant une masse moléculaire de 1356 g/mol. La molécule est constituée (figure 6) d'un noyau corrine central presque plan, qui contient quatre ligands sur l'ion cobalt central. Elle comporte deux chaînes axiales. L'une est en position α (en-dessous) avec un groupement pseudo-nucléotidique (diméthylbenzimidole-ribose-phosphate) dont le groupe imidazole est relié au cobalt et dont le phosphate est relié à l'un des noyaux pyrroles. L'autre chaîne, en position β (au-dessus), est occupée par un radical anionique variable R. La nature et la fonction physiologique de la vitamine B12 est déterminée par les ligands occupant la position axiale supérieure de la molécule (**Brown, 2005**). Les principales formes identifiées dans les tissus des mammifères sont : la

méthylcobalamine (Me-Cbl) et l'adénosylcobalamine (Ado-Cbl), qui agissent comme des cofacteurs, et l'hydroxycobalamine (OH-Cbl), le glutathionylcobalamine (GS-Cbl), qui sont des intermédiaires.

Dans la plupart des tissus, Ado-Cbl est prédominant par rapport à Me-Cbl (**Thakkar & Billa, 2015**). La cyanocobalamine (CN-Cbl) est formée quand un ion cyanure est attaché à l'atome de cobalt. Ce composé est la forme stable produite industriellement (**Kräutler & Kr, 2005**).



Vitamine B12 ou Cyanocobalamin

NC = cyano

Figure 6: Structure de la vitamine B12 (cobalamine). La vitamine B12 est composée d'un noyau corrine formé d'un atome de cobalt central relié à quatre noyaux pyrroles (A, B, C, D) et deux avec un groupement pseudo-nucléotidique α chaînes axiales, l'une en position qui détermine le β diméthylbenzimidazole et l'autre un radical anionique variable R en position nom du composé vitaminique (**Brown, 2005**).

II.1.3. Sources alimentaires de vitamine B12

La vitamine B12 n'est synthétisée que par des microorganismes. Elle n'est pas présente dans les aliments d'origine végétale et se trouve principalement dans les produits d'origine animale. Les aliments riches en vitamine B12 sont la viande, les abats (foie, rognons), la volaille, le poisson, les crustacés, les fruits de mer, les produits laitiers et les œufs. Les algues vertes (aonori, laitue de mer), rouges (dulse, nori) et la spiruline (une micro-algue), sont également une bonne source. (Watanabe, 2007).

II.1.4. Les apports nutritionnels journaliers conseillés

Le besoin physiologique en vitamine B12 est extrêmement faible. Selon le régime alimentaire, les apports conseillés quotidiens pour les adultes varient de 2 à 2,8 µg par jour. Le tableau 4 résume les apports nutritionnels recommandés selon les tranches d'âge des individus et les conditions physiologiques (AFSSA, 2001).

Tableau 4 : Apports nutritionnels journaliers conseillés pour la vitamine B12 (µg/jour)
(AFSSA, 2001).

Catégorie	Apports nutritionnels conseillés en vitamine B12 en microgrammes (µg/jour)
Enfants de 1 à 3 ans	0,8
Enfants de 4 à 6 ans	1,1
Enfants de 7 à 9 ans	1,4
Enfants de 10 à 12 ans	1,9
Adolescents de 13 à 15 ans	2,3
Adolescents de plus de 16 ans et adultes	2,4
Femmes enceintes	2,6
Femmes allaitantes	2,8

Environ la moitié de l'excédent en vitamine B12 est stockée dans le foie. Chez l'adulte, la réserve hépatique varie entre 2 et 5 mg, ce qui est suffisant pour 3 à 5 ans (**National Academy of Sciences, 2000**).

II.1.5. Métabolisme de la vitamine B12

La vitamine B12 est liée à trois protéines : l'haptocorrine (HC, ou protéines R), le facteur intrinsèque (FI) et la transcobalamine (TC) qui l'achemine dans les liquides extracellulaires. Après l'ingestion de nourriture, la vitamine B12 libérée des nutriments sous l'action de la pepsine et de l'acide chlorhydrique (HCl) se lie à l'haptocorrine, d'origine salivaire et gastrique (Figure 3 ; dans l'intestin, la vitamine B12 est libérée de la HC par les protéases pancréatiques. La vitamine B12 se lie alors avec une haute affinité au facteur intrinsèque (FI), une glycoprotéine de 45 kDa qui est résistante aux protéases, et sécrétée par les cellules pariétales dans le fundus et le cardia de l'estomac. Le complexe FI-Cbl traverse le jéjunum vers l'iléon distal où il est fixé sur des récepteurs membranaires spécifiques multi-ligands, situés sur les microvillosités des entérocytes de l'iléon appelé cubam (**Quadros, 2010**).

Le récepteur Cubam est constitué de deux molécules : la cubiline, une protéine périphérique de 460 kDa (codée par le gène CUBN, chromosome 6) et amnionless, une protéine transmembranaire de 45-50 kDa (codée par le gène AMN, chromosome 7), (**Pedersen et al., 2010**). Ce récepteur possède une affinité élevée pour le complexe FI-Cbl, mais il ne se lie pas à la cobalamine, au FI seule (**Quadros, 2010**). Le cubam est essentiel au transport du complexe FI-Cbl à partir de la lumière intestinale vers l'intérieur de l'entérocyte. La protéine transmembranaire est co-exprimée conjointement avec la cubiline dans les épithéliums polarisés, en particulier dans les reins, les intestins et la vésicule ombilicale (**Namour et al., 2011**). Après l'endocytose, le FI est dégradé et la vitamine apparaît dans le sang, principalement liée à la transcobalamine II (TCII), protéine porteuse de 38 kDa synthétisée dans plusieurs tissus. Le complexe Cbl-TC II est capté par les cellules hépatique et autres organes par le récepteur d'endocytose CD320, protéine transmembranaire présente à la surface cellulaire de tous les tissus (**Quadros et al., 2009**).

II.2. Etiologies de la carence en vitamine B12

Les étiologies principales de la carence en vitamine B12 sont : un apport nutritionnel insuffisant, le syndrome de malabsorption intestinale et des interventions médicales (**Andrés**

et al., 2005). Parmi les causes de risque de carence en vitamine B12 chez les adultes et les enfants, on retrouve une consommation insuffisante d'aliments d'origine animale ou de produits laitiers (**Da Silva et al., 2014**). Le nourrisson né de mère déficient en vitamine B12 présente le risque de naître avec une carence en vitamine B12. (**Langan & Zawistoski, 2011**). L'anémie pernicieuse (maladie de Biermer) est une maladie auto-immune caractérisée par la présence d'auto-anticorps dirigés contre le FI, entraînant une atrophie idiopathique de l'épithélium gastrique (**Zulfiqar et al., 2012**). Chez l'adulte, cette maladie représente de 20 à 50% des causes de carence en vitamine B12 (**Stabler, 2013**).

II.2.1. Manifestations biologiques et cliniques du déficit en vit B12

Les altérations hématologiques sont très caractéristiques et indicateurs de la carence en vitamine B12, au contraire des troubles neurologiques, beaucoup plus variés, et souvent les premiers et parfois seuls signes cliniques. Il existe une corrélation inverse dans la sévérité des symptômes neurologiques et hématologiques mais les causes n'en sont pas connues (**Pétavy-Catala et al., 2003**).

a) Manifestations hématologiques

Généralement, l'anémie par carence ou d'un trouble du métabolisme de la vitamine B12 (anémie de Biermer) est lié au déficit en FI. Cette anémie est macrocytaire, mégaloblastique, normochrome, arégénérative. Elle s'accompagne d'une anisocytose due à un défaut de réplication de l'ADN par piégeage du 5-méthylTHF. Le premier signe de carence en vitamine B12 est la macrocytose. Elle apparaît avant l'anémie et résulte d'un asynchronisme de la maturation du cytoplasme et du noyau (**Federici et al., 2007**).

b) Signes neuropsychiatriques

La carence en vitamine B12 peut affecter le système nerveux central (cerveau, moelle épinière et nerf optique) et le système nerveux périphérique (**Mabrouk et al., 2015**). Les troubles neurologiques associés à la carence en vitamine B12 sont polymorphes. Ils comprennent la myélopathie, la neuropathie, les anomalies neuropsychiatriques et, moins souvent, l'atrophie du nerf optique (**Sahoo et al., 2011**). Dans le système nerveux, la vitamine B12 agit comme coenzyme dans la réaction de méthylmalonyl-CoA mutase, qui est nécessaire pour la synthèse de la myéline (**Mota et al., 2016**). La carence en vitamine B12 entraîne donc une synthèse de la myéline défectueuse conduisant à plusieurs dysfonctionnements du système nerveux central et périphérique. La première anomalie est habituellement une déficience sensorielle, se

présentant le plus souvent sous forme de paresthésie distale et symétrique aux membres inférieurs fréquemment associée à l'ataxie (**Ralapanawa et al., 2015**).

Les manifestations neuropsychiatriques telles que la perte de mémoire, la dépression, l'hypomanie, la psychose paranoïde avec hallucinations auditives et visuelles, la folie mégaloblastique ont été décrites suite à une carence en vitamine B12 (**Scherer, 2003**). Il n'est toujours pas clair si une déficience légère ou modérée de B12 peut causer la démence et si la supplémentation de la diète avec B12 peut prévenir ou retarder l'apparition de démences comme la maladie d'Alzheimer (**Li et al., 2017**).

