



HAL
open science

Impact du microbiote intestinal sur le système immunitaire de l'enfant

Anne Grosdemange

► **To cite this version:**

Anne Grosdemange. Impact du microbiote intestinal sur le système immunitaire de l'enfant. Sciences pharmaceutiques. 2014. hal-01731902

HAL Id: hal-01731902

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01731902>

Submitted on 14 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITE DE LORRAINE
2014

FACULTE DE PHARMACIE

THESE

Présentée et soutenue publiquement à Nancy le 8 janvier 2014,

sur un sujet dédié à :

Impact du microbiote intestinal sur le système immunitaire de l'enfant

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par Anne GROSDÉMANGE

Née le 06/11/1989

Membres du jury :

Président : M. Raphaël DUVAL, Professeur des Universités.

Juges : M. François BOOB, Docteur en Pharmacie,
Mme Dominique FLORENTIN-BALLEE, Médecin Généraliste,
M. Gabriel TROCKLE, Maître de Conférences.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2013-2014

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Jean-Yves JOUZEAU

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS :

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du Collège d'Enseignement

Pharmaceutique Hospitalier :

Jean-Michel SIMON

Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :

Raphaël DUVAL

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POCHON

Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Chantal FINANCE	82	<i>Virologie, Immunologie</i>
Jean-Yves JOUZEAU	80	<i>Bioanalyse du médicament</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Jean-Claude BLOCK	87	<i>Santé publique</i>
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Luc FERRARI ✕	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND ✕	87	<i>Environnement et Santé</i>
Pierre LABRUDE (retraite 01-11-13)	86	<i>Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	32	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Mariette BEAUD	87	<i>Biologie cellulaire</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>

Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Caroline GAUCHER	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Christine PERDICAKIS	86	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

⌘ *En attente de nomination*

***Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

Ɖ' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

Ɖ'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

Ɖe ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



Remerciements

❖ A mon directeur de Thèse et Président du Jury :

Monsieur Raphaël DUVAL,

Professeur des Universités à la Faculté de Pharmacie de Nancy,

Laboratoire de Microbiologie clinique,

Je vous remercie d'avoir accepté de m'accompagner tout au long de ce travail. Bénéficier de vos compétences, de votre dynamisme et de votre disponibilité fut un réel privilège.

❖ A mes juges,

Madame FLORENTIN-BALLEE, Médecin Généraliste, Monsieur BOOB, Docteur en Pharmacie, Monsieur TROCKLE, Maître de Conférences, je vous adresse mes remerciements pour avoir participé à ce jury et pour avoir pris le temps de juger mon travail. **C'est un honneur pour moi d'avoir pu présenter cette thèse en votre présence et d'avoir pu la finaliser** avec votre soutien.

❖ A mes parents,

Je vous remercie de m'avoir porté aussi haut dans mon cursus universitaire et d'avoir cru en moi. Mon meilleur cadeau **aujourd'hui reste** la satisfaction que je peux voir en vous.

❖ A mes frères :

Merci à Olivier qui m'a éclairé vers le chemin de la pharmacie. Merci à Adrien pour son rôle indispensable de coach personnel. Merci à David **qui m'a sans cesse encouragé durant mes** plus jeunes études. Vous avez été les premiers à me soutenir dans **cette voie qu'est la** Pharmacie ainsi que les premiers à croire en mes capacités scientifiques et en mon sérieux. **J'ai pu**, grâce à vous, **m'épanouir à travers un métier que j'ai découvert année après année** et qui me séduit davantage jour après jour.

❖ A ma cousine :

Virginie, merci pour ton soutien et tes encouragements tout au long de ces six années **d'études.**

❖ A mes amis et collègues de promo :

Merci à Emilia, Hélène, Emilie, Ophélie, Candice, Gaëlle, pour votre amitié, votre douceur, votre présence et votre soutien. **J'adresse une pensée aux autres personnes qui m'ont soutenue et encouragée.**

Table des matières

Table des illustrations	9
Table des tableaux	11
Liste des abréviations.....	12
Introduction générale.....	1
Chapitre I - Les méthodes d'étude du microbiote intestinal	4
1) Techniques moléculaires quantitatives.....	7
1. Les techniques d'hybridation	7
2. La PCR en temps réel et le multiplexage	8
3. Le pyroséquençage	12
2) Techniques moléculaires qualitatives	12
1. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction	12
2. L'électrophorèse à champ pulsé	14
3. L'électrophorèse sur gel dénaturant	14
Chapitre II - Le système immunitaire.....	16
1) Les acteurs du système immunitaire	16
1. Les lymphocytes	17
2. Les autres cellules de l'immunité	25
3. Les cytokines	26
4. Le complexe majeur d'histocompatibilité	27
5. Le système du complément	30
2) L'immunité innée	32
3) L'immunité adaptative	33
Chapitre III - Le microbiote intestinal de l'enfant	37
1) Mise en place du microbiote intestinal à la naissance	37
2) Composition du microbiote intestinal et son évolution.....	41
3) Facteurs influençant la composition du microbiote intestinal	43
1. Les facteurs externes	43
2. Les facteurs internes liés à l'hôte	51
Chapitre IV - Impact du microbiote intestinal sur le système immunitaire.....	55
1) L'immaturité du système immunitaire à la naissance	56
2) L'immunité au niveau intestinal	57
3) Intervention du microbiote intestinal dans le développement du système immunitaire	60

4) Différences de composition du microbiote intestinal chez un enfant atopique	61
Chapitre V - Impact de certains compléments alimentaires sur le microbiote intestinal : Probiotiques, prébiotiques et synbiotiques.....	74
1) Présentation des probiotiques et des prébiotiques	74
2) Actions principales des probiotiques	76
3) Etudes cliniques recensées dans la littérature	78
4) Rôles des prébiotiques	85
Chapitre VI - Les produits et conseils en officine pour certaines pathologies courantes	87
1) Utilisations courantes des probiotiques et des prébiotiques	87
2) Quelques spécialités à demander à votre pharmacien à l'officine	90
1. Pour les enfants	91
2. Pour les adultes	92
Conclusion.....	95
Bibliographie.....	96

Table des illustrations

Figure 1 : Structure de l'ADN et de l'ARN	4
Figure 2 : Schéma illustrant l'ARNr 16S.	5
Figure 3 : Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence.....	8
Figure 4 : Schéma de la méthode PCR	9
Figure 5 : Illustration de la PCR SYBR®Green	10
Figure 6 : Illustration de la PCR Taqman	11
Figure 7 : Illustration de la méthode de pyroséquençage	12
Figure 8 : Illustration de la méthode RFLP	13
Figure 9 : Présentation d'une analyse par DGGE	14
Figure 10 : L'hématopoïèse	16
Figure 11 : Contact d'un lymphocyte B avec un antigène.....	18
Figure 12 : Présentation de la structure d'un anticorps	19
Figure 13 : Les différents types d'immunoglobulines	20
Figure 14 : Réponse humorale primaire et secondaire	20
Figure 15 : Activation d'un lymphocyte T auxiliaire	22
Figure 16 : Activation d'un lymphocyte T cytotoxique.....	22
Figure 17 : Lyse d'une cellule cible engendrée par l'activation d'un lymphocyte T cytotoxique	23
Figure 18 : Mode d'action d'un lymphocyte Natural Killer	24
Figure 19 : Schéma récapitulatif de l'activation des différents lymphocytes.....	24
Figure 20 : Cytokines et communication intercellulaire	27
Figure 21 : Le complexe majeur d'histocompatibilité	28
Figure 22 : Intervention du CMH dans la présentation de l'AG	29
Figure 23 : Formation du complexe de lytique par le système du complément	30
Figure 24 : Le système du complément	31
Figure 25 : Schéma récapitulatif du système immunitaire	35
Figure 26 : Présentation des deux principaux indices de diversité bactérienne.....	39
Figure 27 : Abondance relative des espèces bactériennes	44
Figure 28 : Facteurs influençant la mise en place du microbiote intestinal et le développement du système immunitaire.....	53
Figure 29 : Composition et répartition de la flore bactérienne intestinale	55
Figure 30 : Tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT)	58
Figure 31 : Réponse immunitaire contre un élément pathogène.....	59

Figure 32 : Tolérance vis-à-vis des bactéries commensales ou d'antigènes alimentaires	59
Figure 33 : Rupture de l'homéostasie du système immunitaire et ses conséquences	64
Figure 34 : Pourcentage de bifidobactéries présentes dans nos échantillons en fonction de la sévérité de la dermatite atopique	68
Figure 35 : Présentation d'un prick test cutané	69
Figure 36 : Le système immunitaire au niveau de la lumière intestinale	75
Figure 37 : Rôles bénéfiques des probiotiques au niveau intestinal	76
Figure 38 : Principales actions des probiotiques	77
Figure 39 : Illustration des probiotiques étudiés par la gamme de micro nutrition Nutergia	78
Figure 40 : Effets bénéfiques sur la santé humaine entraînés par la consommation de probiotiques	79
Figure 41 : Evolution de l'étude prospective en question	80
Figure 42 : Les points critiques des études actuelles concernant les bienfaits des pro-, pré- et des synbiotiques	83
Figure 43 : Modulation du système immunitaire par les probiotiques	84
Figure 44 : Causes et conséquences d'une hyperperméabilité intestinale.....	87
Figure 45 : Souches de probiotiques et cibles d'action	90

Table des tableaux

Tableau I : Etude des dix nouveaux nés brésiliens	38
Tableau II : Estimation de la richesse et de la diversité des espèces bactériennes présentes au moyen d'indices spécifiques.....	39
Tableau III : Prévalence et abondance relative des genres bactériens présents dans le microbiote intestinal de neuf nouveaux nés brésiliens.....	41
Tableau IV : Comparaison des compositions du lait humain et du lait de vache	46
Tableau V : Développement du système immunitaire.....	56
Tableau VI : Caractéristiques importantes de l'étude, résultats de la DGGE et indice de Shannon	62
Tableau VII : Quantités de copies de gènes d'ARNr 16S bactériens par microgramme de fèces chez les enfants atopiques et chez les enfants témoins.....	65
Tableau VIII : Présentation de l'étude sur les trois populations avec les groupes témoins et les groupes atopiques	66
Tableau IX : Diversité bactérienne du microbiote intestinal des enfants non atopiques et atopiques	66
Tableau X : Composition de la microflore fécale des patients présentant une dermatite atopique et des témoins.....	67
Tableau XI : Critères des enfants de l'étude.....	70
Tableau XII : Indice de Shannon à 1 semaine, 1 mois et à 12 mois d'âge chez nos enfants atopiques et chez nos enfants témoins.....	71
Tableau XIII : Caractéristiques des enfants de l'étude	81
Tableau XIV : Présentation des résultats de l'étude de la supplémentation en Lactobacillus casei versus placebo.	82

Liste des abréviations

AC:	Anticorps
ADNr 16S:	Acide désoxyribonucléique ribosomal 16S
AE:	Atopic eczema (voir DA)
AG:	Antigènes
AGCC :	Acides gras à chaîne courte
AR:	Abondance relative
ARNr 16S:	Acide ribonucléique ribosomal 16S
BCR :	Récepteurs des lymphocytes B
C :	Constante
CARD:	Caspase recruitment domain
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA:	Cellules présentatrices de l'antigène
CSH :	Cellule souche hématopoïétique
DA:	Dermite atopique, dermatite atopique, eczéma atopique
DGGE:	Denaturation gradient gel electrophoresis
ECUN:	Entérocolites nécrosantes du nouveau-né
FISH:	Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence
FOS:	Fructo-oligosaccharides
GALT:	Gut associated lymphoid tissue
GOS:	Galacto-oligosaccharides
HLA:	Antigènes leucocytaires humains
HMOS:	Human milk oligosaccharides
IBD:	Inflammatory bowel disease
Ig:	Immunoglobulines
IgA S :	IgA sécrétoires
Kb:	Kilos bases
KIR:	Killer inhibitory receptor
LB:	Lymphocytes B
LGG:	Lactobacillus rhamnosus GG
LPS:	Lipopolysaccharides
LRRs:	Leucine-rich repeats
LTc:	Lymphocytes T CD8+ cytotoxiques
LTh, CD4+:	Lymphocytes T helper, lymphocytes T auxiliaires
LTh0:	Lymphocytes T naïfs
L NK:	Lymphocytes Natural Killer

LTreg:	Lymphocytes T régulateurs
MALT:	Mucus associated lymphoid tissue
MAMPs:	Microbe-associated molecular patterns
MDP:	Muramyl dipeptide
MICI:	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
NCA:	Nutrition Cellulaire Active
NLRs:	Nucleotid binding domain, leucin-rich repeats
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
OTUs :	Unités taxonomiques opérationnelles ou taxons
PAMPs:	Pathogen-associated molecular patterns
Pb:	Paire de bases
PCR:	Polymerase chain reaction
PFGE:	Electrophorèse à champ pulsée
PNB, PNE et PNN :	Polynucléaires basophile, éosinophile et neutrophile
PRRs:	Pattern-recognition receptors
RFLP:	Polymorphisme de longueur de fragments de restriction
SII:	Syndrome de l'intestin irritable
TCR :	Récepteurs des lymphocytes T
TLRs:	Toll-like receptors
TGGE:	Temporal temperature gradient gel electrophoresis
T-RFLP:	Terminal restriction fragment length polymorphism
UFC :	Unité Formant Colonies (CFU : Colony Forming Unit)
V :	Variable
XOS :	Xylo-oligosaccharides

Introduction générale

Le microbiote humain regroupe les bactéries qui vivent dans notre organisme, autant **au niveau interne qu'externe**. Des bactéries résident notamment **au niveau cutané, au niveau buccal et au niveau intestinal**, elles constituent ce que l'on appelle **la flore cutanée, la flore buccale et la flore intestinale**. Cette dernière prend également le nom de microbiote intestinal. Ce microbiote intestinal est constitué **d'un quintillion soit 10^{13} cellules microbiennes, c'est-à-dire 10 fois plus de cellules que l'organisme humain à lui seul** (1). Notre corps héberge donc une population de bactéries ayant une diversité génétique supérieure à la diversité de notre propre génome. Cette population bactérienne **permet à l'Homme de compléter ses fonctions métaboliques**.

Le microbiote intestinal se compose de **plusieurs centaines d'espèces, sous-espèces et biotypes bactériens**, dont la majorité est anaérobie stricte (2). **Il est estimé qu'un ensemble d'environ 40 espèces représente 99% de la flore intestinale**. Les espèces bactériennes hébergées par ce microbiote intestinal jouent un rôle important à plusieurs niveaux : elles participent **à l'extraction des nutriments, à la régulation du stockage des graisses, à la stimulation du renouvellement de l'épithélium intestinal mais aussi à la maturation du système immunitaire** (3). **L'intestin constitue une interface importante avec l'environnement et représente une source d'exposition majeure aux antigènes** (4).

Au cours de mon parcours universitaire, **j'ai pu rencontrer un Pharmacien d'officine qui s'intéressait au rôle fondamental de l'intestin dans notre santé. J'ai alors voulu consacrer ma thèse à l'étude du microbiote intestinal et à son rôle dans l'immunité**. En effet, les modifications du mode de vie et les changements dans l'environnement sont responsables **depuis 1960 d'une flambée de manifestations allergiques telles que l'asthme, la rhinite allergique, l'eczéma atopique ou encore certaines intolérances alimentaires**. Parallèlement, on a constaté une émergence de maladies chroniques inflammatoires. Le Pharmacien **d'officine, en tant que professionnel de santé, doit pouvoir accompagner ces patients victimes de désagréments dans leur vie quotidienne, pouvoir les guider et les conseiller**.

La compréhension du rôle du microbiote intestinal, de sa composition et des facteurs pouvant le modifier, peut fournir de nouvelles cibles thérapeutiques. Il existe une **homéostasie entre la charge bactérienne et la réponse immunitaire de l'organisme**. **Lorsqu'un déséquilibre est créé, on parle alors de dysbiose, le risque pathologique s'installe, tout comme le risque allergique** (5).

Dans une première partie, nous évoquerons les **moyens qui permettent d'étudier la** composition du microbiote intestinal. Une seconde partie nous permettra de rappeler les principes et les acteurs clefs du système immunitaire. Dans une troisième partie, nous étudierons la mise en place ainsi que la composition du microbiote intestinal **chez l'enfant avant d'élucider dans une quatrième partie** son impact sur le système immunitaire. Pour finir **ce travail nous parlerons des compléments alimentaires ayant un pouvoir d'action sur la** composition de la flore intestinale. Ce sont les probiotiques et les prébiotiques. Nous citerons quelques unes des nombreuses spécialités désormais disponibles en officine. Je vous souhaite une excellente lecture parsemée de découvertes au fil des prochaines pages.

Chapitre I
Les méthodes d'étude du microbiote
intestinal

Chapitre I - Les méthodes d'étude du microbiote intestinal

Il existe une réelle diversité bactérienne autant quantitative que qualitative au niveau du système digestif. L'étude de cette diversité n'est pas simple et les techniques classiques de mise en culture ne permettent pas la mise en évidence de la totalité des espèces présentes. On estime que 60% de la microflore colique dominante de l'homme n'est pas cultivable (2). Ces dernières années, avec le développement de nouvelles techniques de biologie moléculaire, la représentation du microbiote intestinal devient de plus en plus proche de la réalité. Ceci a bien évidemment un coût. Ces nouvelles techniques d'identification sont basées sur la séquence de gènes et non plus seulement sur des caractéristiques morphologiques et métaboliques telles que sont la coloration de Gram, la fermentation des sucres ou encore la présence d'enzymes spécifiques.

Pour rappel, la figure 1 suivante illustre les structures de l'ADN (acide désoxyribonucléique) et de l'ARN (acide ribonucléique). L'ADN est composé de deux brins complémentaires en double hélice, dont chacun comporte des milliers de gènes qui se présentent sous la forme d'un enchaînement de nucléotides dans un ordre propre à chaque individu, constituant ce que l'on appelle son patrimoine génétique.

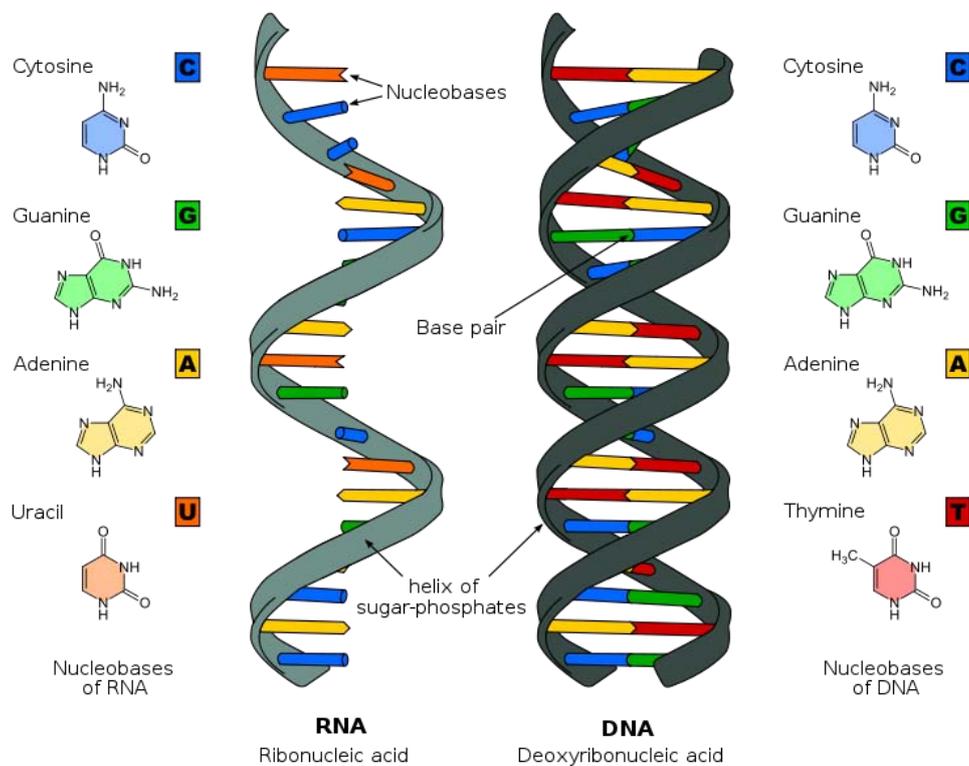


Figure 1 : Structure de l'ADN et de l'ARN

L'appariement des deux brins d'ADN se fait au moyen des bases présentes dans les nucléotides : l'adénine (A) s'apparie à la Thymine (T), et la cytosine (C) s'apparie à la guanine (G). L'ARN, qui lui est monobrin, est produit par transcription de l'ADN par une ARN polymérase. La thymine y est remplacée par de l'uracile (U) qui est une base qui s'apparie de la même manière à l'adénine.

C'est l'acide ribonucléique ribosomal 16S (ARNr 16S) et l'ADN correspondant qui sont principalement étudiés. La figure 2 nous présente cet ARNr 16S.

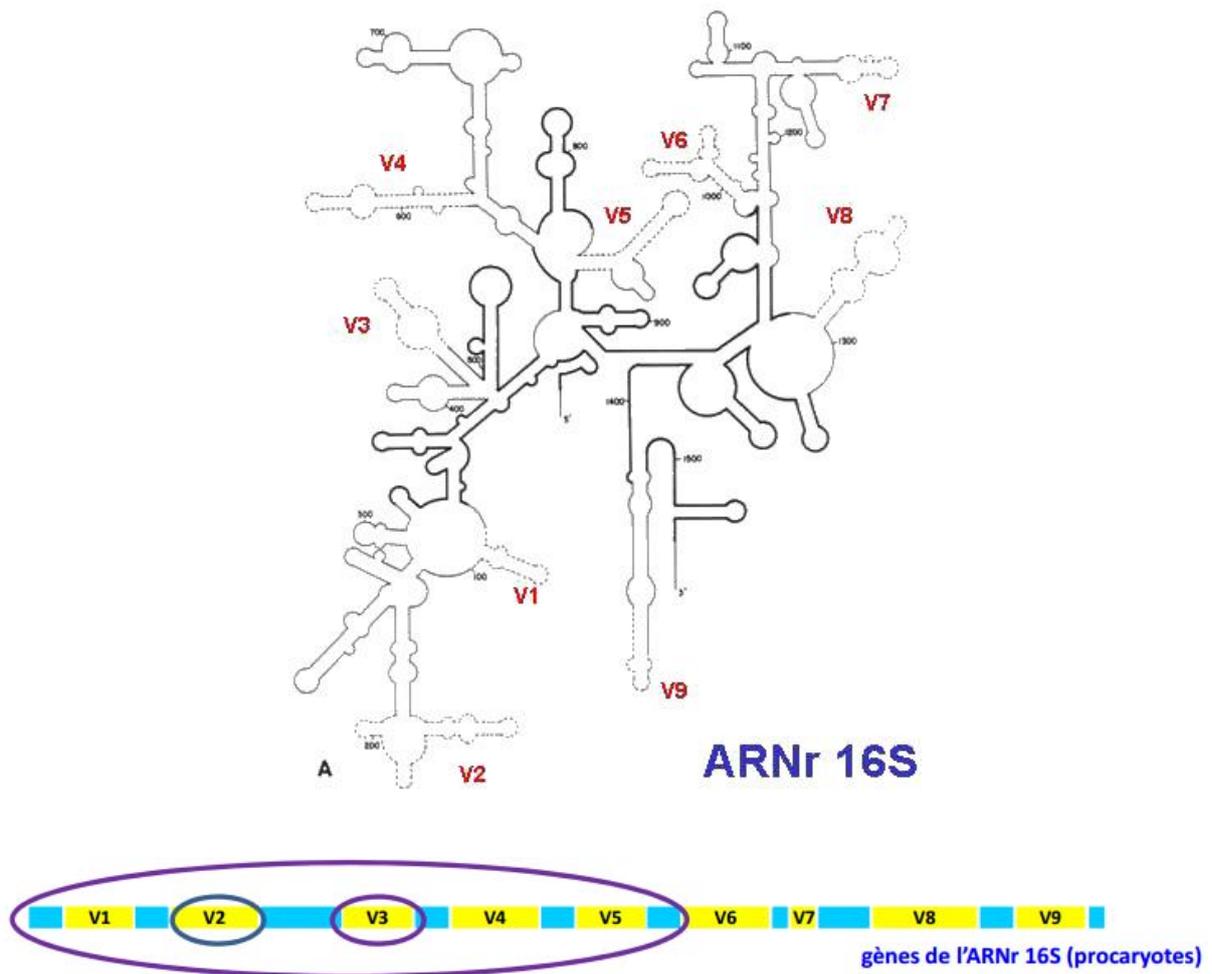


Figure 2 : Schéma illustrant l'ARNr 16S

(7)

Légende Figure 2

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

En effet, la nouvelle classification phylogénétique des bactéries se base sur des critères **de proximité génétique et non plus sur de simples critères phénotypiques**. L'ADNr 16S codant pour l'ARNr 16S correspondant étant la molécule la mieux renseignée dans les bases de données de séquences nucléotidiques, ceci en fait la base de la phylogénie bactérienne. Cette molécule d'ADNr 16S se compose de 1500 paires de bases (pb) et est ubiquiste chez toutes les bactéries. Il n'y a pas de transfert de gènes d'ADNr 16S entre les bactéries. L'ARNr 16S se compose de 9 régions hypervariables et de 10 régions conservées. Les régions conservées sont la source d'amorces (ou sondes) universelles, tandis que les régions hypervariables permettent de créer des amorces **spécifiques d'un groupe précis de bactéries** (8).

Cependant étudier **la totalité de l'ARNr 16S serait trop fastidieux, trop long et trop coûteux**. Il faut cibler une portion de séquences. Les nombreuses publications disponibles dans la littérature et qui étudient la constitution du microbiote intestinal ne se fondent pas sur **une même région**. Il n'existe aucun consensus qui recommande l'étude d'une région particulière. Ce manque de standardisation pose problème pour comparer les études qui évaluent la constitution du microbiote intestinal. Nous ne savons à quoi imputer les résultats. **A la séquence particulière utilisée dans l'étude ? Est-ce un hasard que plusieurs études basées chacune sur leur propre séquence cible d'ARNr 16S s'accordent ?** Pouvons-nous **mettre dans le même sac les conclusions de ces nombreuses études alors qu'elles n'emploient pas les mêmes protocoles ?** Raisonnablement nous ne devrions pas prendre ce risque. Ainsi les chercheurs vont être amenés pour le bien de tous **à se mettre d'accord**. **Dans le but de pouvoir mêler chaque conclusion à une nouvelle conclusion et de voir apparaître des contradictions justifiées et sans biais de mesure**. Les régions actuellement concernées dans **l'étude du microbiote intestinal sont les régions variables V2, V4 et V6** (1). Il serait temps de standardiser les méthodes pour que les études entreprises se complètent à juste titre. Il est également recommandé de regrouper les échantillons entre eux (1) afin de réduire le coût de **la méthode d'analyse en limitant le nombre de reproductions de la technique**. Il sera donc entrepris un marquage de chaque échantillon avec un code barre unique, pour enfin accéder **à la variabilité des échantillons en fin d'analyse, de façon informatisée**.

Dans un premier temps nous allons aborder les techniques **d'étude quantitatives** qui nous permettent de voir l'abondance des diverses bactéries constituant le microbiote intestinal, puis nous présenterons certaines techniques qualitatives qui nous permettent de cibler les espèces bactériennes qui y sont présentes.