II.3. La souris comme modèle génétique pour la carence en vitamine B12

La souris est l'organisme modèle le plus utilisé dans la recherche biomédicale (**Bond et al., 2013**). Il est excellent pour les études génétiques parce qu'il est facile à entretenir, possède un génome bien caractérisé qui est similaire aux humains (99%) et permet de mimer plusieurs maladies humaines.

Les modèles de souris génétiquement modifiés se sont révélés être un outil puissant dans l'étude de neuropathologies. La capacité de modifier génétiquement le génome de la souris en supprimant ou en remplaçant un gène spécifique a amélioré notre capacité à identifier et à valider les gènes cibles d'intérêt (**Sacca et al., 2010**). Dans notre laboratoire, de nombreux travaux ont été réalisés ces dernières années, avec un accent particulier sur le manque de vitamines B9 et B12 et les résultats négatifs qui en résultent sur divers systèmes du corps. L'unité U954 a développé plusieurs modèles animaux. Le modèle le plus utilisé est le rat carencé en donneurs de méthyle : les rats femelles sont nourris avec un régime déficient en vitamines B9 et B12, un mois avant l'accouplement, pendant la grossesse puis la période d'allaitement. Nous utilisons également un modèle de souris transgénique invalidée au niveau du gène CD320, (codant pour le récepteur membranaire TCblR / CD320 du complexe cobalamine/transcobalamine), a été générée à l'aide du système gene-trap. Chez ce modèle de souris, une carence sévère en vitamine B12 est observée spécifiquement dans le cerveau. Le TCblR / CD320 est nécessaire pour l'absorption de la Cbl liée à la transcobalamine (TC) dans les cellules (**Quadros et al., 2008**). Ces souris transgéniques ont un développement normal. Les études menées sur ce modèle ont montré que la carence en cobalamine provoque des taux élevés de HCY et d'acide méthylmalonique (MMA) dans le sérum et dans le cerveau. Cependant, la maladie du système nerveux central résultant d'une carence en vitamine B12 chez les humains peut ne pas apparaître dans ce modèle de souris (**Lai et al., 2013**).

Chapitre III:
Matériels et
Méthodes.

Chapitre III: MATERIELS ET METHODES.

Ce travail a été réalisé au laboratoire des micro-organismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS), Ines faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem. Ce travail permet d'établir une relation entre le déficit en vitamine B12 et les fonctions comportementales médiatisées par le cerveau. Pour cela, des souches bactériennes productrice de cobalamine *in vitro*, préalablement isolées par (Abbassa et Moussa, 2018) ont fait l'objet de notre démarche expérimentale.

Estimées à 30% au mois de Mars, les manipulations *in vitro* ont été arrêtées, celles *in vivo* n'ont pas eu lieu, suite à la crise sanitaire. Le protocole expérimental approuvé est détaillé comme suit :

III .1. Matériels

III .1.1. Souches utilisées

- Les souches bactériennes utilisées dans notre étude sont des souches lactiques déjà isolées et purifiées (Abbassa et Moussa, 2018) et qui sont d'origine de laits maternels out de selles de bébés sains. Dix souches bactériennes désignées par SL (isolées du lait maternel), SS (isolées de selles de bébés) ont fait l'objet de ce travail. Ces souches ont prouvé une bonne production de cobalamine *in vitro* (Abbassa et Moussa, 2018).

- Les souris wild-type (WT) sauvages et knock-out CD320 (KO) génétiquement modifiées (Quadros et al., 2010 ; Mimoun, 2017), mâles et femelles jeunes (âge : 10 semaines) ont fait l'objet des travaux de l'*in vivo*. Les souris knock-out CD320 sont déficientes pour le gène CD320 qui code pour une protéine membranaire qui est un récepteur du transporteur Transcobalamine II, lié à la vitamine B12.

III .1.2. Les milieux de culture utilisés

- **Bouillon MRS:** Le bouillon MRS de MAN, ROGOSA et CHARPE (De Man et al., 1960), référence (Merck, VM 10661) est utilisé pour la réactivation des bactéries.
- **MRS gélosé :** Il s'agit du milieu MRS précédemment cité, additionné de 20 g/L d'agar-agar, réparti dans des flacons et autoclavé 15 minutes à 121°C. Il a été utilisé pour le dénombrement des souches, dans différents tests.

- **MRS cystéiné** : Il s'agit du milieu MRS précédemment cité, additionné de 20 g/L d'agar-agar et de chlorhydrate de cystéine à 0.05%, réparti dans des flacons et autoclavé 15 minutes à 121°C.
- **Bouillon MRS acidifié** à pH =2

III.2. Méthodes

III.2.1. *IN VITRO*

1- Réactivation des souches bactérienne

Les bactéries utilisées sont sous forme congelées en cultures pures à -18°C. Elles sont activées et maintenues vivantes par un repiquage avec 100µl d'inocula dans 10ml de milieu de croissance MRS et incubées à 37 °C pendant 72 heures. Avant leur utilisation, un examen microscopique est nécessaire pour identifier les bactéries et contrôler leurs états de développement.

2- Préparation de l'inoculum

Dans un tube à essai contenant 9 ml de bouillon de croissance MRS, 1 ml de la culture pure est ajouté à l'aide d'une pipette stérile.

Une agitation est nécessaire pour rendre parfaitement homogène le mélange. L'incubation se fait dans une étuve à 37°C pendant 24heures. L'inoculum est prêt à être utilisé pour les différentes expérimentations.

3- Pré-Identification des bactéries lactiques

- **Aspect macroscopiques des colonies**

La détermination des caractères macroscopiques, se fait à l'œil nue. Les souches ont été cultivées sur le milieu gélosé MRS nous permet de renseigner sur la couleur, la forme, la taille, l'aspect, la consistance, l'opacité et l'odeur.

- **Aspect microscopique des bactéries (coloration de Gram)**

La coloration de Gram est la première étape de l'identification.

La coloration d'un frottis doit être préparé comme suit :

- ❖ Déposer sur une lame propre une goutte d'eau physiologique stérile.
- ❖ Prélever un fragment de colonie à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée.

- ❖ Dissocier soigneusement l'inoculum dans la goutte d'eau, puis sécher et fixer le frottis au-dessus de la flamme du bec benzène sans trop chauffer (**Leyral et Joffin, 2001**).

Une fois refroidi, on entame la coloration de Gram :

- ❖ Recouvrir la lame de violet de Gentiane et laisser agir 1 minute.
- ❖ Rincer rapidement à l'eau du robinet et éliminer l'excès d'eau.
- ❖ Recouvrir la lame de lugol et laisser agir 30 secondes.
- ❖ Rincer rapidement à l'eau du robinet et éliminer l'excès d'eau.
- ❖ Recouvrir la lame de l'alcool à 95° pendant 10 secondes.
- ❖ Rincer rapidement à l'eau du robinet et recouvrir la lame de fushine pendant 1minute.
- ❖ Rincer rapidement à l'eau du robinet.
- ❖ Sécher puis observer au microscope (objectif x100 à immersion).

4- Caractères physico-chimiques

✓ Test de catalase

Cette activité a été réalisée selon le protocole expérimental décrit par **Prescott et al. (2003)**. La Catalase consiste à mettre sur une colonie prélevée du milieu MRS gélosé à l'aide d'une pipette pasteur, quelques gouttes d'eau oxygénée à 10 % (**Guiraud et al., 2003**).

✓ Test oxydase

L'activité oxydase a été déterminée selon le protocole décrit par **Kovacs et al. (1995)**.

Une colonie pure prise de chaque milieu gélosé est mise sur papier Wattman imprégné de réactif Oxydase. Les bactéries produisant l'enzyme oxydase oxydent ce réactif pour former un Composé violet, l'indophénol ; la suspension devient alors violette après 20 à 60 secondes et la couleur persiste pendant 15 minutes environ (**Delarras, 2007**).

✓ Nitrate réductase

Ce test se fait par ensemencement de bouillon nitraté et incubation à 30°C pendant 24h. Ajouter quelques gouttes de réactifs NR1 et NR2 pour la détermination de la capacité des bactéries à réduire les nitrates en nitrites.

✓ Test de croissance à différentes températures (Larpen, 1996)

Les souches bactériennes sont ensemencées dans leurs milieux sélectifs et tester leurs croissances à deux températures 15°C, 37°C et 45°C. Le développement des souches était apprécié après une semaine d'incubation pour les cultures à 15°C et après 24 et 48h pour les cultures à 37°C et 45°C, par comparaison avec un tube de milieu non ensemencé incubé à la même température (examen de la turbidité).

5- Etude du profil fermentaire

- Identification par la galerie Api 20 A

Les galeries Api 20 A (Biomérieux, France) permettent une identification des bactéries anaérobies au niveau du genre ; et même parfois de l'espèce sur la base de la fermentation des différents sucres. La galerie Api 20 A est constituée de 20 cupules permettant l'étude de : L-tryptophane, urée, D-glucose, D-mannitol, D-lactose, D-saccharose, D-maltose, salicine, D-xylose, L-arabinose, gélatine, esculine, glycérol, D-cellobiose, D-mannose, D-mélézitose, D-raffinose, D-sorbitol, L-rhamnose, D-tréhalose.

- Préparation des galeries Api 20 A

Chaque galerie Api 20 A est constituée d'une bande comprenant chacune 20 cupules.

- Cultiver les bactéries sur MRS-cys gélosé.
- Après 24 h d'incubation, préparer l'inoculum en prenant quelques colonies isolées dans le diluant de l'Api 20.
- Réunir fond et couvercle (figure 7).
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Répartir environ 10 ml d'eau distillée ou déminéralisée stérile dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide.
- Sortir la bande de son emballage, et la déposer dans le fond de la boîte d'incubation.
- Remplir les cupules à moitié jusqu'au trait indiqué, exception pour le test Indole, ajouter une couche de vaseline stérile et le test de gélatine où la cupule est totalement remplie.



Figure 7 : Schéma d'une galerie Api 20A.

- Lire les résultats de fermentation après 24 et 48 h.
- Procéder à l'identification des tests positifs selon le schéma suivant :

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS			
				NEGATIF	POSITIF		
IND	L-tryptophane	0,98	formation d'INDole	jaune	rouge		
URE	urée	0,648	UREase	jaune-orangé	rouge		
GLU MAN LAC	D-glucose D-mannitol D-lactose (origine bovine)	1,96 1,96 1,96	acidification (GLUcose) acidification (MANnitol) acidification (LACtose)	pourpre	jaune / vert-jaune		
SAC MAL SAL XYL ARA	D-saccharose D-maltose salicine D-xylose L-arabinose	1,86 1,96 1,64 1,64 1,64	acidification (SACcharose) acidification (MALtose) acidification (SALicine) acidification (XYLose) acidification (ARAbinose)				
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)			pas de diffusion du pigment (1)	diffusion du pigment noir (1)
ESC	esculine citrate de fer	0,36 0,11	hydrolyse (β-glucosidase) (ESCuline)			jaune (2)	brun-noir (2)
						sous UV (365 nm)	
						fluorescence	pas de fluorescence
GLY CEL MNE MLZ RAF SOR RHA TRE	glycérol D-cellobiose D-mannose D-mélézitose D-raffinose D-sorbitol L-rhamnose D-tréhalose	1,82 1,86 1,96 1,96 2,18 2,18 1,96 1,96	acidification (GLYcérol) acidification (CELlobiose) acidification (ManNosE) acidification (MÉLÉZitose) acidification (RAFfinose) acidification (SORbitol) acidification (RHAmnose) acidification (TREhalose)			pourpre	jaune / vert-jaune

Figure 8 : Tableau de lecture tel qu'il est indiqué dans la fiche technique de l'Api 20A Biomérieux.

III.2.2. IN VIVO

Les souris sont élevées dans une animalerie à une température contrôlée de 22-23°C avec un cycle lumière/obscurité de 12h-12h, avec une humidité contrôlée. Les souris disposent d'un accès illimité à l'eau et à la nourriture. Les souris sont divisées en 4 groupes, deux groupes WT et CD 320 reçoivent 0,2 ml du mélange bactérien dans l'eau de boisson par voie orale (5×10^7 UFC / ml) du jour 1 au jour 5, tandis que les souris des deux autres groupes témoins reçoivent des quantités égales de solution saline normale comme placebo.

Le protocole expérimental mis en place par **Mimoun (2017 ; modifié par nous)** dans le cadre de l'étude *in vivo* est présenté dans la figure 9 ci- dessous :

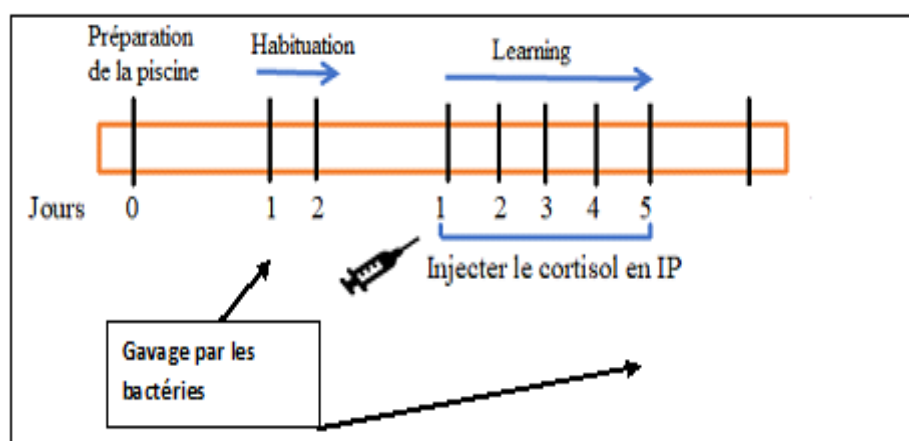


Figure 9: Représentation schématique du Protocole expérimental à suivre. Il se compose de deux étapes, l'habituation pour deux jours consécutifs suivie par la deuxième étape (Learning). Dès la première étape d'habituation, les lots de souris WT et CD320 sont gavés du mélange bactérien pendant sept jours consécutifs. Dans l'étape Learning, les souris sont injectées avec de cortisol pendant cinq jours consécutifs (**Mimoun, 2017 ; modifié par nous**).

1- Analyses comportementales

➤ LABYRINTHE AQUATIQUE MULTI-T

Ce test permet d'évaluer les capacités d'apprentissage et de mémorisation hippocampo-dépendantes chez la souris ayant reçu ou non nos bactéries productrices de cobalamine dans une situation aversive (l'eau d'un bassin). Il est basé sur les aptitudes des individus à mémoriser un parcours dans lequel ils naviguent en fonction de repères environnementaux (non contrôlés par l'expérimentateur). Le dispositif expérimental de ce test est constitué d'une piscine en verre de forme quadrant (1 x 1m), rempli sur 25cm de hauteur d'eau rendue opaque par l'ajout de 50 ml de lait concentré. La température de l'eau est maintenue à 22°C. Le Point de sortie est une échelle en plastique gris opaque installé à l'extrémité du labyrinthe. La piscine se situe dans une pièce maintenue à 21-22°C et comprenant des indices visuels accrochés sur le mur entourant la piscine à 0,5 m de la piscine. Le trajet effectué par l'animal dans la piscine est filmé à l'aide d'une caméra reliée à un ordinateur qui numérise ce trajet et l'enregistre grâce à un logiciel. Les différentes variables mesurées sont : Le nombre d'erreurs (entrée avec les quatre pattes dans un bras impasse ou dans un bras déjà emprunté qualifié de « retour en arrière »), la latence d'atteinte de sortie du labyrinthe (entrée avec les quatre pattes dans le bras d'arrivée), la distance parcourue et la vitesse de nage. Le test est un succès lorsque les souris rejoignent la sortie sans avoir visité de voies sans issue ou sans être revenu en arrière.

➤ LE TEST DE L'OPEN FIELD (L'ESPACE OUVERT)

Ce test analyse le comportement exploratoire du rongeur dans une enceinte close. Traditionnellement, On l'utilise pour évaluer de comportement d'un animale vis-à-vis d'un environnement nouveau, ses fonctions motrices, mais aussi son l'état émotionnel.

Un animal anxieux (déficit en vitamine B12) évite le centre ouvert, et reste près la périphérie de l'appareil. Les variables mesurées sont l'activité ambulatoire totale, le nombre d'entrées et le temps passé dans l'aire centrale. Le nombre de fèces est aussi relevé.

L'appareil est constitué d'une arène circulaire de 1 m de diamètre avec une hauteur 35 cm. Le sol est constitué d'une plaque en verre sur laquelle a été dessiné au centre un cercle dit central de 50 cm laissant apparaître entre ce cercle et les murs du dispositif un cercle dit périphérique de 100 cm. Plusieurs lignes radiales traversent les deux zones divisant l'arène en 8 quartiers périphériques et 8 quartiers centraux.

Chapitre IV:
Résultats et
Discussion.

Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSION.

IV.1. Résultats d'identification des isolats

IV.1.1. Pré-identification des souches

L'identification des souches qui ont été isolées à partir de laits maternels et selles de bébé (Abbassa et Moussa, 2018) et cultivées sur milieu MRS-cys et MRS acidifié en surface, est basée sur des observations macroscopiques, microscopiques et sur des tests physicochimiques.

- **Caractères macroscopiques**

L'étude de l'aspect macroscopique des souches probiotiques sur les boîtes de Pétri sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille, l'aspect ainsi que la couleur des colonies. Les différentes observations (figures 10 et 11) montrent que toutes les souches cultivées sur le milieu MRS-cys solide donnent des colonies petites ou moyennes et parfois grosses, rondes et blanchâtres avec un aspect lisse, leur taille est d'environ 1mm à 2 mm de diamètre (**Tableau 5**)

Tableau 5: Résumé de l'observation macroscopique des souches étudiées.

Les souches	Forme	Aspect	Couleur
SL1	Petite	Lisse	Blanchâtre
SL2	Petite	Lisse	Blanchâtre
SL3	Petite	Lisse	Blanchâtre
SL4	Grosse	Lisse	Blanchâtre
SL7	Grosse	Lisse	Blanchâtre
SL8	Grosse	Lisse	Blanchâtre
SL9	Moyenne	Lisse	Blanchâtre
SS1	Petite	Lisse	Blanchâtre
SS2	Petite	Lisse	Blanchâtre
SS10	Moyenne	Lisse	Blanchâtre



Figure 10 : Observation macroscopique de la souche SL1 cultivée sur milieu MRS-cys.