1) Techniques moléculaires quantitatives

1. Les techniques d'hybridation

L'hybridation ponctuelle (dot blot) est une méthode semi-quantitative. Après extraction de l'ARN et de l'ADN présents dans les échantillons considérés, il y a dénaturation sous température et pH adéquats, c'est-à-dire rupture des liaisons hydrogènes présentes entre les deux brins. La température de passage de l'état bicaténaire à l'état monocaténaire s'appelle la température de fusion. L'ADN et l'ARN à présent dénaturés sont disposés sous forme de gouttes (dot) sur une membrane de nylon chargée positivement. Ces ARN et ADN sont nos cibles. On met alors en contact cette membrane avec des séquences d'acides nucléiques connues et spécifiques, ce sont les sondes. Celles-ci vont s'hybrider sur les régions d'intérêt de l'ARNr 16S. Ces sondes possèdent un marqueur radioactif à leur extrémité 5'. L'étape d'hybridation est longue, plusieurs heures, et s'effectue à une température spécifique pour chaque sonde. En effet, la température de fusion varie en fonction de différents paramètres tels que sont la composition en bases, la longueur des brins et le milieu environnant (notamment le pH). Il y a ensuite analyse du signal radioactif (9). La sonde Bact338 vise une région très conservée commune à la majorité des bactéries du microbiote intestinal, elle sert donc de référence et permettra de quantifier la proportion relative des autres populations bactériennes présentes dans l'échantillon (2).

L'hybridation est une technique assez sensible, avec un seuil de détection de 10^3 à 10^4 copies de gènes, et rapide. Elle ne nécessite aucune étape d'enrichissement ni de digestion enzymatique, et ne nécessite pas de séparation sur gel d'agarose. C'est l'usage de la radioactivité qui est un peu gênant car il faut en conséquence prendre des mesures de précaution durant la manipulation. De plus l'analyse des signaux doit se faire rapidement après l'hybridation car il y a une décroissance radioactive au cours du temps.

L'hybridation in situ en fluorescence (FISH), présentée par la figure 3 suivante, utilise des sondes marquées par un marqueur fluorescent ou fluorochrome.

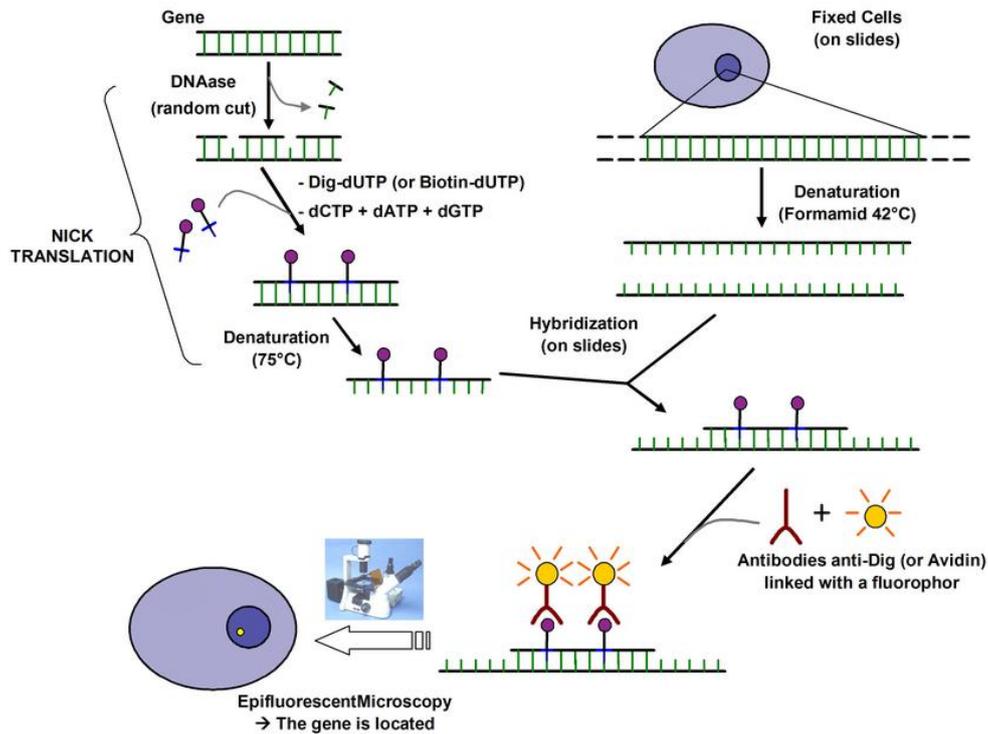


Figure 3 : Hybridation *in situ* en fluorescence

(10)

Le signal fluorescent est ensuite détecté rapidement par microscopie électronique ou par cytométrie de flux. L'auto fluorescence de certains échantillons peut fausser l'interprétation. Le souci majeur de cette technique est qu'on ne distingue pas les bactéries vivantes des bactéries mortes et que la sensibilité est faible avec un seuil de détection à 10^6 copies de gènes (2).

La technique des microarrays permet d'effectuer un grand nombre d'analyses en une seule manipulation (11). On utilise plusieurs sondes de marqueurs distincts afin de détecter la présence simultanée de plusieurs cibles dans nos échantillons. Cette méthode a récemment été utilisée dans l'étude du développement du microbiote intestinal de l'enfant dès sa naissance (1). On l'utilise pour estimer l'abondance des différents groupes bactériens présents dans nos échantillons.

2. La PCR en temps réel et le multiplexage

La « Polymerase Chain Reaction » (PCR) est une technique de réplication ciblée *in vitro* qui permet d'obtenir d'un échantillon complexe et peu riche un grand nombre de copies d'une séquence de nucléotides donnée. En quelques heures on obtient plusieurs millions de

copies de la séquence. L'amplification est exponentielle puisque d'un cycle de PCR à l'autre le nombre de séquences à répliquer double.

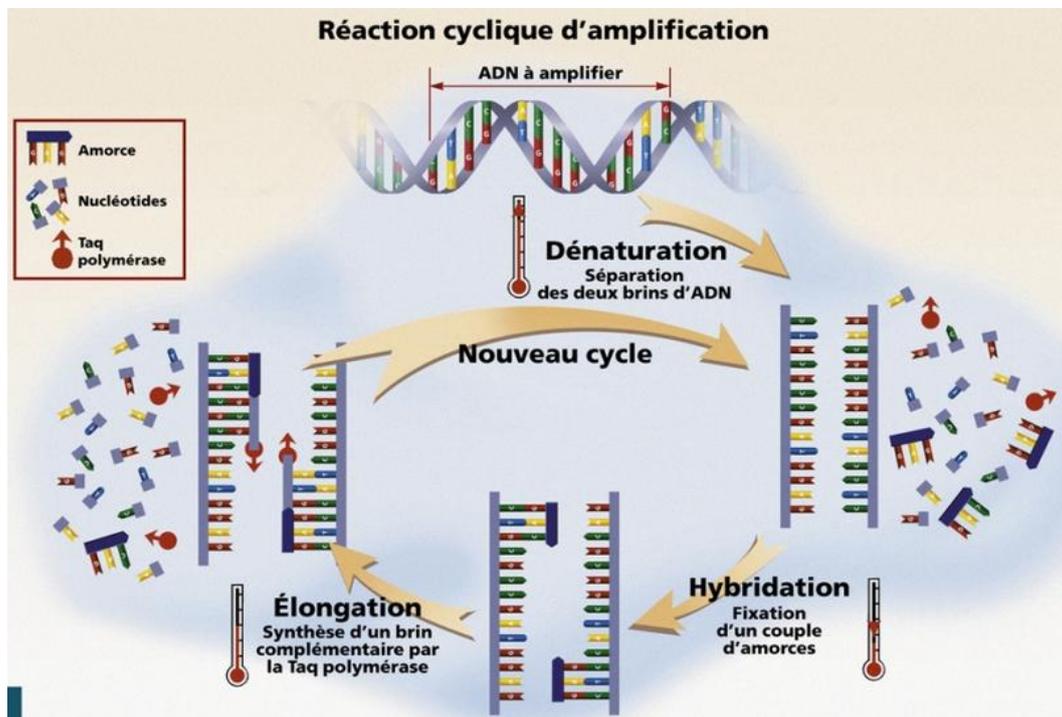


Figure 4 : Schéma de la méthode PCR

(12)

La figure 4 nous représente le protocole de cette méthode. Il s'agit d'ajouter à l'ADN à amplifier des amorces spécifiques du segment d'ADN voulu, de l'ADN polymérase et un mélange des quatre désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN. Tous sont ajoutés en large excès par rapport à l'ADN (13). La séquence cible à amplifier est déterminée par le couple d'amorces choisi. Chaque cycle de PCR est composé de 3 étapes successives à 3 températures différentes : La dénaturation des 2 brins, l'hybridation puis l'élongation.

La détection quantitative des produits d'amplification met en jeu soit des agents se liant à l'ADN double brin (agents intercalant), soit des sondes fluorescentes. Dans le premier cas, l'agent intercalant le plus utilisé est le SYBR®Green (14) et on parle alors de PCR SYBR®Green comme dans la figure 5 ci-dessous. L'agent intercalant émet une fluorescence plus importante lorsqu'il s'insère entre 2 brins complémentaires d'ADN lors de l'étape de polymérisation de la PCR.

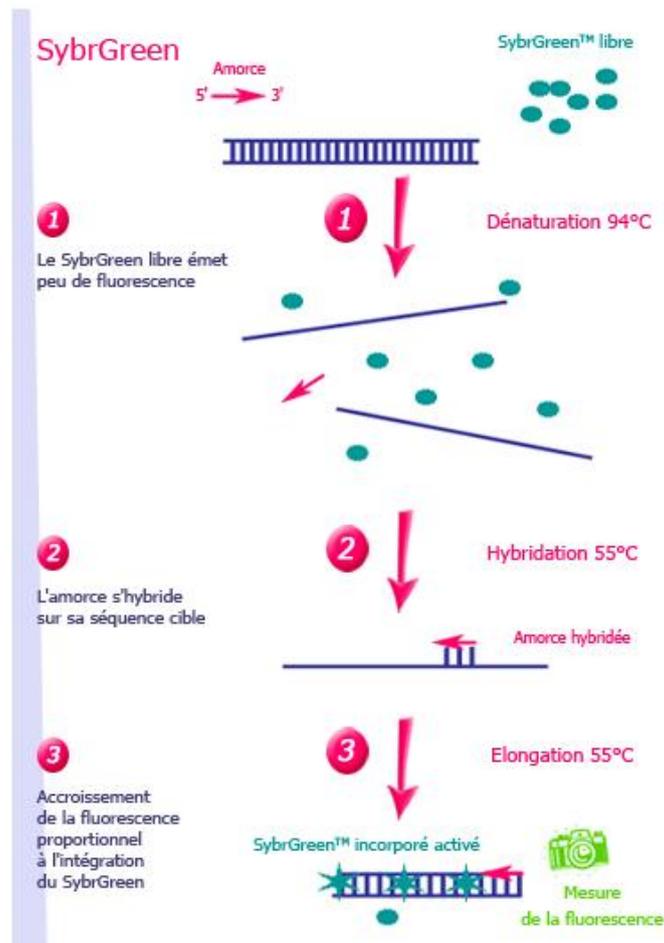


Figure 5 : Illustration de la PCR SYBR®Green

(15)

Les sondes fluorescentes ont une spécificité meilleure et une capacité de multiplexage plus importante que les agents intercalant. La PCR Taqman est l'une des méthodes utilisant des sondes fluorescentes. Dans cette méthode, présentée dans la figure 6, les sondes sont marquées par un fluorochrome émetteur à leur extrémité 5', et un fluorochrome suppresseur (ou quencher) à leur extrémité 3' qui inhibe l'émission de l'émetteur lorsqu'ils sont à proximité (14). C'est leur séparation pendant la phase d'hydrolytation par l'ADN polymérase qui permet la fluorescence, si la sonde s'est bien entendu hybridée à sa cible au préalable.

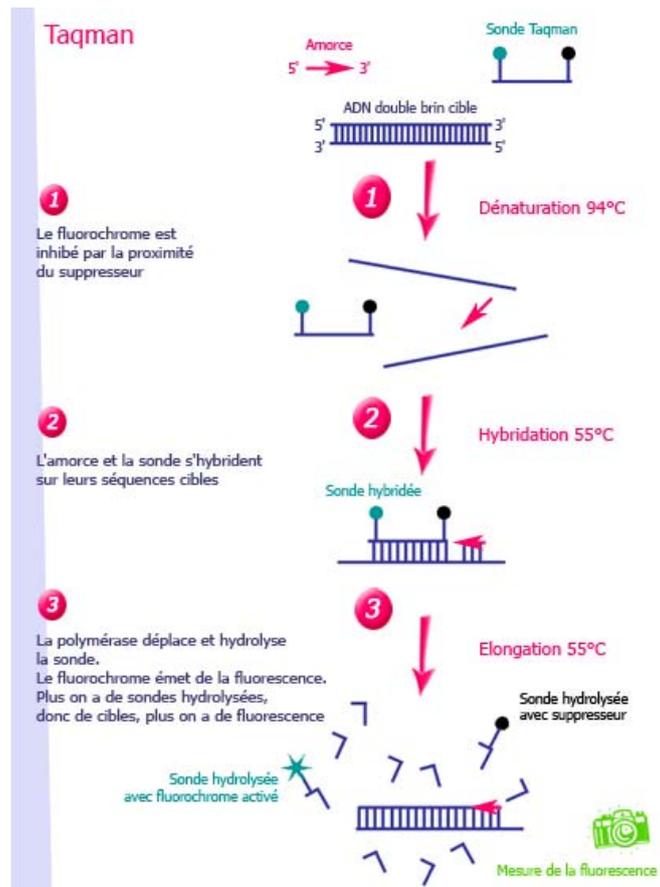


Figure 6 : Illustration de la PCR Taqman

(15)

Le multiplexage désigne une mise au point de la technique PCR autorisant l'amplification, en une seule réaction, de plusieurs segments d'ADN distincts. Les couples d'amorces correspondant aux différentes séquences à analyser sont introduits dans le même **tube réactionnel**. **Les sondes sont marquées à l'aide de fluorochromes à spectres d'émission différents**. Le choix des conditions d'amplification résulte d'une mise au point poussée. En particulier, le choix des couples d'amorces doit être rigoureux pour pouvoir trouver un compromis entre les températures d'hybridation des amorces et les durées d'élongation **optimales de chacune des réactions de PCR**. **L'avantage** de la PCR multiplexe est la réduction du coût et la diminution du temps de réalisation. Elle permet aussi de réduire la quantité d'ADN nécessaire (1).

Le principal problème de cette méthode est son coût, sinon cette technique est intéressante et **efficace à grande échelle puisqu'elle est entièrement automatisée**. **La reproductibilité est très bonne** (2). Grâce à la PCR, on peut réaliser un inventaire et une analyse phylogénétique des espèces constitutives du microbiote intestinal (2).

3. Le pyroséquençage

Le pyroséquençage permet de déterminer la séquence de gène. Comme nous l'illustre la figure 7, on ajoute progressivement des nucléotides au milieu réactionnel et si l'ADN polymérase peut l'intégrer au brin en cours de synthèse, il y a libération d'un pyrophosphate et alors synthèse d'ATP par l'ATP sulfurylase. Une luciférase transforme l'ATP produit en un signal lumineux qui sera détecté. Ce signal lumineux sera retranscrit sur un pyrogramme sous forme de pic. La hauteur du pic est proportionnelle à ce signal, et de ce fait proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés. De ces pics peut être déduite la séquence présente dans notre échantillon. Une apyrase dégrade les nucléotides qui n'ont pas pu être incorporés au brin en cours d'élongation (16).

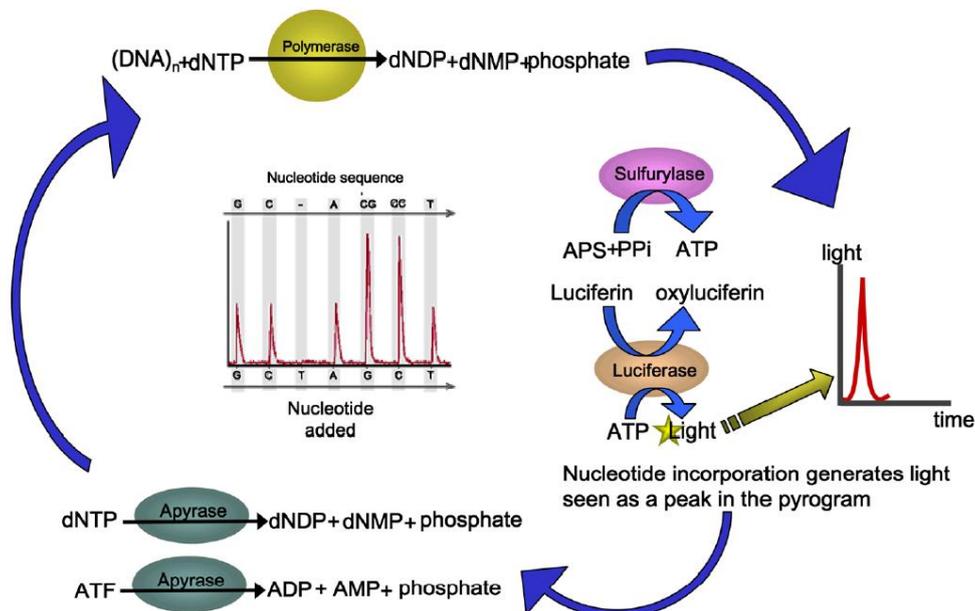


Figure 7 : Illustration de la méthode de pyroséquençage

(17)

2) Techniques moléculaires qualitatives

1. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction, ou RFLP, est une technique qui utilise des enzymes de restriction. Après amplification de certaines parties du gène **codant** l'ARNr 16S par PCR, les enzymes de restriction vont couper ces produits en plusieurs fragments de taille variable (entre 1 et 20 kb). **En effet, l'action des enzymes de restriction dépend du nombre de sites de restriction présents dans le génome pour l'enzyme**

utilisée. Le nombre de ces sites et leurs positions diffèrent en fonction de l'individu. On a donc un polymorphisme de longueur des fragments de restriction, et ces fragments sont **séparés suivant leur taille par migration sur gel d'agarose**. L'ADN étant chargé négativement, il migre de la cathode vers l'anode. Les fragments les plus petits sont les plus rapides. L'ADN est transféré sous forme dénaturée sur une membrane de nylon. La position relative des fragments d'ADN est préservée durant le transfert. On hybride alors les différents fragments **à l'aide de sondes marquées et on procède à la révélation pour observer la diversité de notre échantillon** (18). La révélation se fait souvent par autoradiographie. La figure 8 nous schématise le principe de cette technique.

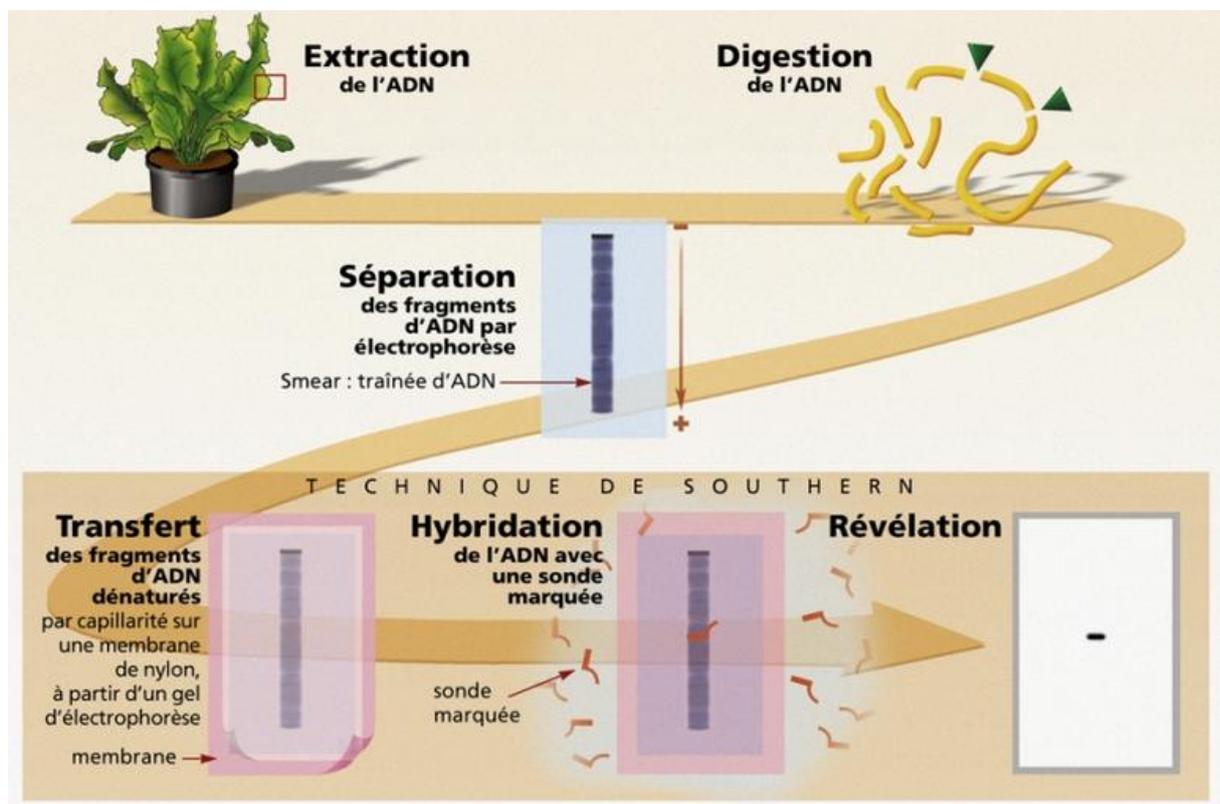


Figure 8 : Illustration de la méthode RFLP

(19)

Cette méthode est rapide et simple, peu coûteuse, cependant les fragments obtenus par la digestion enzymatique sont nombreux et de taille similaire ce qui rend l'interprétation des profils RFLP laborieux (2).

2. L'électrophorèse à champ pulsé

L'électrophorèse à champ pulsé, ou PFGE, est une autre méthode basée sur la digestion enzymatique de séquences d'ARNr 16S. Cependant les enzymes utilisées ici coupent le génome en fragments plus gros (entre 50 et 1000 kb). Il y a séparation sur gel d'agarose des fragments obtenus selon leur taille grâce à un champ électrique pulsé qui provient d'angles différents. On obtient un pulsotype qui représente le génome complet de la bactérie. Cette méthode est très bonne mais coûte relativement cher et nécessite une étape d'enrichissement des isolats (2). De plus sa mise en œuvre est longue, environ 5 jours, et les résultats obtenus ne sont pas standardisés : C'est-à-dire que pour une même analyse répétée plusieurs fois, les résultats obtenus peuvent varier. Cela est gênant au niveau interprétatif.

3. L'électrophorèse sur gel dénaturant

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

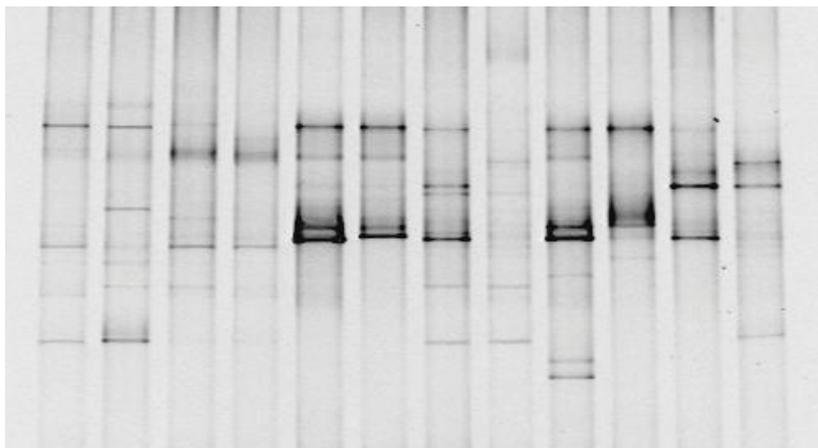


Figure 9 : Présentation d'une analyse par DGGE

(20)

Chapitre II

Le système immunitaire

Chapitre II - Le système immunitaire

La fonction essentielle de notre système immunitaire est de défendre notre organisme contre les éléments étrangers potentiellement nuisibles et contre les pathogènes. Il est également crucial dans l'identification et la destruction des cellules tumorales. La reconnaissance des cellules du soi et du non-soi permet de conserver l'intégrité des tissus de l'hôte. A la naissance, le système immunitaire n'est pas effectif à 100%. C'est ce qui constitue la fragilité toute particulière d'un nouveau-né.

Dans un premier temps je vais vous parler des acteurs du système immunitaire, pour ensuite aborder les notions d'immunité innée et d'immunité adaptative.

1) Les acteurs du système immunitaire

La figure 10 suivante nous illustre le phénomène de l'hématopoïèse dont sont issues de nombreuses cellules de l'immunité. L'hématopoïèse correspond à la synthèse et au renouvellement permanent, à partir de cellules souches pluripotentes de la moelle osseuse (CSH pour cellule souche hématopoïétique), des cellules du sang que sont les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes.

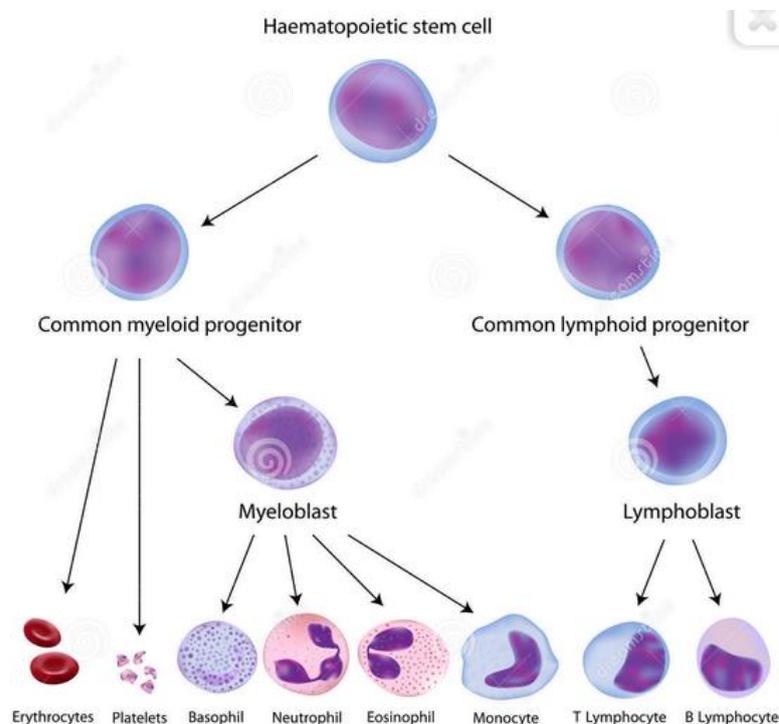


Figure 10 : L'hématopoïèse

L'hématopoïèse est scindée en deux lignées que sont la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde. La lignée myéloïde aboutit à la fabrication des globules rouges ou érythrocytes, des globules blancs ou leucocytes (sauf des lymphocytes) ainsi que des plaquettes. Parmi les leucocytes, nous avons les leucocytes granulaires ou granulocytes ou polynucléaires qui sont de trois sortes : Les polynucléaires neutrophiles (PNN), basophiles (PNB) et éosinophiles (PNE). Nous avons également les leucocytes non granulaires ou mononucléaires qui sont les monocytes. Les monocytes à proprement parlé sont des cellules circulant dans le sang. Sous leur forme tissulaire on parle de macrophages. La lignée lymphoïde quant à elle concerne la **synthèse des lymphocytes B et des lymphocytes T. L'hématopoïèse aboutit à la production de 10^{13} cellules par jour.**

1. Les lymphocytes

Les lymphocytes assurent la fonction de défense du système immunitaire. On les retrouve dans les organes lymphoïdes primaires tels que la moelle osseuse ou la rate, et dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques et les MALT (tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) (22). Les lymphocytes se répartissent de manière **stratégique dans le but de pouvoir agir rapidement en cas d'infection. Ils présentent à leur surface des récepteurs pour l'antigène.**

Il existe deux types de lymphocytes : Les lymphocytes B et les lymphocytes T. Ces derniers ont une morphologie similaire et se différencient par leurs marqueurs de surface.

a) Les lymphocytes B

Les lymphocytes B participent à la réponse immunitaire à médiation humorale dont le **but est d'éliminer et/ou de neutraliser les** bactéries, les virus et les toxines bactériennes extracellulaires. La réponse immunitaire humorale met donc en place une immunité spécifique dirigée contre un antigène spécifique.