Figure 11: Observation macroscopique de la souche SS1 cultivée sur milieu MRS-cys.

- **Caractères microscopiques**

Un nombre de bénéfiques pour la santé des nourrissons du lait maternel sont liés aux bactéries qu'il contient ainsi qu'à ses oligosaccharides (HMO – Human Milk Oligosaccharides, oligosaccharides du lait humain), qui agissent comme des prébiotiques contribuant à l'établissement des bactéries bénéfiques. Pour essayer d'apporter une réponse à cette question, une équipe de scientifiques (**Pannaradj et al., 2017**) a suivi 107 paires « mères/enfants » sains pendant cinq ans. Les chercheurs ont examiné le contenu microbien des seins des femmes, de la peau autour des mamelons ainsi que de leur lait, puis ont analysé les selles des nourrissons afin d'identifier les microbes composant leur microbiote intestinal.

Ils ont constaté que les bactéries des excréments des bébés étaient plus proches des microbes de leur mère que de ceux des autres mères participant à l'expérience. Selon les auteurs, ceci suggérerait que les bactéries colonisant l'intestin des bébés passent de la mère à l'enfant à travers le lait maternel. Les auteurs affirment que ces travaux constituent l'étude la plus vaste à ce jour faisant état du transfert de microorganismes du lait à l'intestin du bébé.

Dans une étude menée par l'équipe américaine de **Kozak et al. (2015)**, les bactéries suivantes peuvent, à la fois, exister dans les laits des mamans et dans les selles de leurs bébés : *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri* et *Enterococcus faecalis*. Ces bactéries ont été parmi 126 isolats appartenant aux genres *Bifidobacterium* sp, *Lactobacillus* sp, *Corynebacterium* sp, *Propionibacterium* sp, *Rothia* sp, *Enterococcus* sp, *Staphylococcus* sp et *Streptococcus* sp, prélevés des mamans ou de leurs bébés.

- ✓ **Lecture de test coloration de Gram**

- Certaines bactéries présentent dans la préparation une couleur violet sont les bactéries à Gram positif.

- D'autres, présentent une couleur rose sont les bactéries à Gram négatif.

L'aspect microscopique a révélé que les cellules sont Gram positives apparaissant sous différentes formes avec différents modes d'association.

La technique de coloration de Gram a été appliquée, uniquement pour déterminer le Gram et la forme des isolats coques et bâtonnets. Seulement les isolats à Gram positif ont été retenus.

Les bactéries ont la forme de coques et sont disposées en paires (diplocoques) ou en courtes chaînettes et en amas (figure 12). Le mode d'association varie d'un isolat à l'autre. Ces observations permettent de les classer initialement selon le Gram, leur morphologie et leur mode d'association (**Joffin et Leyral, 1996**).

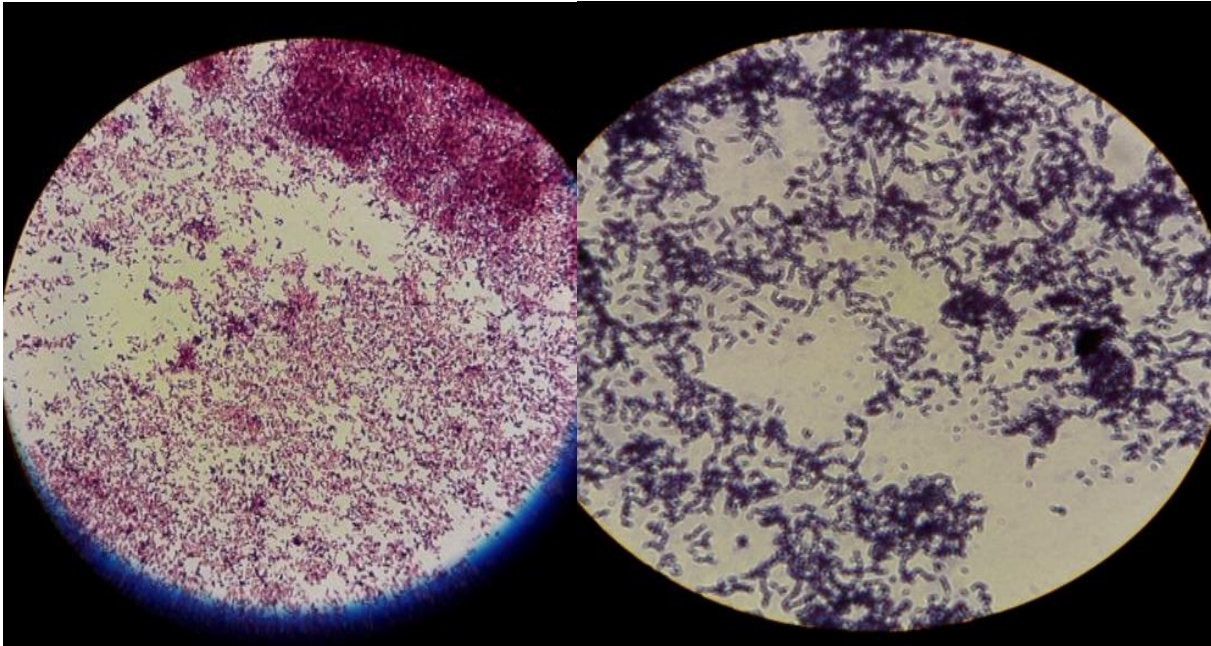


Figure 12 : Observation microscopiques (Objectif X100) des isolats lactiques après coloration de Gram.

✓ Lecture de test catalase

La recherche de la catalase constitue une étape importante dans l'identification des bactéries lactiques

- Le dégagement de bulles de gaz signifie qu'il y a production de l'enzyme catalase et que le test est positif (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

- L'absence de bulles de gaz signifie que le test est négatif.

Pour toutes les colonies testées le test catalase est **négatif**. Ce qui laisse suggérer que ces bactéries sont des souches lactiques (figure 13).



Figure 13: Toutes les souches sont catalases négatives.

✓ Lecture de test oxydase

- Le développement d'une couleur bleue signifie que le test est positif ce qui signifie que l'isolat possède l'enzyme oxydase.

- Si la couleur ne change pas, le test est négatif.

Toutes les souches sont catalase et oxydase négatives. Nous avons retenu 10 isolats possédant les caractères décrits par la littérature comme étant des bactéries lactiques.

✓ Lecture de test Nitrate réductase

- L'apparition d'une couleur rouge indique la présence de nitrate réductase.

- Si Absence de coloration, ajouter le zinc

-Réaction positive : absence de coloration

-Réaction négative : apparition en 5min d'une coloration rose ou rouge (figure 14).

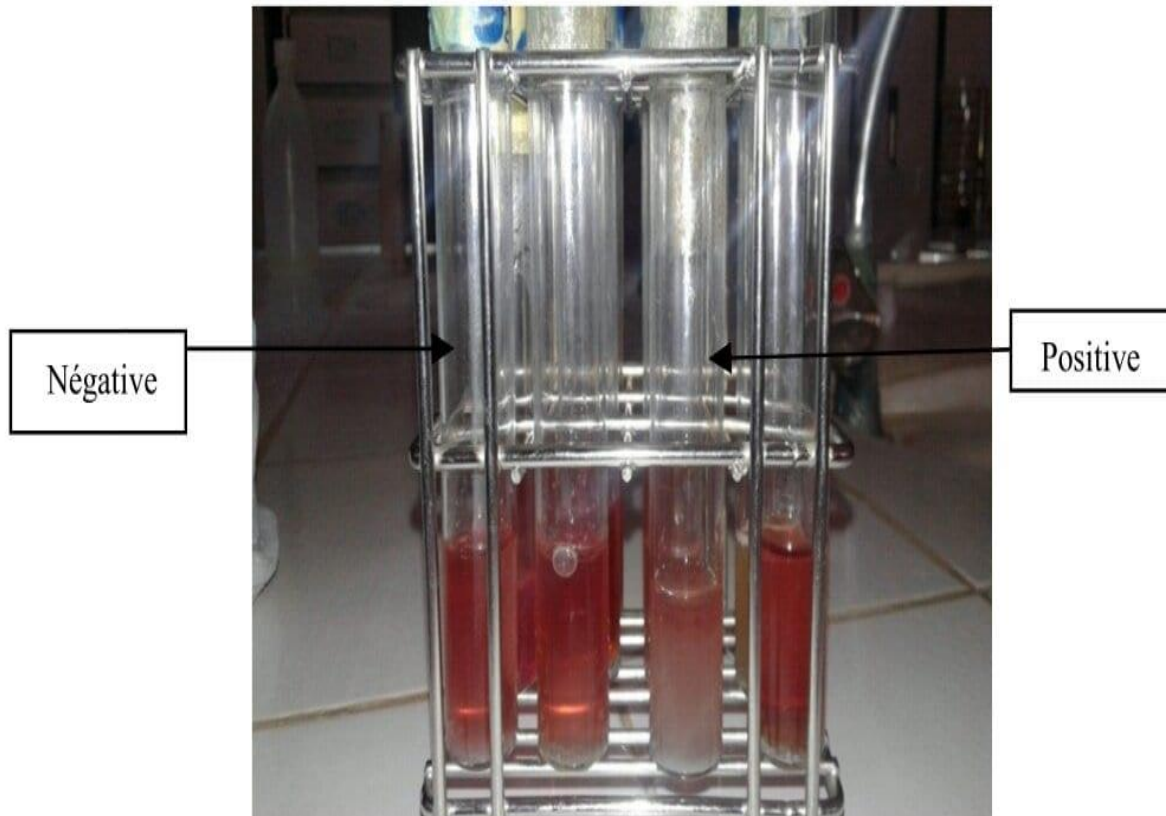


Figure 14: Résultat du test de nitrate réductase.

✓ Lecture de test Croissance à différentes températures

Le développement des souches est apprécié après 24 à 48 h par comparaison avec un tube de milieu non ensemencé, incubé à la même température (appréciation visuelle de la turbidité) (Bjorkroth et al., 1998 ; Guiraud, 2003).

Le test de croissance à différentes températures (15, 37 et 45°C) est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Ce test est réalisé en bouillon MRS. La croissance est appréciée par un trouble du milieu après

24 heures d'incubation à 15, 37 et 45°C en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (Hassaine, 2013).

Le test de croissance à différentes températures a montré que les souches SS1, SS2 et SS10, et de SL1 à SL9 peuvent pousser entre 15° et 37°C mais n'ont pas pu pousser à 45°C : ce sont des bactéries mésophiles (tableau 7).

Tableau 7 : Résumé du test de croissance à différentes températures.

Souches	Température		
	15°C	37°C	45°C
SL1	+	+	-
SL2	+	+	-
SL3	+	+	-
SL4	+	+	-
SL7	+	+	-
SL8	+	+	-
SL9	+	+	-
SS1	+	+	-
SS2	+	+	-
SS10	+	+	-

+ : test positif / - : test négatif

IV.1.2. Résultats de l'identification par les galeries Api 20A

Après avoir effectué les examens de la recherche de la catalase, de l'oxydase et de la coloration de Gram, toutes nos bactéries sont Gram positives, catalase et oxydase négatives et sont présumées comme bactéries lactiques (Kihal, 1996 ; Carr et al., 2002).

Les résultats qu'a révélés l'analyse par les Api 20A sont ci-dessous illustrés dans la figure 15 :



Figure 15 : Résultats des profils obtenus après 24 h d'incubation, restant inchangés après 48 h de nos isolats bactériens sur Api 20A.

Les souches se rapprochent dans le profil sucre car elles fermentent tous les sucre de la galerie (résultat positif après ajout du réactif BCP). L'analyse des résultats par le site web Biomérieux a révélé les espèces suivantes :

- *L. fermentum* capable de dégrader l'esculine (SL1 à SL10) : absence de fluorescence sous UV.
- *L. brevis* incapable de dégrader l'esculine (SS1, SS2 et SS10) : absence de fluorescence sous UV.

La distinction entre-elles était basée sur le test de la production d'acétoïne (**Abbassa et Moussa, 2018**) et la dégradation de l'esculine.

Ces résultats sont très en accord et complètent les données trouvées par **Abbassa et Moussa (2018)**.

IV.2. Résultats de la démarche comportementale des souris

Le cerveau est particulièrement sensible aux carences en donneurs de groupements méthyles puisque les groupes méthyles sont essentiels à sa fonction (**Kirsch et al., 2013**). Des études épidémiologiques ont montré que des déficiences dans le métabolisme de la vitamine B12, soit alimentaires, soit génétiques, sont associées à des troubles neurologiques (**Wei et al., 2011**). En effet, une déficience en vitamine B12 est associée à une accélération du déclin cognitif, un vieillissement anormal des structures cérébrales et à la démence (**Clarke, 2006; Scalabrino, 2009**).

Les souris TCblR (Transcobalamin cobalamin receptor) / CD320 KO (notées KO) n'expriment pas le récepteur de la transcobalamine fonctionnel, donc l'absorption cellulaire de la vitamine B12 par cette voie n'est pas possible. En conséquence, l'appauvrissement de la vitamine B12 se produit dans le cerveau des souris TCblR / CD320 KO contrairement au cerveau des souris Wild Type (notées WT) qui présentent une expression normale de TCblR (**Quadros et al., 2010**).

Afin d'étudier les performances cognitives liées au comportement chez la souris, un test de labyrinthe aquatique a été réalisé par **Mimoun (2017)**. Les données comportementales sont représentées sur la figure 19. L'analyse des résultats après 4 sessions consécutives d'apprentissage a montré que les souris KO (déficientes en B12 dans le cerveau) avaient une latence de sortie du labyrinthe plus longue et un nombre

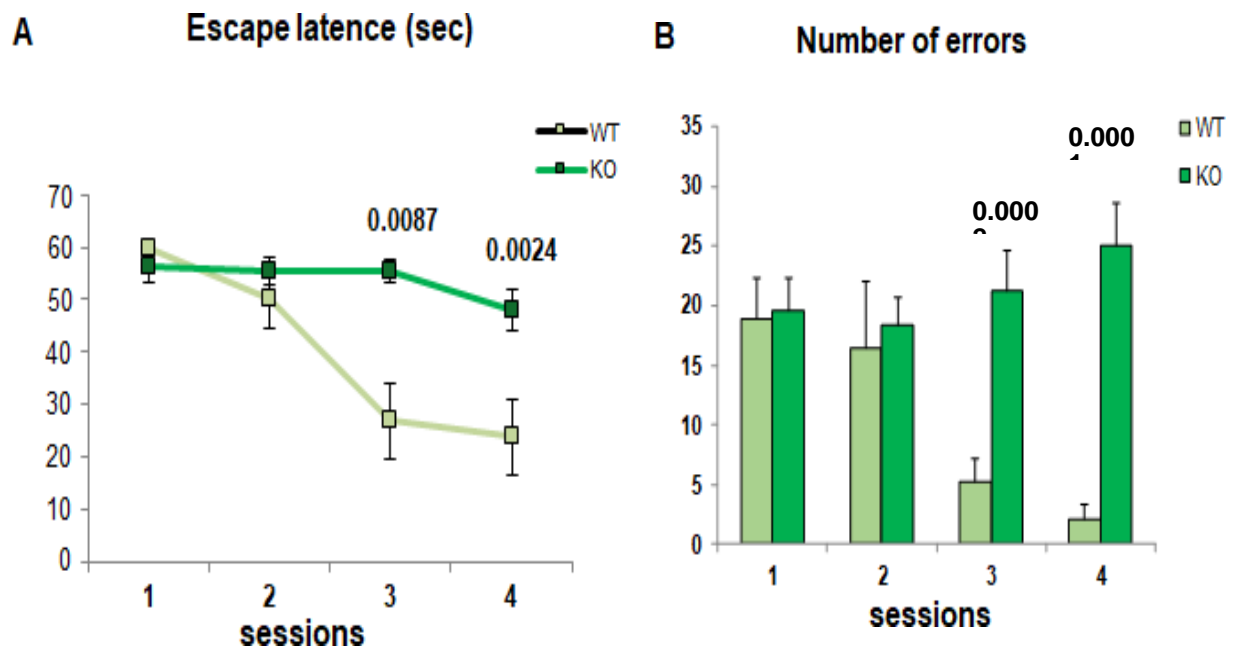


Figure 16 : Principaux paramètres obtenus dans le test du labyrinthe aquatique pour les souris wild-type (WT) et knock-out CD320 (KO) (A, B). Aucune différence n'a été enregistrée entre les mâles et les femelles dans chaque groupe. Donc, les données ont été regroupées pour chaque sexe (**Quadros et al., 2010 ; Mimoun, 2017**).

Les données représentent la moyenne \pm S.D. ; N = 6 à 9/ groupe. Test ANOVA, différence entre animaux wild-type et knock-out.

d'erreurs commises plus élevé que les souris WT témoins (figure 16A et B). Les résultats décroissants, obtenus pour chaque paramètre chez les souris WT selon les sessions, montrent des capacités croissantes pour apprendre à échapper au labyrinthe, au contraire des souris KO.

Afin de tester le rôle putatif du stress et des corticoïdes dans la régulation de l'apprentissage, **Mimoun (2017)** a injecté des doses physiologiques d'hydrocortisone (8 mg / kg / jour I.P.) dans les souris WT et les souris KO juste avant d'effectuer à nouveau le labyrinthe aquatique. Les résultats ont montré une normalisation des performances puisque les latences d'évasion et le nombre d'erreurs obtenues par les deux groupes de souris n'étaient pas significativement différents.

L'hypothèse de l'implication de l'axe du stress et plus particulièrement des corticoïdes semble être confirmée à la fois par des résultats comportementaux et histopathologiques. En effet, en utilisant un test de champs ouvert, **Mimoun (2017)** a montré que les souris KO présentait essentiellement (c'est-à-dire sans stimulation) un niveau de stress plus faible puisqu'elles ont passé une partie significativement moins importante du temps à rester dans les zones non protégées par rapport aux souris témoins WT (figure 17). De plus, les souris KO produisent significativement moins de fèces dans les situations comportementales que les souris WT; ce qui représente également un indice de niveau de stress basal plus faible chez les KO.