Ces lymphocytes proviennent de la lignée myéloïde de l'hématopoïèse comme vu dans les pages précédentes. Ils sont produits dans la moelle osseuse d'où le B pour « Bone » de **l'anglais** qui veut dire « os ». Après un contact avec un antigène, comme illustré dans la figure 11, **ils se transforment en plasmocytes producteurs d'anticorps et en** lymphocytes B mémoires. Les plasmocytes représentent moins de 0,1% des lymphocytes circulants dans le sang et ont souvent un temps de vie très court. Ils sont concentrés dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate, MALT pour tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) et dans la moelle osseuse qui est un organe lymphoïde primaire. Les lymphocytes B mémoires ont eux un temps de vie long et circulent dans le sang pour

permettre une réponse plus rapide et plus intense lors de la **réintroduction d'un AG connu** par l'organisme.

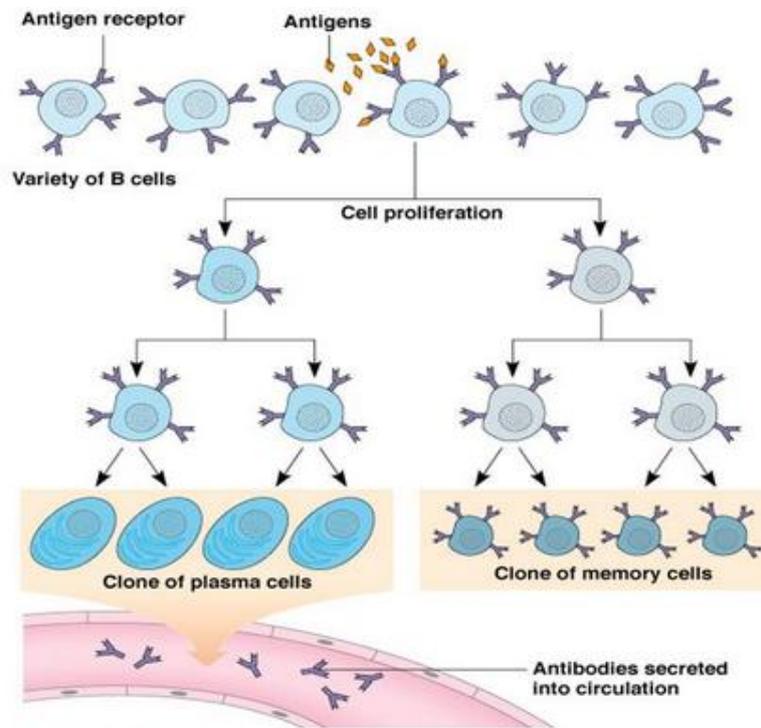


Figure 11 : Contact d'un lymphocyte B avec un antigène

(23)

Les récepteurs à l'antigène présents à leur surface sont nommés BCR pour « Récepteur des cellules B ». Ce sont des immunoglobulines membranaires. La reconnaissance d'un BCR pour un AG entraîne une phosphorylation qui va activer les lymphocytes B. Cette activation consiste en une prolifération de lymphocytes B dont certains vont se différencier en **plasmocytes producteurs d'AC** et d'autres en lymphocytes B mémoires.

Les anticorps (AC) produits, encore nommés immunoglobulines (Ig), sont des glycoprotéines composées de chaînes lourdes et légères reliées entre elles par des ponts disulfures (pont entre deux atomes de soufre). Chacune de ses chaînes comporte une région variable V et une région constante C. La région variable sert de socle de reconnaissance pour la fixation avec l'antigène. La figure 12 nous illustre la structure d'une immunoglobuline.

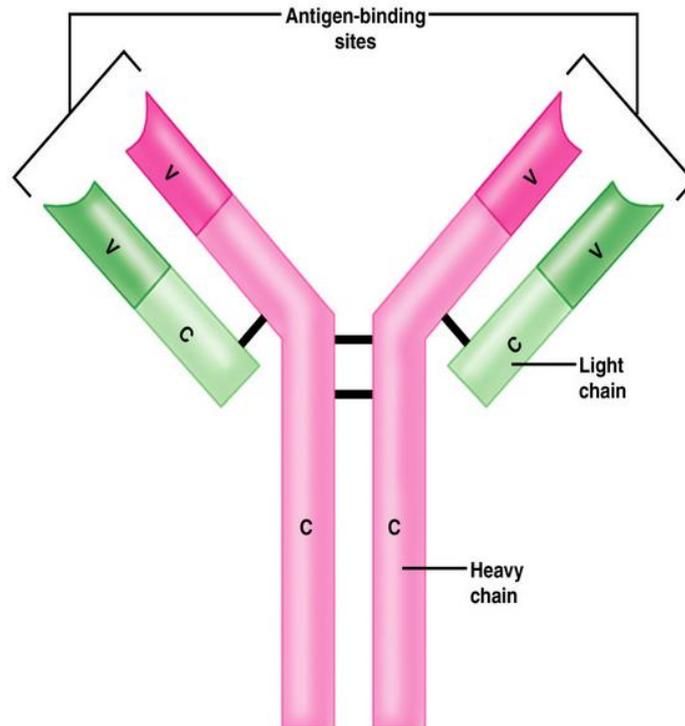


Figure 12 : Présentation de la structure d'un anticorps

(24)

Il existe plusieurs types d'immunoglobulines. Les Ig G constituent 80% des Ig. Ce sont des monomères extravasculaires. Ces immunoglobulines sont les seules capables de traverser le placenta et de ce fait, elles assurent une protection du fœtus et du nouveau-né. Les Ig A constituent 13% des Ig. Elles font parties de la barrière de défense muqueuse contre les éléments étrangers potentiellement pathogènes. Ces Ig A sont tantôt monomériques et sont alors présentes dans le sang, tantôt formées de deux monomères reliés entre eux par un pont disulfure, il s'agit alors des Ig A sécrétoires présentes dans les larmes, la salive, la sueur, le lait, et dans les sécrétions génito-urinaires. Les Ig M représentent 10% des Ig. Sous leur forme pentamérique, elles sont intra vasculaires et participent activement à la réponse **immunitaire primaire**, c'est-à-dire au premier contact avec un AG. Les Ig M monomériques sont des Ig membranaires présentes à la surface des lymphocytes B. Il existe aussi en moindre proportion des Ig E fixées aux mastocytes par leur fragment constant, elles **participent à l'immunité antiparasitaire et au phénomène d'hypersensibilité**. Enfin les Ig de type D sont co-exprimées à la surface des lymphocytes B avec les Ig de type M, mais ces Ig D tendent à se dégrader spontanément. La figure 13 nous présente un schéma simplifié des différents types d'immunoglobulines.

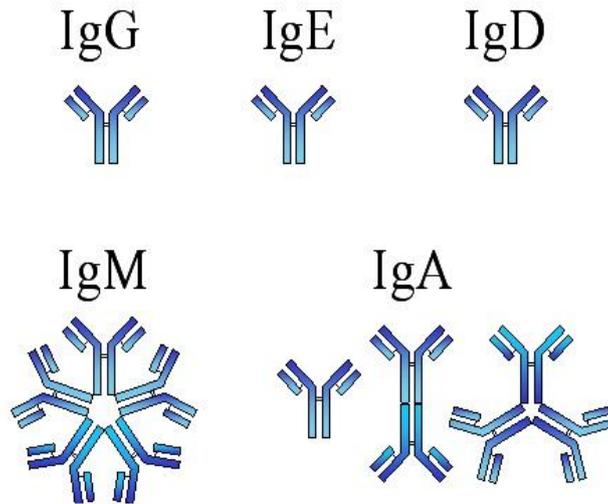


Figure 13 : Les différents types d'immunoglobulines

(25)

Pour rappel, la figure 14 nous illustre la réponse immunitaire humorale primaire et secondaire. La réponse secondaire concerne la deuxième présentation d'un antigène connu par l'organisme. Cette réponse, qui a un temps de latence très court, entraîne une production d'Ig en nombre important. La décroissance du nombre d'AC sériques est également plus lente que pour la réponse primaire qui concerne la toute première présentation d'un AG inconnu par l'organisme.

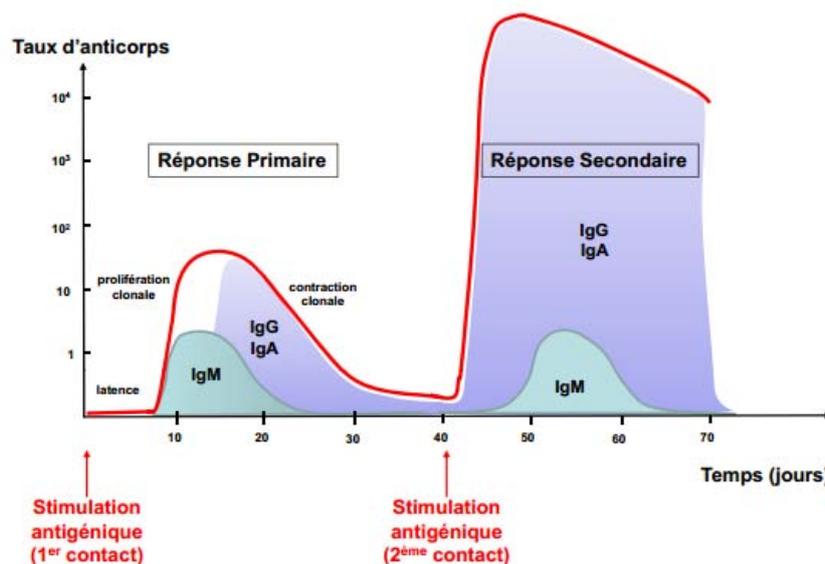


Figure 14 : Réponse humorale primaire et secondaire

(23)

Les lymphocytes B matures comportent également :

- ✓ Des récepteurs à certains fragments protéiques du complément : mécanisme qui permet **d'amplifier la réponse** immunitaire à un agent étranger dont nous parlerons par la suite,
- ✓ Des récepteurs aux fragments constants des immunoglobulines G responsables de la réponse secondaire humorale,
- ✓ Et des récepteurs à certaines cytokines.

b) Les lymphocytes T

Les lymphocytes T participent à ce que l'on appelle la **réponse immunitaire à médiation cellulaire** dont le but est de détruire les bactéries et les virus intracellulaires ainsi que les **cellules anormales de l'organisme**. Ils sont produits dans la moelle osseuse et deviennent **matures dans le thymus d'où le « T »** pour Thymus. Parmi eux on distingue les lymphocytes T CD4+ qui correspondent aux lymphocytes T auxiliaires ou encore T helper (LTh) et les lymphocytes T CD8+ qui correspondent aux lymphocytes T cytotoxiques. La proportion de CD4+ doit être au moins deux fois plus importante que celle de CD8+. Si ce rapport est **modifié, le patient court un fort risque d'immunodéficience et il est possible de voir apparaître des maladies auto-immunes**.

- ✓ Les lymphocytes T auxiliaires ou lymphocytes T CD4+ :

Ces lymphocytes T CD4+, encore appelés lymphocytes T helper (LTh), produisent des **cytokines permettant d'activer les lymphocytes B (pour la production d'anticorps anti-antigène)**, les macrophages (pour leur rôle phagocytaire) et les lymphocytes T cytotoxiques (pour leur rôle de lyse cellulaire). **L'activation du lymphocyte T auxiliaire, vu à la figure 15, se fait via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) dont nous parlerons dans la suite de ce travail.**

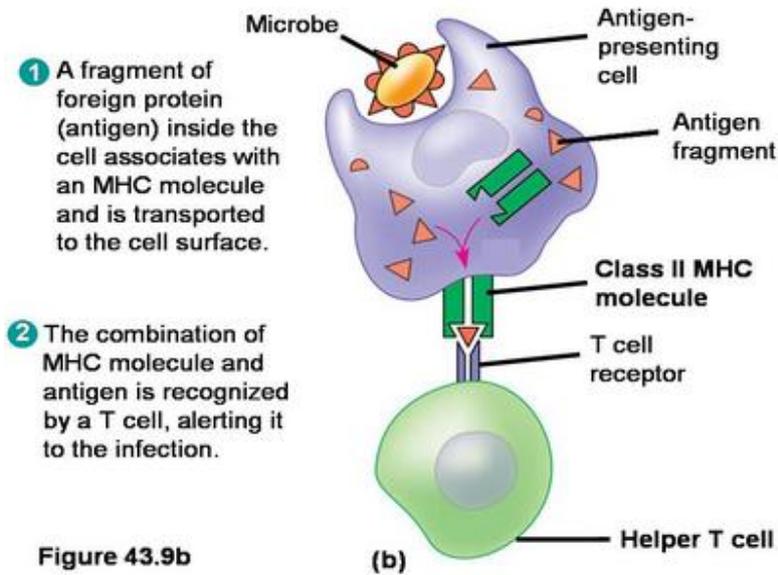


Figure 15 : Activation d'un lymphocyte T auxiliaire

(23)

✓ Les lymphocytes T cytotoxiques ou lymphocytes T CD8+ :

Ces lymphocytes LTc sécrètent très peu de cytokines mais permettent de détruire les cellules infectées ou les cellules du soi altérées par un phénomène de lyse cellulaire. L'activation de ces lymphocytes, à la figure 16, met en jeu le CMH de classe I dont nous parlerons par la suite.

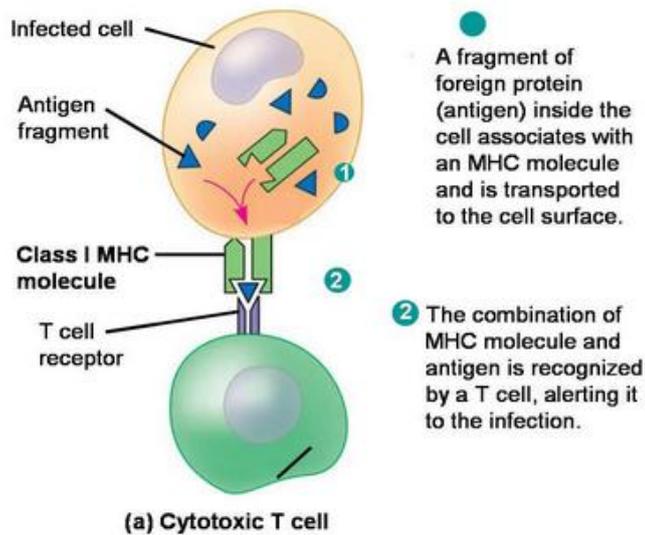


Figure 16 : Activation d'un lymphocyte T cytotoxique

(23)

Les récepteurs à l'antigène présents à la surface des lymphocytes T sont nommés TCR pour « Récepteur des cellules T » qui reconnaissent spécifiquement les peptides antigéniques associés aux protéines de CMH de classe I pour les lymphocytes T cytotoxiques et de classe II pour les lymphocytes T auxiliaires. Lors d'une reconnaissance du TCR pour un complexe CMH-AG, une phosphorylation active le lymphocyte T.

L'activation d'un lymphocyte T cytotoxique aboutit à une lyse cellulaire comme nous le présente la figure 17 ci-dessous.

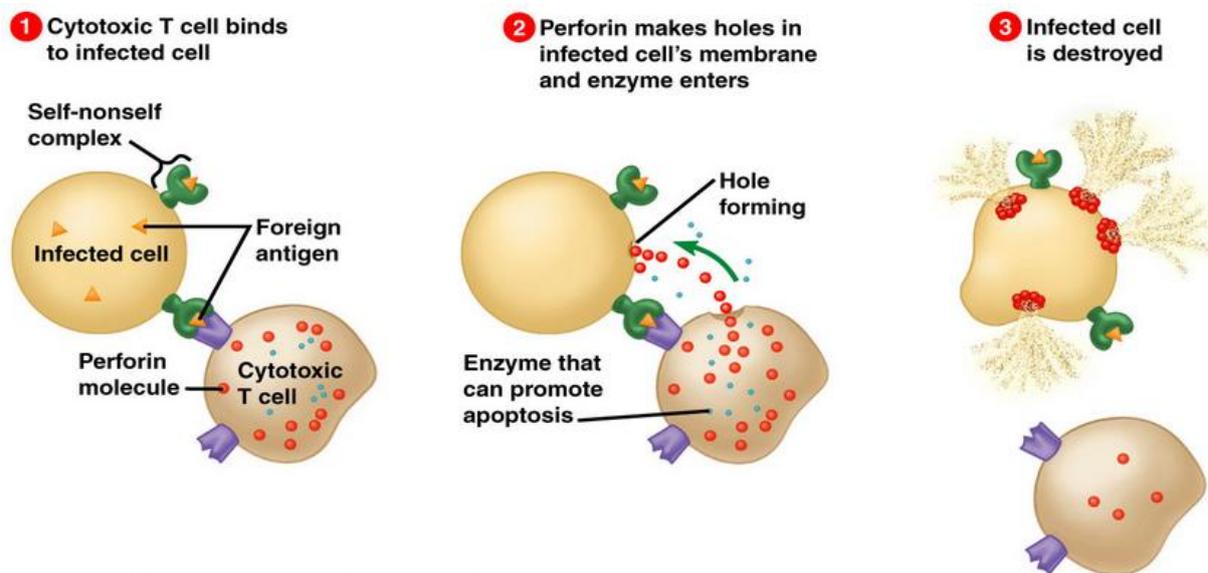


Figure 17 : Lyse d'une cellule cible engendrée par l'activation d'un lymphocyte T cytotoxique

(24)

- ✓ Il existe également des lymphocytes dits « Natural Killer » (lymphocytes NK) ou encore appelés grands lymphocytes granuleux.

Ces lymphocytes NK sont **dotés d'une action non spécifique ne nécessitant aucune activation préalable** : détruire des cellules cibles infectées ou anormales. **Il s'agit ici d'une réponse immunitaire non spécifique ou innée.** Présents naturellement dans la rate, la moelle osseuse, le foie, les foyers inflammatoires et dans le sang, l'aboutissement de la reconnaissance d'une cellule anormale par ce lymphocyte NK est la lyse de cette cellule cible, comme nous l'illustre la figure 18.

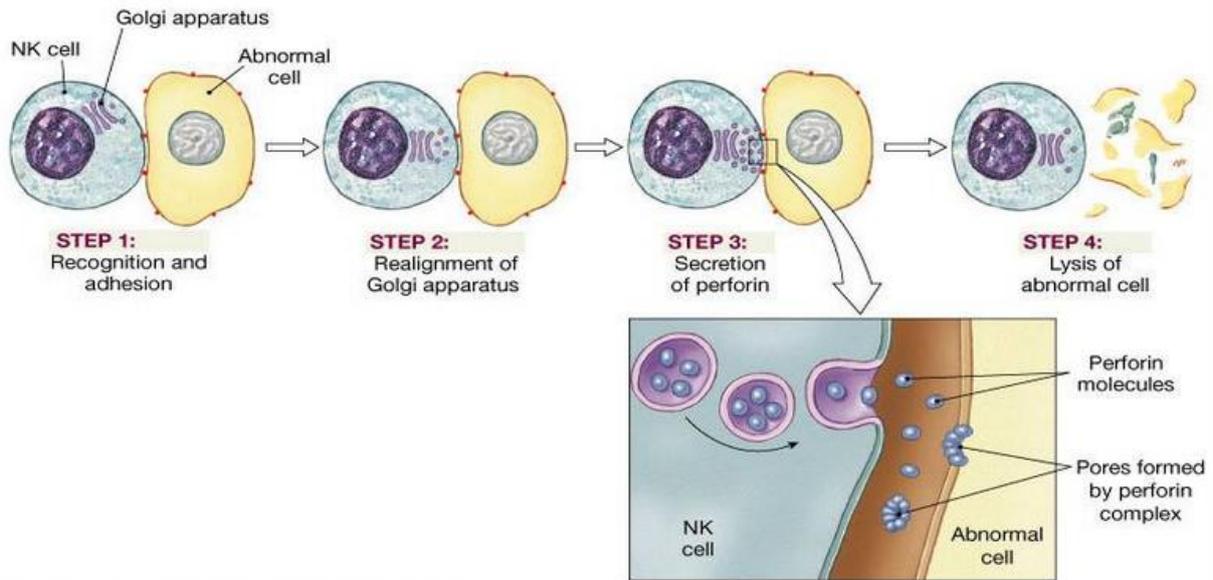


Figure 18 : Mode d'action d'un lymphocyte Natural Killer

(23)

La figure 19 nous présente de façon schématique le déroulement de l'activation des différents lymphocytes (LTh, LTc, LB, et LNK) et le recrutement des macrophages via les CPA, les cytokines et le CMH de classe I et II.

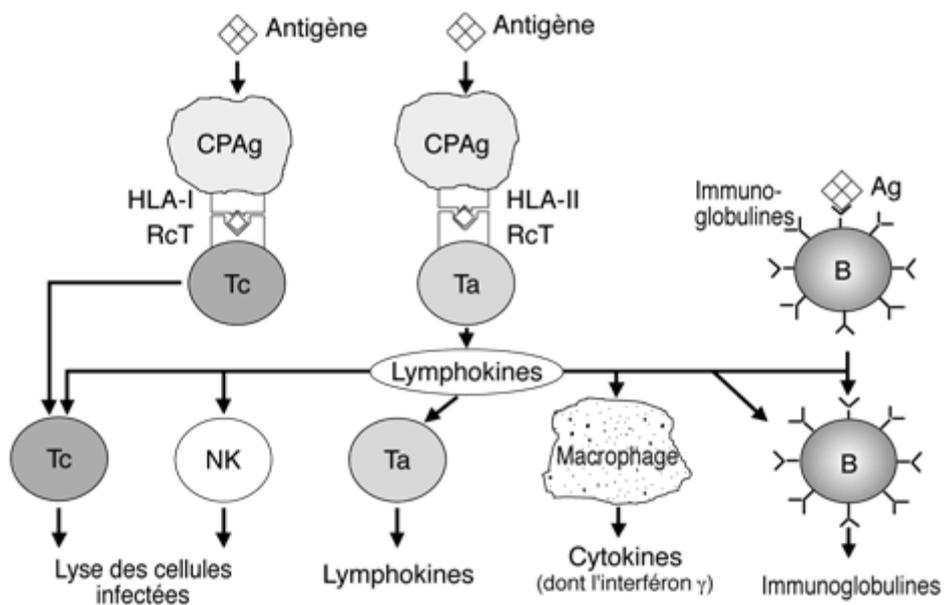


Figure 19 : Schéma récapitulatif de l'activation des différents lymphocytes

(26)

Légende Figure 19

B : Lymphocyte B
CPAg : **CPA pour cellule présentatrice de l'AG**
HLA-I: CMH de classe I
HLA-II: CMH de classe II
NK : Lymphocyte Natural Killer
RcT : TCR pour récepteur des cellules T
Ta : Lymphocyte T auxiliaire
Tc : Lymphocyte T cytotoxique

2. Les autres cellules de l'immunité

Il existe d'autres cellules très importantes qui participent autant aux défenses mises en œuvre par notre système immunitaire (22) :

a) Les phagocytes :

Ils regroupent les monocytes sanguins, les macrophages ainsi que les polynucléaires neutrophiles : **Ils capturent l'agent pathogène** par phagocytose pour ensuite présenter à leur surface les fragments internalisés aux lymphocytes.

b) Les cellules accessoires :

Elles regroupent les cellules **présentatrices de l'antigène ou CPA**. Parmi elles, nous pouvons distinguer les CPA professionnelles et les CPA non professionnelles.

Les CPA professionnelles sont représentées par les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B tandis que les CPA non professionnelles comportent les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules gliales. Les CPA, comme leur nom **l'indique, permettent de présenter l'AG rencontré sous forme de peptides associés aux molécules de classe II du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité)**. Ces AG peptidiques sont présentés aux lymphocytes T helper ou CD4+. Les CPA non professionnelles **n'interviennent qu'en cas de réponse** inflammatoire intense. Les CPA se chargent donc **d'initier la réponse immunitaire** spécifique en activant les lymphocytes T.

Toute cellule nucléée capable de se comporter comme une cellule cible peut présenter des antigènes endogènes aux lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. Cette présentation antigénique se fait ici via les molécules de classe I du CMH (27).

3. Les cytokines

a) Définition

Les cytokines sont des molécules protéiques servant de messagers chimiques. Elles permettent les communications intercellulaires impliquant le système immunitaire, inflammatoire mais également le système hématopoïétique. Elles activent ou inhibent **l'activation, la différenciation ou encore la prolifération de cellules**. Les cytokines sont produites et sécrétées par une large variété de cellules dont les lymphocytes, les cellules **présentatrices de l'antigène** mais aussi les fibroblastes. Elles agissent de façon conjointe en formant des réseaux de communication et des cascades de réactions.

C'est la liaison de la cytokine à son récepteur spécifique qui permet la transduction d'un signal. Ce signal active l'expression d'un gène ou de plusieurs gènes particuliers permettant d'obtenir l'effet biologique voulu (28).

Il existe plusieurs types de cytokines :

- ✓ Les hématopoïétines comprenant les interleukines (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4,...).
- ✓ Les chémokines.
- ✓ Les interférons : IFN-alpha, IFN-gamma, IFN-**bé**ta,...
- ✓ Les facteurs de nécrose tumorale dont TNF-alpha, TNF-**bé**ta,...

b) Caractéristiques des cytokines

- ✓ La pléiotropie : capacité pour une cytokine à induire différents effets biologiques suivant sa cible et à activer plusieurs cibles.
- ✓ La redondance : plusieurs cytokines ont le même effet biologique.
- ✓ La synergie : **deux cytokines réunies peuvent permettre d'obtenir un effet biologique plus intense que séparément.**
- ✓ **L'antagonisme : une cytokine peut inhiber l'effet biologique d'une autre.**
- ✓ **L'induction de cascade de réactions** entre plusieurs cellules (28).

c) Fonctions des cytokines

Les cytokines permettent le développement des réponses immunitaires à médiation cellulaire qui utilise les lymphocytes T cytotoxiques, et à médiation humorale qui utilise les lymphocytes B et les macrophages. **En tout cas il s'agit bien ici de mettre en œuvre une réponse immunitaire spécifique, c'est-à-dire acquise.**

Les cytokines ont la capacité d'induire une réaction inflammatoire et de contrôler la prolifération ainsi que la différenciation cellulaire. Les cytokines régulent également l'hématopoïèse et participent au remodelage tissulaire (27).

Pour ce qui est de leur rôle dans le phénomène inflammatoire, il faut préciser qu'il existe des cytokines pro-inflammatoires (dont TNF-alpha, IFN-alpha et IFN-bêta, IL-1 et IL-6), et anti-inflammatoires (TGF-bêta, IL-10) de par les effets biologiques qu'elles engendrent (28).

Le schéma suivant a pour vocation simplement d'illustrer la complexité avec laquelle les cytokines interviennent dans le phénomène de l'inflammation.

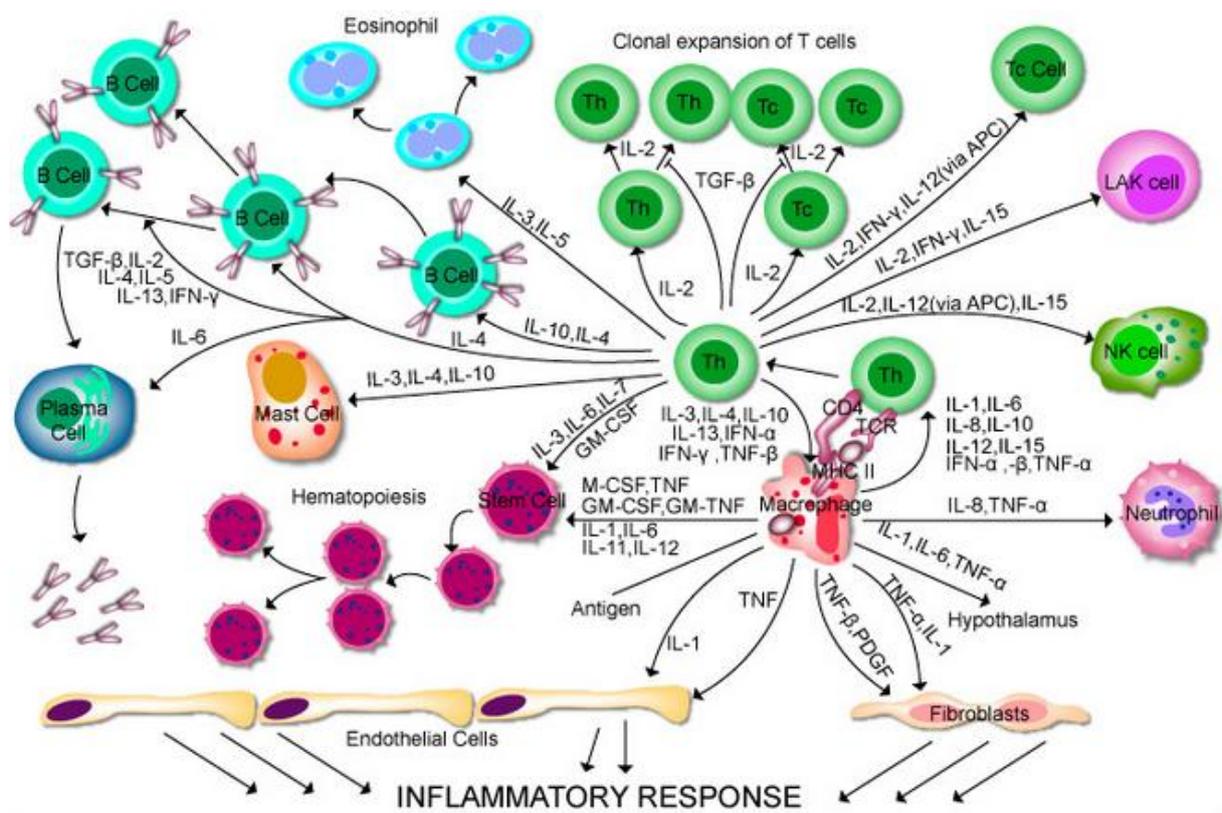


Figure 20 : Cytokines et communication intercellulaire

(29)

4. Le complexe majeur d'histocompatibilité

Le CMH est un ensemble de gènes codant pour des protéines membranaires localisées sur les cellules présentatrices de l'antigène. Ces gènes forment un haplotype, puisqu'ils sont étroitement liés et se transmettent en bloc. L'expression est codominante. C'est le principal locus génique qui détermine la prise ou le rejet d'un greffon. Les gènes constituant le CMH codent pour des protéines qui sont des AG leucocytaires humains (HLA) (27). Leur

polymorphisme est très important. Nous pouvons citer pour exemple la présence de 767 allèles HLA-A.

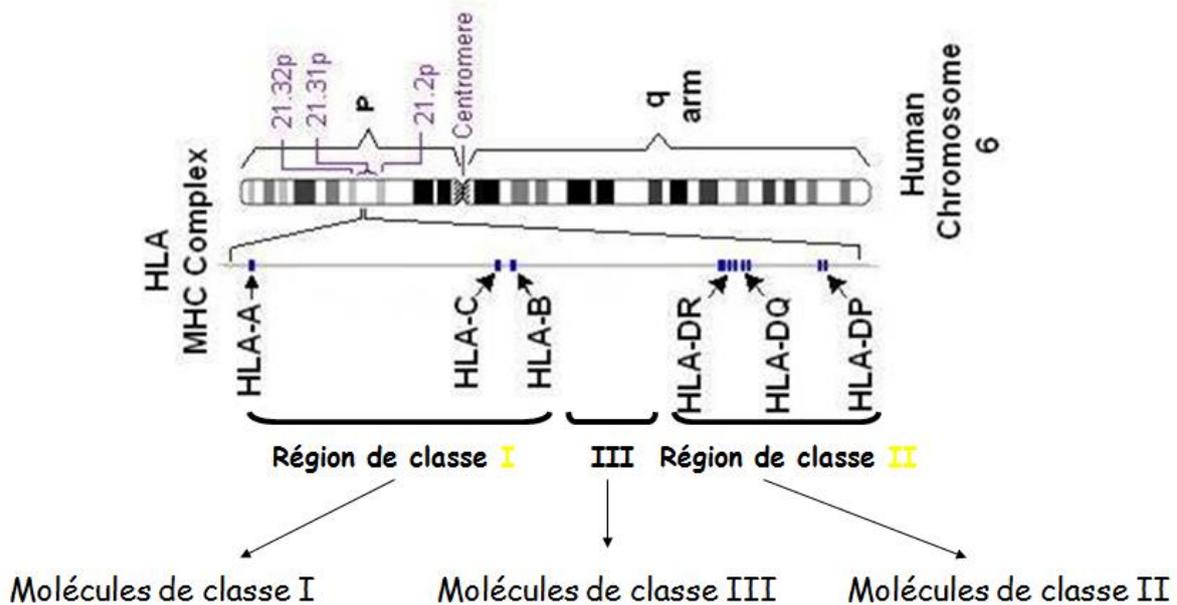


Figure 21 : Le complexe majeur d'histocompatibilité

(27)

Les molécules de classe I classiques (HLA-A, -B et -C) se retrouvent à la surface de **toutes les cellules nucléées de l'organisme**. Les molécules de classe II (HLA-DR, -DQ, -DP) se retrouvent à la surface des **cellules présentatrices de l'antigène**.

Les molécules de CMH de classe I sont des glycoprotéines membranaires chargées de **présenter des AG sous forme peptidique aux lymphocytes T CD8+ cytotoxiques**. C'est la **voie cytosolique d'élimination des antigènes endogènes étrangers à l'organisme**. Cela concerne les virus vivants dans une cellule infectée, les microorganismes phagocytés et les cellules tumorales. Ces antigènes endogènes sont dégradés par des protéasomes en peptides qui sont ensuite assemblés aux molécules de **CMH I avant d'être transportés** vers la membrane plasmique de la cellule impliquée.

Les molécules de CMH de classe II sont chargées de présenter les AG peptidiques aux lymphocytes T CD4+ auxiliaires. Elles font partie de la superfamille des Immunoglobulines (Ig). Les molécules de classe II du CMH sont impliquées dans la voie endocytaire d'élimination des antigènes exogènes étrangers à l'organisme. Il y a d'abord **internalisation de l'antigène par endocytose ou par phagocytose** par une cellule présentatrice de l'antigène,

ensuite assemblage des peptides antigéniques à une CMH de classe II avant un transport vers la membrane plasmique.

La figure 22 permet de situer les sites clés d'action du CMH de classe I et II. Nous pouvons voir que le CMH de classe I permet via une cellule nucléée de l'organisme de présenter un AG aux LT cytotoxiques (LTc), tandis que le CMH de classe II permet via une CPA de présenter un AG aux LT auxiliaires (LTh).

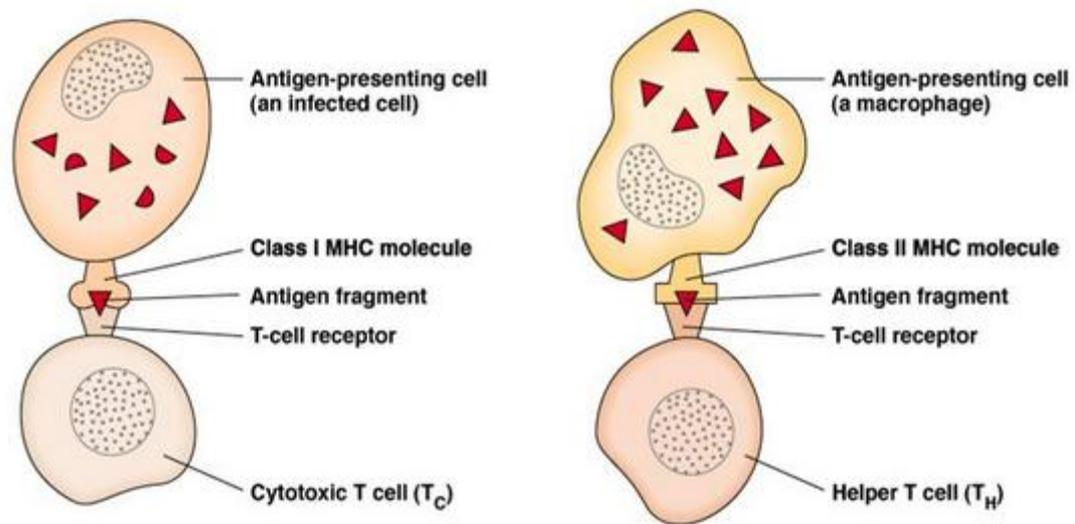


Figure 22 : Intervention du CMH dans la présentation de l'AG

(23)

Les fonctions du CMH sont :

- ✓ L'immuno-surveillance de l'organisme puisque les lymphocytes T sont restreint par le CMH à ne reconnaître que les AG qu'il leur présente.
- ✓ L'induction d'une réponse immunitaire allogénique en cas d'incompatibilité lors de greffes d'organes, de transfusion.
- ✓ L'éducation thymique des lymphocytes T puisqu'il y a une sélection des lymphocytes T avec un TCR apte à reconnaître le CMH.
- ✓ Rôle dans le phénomène d'inhibition de la cytotoxicité naturelle des lymphocytes NK via le récepteur KIR (killer inhibitory receptor) des lymphocytes NK. La reconnaissance KIR-CMH I inhibe la lyse cellulaire.

5. Le système du complément

Le système du complément est un ensemble de protéines enzymatiques solubles présentes dans le sérum sous forme inactive. Le sérum est le liquide sanguin débarrassé de ses cellules ainsi que des protéines de la coagulation. Le système du complément est le principal **effecteur de l'immunité** puisqu'il permet aux anticorps d'exercer leur action de défense (30). Il comporte trois **voies d'activation** :

- ✓ La voie classique qui est activée par des complexes AG-AC, par des IG agrégées, par la **membrane des bactéries gram négatif**, par l'enveloppe des **rétrovirus**, par la protéine CRP **importante dans l'inflammation** et par d'autres molécules aussi telles que l'ADN et certains lipides. Cette voie fait partie de l'immunité spécifique ou adaptative dont nous parlerons par la suite.
- ✓ La voie des lectines : la MBL (lectine liant le mannose) est une protéine de la phase aigue de l'inflammation.
- ✓ La voie alterne qui est activée par la surface des bactéries gram négatif et gram positif, par les **LPS (lipopolysaccharides)**, par les levures... Elle fait partie de l'immunité innée ou non spécifique et constitue une voie d'amplification de la réponse immunitaire.

Le schéma suivant illustre le fonctionnement du système du complément.

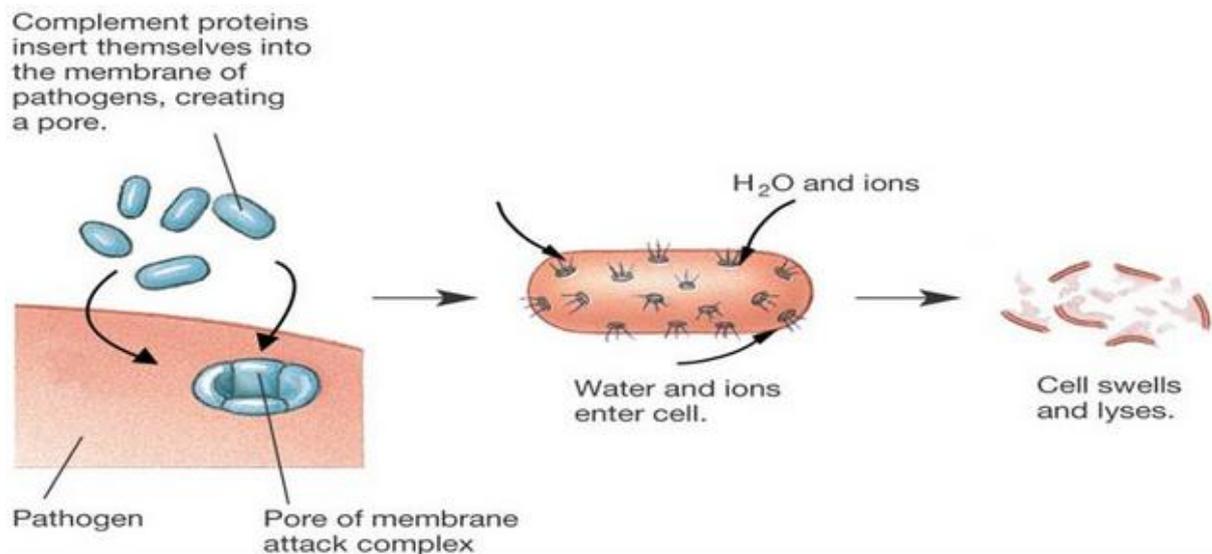


Figure 23 : Formation du complexe de lytique par le système du complément

(23)

L'activation se fait par clivage protéolytique qui entraîne une cascade enzymatique aboutissant à la formation d'un complexe lytique à la surface de la cellule cible à détruire.

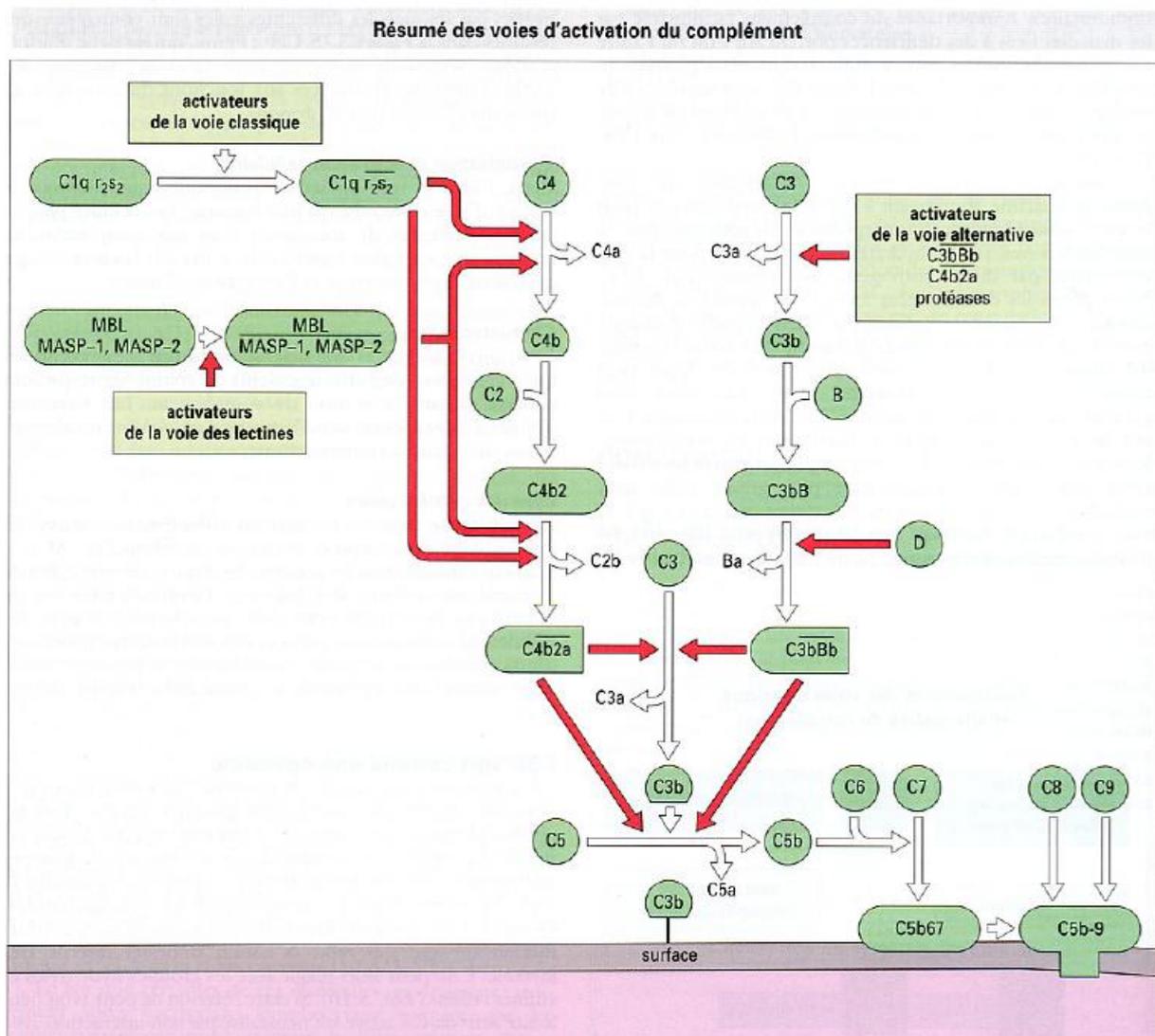


Figure 24 : Le système du complément

(30)

Les fonctions du complément sont nombreuses puisqu'il permet de lutter contre les infections en éliminant virus et bactéries par opsonisation. Il a également une action anti tumorale par phénomène de cytolyse, et il permet de déclencher et d'amplifier une réponse inflammatoire.

2) L'immunité innée

L'immunité innée concerne les premiers moyens de défense de l'organisme contre les éléments invasifs. **C'est une immunité** « génétiquement programmée » qui ne nécessite aucune exposition préalable à un antigène pour être effective. Elle est dite « non-spécifique ».

Elle comprend la barrière mécanique constituée par le mucus des voies respiratoires et gastro-intestinales **qui se charge de piéger et d'éliminer par péristaltisme** les éléments pathogènes. Le mucus contient également des immunoglobulines A sécrétoires (IgA S). **L'autre acteur de cette barrière mécanique est l'épithélium constitué de cellules épithéliales à jonctions serrées** qui empêchent la diffusion de **molécules et d'éléments pathogènes**. Une barrière chimique existe également. Celle-ci se compose de peptides antimicrobiens présents **au niveau de la peau, de l'intestin et du tractus respiratoire**. **Les peptides antimicrobiens** bloquent la croissance des cellules bactériennes et fongiques (31). **Le pH acide de l'estomac et les protéases** qui y séjournent font également partie de cette barrière chimique.

La flore bactérienne commensale constitue aussi une barrière contre les pathogènes puisqu'elle **permet la sécrétion de substances antimicrobiennes qui empêchent la croissance** de bactéries indésirables. Cette flore entre en compétition avec les organismes invasifs au niveau des sites de liaison ou encore via la consommation de nutriments qui leur sont essentiels (31).

L'immunité innée se compose également de facteurs solubles constitutifs que sont notamment les protéines du complément et les défensines, mais aussi de facteurs solubles issus de **l'activation cellulaire** tels que les cytokines dont nous avons parlé précédemment. Les lymphocytes NK font partie intégrante de la défense immunitaire innée (24). Ces cellules **limitent le développement de tumeurs et d'infections bactériennes**. Elles sont capables de **sécréter rapidement un grand nombre d'effecteurs chimiques et d'entraîner une cytotoxicité** par lyse cellulaire.

Le phénomène inflammatoire et la phagocytose sont d'autres éléments importants de l'immunité innée. Les cellules dendritiques jouent leur rôle aussi et comprennent à leur surface des récepteurs nommés « pattern-recognition receptors » (PRRs). Ces récepteurs **sont chargés de détecter l'invasion de microorganismes dans les tissus de l'hôte**. Parmi eux nous avons deux groupes majeurs de récepteurs : Les « toll-like receptors » (TLRs) qui sont endosomals et les « Nucleotide binding domain, Leucine-rich repeats » (NLRs) qui sont cytoplasmiques. Ils reconnaissent spécifiquement les « pathogen-associated molecular patterns » (PAMPs) (32). Les PAMPs sont des structures moléculaires conservées présentes

dans de nombreux microorganismes pathogènes (bactéries et virus notamment). Pour regrouper des structures également présentes dans les microorganismes de la flore commensale, on parle de MAMPs pour « microbe-associated molecular patterns ». **L'engagement des PRRs à la surface d'un macrophage entraîne l'activation du macrophage et la synthèse de cytokines pouvant déclencher la phagocytose qui engendre la destruction de l'élément pathogène rencontré. Se déroule alors une suite de signalements moléculaires qui a pour conséquence le déclenchement de l'immunité adaptative mais aussi l'induction à plus forte échelle de l'immunité innée.**

A propos des NLRs, ce sont des protéines cytoplasmiques présentes dans de nombreuses cellules, dont les cellules épithéliales et immunitaires. Leur rôle est crucial dans la reconnaissance et dans la défense contre les éléments pathogènes. Leur partie C-terminale contient les « Leucine-rich repeats » (LRRs) qui sont les détecteurs des PAMPs. Parmi les NLRs nous avons les récepteurs Nod1 et Nod2 qui possèdent une capacité à reconnaître des molécules microbiennes intracellulaires (33). Les récepteurs Nod2 possèdent un domaine de « caspase recruitment domain » (CARD) à leur extrémité N-terminale. Or les caspases sont des protéases à cystéine jouant un rôle dans les phénomènes inflammatoires, dans la nécrose **ainsi que dans l'apoptose cellulaire. Elles ont un contrôle sur la vie des cellules. L'expression de ces récepteurs Nod2 est essentiellement faite au niveau des cellules dendritiques, des macrophages, des cellules intestinales dont les cellules de Paneth, des cellules épithéliales au niveau pulmonaire et buccal mais aussi au niveau des lymphocytes T. Les récepteurs Nod2 confèrent une résistance contre de nombreuses bactéries portant le motif « muramyl dipeptide » (MDP). L'étude de souris déficientes en Nod2 a montré l'activité antimicrobienne de ce récepteur, en interaction avec les cellules de Paneth qui sont des cellules sécrétrices spécialisées au niveau de l'intestin et qui produisent et libèrent de nombreux peptides antimicrobiens. En effet, ces cellules expriment à un niveau élevé le récepteur Nod2, et ceci contribuerait à une voie importante d'induction d'une activité bactéricide contre de nombreuses bactéries (33).**

3) L'immunité adaptative

L'immunité adaptative, aussi appelée **immunité acquise** ou spécifique, fait appel aux lymphocytes T et aux lymphocytes B. La réponse mise en jeu est ici **plus spécifique qu'avec l'immunité innée vue précédemment. Il y a instauration d'une mémoire immunitaire sur le long terme qui persiste à l'arrêt de la réponse immunitaire déclenchée.**

L'immunité adaptative comprend l'immunité à médiation humorale et l'immunité à médiation cellulaire. **L'immunité à médiation humorale comprend le déploiement des**

lymphocytes B et donc de plasmocytes producteurs **d'AC**, tandis que **l'immunité** à médiation cellulaire concerne les lymphocytes T et leur pouvoir de cytolyse.

Les lymphocytes B mettent en jeu leur efficacité par la production d'anticorps spécifiques de l'antigène rencontré. Nous avons déjà vu qu'il existait plusieurs sortes d'anticorps, ou immunoglobulines, il en existe effectivement cinq classes. Les IgG, IgA, IgM, IgD et IgE. Les IgA sont les plus importantes concernant le déploiement de l'immunité muqueuse. Les IgM et les IgG sont dominantes sur le plan de l'immunité systémique. Les IgE ont un rôle important dans les phénomènes allergiques en se liant au fragment constant de leur récepteur présent à la surface des mastocytes et des basophiles. Cette fixation entraîne une dégranulation des mastocytes et des basophiles. Le résultat de cette dégranulation est un phénomène inflammatoire.

Les lymphocytes T reconnaissent **l'antigène présenté par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA)** qui exposent à leur surface les glycoprotéines transmembranaires du CMH de classe II (complexe majeur d'histocompatibilité).

Les lymphocytes T helper (LTh) activent à la fois la réponse immunitaire humorale et cellulaire. Les lymphocytes T cytotoxiques (LTc) sont les CD8+ et leur nom indique une activité cytotoxique majeure contre des cellules infectées par des microorganismes pathogènes ou contre des cellules cancéreuses.

Il est nécessaire de prendre en compte le phénomène de tolérance au soi qui est prévu au **niveau du thymus lors de l'éducation des lymphocytes T**, où sont éliminées ou bien différenciées les cellules qui réagissent aux antigènes du soi. Cette tolérance au soi est très importante, tout comme la tolérance envers certains antigènes étrangers, dont ceux de notre flore bactérienne commensale. Ceci dans le but de prévenir toute pathologie immune (34). **C'est tout particulièrement le rôle tenu par** les lymphocytes T régulateurs (LTreg) qui permettent de diminuer la réponse immunitaire engendrée par un **stimulus qui n'est pas à** risque.

Les lymphocytes T naïfs (LTh0) peuvent être différenciés en lymphocytes Th1, Th2 ou Th17 selon les cytokines présentes au niveau du site d'activation, le stimulus exogène et la cellule présentatrice de l'antigène. En général, les LTh1 se chargent de la réponse immunitaire cellulaire et les Th2 de la réponse humorale et sont en plus impliqués dans les phénomènes allergiques. En effet les LTh1 produisent de l'IFN γ , de l'IL2 et du TNF β qui entraînent la clairance des virus et des bactéries intracellulaires en activant les macrophages et en induisant les réponses cytotoxiques des LT NK et des LTc. Les LTh2 produisent l'IL4, l'IL5,

l'IL10 et l'IL13 qui elles entraînent la clairance des parasites extracellulaires et l'activation des éosinophiles avec mise en jeu des IgE.

Afin que ce court rappel puisse vous apporter au mieux les éléments essentiels à notre système immunitaire, je vous adresse ci-dessous un schéma récapitulatif.