Enfin, un dosage plasmatique du cortisol circulant montre que les souris WT et KO produisent le même niveau de cortisol en situation non-stressante (prélèvement réalisé dans leur boîte d'élevage). Un dosage réalisé immédiatement après la 5eme session du test du labyrinthe aquatique montre également que les niveaux de cortisol sont équivalents entre WT et KO; et que ce labyrinthe n'engendre pas plus de stress qu'une situation en boîte d'élevage. Mais lors d'une situation de stress, comme par exemple la stimulation par choc électrique, les souris KO produisent significativement plus de cortisol que les souris WT (figure 17).

Il a été trouvé que le microbiote intestinal influence les comportements de type anxieux et dépressif de souris, et influence la physiologie de ces animaux (**Mir, 2017**).

Comme les probiotiques sont impliqués dans la production de la vitamine B12, tout déficit en cette vitamine implique un désordre du microbiote intestinal et l'augmentation de la probabilité d'atteintes de types neuro-psychiatrique. C'est dans ce contexte que nous avons voulu faire notre expérimentation sur les souris.

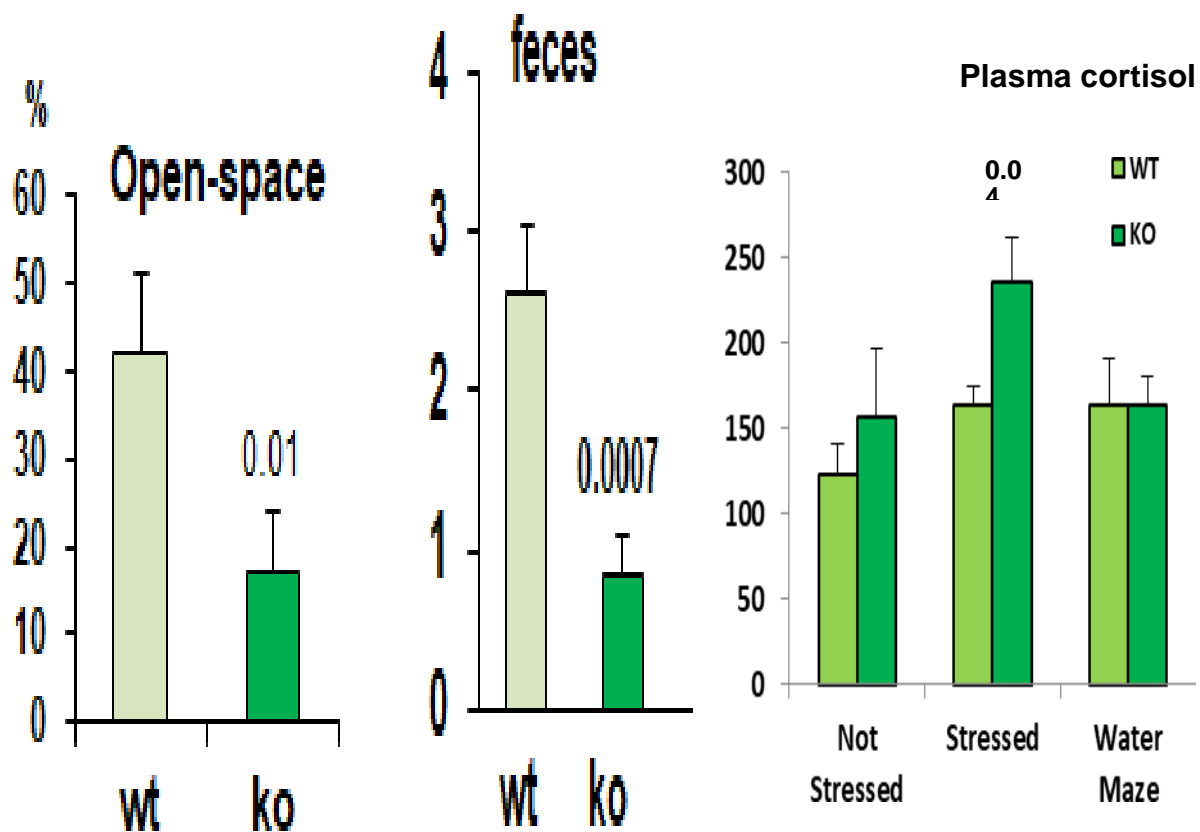


Figure 17 : L'évaluation des indicateurs de stress. Le paramètre présence dans la zone la plus protégée (près des parois) du test de l'Open-field est présenté (panneau de gauche). Le nombre de fécès produits pendant les 5min du test est présenté (panneau du milieu) (Mimoun, 2017).

Les dosages du cortisol plasmatique dans 3 situations sont présentés (panneau de droite):

"not stressed" = prélèvement sanguin par anesthésie douce dans la boîte d'élevage;

"stressed" = prélèvement sanguin 15min après un choc électrique aux pattes des souris;

"Water maze" = prélèvement sanguin 15min après la 5eme session dans le labyrinthe aquatique).

Conclusion

CONCLUSION

La vitamine B12 ou cobalamine, est indispensable au fonctionnement normal du cerveau. Elle est synthétisée uniquement par les bactéries, les champignons microscopiques et les algues. Il est donc nécessaire de consommer des produits animaux (œufs, viande, poisson) hébergeant ces microorganismes pour en assurer la synthèse ou disposer de bactéries capables de synthétiser la cobalamine.

Ce travail est la continuité de celui de **Abbassa et Moussa (2018)** qui ont réussi à isoler des bactéries lactiques productrices de cobalamine. Toutefois, il faut savoir tout d'abord que les différentes souches bactériennes provenant du même milieu d'isolement, comme le cas ici du lait maternel ou de selles de bébés sains, ne sont pas équivalentes en termes d'effets biologiques et cliniques. De ce fait, les résultats de travaux sur une souche donnée ne peuvent être extrapolés à une autre souche, même si elles appartiennent au même genre ou à la même espèce bactérienne. C'est pourquoi la première partie *in vitro* réalisée visait à continuer l'identification de ces isolats initialement identifiés. Cette approche est effectuée par les étapes suivantes :

Identification des isolats des souches de lait maternel et de selles de bébé par les tests usuels : coloration de Gram, catalase, oxydase, nitrate réductase, croissances à différence de températures et une identification par comparaison des profils fermentaires des sucres en utilisant les Api 20A de Biomérieux. Nos résultats ont permis de constater que toutes les isolats sont Gram positives, catalase et oxydase négatives et sont présumées comme bactéries lactiques mésophiles. Les souches se rapprochent dans le profil sucre car elles fermentent tous les sucres de la galerie. La distinction entre les isolats était possible en se référant aux tests de la production d'acétoïne réalisé par **Abbassa et Moussa (2018)** et celui de la dégradation de l'esculine réalisé par Api20A.

L'analyse des résultats par le site web Biomérieux a révélé les espèces suivantes :

- *L. fermentum* capable de dégrader l'esculine (les isolats de SL1 à SL10) : absence de fluorescence sous UV.
- *L. brevis* incapable de dégrader l'esculine (les isolats SS1, SS2 et SS10) : absence de fluorescence sous UV.

Ces résultats sont très en accord et complètent les données trouvées par **Abbassa et Moussa (2018)**.

Les résultats de l'étude *in vivo* est ceux de **Mimoun (2017)**. Conformément aux déficits comportementaux, le modèle knock-out montre une diminution de l'expression comportementale. Les souris KO (déficientes en B12 dans le cerveau) avaient une latence de sortie du labyrinthe plus longue comparées aux souris témoins WT. Ces observations ont été confirmées par le test de champs ouvert où **Mimoun (2017)** a montré que les souris KO présentaient essentiellement un niveau de stress plus faible puisqu'elles ont passé une partie significativement moins importante du temps à rester dans les zones non protégées par rapport aux souris témoins WT. L'apport probiotique par des souches productrices de cobalamine pourrait faire reculer davantage les scores élevés de stress. C'est dans ce contexte que nos prévisions étaient dessinées.

Faute de la persistance de la pandémie de Covid-19, ce travail a été arrêté au niveau de sa partie *in vivo*. Comme continuité de tout travail de recherches utile, il serait intéressant:

- De faire l'identification moléculaire des différents isolats et la mise en évidence de leurs caractéristiques probiotiques.
- De réaliser effectivement la partie *in vivo* décrite dans le protocole expérimental de ce travail.

*Les références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

- Abbassa ,A. & Moussa, I., 2018. La production de cobalamine par les bactéries probiotiques. Mémoire de master. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, pp. 65.
- Adlerberth I, Wold AE. 2009. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatrica* 98(2):229-238.
- Alais (1975). Charles, société d'édition et de publicité agricoles industrielle et commerciale.,3 :807p.
- Andrés, E. et al., 2004. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *Cmaj*, 171(3), pp.251–259. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15289425> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC490077>.
- Anonyme 1: Science Daily et Environmental Microbiology *19T*, 2013).
- Apostolou E., Kirjavainen P. V., Saxelin M., Rautelin H., Valtonen V., Salminen S.J., Ouwehand A.C.,(2001b) Good adhesion properties of probiotics: a potential risk for bacteremia. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 31: 35-39.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473(7346):174-180.

B

- Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307(5717):1915-1920.