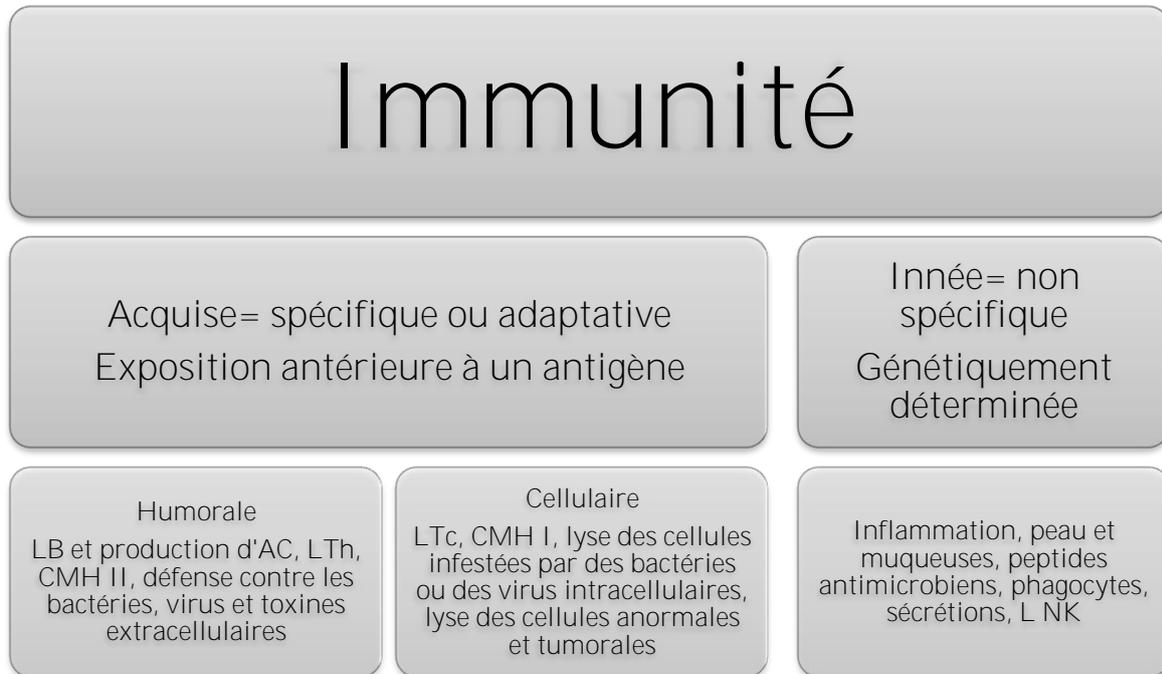


Figure 25 : Schéma récapitulatif du système immunitaire

Nous avons pu voir que les éléments participant au système immunitaire sont complexes et multiples. Le système immunitaire nécessite en effet une mise en place pointue et longue qui démarre à la naissance et c'est pour cela qu'un nouveau-né ne bénéficie pas immédiatement de bons moyens de défenses. **L'immunité innée est le premier moyen de défense efficace chez un enfant, tandis que l'immunité adaptative, qui est bien plus complexe à mettre en œuvre, se met en place plus lentement.** En effet, cette immunité spécifique demande une maturité du système immunitaire que l'enfant n'acquière pas immédiatement à sa naissance.

Chapitre III
Le microbiote intestinal de l'enfant

Chapitre III - Le microbiote intestinal de l'enfant

La colonisation du tractus gastro-intestinal démarre immédiatement après la naissance. Son étude est devenue plus aisée grâce aux nouvelles techniques moléculaires **basées sur l'étude de l'ARNr 16S que j'ai pu vous présenter succinctement dans ma première partie. Les populations bactériennes proviennent de l'environnement extérieur et de la mère. L'établissement du microbiote** chez le nouveau né est une période critique qui a un impact sur l'état global de sa santé future.

A travers cette troisième partie, nous allons voir comment se met en place le microbiote intestinal chez un nouveau né. Nous nous intéresserons ensuite aux facteurs qui influencent sa composition tant sur le plan qualitatif que quantitatif.

1) Mise en place du microbiote intestinal à la naissance

Un grand nombre de facteurs sont impliqués dans la mise en place de la flore intestinale. Notamment le mode de délivrance, **l'alimentation et** la charge bactérienne environnante. Il faut noter que les études respectives dans des pays développés et en voie de développement ne donnent pas les mêmes résultats, les proportions de chaque population **bactérienne varient. L'hygiène** bien plus prononcée des pays développés en serait en majeure partie responsable.

Pour exposer cette partie je me suis basée sur une étude assez complète malgré son **échantillonnage restreint d'enfants. Cependant mes lectures ont montré que ses résultats** étaient représentatifs. Cette étude concerne dix nouveaux nés brésiliens (35). Un seul parmi eux a eu recours à une antibiothérapie orale de dix jours par céphalosporine **à cause d'une** infection cutanée, et tous ont été nourris par allaitement maternel. Les mères étaient bien **nourries et en bonne santé, et n'ont pris aucun antibiotique durant les derniers mois de** grossesse. Le mode de délivrance fut vaginal pour les dix nouveaux nés. Les conditions **d'hygiène de vie des parents et leur niveau d'étude étaient relativement bas.**

Des collectes d'échantillons fécaux ont été effectuées le deuxième, le septième et le trentième jour après la naissance. Sur ces échantillons ont été réalisés une extraction de l'ADN puis un séquençage de l'ARNr 16S pour une analyse phylogénétique des populations bactériennes présentes. La collecte fut effectuée par les mères selon un protocole rigoureusement établi pour éviter les divergences de prélèvements et de conservation des selles. Le premier échantillon a été recueilli le deuxième jour après la venue au monde, pendant que les enfants

séjournèrent à l'hôpital. Le second et le troisième échantillon ont été recueillis au domicile maternel le septième et le trentième jour.

Le tableau 1 suivant illustre les caractéristiques principales de nos dix nouveaux nés.

Tableau I : Etude des dix nouveaux nés brésiliens

	Age gestationnel (en semaines)	Poids à la naissance (en grammes)	Sexe	Recours à un traitement antibiotique
1	40.5	3.560	Fille	Non
2	40.1	2.870	Fille	Non
3	41.1	2.765	Fille	Oui*
4	41.6	3.725	Garçon	Non
5	37.6	3.030	Garçon	Non
6	39.3	3.300	Fille	Non
7	37.3	3.210	Garçon	Non
8	40	3.290	Garçon	Non
9	40.6	3.520	Garçon	Non
10	38.1	4.015	Garçon	Non

*Antibiotique utilisé : Céphaléxine, céphalosporine de première génération, pendant 10 jours.

(35)

Dans l'utérus de la mère, le fœtus possède un tractus digestif stérile (35) et sa colonisation est un phénomène rapide qui débute dès l'accouchement. A cette étape d'instauration, les principaux facteurs qui impactent la composition du microbiote intestinal sont le mode d'accouchement et les conditions d'hygiène présentes dans l'environnement. La composition en espèces et les proportions de chacune d'elles s'étudient au moyen d'échelles et d'indices.

Tout d'abord il faut savoir qu'il existe différents indices pour évaluer la richesse en espèces bactériennes ainsi que la diversité en espèces bactériennes (36). La richesse correspond au nombre d'espèces différentes au sein de notre échantillon, tandis que la diversité correspond à la richesse mêlée à une notion de répartition du nombre d'individus par espèces bactériennes, c'est-à-dire à l'existence éventuelle d'une espèce dominante. Les indices qui permettent d'évaluer la richesse sont les indices ACE et Chao1. Plus ces indices sont grands, plus la richesse en espèces bactériennes est importante. Shannon et Simpson

sont quant à eux des indices qui évaluent la diversité bactérienne. Voici un petit schéma illustrant leur signification.



Figure 26 : Présentation des deux principaux indices de diversité bactérienne

Nous retiendrons qu'un indice de Shannon qui tend vers zéro exprime la dominance d'une espèce bactérienne par rapport aux autres (diversité minimale), et qu'un indice de Shannon qui augmente témoigne la codominance entre les espèces présentes dans notre échantillon (diversité maximale). Quant à l'indice de Simpson, compris entre zéro et un, il est inversement proportionnel à la diversité. C'est-à-dire qu'en tendant vers zéro il exprime la codominance entre les espèces bactériennes (diversité maximale) et qu'en tendant vers un il exprime qu'une espèce est dominante (diversité minimale) (37) (38). Attention, il existe dans la littérature un indice de Simpson compris entre zéro et un qui est directement proportionnel à la biodiversité. Dans tous les cas, l'indice de Shannon est corrélé à l'indice de Simpson. Le tableau 2 ci-dessous illustre la richesse et la diversité de la flore des enfants de notre étude au deuxième, au septième ainsi qu'au trentième jour post-natal.

Tableau II : Estimation de la richesse et de la diversité des espèces bactériennes présentes au moyen d'indices spécifiques

Echantillon	Nombre de séquences	OTUs	Indices d'estimation de richesse		Indices d'estimation de la diversité		Pourcentage de séquences identifiées
			ACE	Chao1	Simpson	Shannon	
2 jours après la naissance	421	28	67	48	0.440	1.516	99.9
7 jours après la naissance	304	17	18	17	0.246	1.891	99.9
30 jours après la naissance	352	27	31	29	0.132	2.437	89.5

(35)

D'après ce tableau, la richesse de la flore intestinale apparaît la plus élevée le deuxième jour après la naissance avec des indices ACE et Chao1 respectifs de 67 et 48. Cependant la diversité des espèces est la plus élevée au trentième jour, **en effet l'indice de Shannon** est maximal avec 2.437 au trentième jour contre 1.516 au deuxième jour, et **l'indice de Simpson** se rapproche bien de zéro en passant de 0.440 à 0.132. Cela illustre une diversification au fur et à mesure du temps avec une plus grande variété **d'espèces** présentes mais chacune en proportion plus faible. Le pourcentage de séquences identifiées est également au plus bas au trentième jour, exprimant là encore une diversification importante de la population bactérienne présente dans nos échantillons de selles. Cette diversification notable entraîne **un nombre certain d'espèces non identifiées par les techniques d'étude actuellement disponibles.**

La notion d'espèce étant difficile à définir sur des bases moléculaires, la plupart des auteurs préfèrent classer les **gènes d'ARNr 16S en unités taxonomiques** opérationnelles (OTUs) ou taxons, définis par un seuil de similarité, plutôt que de les affilier à des espèces ou à des genres (39). Le nombre de taxons présents dans la flore intestinale est maximal le deuxième jour avec 28 OTUs et minimal au septième jour avec 17 OTUs. Nous avons **approximativement 6 taxons qui sont présents tout au long de l'étude** (35). Globalement, il faut souligner que chaque nouveau né a une communauté bactérienne qui lui est propre. La composition de chacun de nos échantillons est différente. On peut ainsi assimiler le **microbiote intestinal d'un individu à sa « carte d'identité »** (40).

Durant les premières 48 heures, la colonisation du tractus digestif du nouveau né se fait **dans un ordre établi qui est indépendant de l'alimentation. L'environnement colique est propice au développement d'une flore aérobie dominée par les streptocoques et les entérobactéries. Cette colonisation se fait via l'univers bactérien riche dans lequel se trouve le nouveau né, constitué notamment de la flore vaginale et fécale de la mère, et de la flore environnementale. A partir du troisième jour s'établit une colonisation par une microflore anaérobie stricte avec en premier des espèces du genre *Bifidobacterium*, puis *Bacteroides*, *Clostridium* et *Fusobacterium* (2). Cette colonisation anaérobie s'effectue sous contrôle de l'alimentation mais varie également selon le mode de vie et les personnes de l'entourage au contact de l'enfant** (40).

2) Composition du microbiote intestinal et son évolution

Nous nous basons ici sur la composition intestinale en espèces bactériennes des échantillons de selles recueillis dans la même étude que vue précédemment, mais simplement chez les neufs nouveaux nés brésiliens **n'ayant pas reçu** de traitement antibiotique.

Le tableau 3 suivant expose la prévalence (P) ainsi que l'abondance relative (AR) en espèces bactériennes présentes dans nos échantillons de selles au deuxième, au septième et au trentième jour.

Tableau III : Prévalence et abondance relative des genres bactériens présents dans le microbiote intestinal de neuf nouveaux nés brésiliens

Genres bactériens	Deuxième jour (n=9)		Septième jour (n=9)		Trentième jour (n=9)	
	P (%)	AR (%)	P (%)	AR (%)	P (%)	AR (%)
<i>Bacteroides</i>	33	10	22	4	33	10
<i>Clostridium</i>	44	3	22	1	56	33
<i>Escherichia</i>	100	61	78	47	67	31
<i>Enterobacter</i>	44	9	0	0	33	1
<i>Klebsiella</i>	22	1	22	2	44	2
<i>Lactobacillus</i>	11	1	22	3	33	5
<i>Staphylococcus</i>	22	2	33	10	0	0
<i>Streptococcus</i>	56	7	44	13	44	6
<i>Uncultured Bacteria</i>	60	3	78	10	80	5
<i>Veillonella</i>	22	1	44	7	44	5
<i>Others</i>	25	2	44	3	44	2

(35)

✓ Au deuxième jour :

Escherichia coli est présent avec une prévalence de 100% dans tous nos échantillons et avec une abondance relative de 61% qui est la plus élevée. Des genres anaérobies facultatifs sont présents, comptant des bactéries gram négatif : des entérobactéries dont *Enterobacter* avec une prévalence de 44% (AR 9%), *Klebsiella* 22% (AR 1%) ; et des *cocci* gram positif : *Streptococcus* 56% (AR 7%) et *Staphylococcus* 22% (AR 2%). Remarquons tout de même la

présence de bactéries anaérobies strictes telles que *Bacteroides* présentant une prévalence de 33% **ainsi qu'**une abondance relative de 10% et *Clostridium* présentant une prévalence de 44% avec une abondance relative faible de 3%.

✓ Au septième jour :

Escherichia coli est moins dominant mais reste très présent avec une prévalence de 78% et une abondance relative de 47%. *Streptococcus* et *Staphylococcus* sont présents en proportion relativement similaires (**AR d'environ 10%**) avec des prévalences respectives de 44 et de 33%. Les bactéries anaérobies strictes *Bacteroides* et *Clostridium* ont une prévalence identique de 22% avec une abondance relative faible de 4 et de 2% respectivement. *Lactobacillus* voit sa prévalence passer de 11 à 22% et son abondance augmente de 1 à 3%. Notons la forte prévalence de 78% qui rassemble des bactéries non identifiées.

✓ Au trentième jour :

On observe une distribution plus homogène entre les différents genres bactériens. La prévalence de *Clostridium* à **56% se rapproche de celle d'Escherichia** à 67% de même que leur abondance relative est assez similaire avec 33% et 31%. *Klebsiella* atteint une prévalence de 44% avec une AR de 2%. *Bacteroides* est présent dans 33% des échantillons avec une AR de 10% comme au deuxième jour. Et comme au septième jour, *Veillonella* est présent chez 44% des échantillons avec une prévalence à peu près équivalente de 5%. *Lactobacillus* atteint la prévalence de 33% et une AR de 5%.

Au fil des jours, on peut donc déjà percevoir une augmentation de la prévalence **ainsi que de l'abondance des Lactobacillus**, **ainsi qu'une certaine stabilité de la prévalence ainsi que de l'abondance des Bacteroides**. *Escherichia coli* reste présent de façon importante même si on constate une légère baisse de sa prévalence et de son abondance. La prévalence des bactéries non identifiées car non cultivables est initialement importante et augmente même pour atteindre les 80%. Les *Staphylococcus* disparaissent en revanche avec une prévalence de 0% au trentième jour.

3) Facteurs influençant la composition du microbiote intestinal

1. Les facteurs externes

a) Exposition prénatale, environnement maternel :

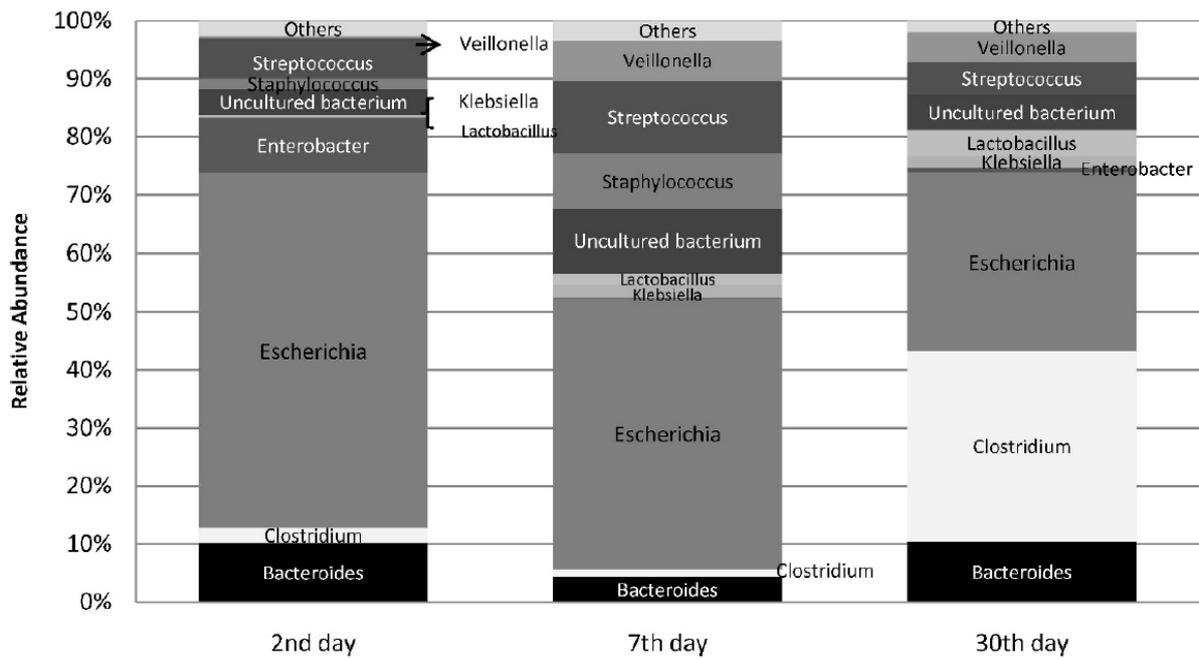
Les mères vivant dans des fermes durant leur grossesse ont des enfants moins **fréquemment touchés par des problèmes allergiques et par l'asthme** (41). Cette constatation **s'étend aux** foyers où vivent des animaux de compagnie comme les chats et les chiens. Là encore les enfants nés dans un tel milieu ont présenté une meilleure protection contre le développement de phénomènes allergiques (42).

Un facteur en revanche non protecteur, **une prise d'antibiotiques** par la mère pendant la grossesse augmente de manière dose-dépendante **l'apparition d'asthme durant l'enfance** (42). En parallèle, une hygiène trop stricte de la mère et une flore vaginale perturbée amènera à une AR faible en Lactobacilles (43). **Il faut également noter qu'une consommation de produits industriels stériles par la mère diminue la production d'acide lactique par les bactéries.**

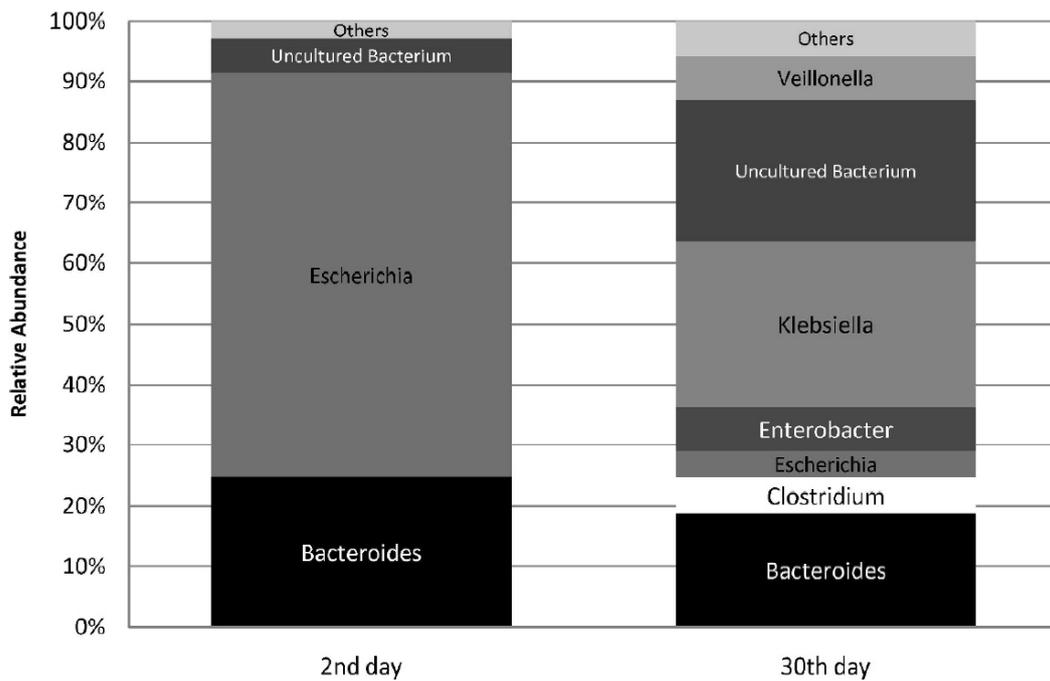
b) La prise d'antibiotique:

Nous **allons nous pencher sur l'impact** d'un traitement oral par antibiotique sur la composition de la flore intestinale. **Concernant toujours l'étude des dix nouveaux nés brésiliens, l'un parmi eux avait reçu un traitement par une céphalosporine de première génération.**

Je vous présente, sur la page suivante, la figure 27 qui illustre la divergence des proportions en espèces bactériennes des neuf **enfants précédemment étudiés avec l'enfant** ayant pris le traitement antibiotique.



A



B

Figure 27 : Abondance relative des espèces bactériennes

(35)

Légende Figure 25

A. chez les enfants n'ayant pas pris de traitement antibiotique
 B. chez l'enfant ayant pris un traitement antibiotique

Chez l'enfant ayant pris le traitement antibiotique, l'étude au deuxième jour apporte des résultats similaires à ceux décrits précédemment **pour les nouveaux nés n'ayant pas reçu** de traitement. Le traitement oral antibiotique a en effet été instauré le septième jour de vie. **Aucun échantillon de selles n'a** été prélevé au septième jour.

Au trentième jour : l'**abondance relative d'*Escherichia*** a beaucoup diminué passant de 31% à seulement 4%. *Klebsiella* en revanche voit son abondance relative augmenter pour atteindre 28%. Les bactéries anaérobies représentent 35% **des séquences obtenues dans l'échantillon** de selles avec en premier *Bacteroides* puis *Clostridium*.

D'après une étude chez 1032 enfants aux Pays-Bas (41), le recours à un traitement antibiotique (majoritairement de l'amoxicilline) durant le premier mois de vie fait décroître le taux de Bifidobactéries et de *Bacteroides fragilis*.

c) L'existence de frères et sœurs

D'après cette même étude aux Pays-Bas (41), la présence de frères et sœurs plus âgés est corrélée à un plus faible taux de bactéries présents par gramme de selles dans les échantillons récoltés, avec parmi elles une proportion élevée de Bifidobactéries en **comparaison à des enfants sans frères et sœurs**. On retrouve les mêmes conclusions dans d'autres publications.

d) Le rôle de l'allaitement

Une fois que la colonisation du tractus gastro-intestinal a eu lieu, le microbiote **intestinal va pouvoir se développer**. C'est l'alimentation du nouveau né qui va jouer un rôle essentiel. En effet, différentes études ont démontré les divergences de composition du microbiote intestinal chez des enfants nourris au sein comparé à ceux nourris au lait infantile. Les enfants nourris au sein développent une flore qui est dominée par des Bifidobactéries et des Lactobacilles qui représentent entre 60 et 91% de la microflore intestinale (2). **De plus on observe une diminution de la proportion d'*Escherichia coli*** et de *Clostridium difficile* pour ces enfants exclusivement allaités (41). En revanche, les enfants nourris au lait infantile développent une microflore plus complexe avec une baisse de **l'abondance des Bifidobactéries qui dominent toujours mais à 40% seulement**, avec des bactéries anaérobies strictes telles que *Bacteroides*, *Clostridium* et *Staphylococcus*. Les bactéries aérobies sont présentes en plus grand nombre chez ces enfants nourris au lait infantile. Il a de plus été observé que les enfants nourris avec des formules infantiles sont plus touchés par les troubles gastro-intestinaux telles les diarrhées infectieuses (à rotavirus en particulier), et ont un risque plus élevé de développer des allergies, notamment

alimentaires. L'absence d'allaitement représente, après la prématurité et l'accouchement par césarienne, un risque important de dysbiose (40). Le lait maternel renferme effectivement **l'essentiel pour procurer à l'enfant de quoi renforcer ses défenses**. De nombreuses cellules y sont présentes (4 milliards de cellules par litre), dont 5 à 10% de lymphocytes avec 83% de lymphocytes T et 6% de lymphocytes B. Ces lymphocytes **compensent l'immaturité du nouveau né par un transfert rapide des défenses immunitaires de la mère à l'enfant** (32). Adapté aux besoins du nouveau né, le lait maternel favorise le développement du système **immunitaire ainsi que le développement d'une flore intestinale dominée par les Bifidobactéries** qui, nous le verrons par la suite, sont bénéfiques pour la santé.

Le tableau 4 présente les différences de composition entre le lait humain et le lait de vache en vitamines, minéraux et oligo-éléments, ainsi que leur composition énergétique respective accompagnée de leur répartition en protéines, en glucides et en lipides.

Tableau IV : Comparaison des compositions du lait humain et du lait de vache

	Lait humain	Lait de vache
Vitamines hydrosolubles (mg/litre)		
-B1 (thiamine)	0.2	0.4
-B2 (riboflavine)	0.4	1.7
-B6 (pyridoxine)	0.1	0.5
-B12 (cobalamine)	0.0001	0.0045
-B9 (acide folique)	0.0014	0.05
-C (acide ascorbique)	43.0	18.0
Vitamines liposolubles (mg/litre)		
-A (acide rétinoïque)	0.5	0.4
-β-carotène	0.3	0.2
-D (cholécalférol)	traces	0.0008
-E (α-tocophérol)	5.6	1.1
-K	0.010	0.03
Minéraux (mg/litre)		
-Calcium	300	1250
-Magnésium	35-45	120
-Phosphore	150	860
-Sodium	100	490
Oligo-éléments (µg/litre)		
-Aluminium	0.5	0.6-1.0

-Cuivre	0.4	0.1-0.4
-Fer	0.7	0.2
-Iode	0.08	-
-Manganèse	0.02	0.01-0.03
-Molybdène	0.002	0.07
-Zinc	2.4	3-6
Valeur énergétique (kcal/litre)	690	705
Protéines (g/litre)	10.6	32.0
Caséines	3.7	26.0
Protéines solubles	6.9	6.0
- α -lactalbumine	3.6	2.7
- β -lactalbumine	-	1.5
-Lactoferrine	1.5	traces
-Lysozyme	3.0	traces
-Albumine sérique	0.5	0.3
Immunoglobulines	1.0	0.7
-IgA sécrétoires	1.00	-
-IgG	0.01	-
-IgM	0.01	-
-IgD	traces	-
Glucides (g/litre)	75-80.0	48.0
-Lactose	70.0	48.0
-Oligosaccharides	5-10	-
Lipides (g/100g de matières grasses)	45.0	35.0
-Triglycérides	98.0	96.0-98.0
-Diglycérides	0.7	0.3-1.6
-Monoglycérides	traces	traces
-Phospholipides	0.3	0.2-1.0
-Cérébrosides	traces	traces
-Stérols	0.3	0.2-0.4
-Acides gras libres	0.4	0.1-0.4

(2)

Le lait humain regroupe des composés intéressants et en juste proportion, le lait de vache n'est pas son équivalent. En premier lieu nous pouvons parler des protéines du lait

humain qui y sont présentes à hauteur de 10,6 g/L. Elles regroupent les caséines et les protéines solubles encore nommées protéines du lactosérum.

Les caséines sont des glycoprotéines insolubles présentes sous différentes formes. La caséine **β est la plus présente et joue un rôle nutritionnel important** car elle est capable de fixer le calcium et de favoriser sa biodisponibilité, et améliore **l'absorption d'ions divalents comme le zinc**. La caséine **κ stimule la croissance des bifidobactéries et possède une activité antimicrobienne**, notamment contre *Helicobacter pylori* en inhibant son adhésion.

Les protéines solubles se composent de quatre éléments majeurs qui sont, du plus au moins abondant :

- ✓ L' **α -lactalbumine (30%) qui est source d'acides aminés essentiels**. Sa digestion apporte à l'enfant des **peptides d'activité antibactérienne et immunostimulante**.
- ✓ Le lysozyme qui est présent dans le lait à hauteur de 3 g/L. **C'est une hydrolase acide** sécrétée par les granulocytes et par les monocytes sanguins. Elle est bactéricide par lyse des parois bactériennes.
- ✓ La lactoferrine qui **est dotée d'un pouvoir bactériostatique puissant puisqu'elle** est capable de fixer le fer, élément de croissance indispensable à certains organismes. Elle **augmente également l'absorption du fer par l'enfant au niveau intestinal**.
- ✓ L'**albumine sérique**. Cette protéine est indispensable au maintien de la pression osmotique permettant ainsi une bonne répartition des liquides entre les vaisseaux et les tissus.

D'autres protéines du lait maternel sont les immunoglobulines (Ig) ou anticorps (AC). Actrices du système immunitaire, elles sont antibactériennes, antivirales et antiparasitaires. **On observe une prédominance d'IgA sécrétoires (IgA S)** dans le lait maternel, et ce sont ces **anticorps qui procurent à l'enfant l'immunité de la mère en exerçant au niveau du tube digestif une défense contre les antigènes bactériens, viraux mais aussi contre certains antigènes alimentaires (2)**.

Certaines fractions peptidiques présentes dans le lait maternel seraient capables de stimuler la **croissance de Bifidobacterium** et ainsi **d'orienter la constitution du microbiote intestinal (32)**.

Suite aux protéines nous pouvons constater l'abondance en glucides présent dans le lait humain à hauteur de 75 g/L. Le lactose est le **glucide essentiellement présent**. C'est un **apport d'énergie essentiel en plus d'être une aide précieuse à l'assimilation de certains minéraux** comme le calcium, le magnésium ou encore le phosphore. Le lactose induit une forte **production d'acide lactique** grâce au métabolisme microbien, créant un milieu acide néfaste au développement de bactéries basophiles protéolytiques de putréfaction, mais propice au **développement d'une microflore acidophile anaérobie dont les principaux représentants sont les Bifidobacterium et les Lactobacillus**. S'ajoute à ce milieu acide l'action synergique d'**oligosaccharides qui accentuent le développement de ces deux genres bactériens à profil protecteur intéressant pour la flore intestinale**.

Les lipides du lait maternel sont présents à hauteur de 45 g/L et constituent une source **importante d'énergie pour le nouveau-né**. Ils fournissent des acides gras essentiels intervenant dans le métabolisme des leucotriènes, des prostaglandines via le métabolisme de **l'acide arachidonique par les cyclo-oxygénases et les lipo-oxygénases**. De plus ces acides gras essentiels participent activement à la construction de nombreuses structures cellulaires telles que les cérebrosides et les gangliosides, constituants des membranes des cellules du système nerveux. **Ils ont un rôle fondamental dans l'intégrité des membranes cellulaires via les phospholipides**.

Le lait maternel regroupe également des vitamines hydrosolubles (vitamines B et C) et liposolubles (vitamines A, D, E et K), des oligoéléments (fer, cuivre, **zinc, manganèse...**), et des minéraux (calcium, magnésium, phosphore et sodium) qui couvrent les besoins de **l'enfant et sont indispensables à son développement ainsi qu'à sa santé**.

Malgré tous ces intérêts que regroupe le lait humain, l'allaitement n'est pas toujours possible. Un mauvais état de santé, une insuffisance de sa production ou encore le refus de la mère entraîne l'usage de formules infantiles à base de lait de vache.

Le lait de vache apporte un excès de protéines à l'enfant (32 contre 10 g/L) qui accentue le développement d'une flore protéolytique basophile de putréfaction au niveau du côlon, constituant un excellent milieu de culture pour les agents pathogènes. De plus, les protéines **du lait de vache étant étrangères à l'organisme humain, une intolérance immunologique à leur égard peut entraîner des troubles d'une gravité variable, dont des diarrhées, un choc allergique, des troubles digestifs et des éruptions cutanées**.

Au niveau glucidique, le lactose est beaucoup moins présent dans le lait de vache (48 contre 70 g/L) et les oligosaccharides en sont absents.

En ce qui concerne les lipides, le lait de vache a un apport similaire au lait humain (35 g/L contre 45 g/L pour le lait maternel). **Cependant l'apport en acides gras essentiels est plus important avec le lait maternel. Notamment l'acide linoléique et arachidonique (2).**

Il est vrai que le lait de vache regroupe des vitamines, minéraux et oligoéléments essentiels **intéressants, de plus qu'il contient plus de calcium** que le lait humain. Cependant pour des raisons de biodisponibilité, **il n'est pas une ressource intéressante pour l'enfant qui ne peut en profiter** pour des raisons biochimiques variées.

De plus, le lait maternel constitue un apport notable en bactéries **à l'enfant. Un apport de 800 mL** de lait par jour équivaut à une ingestion de 10^5 à 10^7 bactéries commensales. Les bactéries commensales colonisent naturellement l'organisme sans provoquer de maladie, dans le cas d'un individu immunocompétent. Ces bactéries sont notamment des staphylocoques, des streptocoques et des bifidobactéries. Il a été démontré une hypothèse de « circuit entéromammaire », c'est-à-dire **que les bactéries commensales présentes dans l'intestin de la mère rejoindraient la glande mammaire par voie endogène à l'aide des cellules dendritiques et des macrophages (44).** Cet apport est un élément important puisqu'il est bénéfique au développement du système immunitaire de l'enfant.

L'évolution des connaissances scientifiques et des procédés industriels de fabrication améliore jour après jour la qualité nutritionnelle des laits infantiles afin de converger vers **l'intérêt nutritionnel du lait maternel. On réduit par exemple le taux de protéines et on** compense le manque de glucides avec un apport de saccharose ou de maltodextrines. On supplémente les formules en acides gras polyinsaturés, en nucléotides et en composés spécifiques telles que la lactoferrine et le lysozyme qui ne sont présents dans le lait de vache **qu'à l'état de traces.** Cependant une voie novatrice et prometteuse consiste à ajouter des probiotiques et/ou des prébiotiques aux formules infantiles (45).

e) Le sevrage

Démarrant entre trois et cinq mois après la naissance, **et s'achevant** à la fin de la première année de vie, le sevrage est la période où des aliments autres que le lait sont **introduits dans l'alimentation du nouveau-né. L'ingestion d'aliments solides** va induire des modifications de la flore intestinale autant au niveau de sa composition que de ses capacités métaboliques. Cette période est donc souvent associée à des troubles gastro-intestinaux. Le microbiote intestinal se complexifie. On observe plus de **Bacteroides et d'entérocoques, d'entérobactéries et de streptocoques aérobies (2).** Le pH augmente dans les fèces. A la fin de cette période de sevrage, les jeunes enfants ont un microbiote relativement stable et similaire

à celui d'un adulte. Son activité métabolique n'est cependant pas encore optimale. L'équivalence est obtenue entre deux et trois ans.

f) Le mode de délivrance

Les enfants nés par voie vaginale sont colonisés en premier lieu par les bactéries fécales et vaginales de leur mère (41), tandis que les enfants nés par césarienne sont exposés aux bactéries de l'environnement hospitalier et des personnels soignants.

Une césarienne entraîne une diminution de la proportion de Bifidobactéries et de *Bacteroides fragilis*, tandis que parallèlement la proportion d'*E. coli*, de *Staphylococcus*, de *Streptococcus* et de *C. Difficile* est plus importante (41). Les enfants nés ainsi sont souvent amenés à passer un séjour plus long à l'hôpital et à recevoir un traitement antibiotique. De plus, a été constaté une hausse de 20% de la prévalence d'asthme et de phénomènes allergiques chez les enfants nés par césarienne (43). Ceci est le résultat de la proportion diminuée en microorganismes à vocation protectrice que sont les Bifidobactéries et les *Bacteroides*.

Ce sont les enfants nés par voie vaginale au domicile de la mère, et exclusivement nourris au sein, qui ont la flore la plus bénéfique, avec une proportion importante de Bifidobactéries et une abondance diminuée en *E. coli* et en *C. difficile* (41).

g) L'hygiène

D'après une étude sur la microflore intestinale chez des enfants allergiques de Suède et d'Estonie âgés de deux ans (43), on a noté une possible corrélation entre une hygiène trop stricte lors de l'accouchement ainsi qu'une flore vaginale perturbée avec une diminution de la proportion de *Lactobacillus*.

La prévalence croissante des phénomènes allergiques tels que l'asthme ou la dermatite atopique sont en fait le résultat d'une exposition faible aux infections durant la petite enfance. En quelque sorte les enfants sont privés de *stimuli* immunologiques.

2. Les facteurs internes liés à l'hôte

Les facteurs internes influençant la composition et la mise en place du microbiote intestinal sont nombreux. La physiologie de l'hôte, les nutriments endogènes, l'habitat colique, le pH, le potentiel d'oxydoréduction, les interactions microbiennes, la muqueuse épithéliale, le péristaltisme, les sécrétions de l'hôte et les réponses immunitaires interviennent dans l'instauration du microbiote intestinal (2). A la naissance, l'intestin est

stérile. Après quelques heures, **les bactéries colonisent le tractus digestif. L'environnement intestinal est tout d'abord propice au développement des bactéries aérobies facultatives. La consommation en oxygène change les conditions environnantes et c'est alors qu'une** croissance de bactéries anaérobies strictes se met en place (32). Le pH acide, comme vu plus haut, **favorise le développement d'une microflore protectrice.**

Le mucus intestinal constitue une barrière physique contre les microorganismes pathogènes **de la lumière intestinale. Il a la propriété d'inhiber leur adhésion aux cellules** épithéliales. Le mucus est également un microenvironnement pour les bactéries autochtones, c'est-à-dire celles présentes fréquemment et en grand nombre dans la flore intestinale. Il permet **l'établissement d'un gradient de nutriments, d'oxygène et de pH** à travers sa structure. Le tout forme ce que l'on appelle un biofilm (2).

Le schéma 28 de la page qui suit récapitule les éléments clés qui impactent sur le développement du microbiote intestinal et ainsi sur la mise en place des défenses immunitaires chez le nouveau né. **Nous retiendrons qu'une exposition aux antibiotiques, ainsi que l'urbanisation et le recours aux laits infantiles constituent un risque d'altérer la composition du microbiote intestinal et ainsi d'aboutir à la dysbiose qui favorise la survenue de pathologies principalement d'ordre allergique ou inflammatoire. Les facteurs protecteurs sont, quant à eux, le recours à l'allaitement maternel et l'exposition à divers antigènes durant la petite enfance. Ils apportent à l'organisme des *stimuli* lui permettant de déployer ses moyens de défenses.**

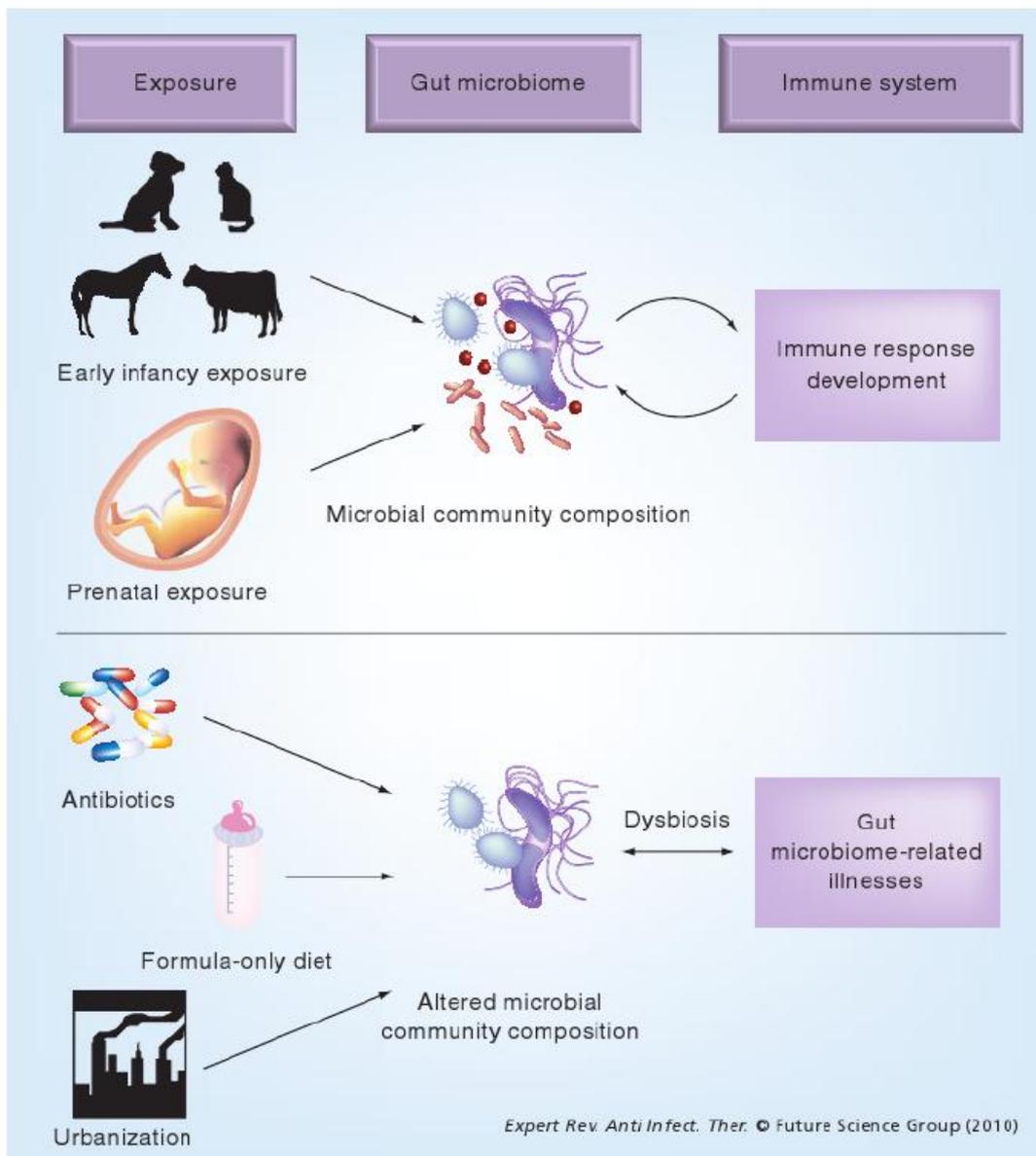


Figure 28 : Facteurs influençant la mise en place du microbiote intestinal et le développement du système immunitaire

(42)

Chapitre IV

Impact du microbiote intestinal sur le système immunitaire

Chapitre IV - Impact du microbiote intestinal sur le système immunitaire

La flore intestinale constitue un *stimulus* important pour la maturation du système immunitaire. Elle se compose d'une flore endogène résidente au sein de laquelle dominent les bifidobactéries qui la peuplent à plus de 90%, tandis que les lactobacilles sont dominants. Il existe également une flore de passage qui ne s'implante pas et qui se compose notamment de bactéries potentiellement pathogènes telles que *Klebsiella*, *Pseudomonas* et *Proteus* (40).

Nous pouvons voir dans l'illustration ci-dessous la répartition et la composition de la flore bactérienne intestinale. Nous remarquons que l'abondance de cette flore augmente de l'estomac au côlon où elle atteint un plus grand nombre d'espèces bactériennes, qui sont chacune présentes en quantités plus importantes. On passe en effet de l'estomac peuplé principalement de streptocoques et de lactobacilles à hauteur de 10^3 UFC (Unité Formant Colonies, c'est-à-dire dont l'unité cellulaire va donner une colonie), au côlon toujours peuplé de streptocoques et de lactobacilles, auxquels viennent s'ajouter des bifidobactéries, des entérobactéries, des staphylocoques, des streptocoques ainsi que des bactéries du genre *Bacteroides*, *Pseudomonas* et *Clostridium* à hauteur de 10^{10} UFC.

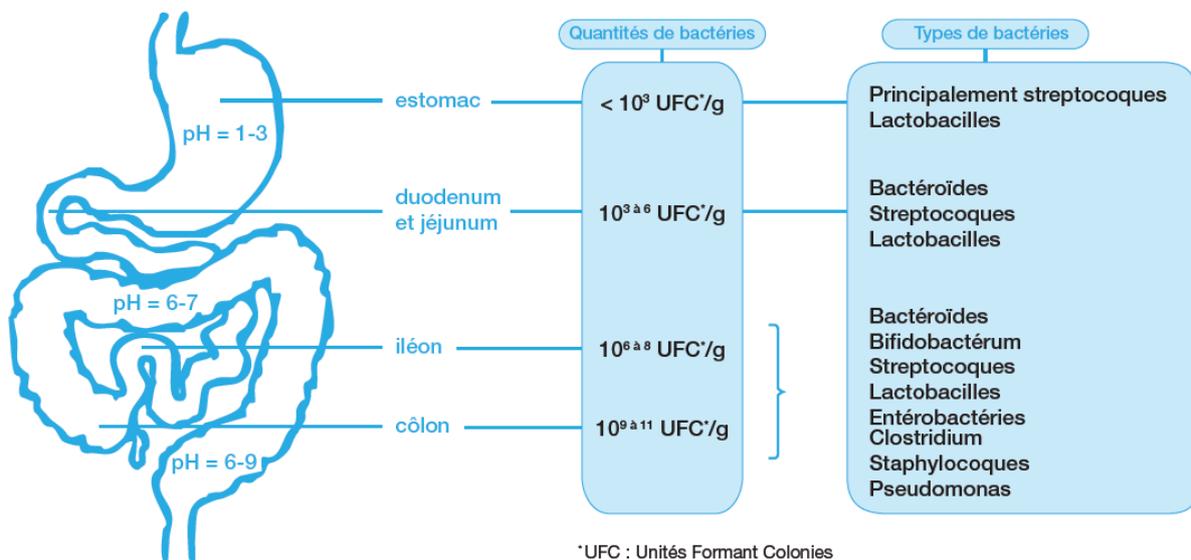


Figure 29 : Composition et répartition de la flore bactérienne intestinale

(40)

1) L'immaturité du système immunitaire à la naissance

Le tableau 5 illustre la mise en place à la naissance du système immunitaire. Le **nouveau né ne bénéficie pas immédiatement des moyens de défense d'un adulte. Il y a une faible exposition antigénique avant la naissance et cela entraîne une immaturité de son système immunitaire.**

Tableau V : Développement du système immunitaire

	Naissance	6 mois	1 an	2 ans	3 ans	4 ans	5 ans	5-15 ans	Adulte
Sécrétion acide	DVP	DVP							
Composition du microbiote	DVP	DVP	DVP	DVP					±
L NK	DVP	>>>	>>>	>>>	>>>	>>>			
Ig G	I	I	DVP	DVP	DVP	DVP	DVP		
Ig M	I	DVP							
Ig A	I	DVP	DVP	DVP	DVP	DVP	DVP	DVP	
L Th1	I	DVP	DVP	DVP					-
L T	I	I	I	DVP	DVP	DVP	DVP		

(32)

Légende Tableau V

Case blanche : **immunité d'un adulte**
 DVP : en développement
 >>> : Niveau supérieur à un adulte
 I : Immaturité
 ± : **Varie avec l'âge**
 - : **Décroit avec l'âge**

La barrière épithéliale **d'un nouveau né** est trop perméable autant au niveau du tractus respiratoire qu'au niveau du tractus gastro-intestinal. Les sécrétions qui participent à la **barrière chimique ne sont pas encore développées et le mucus n'est pas équivalent à celui d'un adulte. De plus, le nombre de neutrophiles et d'éosinophiles est réduit. L'activité des cellules présentatrices d'antigènes est également moins importante chez l'enfant et cela aboutit à une moindre production de cytokines, à une réduction du chimiotactisme, et à une expression moindre des glycoprotéines transmembranaires du CMH de classe II. Cependant les lymphocytes NK sont dès six mois et jusqu'à l'âge de cinq ans présents en grand nombre.**

Bien que le nombre de lymphocyte B soit élevé chez le nouveau né, la maturation du cytoplasme de ces cellules n'est pas complètement achevée. Il en résulte une faible quantité d'IgG circulantes, celles-ci étant en majeure partie d'origine maternelle. Les IgG sont en effet, comme précisé auparavant dans cette thèse, les seules Ig capables de traverser le placenta pendant la grossesse. De ce fait elles confèrent au nouveau né un moyen important de défense.

Les études disponibles montrent un niveau d'Ig équivalent à celui d'un adulte dès l'âge de dix ans (32).

2) L'immunité au niveau intestinal

L'exposition aux microorganismes constitue un élément majeur dans le développement et dans la maturation du système immunitaire. Elle impacte sur la protection contre les infections et réduit les risques d'allergies. L'intestin représente le site clé de l'éducation du système immunitaire puisqu'il comprend un grand nombre de cellules immunitaires et une concentration élevée de bactéries (10^{14} bactéries (7)), la plus haute du corps humain (32).

Le GALT (gut-associated lymphoid tissue) constitue une majeure partie du système immunitaire muqueux. La figure 30 nous illustre sa composition et son fonctionnement. L'induction de la réponse immune se fait via les plaques de Peyer qui sont constituées de 5 à 200 follicules lymphoïdes situés à des intervalles réguliers dans la partie terminale de l'iléon. Les sites effecteurs de la réponse immune sont l'épithélium intestinal et le tissu conjonctif sous-jacent (*lamina propria*) qui comprennent les cellules M et les cellules dendritiques sous-jacentes. Les cellules M sont des cellules épithéliales spécialisées qui permettent le transport des antigènes à travers l'épithélium vers le tissu lymphoïde situé dans la *lamina propria*. Ces cellules effectuent une endocytose, il y aura ensuite une présentation antigénique par les cellules dendritiques (32).

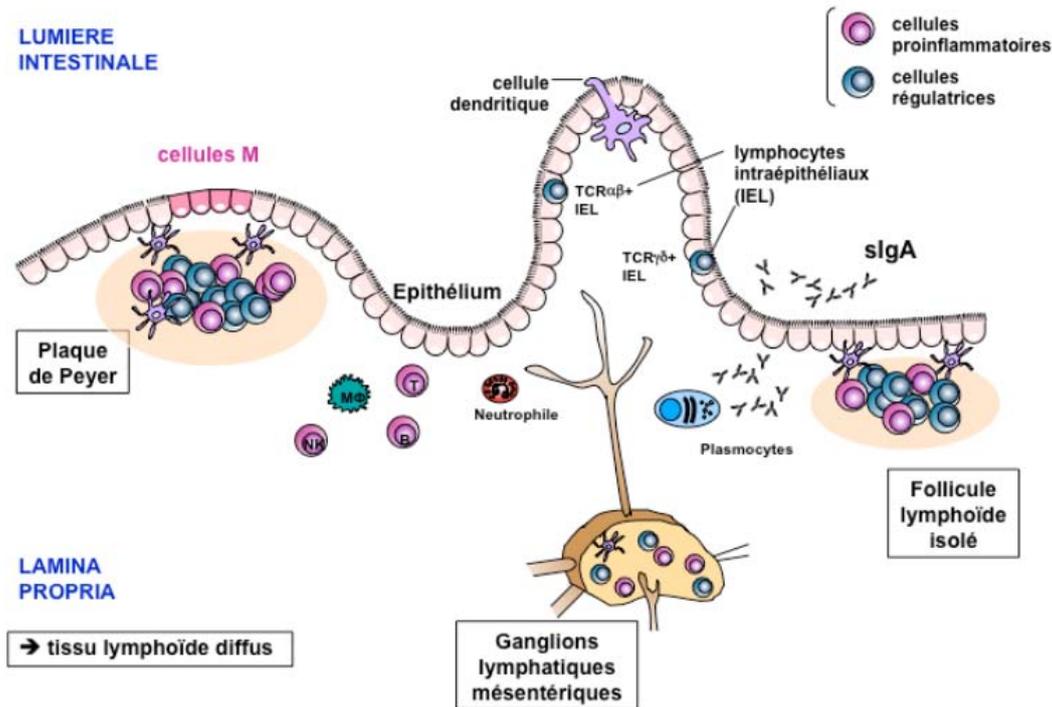


Figure 30 : Tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT)

(31)

Il faut savoir que l'alimentation et la microflore intestinale sont les sources majeures d'apport en antigènes étrangers au niveau de l'intestin. Une certaine tolérance orale permet de ne pas générer de réponse immunitaire pour chacun de ces antigènes. Le GALT permet de freiner la réponse immunitaire contre les éléments inoffensifs, et de promouvoir celle contre les éléments pathogènes. En effet les CPAs résidentes expriment un niveau bas en TLRs, ce qui rend inerte les MAMPs de la microflore commensale intestinale qui pénètrent normalement et en faible nombre à travers la muqueuse intestinale (32).

Les schémas 31 et 32 illustrent deux cas de figures : le cas où l'organisme est confronté à un élément pathogène et le cas où l'organisme développe un phénomène de tolérance en rencontrant des bactéries commensales ou encore des antigènes alimentaires. Dans le premier cas l'organisme va développer une réponse immunitaire pour se défendre. La CPA va alerter les lymphocytes Th CD4+ via le CMH de classe II, il y aura production d'AC mais également amplification de la réponse immunitaire innée de l'organisme via la sécrétion de diverses cytokines. Dans le second cas la CPA, ici la cellule dendritique, va mettre en jeu des lymphocytes Treg qui vont engendrer une tolérance systémique à l'encontre de l'AG en cause.