- Bäckhed, F., H. Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. F. Semenkovich and J. I. Gordon (2004). "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(44): 15718-15723.
- Ball, G., 1998. Vitamin B12. In G. F. M. Ball, ed. *Bioavailability and Analysis of Vitamins in Foods*. Boston, MA: Springer US, pp. 497–515. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3414-7_14.
- Bernalier-Donadille A. (2004). Principales fonctions métaboliques de la flore intestinale de l'homme. In : Rambaud JC, Buts JP, Conthier G, Flourié B, eds. *Flore microbienne intestinale*. Montage : John Libbey Eurotext : 61-80.
- Biavati B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Ann Microbiol.* 50: 117-131.
- Blaut M, Collins M, Welling G, Dore J, Van Loo J, De Vos W. 2002. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. *British Journal of Nutrition* 87(2):203-211.
- Bond, M. et al., 2013. Use of model organisms for the study of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1832(11), pp.1842– 1865. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443913000136>.
- Bourgeois C.M et Larpent J .P., (1996). *Microbiologie alimentaire T2; aliments fermentés et fermentations alimentaire*. Ed. Technique et documentation : 523p.
- Bourgeois, C., Mesclé, J et Zucca, J. (1996). *Microbiologie alimentaire, aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments .tome1*.Edition: Toc, Lavoisier. . pp: 272-293.
- Brown, K.L., 2005. Chemistry and enzymology of vitamin B12. *Chemical Reviews*, 105(6), pp.2075–2149.

- Campeotto F, Waligora-Dupriet A, Doucet-Populaire F. (2007). Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né. *Gastroentérologie Clinique et Biologique.*, 31:533-542.
- Charalampopoulos D, Rastall RA. 2009. *Prebiotics and probiotics science and technology*: Springer.
- Cibik R., F. Marcille, G. Corthier, et J. Dore, “La flore intestinale : mise en place, description et influence du mode d’alimentation,” *Arch. Pédiatrie*, vol. 11, no. 6, pp. 573–575, Jun. 2004.
- Cummings JH. 1998. Dietary carbohydrates and the colonic microflora. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 1(5):409-414.

D

- Da Silva, V.C. et al., 2014. Effect of vitamin B deprivation during pregnancy and lactation on homocysteine metabolism and related metabolites in brain and plasma of mice offspring. *PLoS ONE*, 9(4), pp.1–8.
- Delarras C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d’analyse ou de de contrôle...produits cosmétique ,eaux produits pharmaceutique* Edi .Tec et Doc Lavoisier (paris).
- Doré J, Corthier G.(2010). Le microbiote intestinal humain. *Gastroentérologie Clinique et Biologique.*;34(4):7-16.
- Ducluzeau R, Raibaud P. (1979-1995). *Écologie microbienne du tube digestif : ces microbes qui nous protègent*. Masson éd., Paris. France.
- Duncan S, Louis P, Flint H. 2007. Cultivable bacterial diversity from the human colon. *Letters in Applied Microbiology* 44(4):343-350.
- Dunne C., O'Mahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., O'Halloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O 'Sullivan G. C., Shanahan F., & Collins J. K, 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 386-392.

F

- FAO/OMS (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS) .*Working Group Report*. Cordoba, Argentina.
- FAO/OMS (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS). Working Group Report. London, Ontario, Canada.
- Federici, L. et al., 2007. Manifestations hématologiques de la carence en vitamine B12: données personnelles et revue de la littérature. *La Revue de Médecine Interne*, 28(4), pp.225–231. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S024886630600751X>.
- Fonty G, Chaucheyras-Durand F, editors. 2007. Les écosystèmes digestifs.
- Forchielli ML, Walker WA. (2005). The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr*-93(suppl) : S41-S48.
- Fuller R (1991). Probiotics in human medicine. *Gut*. 32: 439-442.

G

- Gill H. S., Rutherford K. J., Prasad J., & Gopal P. K., 2000. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *British Journal of Nutrition*, 83, 167-76.
- Gilliland SE & Speck ML. (1977). Antagonistic action of lactobacillus acidophilus toward intestinal and food borne pathogens in associative culture. *J food Prot* 40, 820-823.
- Gras-Le Guen C, Launay E, Colas H, Potel G, Caillon J. (2011). Microbiote intestinale et antibiothérapie périnatale. *Journal des Anti-Infectieux*.;13(2):103-108.
- Gray, E.G., 1955. An Asymmetrical Response of Teleost Melanophores. *Nature*,

175(4458), pp.642–643. Available at:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/175642b0>.

- Guiraud J.P., (2003). Microbiologie alimentaire. Technique d'analyse microbiologiques. Ed, Dunod, Paris, 2003, 651, P.

H

- Hassaine O, 2013. Caractéristiques d'intérêt technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien .Thèse de doctorat en biotechnologie. Université d'Oran.
- Hehemann JH, Correc G, Barbeyron T, Helbert W, Czjzek M, Michel G. 2010. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature* 464(7290):908-912.
- Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr.* 73: 365S-373S.
- Hooper LV, Gordon JI. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292(5519):1115-1118.
- Hsieh MH, Versalovic J (2008). The Human Microbiome and Probiotics: Implications for Pediatrics. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health. Care.* 38:309-327.

I

- Ishibashi N., Shimamura S., (1993). Bifidobacteria: Research and development in Japan. *Food Technol.* 47: 126-135.
- Ishibashi N., et Yamazaki S., (2001). Probiotics and safety. *Am J Clin Nutr;* 73(Suppl): 465S-470S.
- Ismail AS, Hooper LV. 2005. Epithelial cells and their neighbors. IV. Bacterial contributions to intestinal epithelial barrier integrity. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 289(5):779-784.

J

- Jean-Christoph Lagire, DESC de Maladie Infectieuse et Tropicale 10avril 2017.IHU Méditerranée Infaction, Marseille, Microbiotedigestivedoce , jean-christophie.lagier@univamu.fr .

K

- Kaufmann P, Pfefferkorn A, Teuber M, Meile L. 1997. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Appl Environ Microbiol.* 63: 1268-1273.
- Kaur IP, Chopra K, Saini A (2002). Probiotics, potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15:1–9.
- Kimberly Kozak, Duane Charbonneau, Rosemary Sanozky-Dawes & Todd Klaenhammer. (2015). Characterization of bacterial isolates from the microbiota of mothers' breastmilk and their infants, *Gut Microbes*, 6:6, 341-351.
- Kimura K., McCartney A. L., McConnell M. A., & Tannock G. W., 1998. 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*, 63, 3394-3398.
- Kovacs L.G., ballati P.A., kroshman H.B. et Pueppke S.G.(1995).transcription alorganisation and expression of nol XWBTUV.A locus that regulate cultivar-specific nodulation soybean by *Rhizobium fredii* USDA257 *Mol.Microbiol.*17:923-933.
- Kräutler, B. & Kr, B., 2005. Vitamin B 12: chemistry and biochemistry 1 .. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 4), pp.806–810.

L

- Lai, S.-C. et al., 2013. The transcobalamin receptor knockout mouse: a model for vitamin B12 deficiency in the central nervous system. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(6),

pp.2468–75. Available at:
[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3659357&tool=pmcentrez
&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3659357&tool=pmcentrez&rendertype=abstract).

- Langan, R.C. & Zawistoski, K.J., 2011. Update on vitamin B12 deficiency. *American Family Physician*, 83(12), pp.1425–1430.
- Larpent J-P., (1996) b. Laits et produits laitiers non fermentés In *Microbiologie alimentaire: Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments*. Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. Tome1, Tec & Doc, Lavoisier, pp: 272-294.
- Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2005. Getting better with bifidobacteria. *J Appl Microbiol*. 98: 1303-1315.
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. 2006a. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124(4):837-848.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. 2006b. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444(7122):1022-1023.
- Li, Y.-J. et al., 2017. Dietary Supplement for Core Symptoms of Autism Spectrum Disorder: Where Are We Now and Where Should We Go? *Frontiers in Psychiatry*, 8, p.155.
- Liévin-Le Moal V, Servin . (2006). The front line of enteric host defence against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucin, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(2): 315-337.
- Lindberg E, Adlerberth I, Hesselmar B, Saalman R, Strannegård IL, Åberg N, Wold AE. 2004. High rate of transfer of *Staphylococcus aureus* from parental skin to infant gut flora. *Journal of Clinical Microbiology* 42(2):530-534.

M

- Mabrouk, E. El et al., 2015. Troubles neurologiques par carence en vitamine B12 : étude rétrospective de 29 cas. *Revue Neurologique*, 171(Supplement 1), p.A107. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0035378715002672>.
- Macfarlane S, Dillon J. 2007. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 102(5):1187-1196.

- Matilla-Sandholm T, Myllärinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fondén R, Saarela M (2002). *Technological challenges for future probiotic foods. Inter. Dairy. J. 12 :173-182.*
- Mattila-Sandholm T., Myllarinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fonden R., Saarela M., (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J. 12:173-182.*
- Melmed G., Thomas L.S., Lee N., Tesfay S.Y., Lukasek K., Michelsen K.S., Zhou Y., Hu B., Arditi M., Abreu M.T., (2003)., Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependant bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J Immunol; 170: 1406-1415.*
- Mimoun Khalid. Effets de la carence en vitamine B12 au niveau cérébral chez le modèle murin in- validé pour le gène CD320 : approche comportementale et mécanismes moléculaires de l'apprentissage hippocampo-dépendant. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2017.
- Mir Hayatte-Dounia. Influence de l'indole produit par le microbiote intestinal sur les comportements émotionnels chez la souris. Thèse en Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Saclay, 2018.
- Moreau MC. (2004). Influence de la microbiologie intestinale sur l'immunité é de l'hôte : conditions physiologiques. In : Rambaud JC, Buts JP, Conthier G, Flourié B, eds. Flore microbienne intestinale. Montage : John Libbey Eurotext : 131-49.
- Mota, A. et al., 2016. Neuropsychiatric manifestations of vitamin B12 and folate deficiencies: Data from an inpatient psychiatric department. *European Psychiatry*, 33(Supplement), p.S371. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924933816013377>.

N

- Namour, F. et al., 2011. Luminal expression of cubilin is impaired in imerslund gräsbeck syndrome with compound AMN mutations in intron 3 and exon 7. *Haematologica*, 96(11), pp.1715–1719.

O

- Obeid, R., 2013. The Metabolic Burden of Methyl Donor Deficiency with Focus on the Betaine Homocysteine Methyltransferase Pathway. *Nutrients*, 5(9), pp.3481–3495. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3798916/>.
- O'Hara AM, Shanahan F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports* 7(7):688- 693.
- Olivares M, Diaz-Ropero MP, Martin R, Rodriguez JM, Xaus J.(2006).Antimicrobial potential of four Lactobacillus strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol.*, 101:72–79.
- Ouwehand A. C., Kirjavainen P. V., Gronlund M. M., Isolauri S. J., & Salminen S., 1999. Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal*, 9, 623-630.
- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Ant. Van. Leeuw.* 82: 279–289.

P

- Pannaraj P, Li F, Cerini C, et al. Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. *JAMA Pediatrics*, 2017;
- Patel RM, Lin PW (2010). Developmental biology of gut-probiotic interaction. *Gut. Microbes.* 1:186-195.
- Pedersen, G.A. et al., 2010. AMN directs endocytosis of the intrinsic factor-vitamin B12 receptor cubam by engaging ARH or Dab2. *Traffic*, 11(5), pp.706–720.
- Pedone CA, Arnaud CC, Postaire ER, Bouley CF, Reinert P. 2000. Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea. *Int J Clin Pract.* 54: 568-571.

- Pétavy-Catala, C. et al., 2003. Signes buccaux révélateurs d'une carence en vitamine B12 avant l'apparition d'une anémie. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 1342(2),p.157 YP-249.
- Preidis GA, Hill C, Guerrant RL, Ramakrishna BS, Tannock GW, Versalovic J 118 (2011). Probiotics, enteric and diarrheal diseases, and global health. *Gastroenterology*. 140: 8-14.
- Prescott L.M., Harley. et Donald A. (2003). Microbiologie, De boeck université, 2eme édition française.128 :28-29.

Q

- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464(7285):59-65.
- Quadros, E. V, Nakayama, Y. & Sequeira, J.M., 2008. The protein and the gene encoding the receptor for the cellular uptake of transcobalamin bound cobalamin The Protein and the Gene Encoding the Receptor for the Cellular Uptake of E Mail: Edward.Quadros@downstate.edu. *October*, 113(1), pp.186–193.
- Quadros, E. V., Nakayama, Y. & Sequeira, J.M., 2009. The protein and the gene encoding the receptor for the cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin. *Blood*, 113(1), pp.186–192.
- Quadros, E. V., 2010. Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *British Journal of Haematology*, 148(2), pp.195–204.
- Quadros, E. V. et al., 2010. Positive newborn screen for methylmalonic aciduria identifies the first mutation in TCb1R/CD320, the gene for cellular uptake of transcobalamin-bound vitamin B12. *Human Mutation*, 31(8), pp.924–929. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2909035/>.
- Quadros, E. V., Lai, S. C., Nakayama, Y., Sequeira, J. M., Hannibal, L., Wang, S., Jacobsen, D. W., Fedosov, S., Wright, E., Gallagher, R. C., Anastasio, N., Watkins, D., & Rosenblatt, D. S. (2010). Positive newborn screen for methylmalonic aciduria identifies the first mutation in TCb1R/CD320, the gene for cellular uptake of

transcobalamin-bound vitamin B(12). *Human mutation*, 31(8), 924–929.
<https://doi.org/10.1002/humu.21297>

- Quigley EMM (2011). Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Cur. Opi. Pharm.* 11:593–603.

R

- Ralapanawa, D.M.P.U.K. et al., 2015. B(12) deficiency with neurological manifestations in the absence of anaemia. *BMC Research Notes*, 8, p.458. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4575440/>.
- RICHARD.V.J.,(1990). Production de lait cru de bonne qualité bactériologique. *MicrobHyg-alim* 2 (1) : 30-33.
- Robin J. et A. Rouchy, “Les probiotiques.” Centre d’étude et de développement de la nutrithérapie, Juin-2011.
- Rouvet M. 2004. Proceeding of the international symposium on propionibacteria and bifidobacteria: dairy and probiotic applications. Saint-Malo, France, June 2-4.

S

- Sacca, R. et al., 2010. Genetically engineered mouse models in drug discovery research. In G. Proetzel & M. V Wiles, eds. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 37–54. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-058-8_3.
- Sahoo, M.K., Avasthi, A. & Singh, P., 2011. Negative symptoms presenting as neuropsychiatric manifestation of vitamin B12 deficiency. *Indian Journal of Psychiatry*, 53(4), pp.370–371. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3267352/>.
- Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, Fonden R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland SE, Mattila-Sandholm T (1998). Demonstration of safety of probiotics - A review. *Int. J. Food. Microbiol.* 44(1-2): 93-106.
- Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, Fonden R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland SE, Mattila-Sandholm T. (1998).

Demonstration of safety of probiotics - A review. *Int. J. Food. Microbiol.* 44(1-2): 93-106.

- Sanders ME (2000). Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J. Nutr.* 130(Suppl): 384-390.
- Savage DC. 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Reviews in Microbiology* 31(1):107-133. Savage DC. 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Reviews in Microbiology* 31(1):107-133.
- Scardovi V. 1986. *Bifidobacterium*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sneath HA, Mair NS, Sharpe ME and Holt JG (Eds), vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp.1418-1434.
- Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord.* 2015;30(3):350-8.
- Scherer, K., 2003. Neurologic Manifestations of Vitamin B12 Deficiency. *New England Journal of Medicine*, 348(22), p.2208. Available at: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMicm020588>.
- Solis G, de Los Reyes-Gavilan CG, Fernandez N, Margolles A, Gueimonde M.(2010). Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe* ., 16:307–310.
- Sonnenburg JL, Angenent LT, Gordon JI. 2004. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine, *Nature Immunology* 5(6):569-573.
- Stabler, S.P., 2013. Vitamin B 12 Deficiency. *New England Journal of Medicine*, 368(2), pp.149–160. Available at: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMcp1113996>.
- Stanton C., Gardiner G., Meehan H., Collins K., Fitzgerald G., Lynch P. B., & Ross R . P.,2001. Market potential for probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 476-483.

T

- Tannock G. W., 1997. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends in Biotechnology*, 15, 270-274.
- Tannock GW.(2003). Probiotics: Time for a Dose of Realism. *Curr. Issues. Intest. Microbiol.* 4: 33-42.
- Thakkar, K. & Billa, G., 2015. Treatment of vitamin B12 deficiency Methylcobalamine[quest] cyanocobalamine[quest] Hydroxocobalamin[quest][mdash]clearing the confusion. *Eur J Clin nutr*, 69(1), pp.1–2. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ejcn.2014.165>.
- Turnbaugh PJ, Gordon JI. 2009. The core gut microbiome, energy balance and obesity. *The Journal of Physiology* 587(17):4153-4158.
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP. 2008. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457(7228):480-484.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. 2007. The human microbiome project. *Nature* 449(7164):804-810.

V

- Vasiljevic T, Shah NP (2008). Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy. J.* 18: 714–728.
- Vasiljevic T, Shah NP (2008). Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy. J.* 18: 714–728.
- Ventura M, van Sinderen D, Fitzgerald GF, Zink R. 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Anton Leeuw.* 86: 205-223.
- VIGNOLA C L.,(2002). Science et technologie du lait : Transformation du lait – Montréal : presse internationale polytechnique .p 600.

W

- Walter J. 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Applied and Environmental Microbiology* 74(16):4985-4996.

- Walter J, Ley RE. 2011. The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annual Review of Microbiology* 65:411-429.
- Ward P, and Roy D. 2005. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *Lait*. 85: 23-32.
- Watanabe, F., 2007. Vitamin B 12 Sources and Bioavailability. *Experimental Biology and Medicine*, 232(10), pp.1266–1274. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.3181/0703-MR-67>.
- Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*. 274: 1–14.
- WGO: World Gastroenterology Organisation. (2008). Probiotiques et prébiotiques. Recommandation pratique.
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(12):6578-6583.
- Wilson M. 2008. *Bacteriology of humans: an ecological perspective*. Malden, MA, USA: Blackwell Publishing Ltd.
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R. 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334(6052):105-108.

Z

- Zocco M, Ainora M, Gasbarrini G, Gasbarrini A. 2007. *Bacteroides thetaiotaomicron* in the gut: molecular aspects of their interaction. *Digestive and Liver Disease* 39(8):707-712.
- Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-van Vliet WM, de Visser JAGM, de Vos WM. 2001. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microbial Ecology in Health and Disease* 13(3):129-134.
- Zulfiqar, A.A. et al., 2012. Maladie de Biermer: De la physiopathologie à la clinique. *Medecine Therapeutique*, 18(1), pp.21–29.