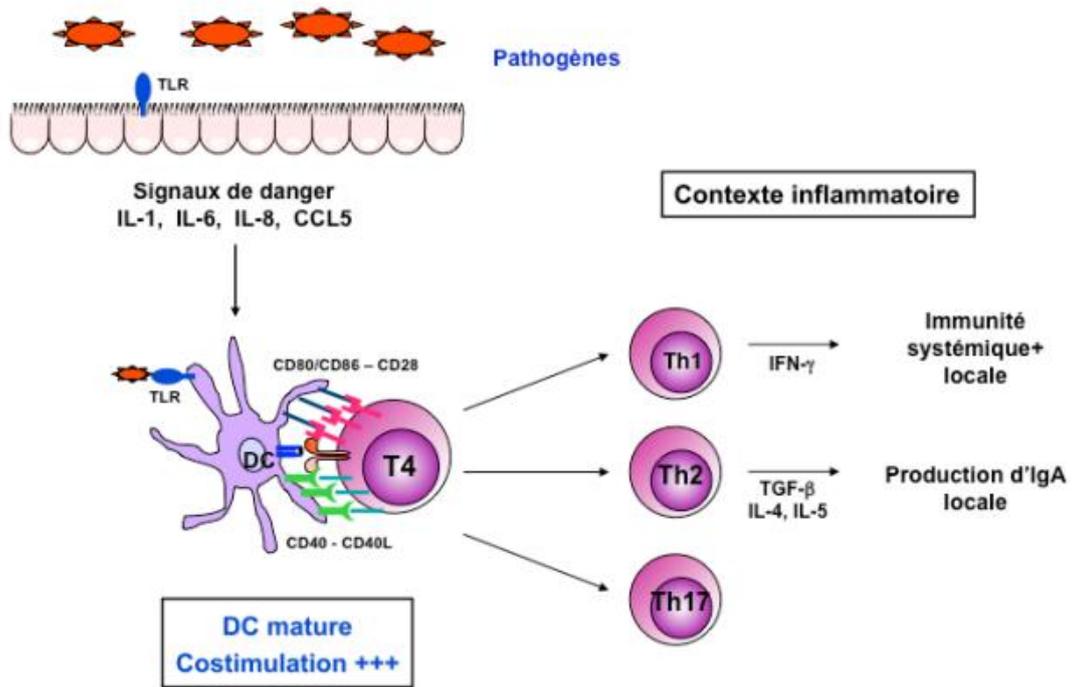


Figure 31 : Réponse immunitaire contre un élément pathogène

(31)

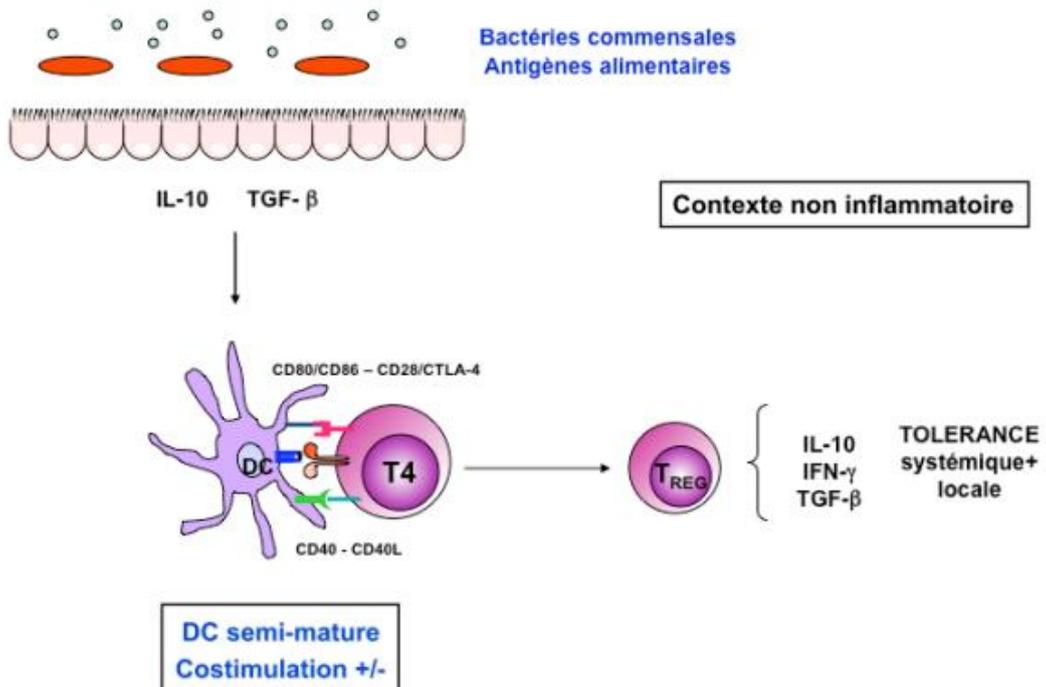


Figure 32 : Tolérance vis-à-vis des bactéries commensales ou d'antigènes alimentaires

(31)

3) Intervention du microbiote intestinal dans le développement du système immunitaire

L'interaction du tractus gastro-intestinal avec les bactéries qu'il colonise est le lieu principal qui permet d'enclencher la maturation des lymphocytes T. A la naissance, c'est la fonction des lymphocytes Th2 qui prime sur la fonction des lymphocytes Th1. Or ce sont ces lymphocytes Th2 qui entraînent des phénomènes allergiques puisque les cytokines qu'ils produisent sont notamment impliquées dans la réponse humorale avec production d'anticorps. C'est là qu'intervient l'exposition antigénique. Celle-ci permet de stimuler le développement des lymphocytes Th1 et ainsi de restaurer la balance entre l'immunité cellulaire qu'entraînent les lymphocytes Th1 et l'immunité humorale entraînée par les lymphocytes Th2 (42). Il y a établissement d'une homéostasie entre Th2 et Th1 qui permet d'instaurer le phénomène de tolérance protégeant ainsi l'hôte contre le développement d'un terrain atopique (46). Le microbiote intestinal induit donc la différenciation des cellules T en lymphocytes Th1 qui corrige l'excès de réponse Th2 instaurée naturellement à la naissance.

Les connaissances que nous avons au sujet du développement du système immunitaire en rapport avec le microbiote intestinal proviennent d'un modèle sur souris « germ-free », c'est-à-dire sur des souris qui n'hébergent pas de microorganisme dans leur intestin ou toute autre surface corporelle. L'étude de ce modèle « germ-free » a permis de mettre en évidence que l'absence de stimulation microbienne a un effet dans le développement de l'immunité innée (42).

La comparaison du modèle conventionnel avec des souris colonisées et ces souris germ-free a mis en évidence le rôle important des bactéries intestinales dans le développement complet du réseau veineux au niveau intestinal. En effet, les souris germ-free développent peu de villosités capillaires. De plus, cette étude a pu montrer que la flore commensale joue un rôle dans le développement des lymphocytes B au niveau des plaques de Peyer et ainsi dans la formation des IgA qui constituent la première barrière de défense des muqueuses de l'organisme. Une absence de lymphocytes T au niveau des plaques de Peyer est également décelée chez les souris germ-free, ce qui empêche le développement du phénomène de tolérance orale (32). Le modèle germ-free a effectivement montré un nombre de LT et de LB circulant faible ainsi qu'un nombre d'IgA fortement diminué (42).

Une supplémentation en bactéries non pathogènes telle que *Lactobacillus plantorum* a mis en évidence une augmentation de l'expression des récepteurs Nod2. Ceci illustre le rôle de la flore commensale dans la régulation de l'expression de Nod2. Il existe une homéostasie intestinale entre la flore commensale et l'immunité de l'hôte (33).

Une étude, toujours sur souris germ-free, a mise en évidence que sans colonisation du tractus gastro-intestinal, les lymphocytes T produisent naturellement plus de cytokines de type Th2 telle que l'IL-4. La colonisation de ces souris par une bactérie commensale **Bacteroides fragilis** a permis le développement d'une réponse à profil Th1 avec davantage production de l'IFN-gamma. La balance Th2/Th1 est alors retrouvée (46).

Le microbiote intestinal humain se compose de près de 10^{14} cellules bactériennes différenciées en plus de 500 espèces (47). **Son rôle dans le développement, l'éducation et le fonctionnement** du système immunitaire a clairement été établi. Ses perturbations sont impliquées dans le développement de nombreuses maladies inflammatoires telles que la **maladie inflammatoire de l'intestin (IBD pour Inflammatory Bowel Disease)**, les maladies auto-immunes, les allergies et le diabète de type II.

4) Différences de composition du microbiote intestinal chez un enfant atopique

L'atopie est définie comme une inflammation chronique causée par une réponse excessive des lymphocytes Th2 contre des antigènes communs et inoffensifs de l'environnement (47). **La prévalence de l'atopie chez les jeunes enfants ne cesse d'augmenter** depuis les dernières décennies. En effet, il y a un changement trop rapide du mode de vie qui **ne laisse pas le temps à la génétique d'effectuer les changements nécessaires au rétablissement d'un fonctionnement normal.**

L'eczéma est souvent le premier signe que nous pouvons voir apparaître chez les enfants à tendance atopique. C'est pourquoi une étude basée sur l'observation d'enfants qui présentent ou non des signes d'eczéma et en parallèle l'observation de la diversité du microbiote intestinal nous permet d'établir un lien de cause à effet quant à la diversité bactérienne et l'apparition d'un terrain atopique (48).

Une étude a été faite par la méthode de la DGGE (Denatured Gradient Gel Electrophoresis) pour étudier la relation entre cette diversité bactérienne et le risque de **développer de l'eczéma durant la petite enfance. Un groupe d'étude de 21** nouveaux nés ont permis de recueillir des échantillons de selles à 1 et 4 mois. Parmi ces 21 enfants, seuls 9 ont **déclenché un eczéma à l'âge de 6 mois. Les 12 autres enfants sont donc nos témoins négatifs (48).**

L'étude a bien entendu était sérieusement mise en place avec une sélection des mamans. Des questionnaires ont été remplis à différentes étapes : **Soit à l'hôpital avant la naissance, soit**

par téléphone au 2^o et au 6^o mois après la naissance des enfants. L'âge de la mère, son état de santé, ses antécédents allergiques et les symptômes associés ont notamment constitué de **grands centres d'intérêts**.

Les échantillons fécaux ont été récoltés de façon standardisée et la DGGE a été instaurée sur **une amplification des régions V2 et V3 de l'ADNr 16S**. Le nombre de bandes obtenues par cette technique et leur intensité respective ont été le support **au calcul de l'indice de Shannon** pour évaluer la biodiversité de nos échantillons. Le tableau suivant nous présente les éléments clés de notre étude.

Tableau VI : Caractéristiques importantes de l'étude, résultats de la DGGE et indice de Shannon

	Total (eczéma et témoins) n (%)	Eczéma positif n (%)	Témoins n (%)
Garçons	11 (52.4)	4 (44.4)	7 (58.3)
Délivrance vaginale	10 (47.6)	5 (55.6)	5 (41.7)
Césarienne	11 (52.4)	4 (44.4)	7 (58.3)
Antécédents maternels d'atopie	12 (57.1)	7 (77.8)	5 (41.7)
Délivrance à terme	17 (81.0)	7 (77.8)	5 (41.7)
Poids de naissance (g)	3319	3192	3415
Allaitement maternel	11 (52.4)	6 (66.7)	5 (41.7)
Garderie	5 (23.8)	6 (66.7)	4 (41.7)
Usage d'antibiotique	3 (18.8)	1 (16.7)	2 (20.0)
Bandes DGGE à 1 mois	4.4	3.8	4.8
Bandes DGGE à 4 mois	5.3	3.9	6.5
Indice de Shannon à 1 mois	0.66	0.53	0.75
Indice de Shannon à 4 mois	0.77	0.59	0.92

(48)

Nous n'avons pas de différence significative quant au mode de délivrance, au sexe des enfants, au poids de naissance, à l'utilisation d'antibiotiques, à l'allaitement maternel entre les enfants présentant de l'eczéma à 6 mois et nos témoins.

Les **bandes obtenues à l'issue de la DGGE** sont en nombre significativement plus élevé chez nos enfants témoins au premier mois avec une moyenne de 4,8 bandes contre 3,8, et encore plus élevé au quatrième mois avec une moyenne de 6,5 bandes contre 3,9 pour nos enfants **présentant de l'eczéma**. Il en est de même pour nos indices de Shannon. Ceci reflète une **diversité bactérienne plus importante chez un enfant qui ne présente aucun signe d'eczéma**. Rappelons qu'un enfant qui ne laisse pas apparaître d'eczéma durant son jeune âge présente un risque moins élevé **de développer d'autres symptômes d'atopie au cours de sa vie**.

Ces résultats nous présentent donc une diversité bactérienne différente entre ces 2 populations. Cette **différence persiste et même s'amplifie au cours des premiers mois de vie**. **L'hypothèse est qu'une réduction de l'exposition bactérienne pendant l'enfance augmenterait le risque de développer des maladies allergiques**. En effet, les lymphocytes Th2 développent des réactions antigène-**spécifiques par l'intermédiaire de la sécrétion** de diverses cytokines (IL-4, IL-5, IL-13) qui augmentent la production **d'IgE et amplifient** la prolifération **d'éosinophiles et de mastocytes**. Ces réactions antigène-**spécifiques sont à l'origine de la mise en place d'une immunité humorale qui a pour conséquence** un phénomène allergique. Cependant pendant la jeune enfance, l'exposition aux allergènes influence l'activité des lymphocytes Treg qui sont normalement censés supprimer l'activité Th1 et Th2. Une défaillance de ce système entraîne donc un excès de réponse immunitaire et des phénomènes allergiques qui ne devraient normalement pas avoir lieu. **L'homéostasie est rompue (voir figure 33)**.

Les lymphocytes Th1 sont eux responsables du développement d'une réponse immunitaire cellulaire par la production d'IFN-gamma en activant les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, les lymphocytes NK ainsi que les macrophages.

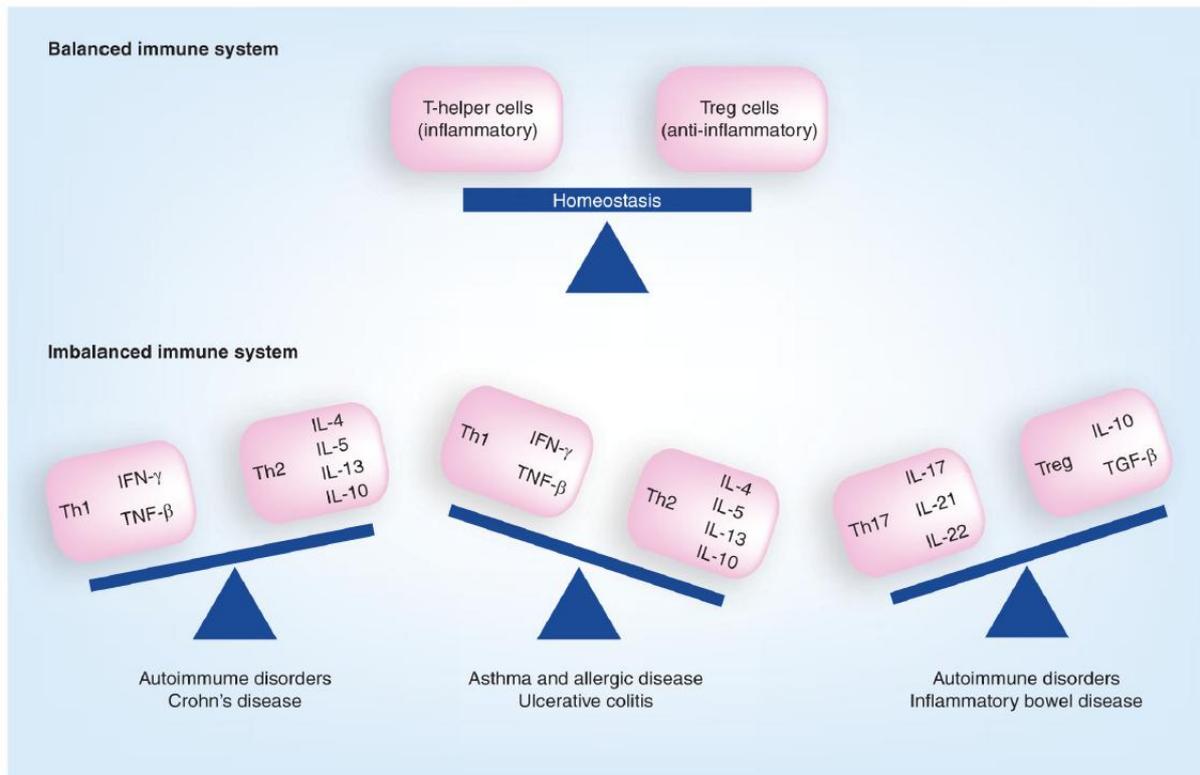


Figure 33 : Rupture de l'homéostasie du système immunitaire et ses conséquences

(42)

Le microbiote intestinal représente la source la plus importante de stimulation du système immunitaire après la naissance. C'est pourquoi des souris issues de modèles expérimentaux venues au monde avec un tractus gastro-intestinal stérile ne développent pas de réponse immunitaire régulée (46). La réintroduction de bactéries dans ce tractus a permis de restaurer la balance immunitaire.

Une étude basée cette fois sur 31 enfants âgés de 4 à 14 ans, dont 19 atopiques et 12 témoins, a également montré une divergence de composition du microbiote intestinal entre ces deux populations (47). Ici la technique employée est celle des microarrays avec une PCR. Il a été détecté ainsi 31 groupes bactériens qui couvrent 95% du microbiote intestinal humain. Pour cela cette étude est très représentative de la réalité. Les 19 enfants atopiques ainsi que les 12 témoins répondent à des critères précis tels que la délivrance naturelle à terme, l'allaitement maternel pendant les trois premiers mois de vie, ils n'ont pas développé de pathologie aiguë durant les deux dernières semaines et n'ont reçu aucun traitement antibiotiques durant les trois derniers mois, et ils ont entre de 4 et 14 ans. Les 19 enfants allergiques répondaient eux à des critères spécifiques d'allergie tels que la présence d'asthme, de rhinite allergique, de dermite atopique, d'allergie aux protéines du lait de vache...La collecte de selles s'est effectuée durant trois jours.

Au vu du tableau 7 suivant, le microbiote intestinal des enfants atopiques s'est révélé appauvri en *Clostridium* cluster IV, *Faecalibacterium prausnitzii* et *Akkermansia muciniphila*. En parallèle une hausse de l'abondance d'entérobactéries a été décelée. Nous avons détecté également une distribution différente des espèces de *Bifidobacterium* ou de *Lactobacillus* entre les enfants allergiques et non-allergiques. Cependant *Clostridium* cluster IV a une capacité d'induire la réponse des lymphocytes Treg dans le but de maintenir une homéostasie ; *F. prausnitzii* a la capacité de promouvoir de nombreux effets anti-inflammatoires ; et *A. muciniphila* a été récemment associée à un rôle protecteur et anti-inflammatoire de l'intestin. En parallèle, les entérobactéries entretiennent les phénomènes inflammatoires. Le profil type du microbiote intestinal chez les enfants allergiques est donc bien confirmé par ces données (47).

Tableau VII : Quantités de copies de gènes d'ARNr 16S bactériens par microgramme de fèces chez les enfants atopiques et chez les enfants témoins

Espèce/genre bactérien	Enfants atopiques	Enfants témoins
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	6.17*10 ⁶	2.03*10 ⁷
<i>Akkermansia muciniphila</i>	3.01*10 ⁵	5.03*10 ⁵
<i>Enterobacteriaceae</i>	3.86*10 ⁴	1.19*10 ⁴
<i>Clostridium cluster IV</i>	4.46*10 ⁶	1.55*10 ⁷
<i>Bifidobacterium</i>	1.08*10 ⁶	1.72*10 ⁶
<i>Lactobacillus group</i>	3.75*10 ²	5.48*10 ²

(47)

Une autre étude a voulu montrer la réduction de la diversité bactérienne de la flore intestinale chez les enfants présentant un eczéma atopique (49). Celle-ci s'est basée sur un groupe d'étude constitué par 35 enfants dont des italiens, des suédois et des britanniques, âgés d'une semaine dont 20 étaient en bonne santé et 15 présentaient des critères précis de dermatite atopique. Un dosage sur sérum a été effectué au 18^e mois pour doser les IgE totales et certaines IgE spécifiques d'allergènes alimentaires (blanc d'œuf, protéines du lait de vache, blé, cacahuètes...) et de pneumo allergènes (poils de chat, de chien, acariens, moisissures...). Les enfants atopiques montraient un taux élevé d'IgE totales ainsi qu'une sérologie positive à des IgE spécifiques de certains allergènes. Les autres enfants témoins ne présentaient aucune élévation des taux d'IgE totales ou spécifiques. Le tableau 8 nous dresse les points clefs de cette étude.

Tableau VIII : Présentation de l'étude sur les trois populations avec les groupes témoins et les groupes atopiques

	Groupe suédois		Groupe britannique		Groupe italien	
	Eczéma n=8	Témoins n=8	Eczéma n=4	Témoins n=7	Eczéma n=3	Témoins n=5
Césarienne	2	2	1	3	2	2
Asthme	1	0	2	0	0	0
Rhinite	1	0	3	0	1	0
Test Ig E spécifiques positif	5	0	4	0	1	0
Ig E total (kU/L), médiane	43	6.5	150	4	70	14

(49)

Le recueil d'échantillons de selles a été effectué lorsque les nouveaux nés avaient une semaine. Les techniques d'étude, après extraction de l'ADN de ces échantillons, étaient ici la technique T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) et la TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis).

Le tableau 9 nous présente les indices de Shannon et de Simpson qui permettent d'évaluer la biodiversité de nos échantillons.

Tableau IX: Diversité bactérienne du microbiote intestinal des enfants non atopiques et atopiques

	Enfants non atopiques	Enfants atopiques
Pics de T-RFLP	9.5	7.0
Indice de Shannon par T-RFLP	1.41	1.22
Indice de Simpson par T-RFLP	0.67	0.59
Bandes de TTGE	4.5	3.0
Indice de Shannon par TTGE	1.33	0.95
Indice de Simpson par TTGE	0.70	0.58

(49)

Ici l'indice de Simpson est directement proportionnel à la biodiversité bactérienne de nos échantillons. Ainsi les deux indices sont plus élevés dans la colonne de gauche concernant les enfants non-atopiques. Dans la même logique, le nombre de pics RFLT et le nombre de bandes TTGE sont en nombre plus grands chez nos enfants non atopiques. Cela confirme

l'existence d'une plus faible diversité bactérienne dans les échantillons de selles issus des enfants qui ont développé un terrain allergique. La flore intestinale des enfants atopiques serait moins diversifiée et moins riche.

Une étude a étudié la différence de composition de la flore intestinale entre des patients présentant une dermatite atopique (DA) et des témoins (50). **L'âge et le sexe ont été contrôlés** pour ne pas influencer les résultats. Il y avait 30 patients avec DA (âge moyen de 7,6 années, 16 garçons et 14 filles) et 68 témoins (âge moyen de 6,5 années, 31 garçons et 37 filles). **Après une semaine d'étude de leur comportement, des échantillons de selles ont été prélevés. Ici une simple technique de culture a été mise au point puisque l'étude a été faite il y a quelques années, en 2002.** La sévérité de la DA a été évaluée selon certains critères : La présence **d'érythèmes, de papules, d'une lichénification de la peau et de démangeaisons.** Le tableau 10 nous présente la composition en bactéries de nos échantillons témoins et de nos échantillons positifs à la dermatite atopique.

Tableau X : Composition de la microflore fécale des patients présentant une dermatite atopique et des témoins

	Groupe DA positif (n=30)		Groupe témoin (n=68)	
	Log CFU/g de fèces	Fréquence d'occurrence (%)	Log CFU/g de fèces	Fréquence d'occurrence (%)
<i>Staphylococcus</i>	4.04	83	4.25	59
<i>Enterococcus</i>	6.75	93	7.17	97
<i>Streptococcus</i>	7.60	47	8.33	47
<i>Enterobacteriaceae</i>	7.23	97	7.69	100
<i>Levures</i>	3.04	43	3.34	41
<i>Bifidobacterium</i>	9.75	93	10.10	100
<i>Eubacterium</i>	9.50	93	9.68	99
<i>Lactobacillus</i>	5.27	77	4.89	76
<i>Clostridium perfringens</i>	4.57	50	5.36	40
<i>Clostridium</i>	7.10	77	7.47	88
<i>Peptostreptococcus</i>	8.63	57	8.97	78
<i>Veillonella</i>	6.71	53	6.35	51
<i>Bacteroides</i>	10.02	100	10.19	100

(50)

On observe un niveau en *Bifidobacterium* significativement plus bas chez nos patients DA positifs. Et chez les 2 patients présentant les symptômes les plus sévères de DA, des *Bifidobacterium* n'ont pas été détectés. La microflore totale se révèle moins importante chez

les patients DA positifs. Le taux de *Clostridium*, de *Streptococcus* et d'*Enterobacteriaceae* est également plus bas chez les patients avec DA que chez nos témoins. Cependant la fréquence d'occurrence des *Staphylococcus* est plus élevée chez ces patients avec 83% contre 59% chez les patients sains.

Le graphique suivant nous illustre la relation de proportionnalité entre la sévérité de la dermatite atopique et le niveau de *Bifidobacterium*. Effectivement, plus la DA est sévère, et plus le taux en *Bifidobacterium* diminue. La fréquence de *Bifidobacterium* passe de 62% environ pour les DA les moins sévères à une fréquence de 19% pour les DA très sévères (50).

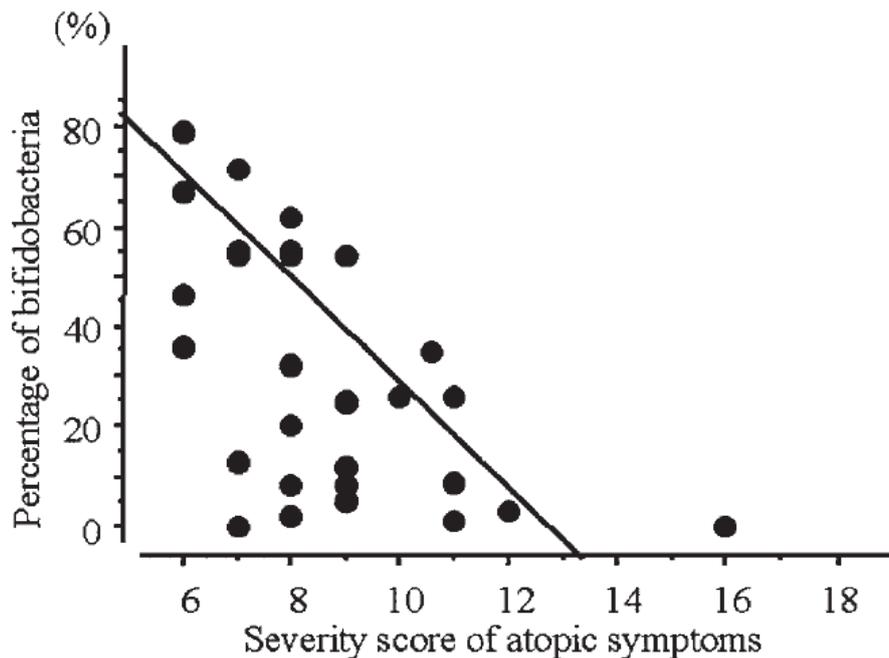


Figure 34 : Pourcentage de bifidobactéries présentes dans nos échantillons en fonction de la sévérité de la dermatite atopique

(50)

Une étude d'Abrahamsson et al. (51) a également étudié la diversité bactérienne du microbiote intestinal durant les premières années de vie et ses relations avec le développement de l'eczéma atopique (AE), c'est-à-dire de DA. Cette fois-ci l'étude a été faite par pyroséquençage d'échantillons de selles à 1 semaine, 1 mois et à 12 mois d'âge chez 20 enfants avec un taux d'IgE corrélé à une DA, ainsi que sur 20 autres enfants témoins qui ne présentaient aucune manifestation allergique jusqu'à l'âge de 2 ans. Le dosage des IgE a été effectué à 6, 12 et à 24 mois, et des prick tests cutanés ont également été faits pour mesurer la réaction allergique à divers allergènes. Les allergènes testés pour les prick tests et le dosage d'IgE spécifiques sont notamment le blanc d'œuf, les protéines de lait de vache, le blé et les cacahuètes.

Les prick-tests consistent en une petite scarification de la peau par piqûre au moyen d'une lancette appliquée sous pression à travers une goutte de l'extrait allergénique sur la face interne de l'avant bras. Nous pouvons observer cet acte sur la figure ci-dessous. Il faut utiliser un témoin positif (chlorhydrate d'histamine + phosphate de codéine) et un témoin négatif (solvant utilisé dans les extraits allergéniques) : Ces deux témoins sont obligatoires pour effectuer ce test. Un test positif laissera apparaître une rougeur diffuse accompagnée d'un prurit intense. La réaction est immédiate et on évalue son intensité par la mesure de l'induration (tissu biologique qui se durcit) en millimètre.

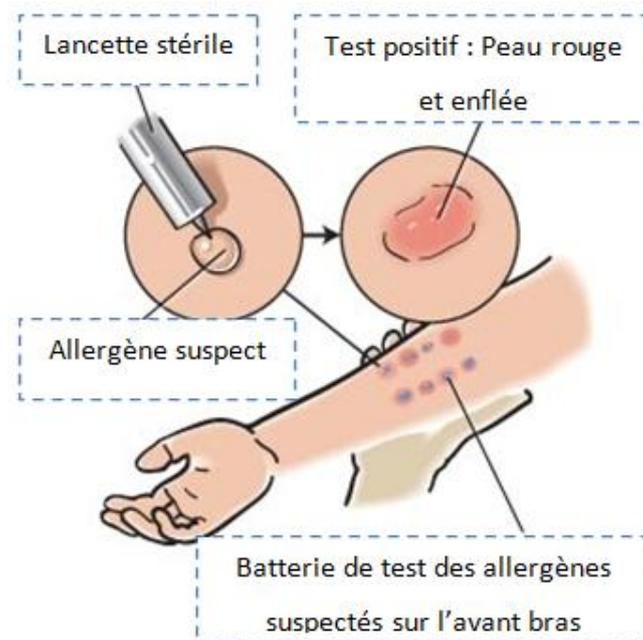


Figure 35 : Présentation d'un prick test cutané

(52)

La répartition des enfants et leurs principales caractéristiques sont présentées dans le tableau 11 suivant.

Tableau XI : Critères des enfants de l'étude

	Enfants avec DA en % (n)	Enfants sains en % (n)
Garçons	60 (12)	50 (10)
Aîné	45 (9)	50 (10)
Césarienne	15 (3)	0 (0)
Animaux à poils	0 (0)	5 (1)
Mère atopique	85 (17)	90 (18)
Père atopique	70 (14)	60 (12)
Allaitement au premier mois	100 (20)	100 (20)
Allaitement au douzième mois	25 (5)	35 (7)
Antibiotiques entre 1 et 12 mois	15 (3)	30 (6)
Antibiotiques entre 12 et 24 mois	50 (10)	30 (6)
Garderie entre 0 et 12 mois	0 (0)	5 (1)
Garderie entre 12 et 24 mois	70 (14)	85 (17)
Recours aux probiotiques	30 (6)	55 (11)

(51)

Nous pouvons voir que tous les enfants ont été allaités pendant leur premier mois de vie. Ce sont les enfants sains qui ont le plus souvent été en garderie avec un enfant entre 0 et 12 mois, contre zéro dans le groupe des atopiques, et 17 enfants contre 14 entre 12 et 24 mois. **L'allaitement maternel a été davantage suivi par les enfants sains jusqu'à 12 mois** avec 7 enfants contre 5 dans le groupe des atopiques. On a recensé un certain nombre de parents atopiques dans les deux groupes. De plus, davantage d'enfants sains ont reçu des compléments de probiotiques.

Le tableau 12 nous présente, à l'aide de l'indice de Shannon, la biodiversité bactérienne de nos échantillons.

Tableau XII : Indice de Shannon à 1 semaine, 1 mois et à 12 mois d'âge chez nos enfants atopiques et chez nos enfants témoins

	Enfants atopiques (n=20)	Enfants sains (n=20)
	Indice de Shannon médian	Indice de Shannon médian
Première semaine		
<i>Microflore totale</i>	1.59	1.58
<i>Firmicutes</i>	0.81	0.86
<i>Proteobacteria</i>	0.15	0.32
<i>Actinobacteria</i>	0.29	0.27
<i>-Bacteroides</i>	0.02	0.20
Premier mois		
<i>Microflore totale</i>	1.47	1.69
<i>Firmicutes</i>	0.55	0.61
<i>Proteobacteria</i>	0.15	0.27
<i>Actinobacteria</i>	0.36	0.42
<i>-Bacteroidetes</i>	0.05	0.48
<i>-Bacteroides sp</i>	0.01	0.44
Douzième mois		
<i>Microflore totale</i>	2.90	2.62
<i>Firmicutes</i>	2.31	1.89
<i>Proteobacteria</i>	0.04	0.07
<i>Actinobacteria</i>	0.21	0.17
<i>-Bacteroidetes</i>	0.16	0.50

(51)

Nous pouvons voir que les indices de Shannon de la colonne de droite, qui concerne les enfants sains, prennent des valeurs plus élevées que ceux des enfants atopiques. Cela illustre une diversité bactérienne plus faible chez les enfants **qui ont développé de l'eczéma atopique**. L'indice de Shannon est en effet plus bas dans la majorité des cas dans la population atopique. L'embranchement des *Bacteroidetes* présente un indice de 0,02 contre 0,20 à l'âge de 1 semaine chez les témoins. Cette différence s'accroît à l'âge de 1 mois. L'espèce *Bacteroides* montre un indice de 0,01 contre 0,44 chez les témoins. Cependant cette espèce a des propriétés anti-inflammatoires qui ont déjà été démontrées (51). *Bacteroides fragilis* supprime par exemple l'induction de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (le TNF-alpha et l'IL-23) et sa présence a réduit l'induction de colites chez un modèle de souris. Les colites regroupent les maladies comportant une inflammation de la paroi colique, dont font partie notamment la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Ces deux maladies

font parties des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et sont probablement d'origine génétique. Elles évoluent par poussées avec alternance de périodes de rémission. Les symptômes de la maladie de Crohn sont notamment des diarrhées chroniques et des douleurs abdominales. La rectocolite hémorragique, également appelée colite ulcéreuse, présente comme symptôme des diarrhées chroniques et sanglantes, très douloureuses. Ces deux pathologies inflammatoires peuvent présenter des symptômes extra-digestifs **comme des uvéites, des problèmes articulaires, mais là n'est pas notre sujet**. La différence principale entre ces deux maladies est que la colite ulcéreuse touche uniquement le côlon et le rectum (partie distale du tube digestif), alors que la maladie de Crohn peut également toucher l'intestin grêle.

Les Proteobactéries présentent également un indice de Shannon réduit chez les enfants atopiques. Cet embranchement comprend des bactéries à gram négatif qui présentent un LPS (lipopolysaccharides) au niveau de leur membrane externe. **Ce LPS constitue l'antigène O des bactéries à gram négatif, c'est une endotoxine qui permet de promouvoir la réponse Th1 entraînant la production d'IL-12** par les monocytes et les cellules dendritiques (51). De plus, l'exposition à cette endotoxine régule de façon négative la réponse Th2 qui est liée au développement d'allergies. La réduction de l'exposition à l'endotoxine de ces bactéries gram négatif entraîne un risque plus élevé de présenter un eczéma atopique.

La conclusion principale de l'étude est en faveur qu'une diversité bactérienne moindre durant les premiers mois de vie est associée à un développement plus fréquent d'un eczéma atopique.

Il reste important de préciser que les échantillons de selles représentent la colonisation du colon **mais pas nécessairement la colonisation de l'intestin**. Cependant c'est dans l'intestin que se trouve la majorité des interactions améliorant le développement du système immunitaire (51).

En résumé **de ce quatrième chapitre, nous pouvons constater qu'il est bien établi dans la littérature un lien entre la diversité et la richesse du microbiote intestinal avec la bonne efficacité de notre système immunitaire**. A la naissance le système immunitaire est immature. Les **stimuli rencontrés au niveau de l'intestin sont nombreux et impactent dans le bon développement de l'immunité**. Une faille dans la mise en place du système immunitaire pourra entraîner une atopie, des intolérances alimentaires ainsi que des pathologies inflammatoires.

Chapitre V
Impact de certains compléments
alimentaires sur le microbiote
intestinal : Probiotiques, prébiotiques
et synbiotiques

Chapitre V - Impact de certains compléments alimentaires sur le microbiote intestinal : Probiotiques, prébiotiques et synbiotiques

L'intestin constitue une sorte de frontière entre l'organisme et l'environnement extérieur. Son rôle est crucial tant dans la protection contre les éléments étrangers et potentiellement pathogènes dont les bactéries, virus, produits toxiques, que dans la tolérance alimentaire (40). La flore bénéfique qu'il renferme se compose d'environ 100 000 milliards de bactéries qui sont nécessaires, de la naissance à l'âge adulte, aux fonctions de digestion des aliments, de maintien de l'immunité et de contrôle de l'inflammation. Le déséquilibre de cette flore, de plus en plus important depuis les deux derniers siècles en raison des évolutions du mode de vie et de l'alimentation, a fragilisé notre système immunitaire et a favorisé le développement de maladies dites « de civilisation » que sont les intolérances alimentaires notamment aux protéines de lait de vache, les phénomènes allergiques telle que la dermite atopique, et les maladies inflammatoires chroniques que sont par exemple la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. C'est pour pallier ces évolutions néfastes que les chercheurs scientifiques se sont penchés sur l'étude des probiotiques. Ainsi l'équilibre intestinal, indispensable à notre santé, peut être retrouvé via leur utilisation en permettant la restauration de la barrière intestinale et un développement efficace du système immunitaire (40).

1) Présentation des probiotiques et des prébiotiques

Les probiotiques sont définis depuis 1989 par Roy Fuller comme des bactéries vivantes ou des levures, non pathogènes et non toxiques, utilisées comme additifs alimentaires et qui exercent une activité bénéfique sur la santé humaine en améliorant l'équilibre du microbiote intestinal (2). Une fois ingérés, ils doivent demeurer vivants pour avoir des effets bénéfiques, en s'implantant ou non. Les principales souches utilisées sont issues des genres *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. plantarum*...), *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. thermophilum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*...) et des coques à gram positif telles que *Streptococcus thermophilus* et *Enterococcus faecium*. Une augmentation de la présence de ces bactéries probiotiques dans l'intestin est corrélée à une protection contre l'atopie (53).

Une alternative permet de stimuler les bactéries bénéfiques commensales (Lactobacilles et Bifidobactéries) du microbiote intestinal en consommant des prébiotiques. Les prébiotiques sont des ingrédients alimentaires non digestibles qui stimulent de manière sélective la croissance et/ou l'activité de certaines bactéries du microbiote intestinal (2). Leur structure chimique leur permet d'échapper à la digestion. Ils résistent aux sucs gastriques et

ne sont ni hydrolysés ni absorbés lors de leur trajet dans le tractus gastro-intestinal. Ils **atteignent donc en l'état le côlon et permettent d'orienter le microbiote intestinal vers un équilibre bénéfique à l'hôte** en stimulant la croissance et le développement des bactéries qui lui sont bénéfiques telles que les Bifidobactéries et les Lactobacilles (42). Ces dernières bactéries comportent les enzymes nécessaires au métabolisme des oligosaccharides qui sont des substrats importants pour leur croissance. Ce qui est intéressant est en somme que ces oligosaccharides ne sont pas les substrats du développement de bactéries potentiellement pathogènes. Les principaux prébiotiques sont les fructo-oligosaccharides (FOS), les galacto-oligosaccharides (GOS), les xylo-oligosaccharides (XOS), les gluco-oligosaccharides, les isomalto-oligosaccharides, les oligosaccharides de soja, le lactulose et le palatinose (2).

La figure 36 nous illustre le système immunitaire au niveau de l'intestin avec une mise en avant des probiotiques et des prébiotiques. En effet, ces éléments jouent un rôle important dans la maturation du système immunitaire car ils ont la capacité de moduler le microbiote intestinal (32).

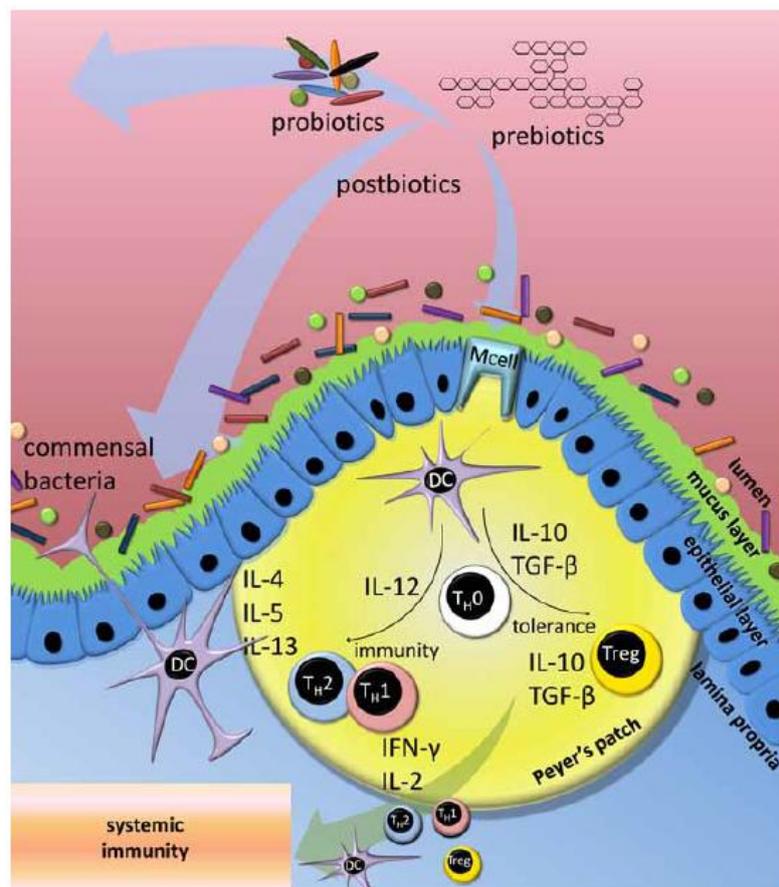


Figure 36 : Le système immunitaire au niveau de la lumière intestinale

(32)

Un prébiotique issu du lait humain a été découvert. **C'est le « Human Milk OligoSaccharide » (HMOS) (32).** Il fait partie des nombreux oligosaccharides présents dans le lait humain qui **atteignent entiers l'intestin. Ces oligosaccharides y favorisent le développement de la flore** bactérienne commensale, et notamment des bifidobactéries (53).

Une combinaison de probiotiques et de prébiotiques constitue un mélange symbiotique. On parle alors de synbiotiques. Une telle combinaison assure une survie des probiotiques puisqu'elle comporte à la fois leurs substrats essentiels (2).

2) Actions principales des probiotiques

La corrélation entre la présence de probiotiques au niveau intestinal et la baisse de phénomènes allergiques est bien présente. **Il s'agit maintenant de comprendre comment ces probiotiques agissent tant au niveau préventif que curatif.**

Il y a plusieurs choses qui caractérisent les probiotiques (voir figure 37). **D'une part ce sont des organismes bactériens qui restent viables et stables après culture, manipulation et stockage jusqu'à leur utilisation. D'autre part les probiotiques sont capables de survivre aux divers sucs digestifs, biliaires et pancréatiques. Leur intérêt majeur est la réponse bénéfique qu'ils entraînent chez l'hôte qui les consomme (53).**

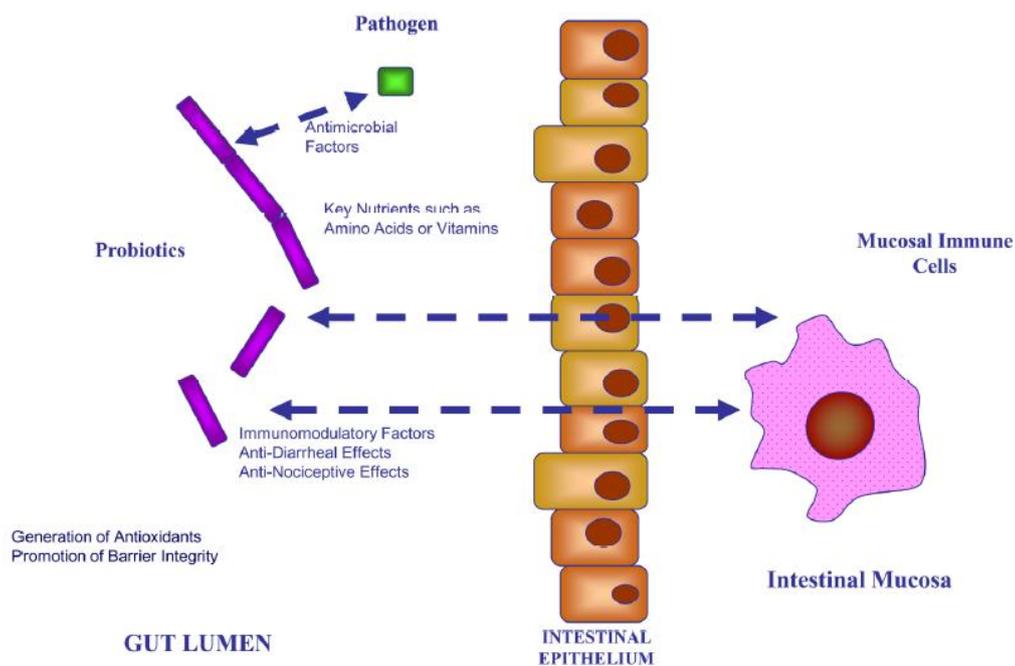


Figure 37 : Rôles bénéfiques des probiotiques au niveau intestinal

Le schéma ci-dessus résume les diverses fonctions que remplissent les probiotiques. Ils sont capables de sécréter divers facteurs qui confèrent des effets bénéfiques à l'hôte. Ils permettent de supprimer les bactéries pathogènes et interagissent avec l'épithélium intestinal et les cellules du système immunitaire (54).

Les probiotiques sont des bactéries vivantes qui permettent d'inhiber l'adhérence des bactéries pathogènes à la muqueuse intestinale, ils améliorent les fonctions de barrière de l'épithélium, ils produisent des bactériocines, augmentent la production d'immunoglobulines A par les lymphocytes B sécréteurs d'anticorps, et ils régulent négativement la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires que sont par exemple le TNF-alpha, l'IFN-alpha et l'IFN-béta, l'IL-1 et l'IL-6 (42). La figure suivante illustre leurs actions principales.

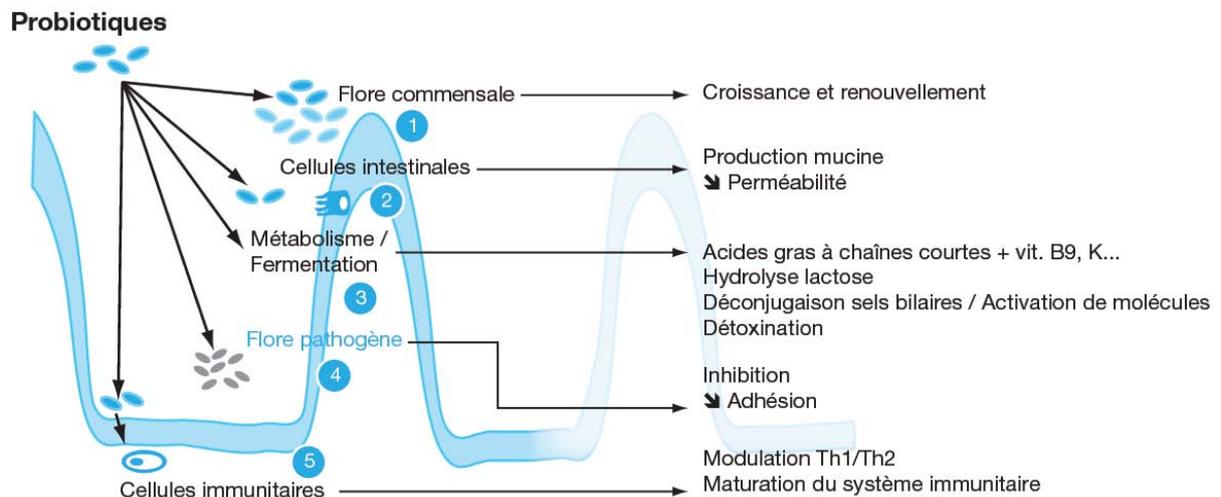


Figure 38 : Principales actions des probiotiques

(40)

Les probiotiques ont une influence locale au niveau intestinal en diminuant la perméabilité de la barrière épithéliale et ainsi en diminuant la pénétration des antigènes dans la circulation systémique (53). Ils ont un effet anti-inflammatoire en agissant à différents niveaux : Ils augmentent la production de lymphocytes Treg, ils stimulent les TLRs, favorisent la réponse Th1 et activent **des cellules dendritiques tolérogènes**, c'est-à-dire qui produisent davantage de médiateurs anti-inflammatoires et moins de médiateurs pro-inflammatoires.

Pour conclure sur cette partie qui étudie les probiotiques, je vous présente un schéma qui regroupe les principales souches de probiotiques qu'utilise le laboratoire de micro nutrition Nutergia.

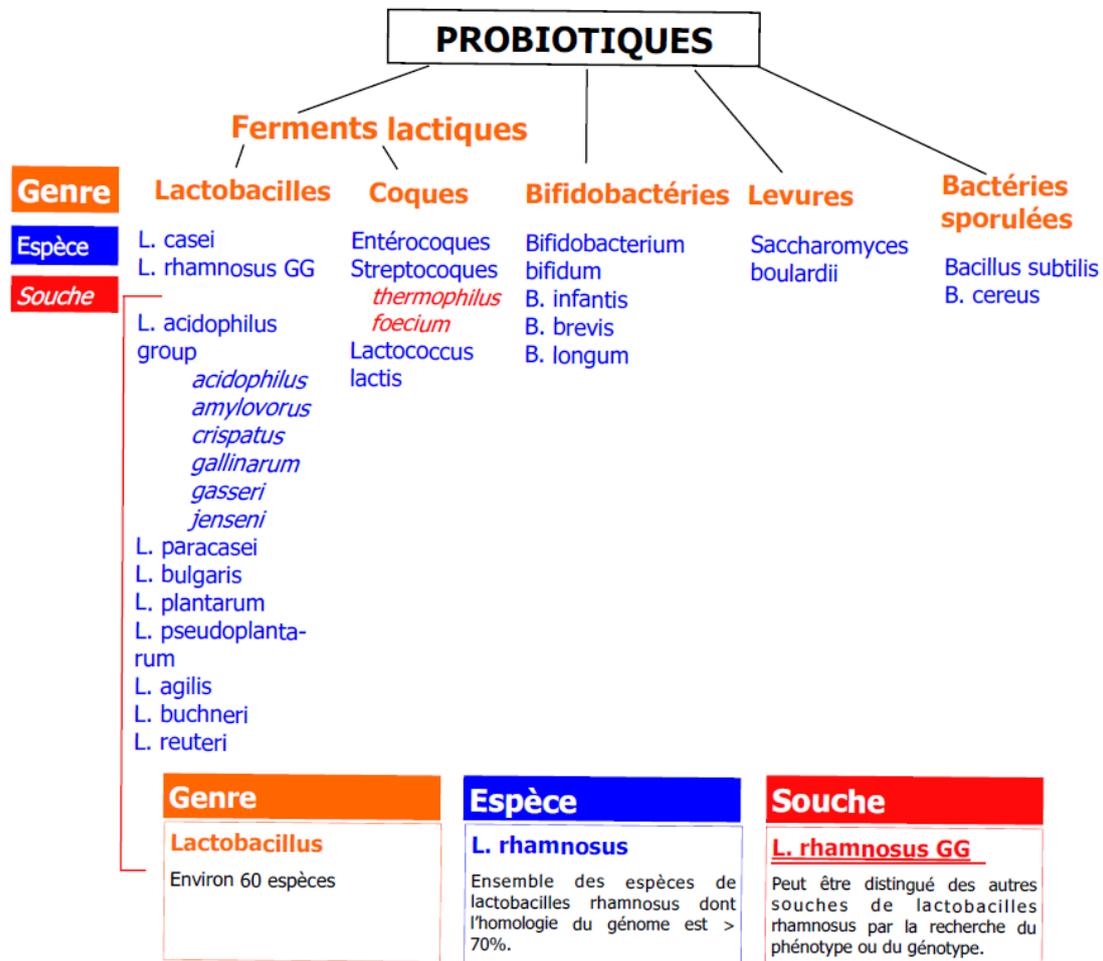


Figure 39 : Illustration des probiotiques étudiés par la gamme de micro nutrition Nutergia

(5)

3) Etudes cliniques recensées dans la littérature

Des études ont recensé une réduction significative de la sévérité des symptômes de la rectocolite hémorragique pour des patients ayant reçu une supplémentation journalière en probiotiques durant 6 semaines. En comparaison au groupe placebo il y a même eu une rémission probante après 12 semaines de supplémentation journalière (42). Une autre étude sur des enfants à haut risque d'asthme a montré qu'une complémentation en *Lactobacillus casei Rhamnosus* GG (LGG), toujours contre placebo, entraîne une évolution favorable du

microbiote intestinal avec une abondance d'espèces bénéfiques pour l'hôte telles que *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* qui entraînent une protection contre les agents pathogènes. Le groupe placebo a en revanche une flore intestinale moins riche en ces espèces favorables et plus riche en espèces associées à des risques de développer des maladies allergiques (42).

Le schéma suivant récapitule de façon explicite les différents atouts et lieux d'actions des probiotiques chez l'homme.

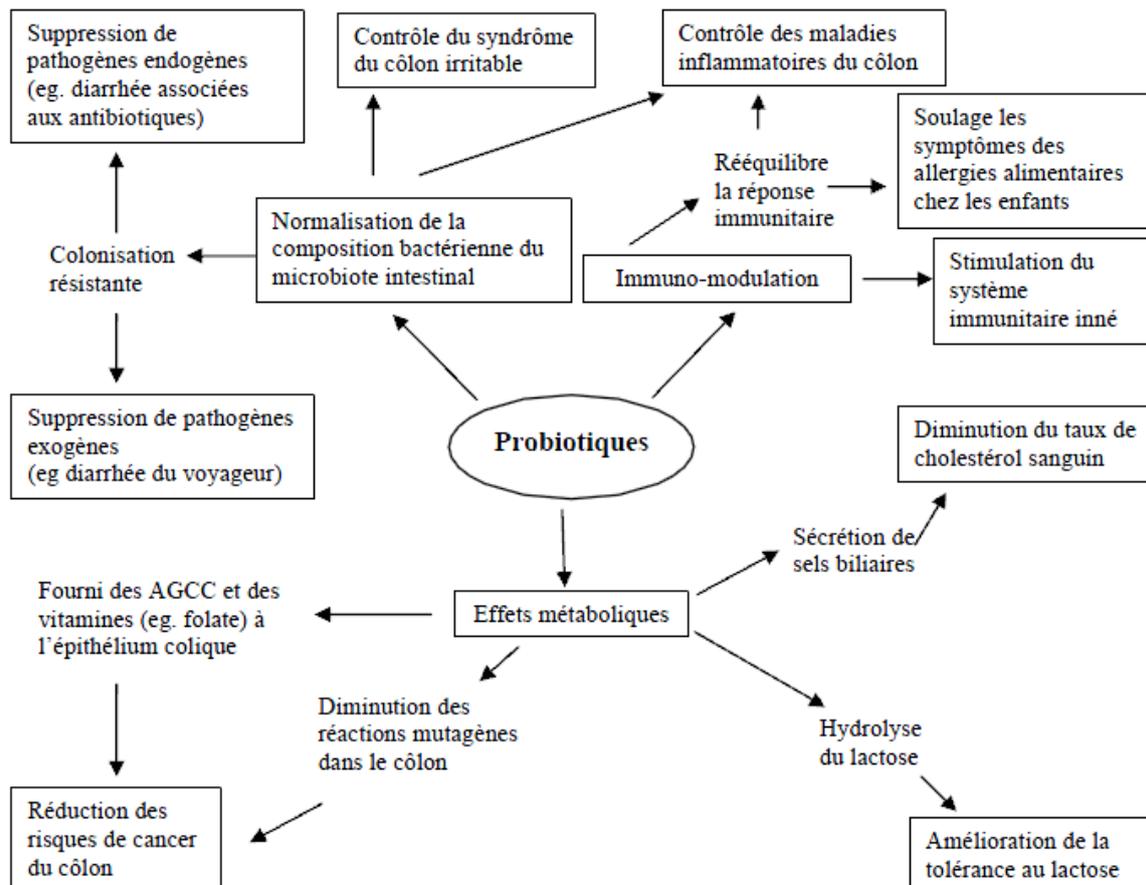


Figure 40 : Effets bénéfiques sur la santé humaine entraînés par la consommation de probiotiques

(2)

Une étude a observé l'effet d'une supplémentation en probiotiques et en prébiotiques dans la prévention des allergies (55). En double aveugle et contre placebo, on a répertorié 1223 mères dont les enfants étaient à haut risque de présenter des allergies, et on les a supplémenté de probiotiques pendant leurs derniers mois de grossesse. Les souches utilisées se composaient de deux *lactobacilli*, de *bifidobacteria* et de *propionibacteria*. Les enfants, après leur naissance, ont reçu ces probiotiques et en plus un prébiotique, le galacto-oligosaccharide, pendant les six premiers mois de vie. On a évalué à l'âge de cinq ans

l'incidence de phénomènes allergiques tels que l'asthme, la rhinite allergique, l'eczéma, les allergies alimentaires, et on a aussi mesuré la sensibilisation des IgE (55).

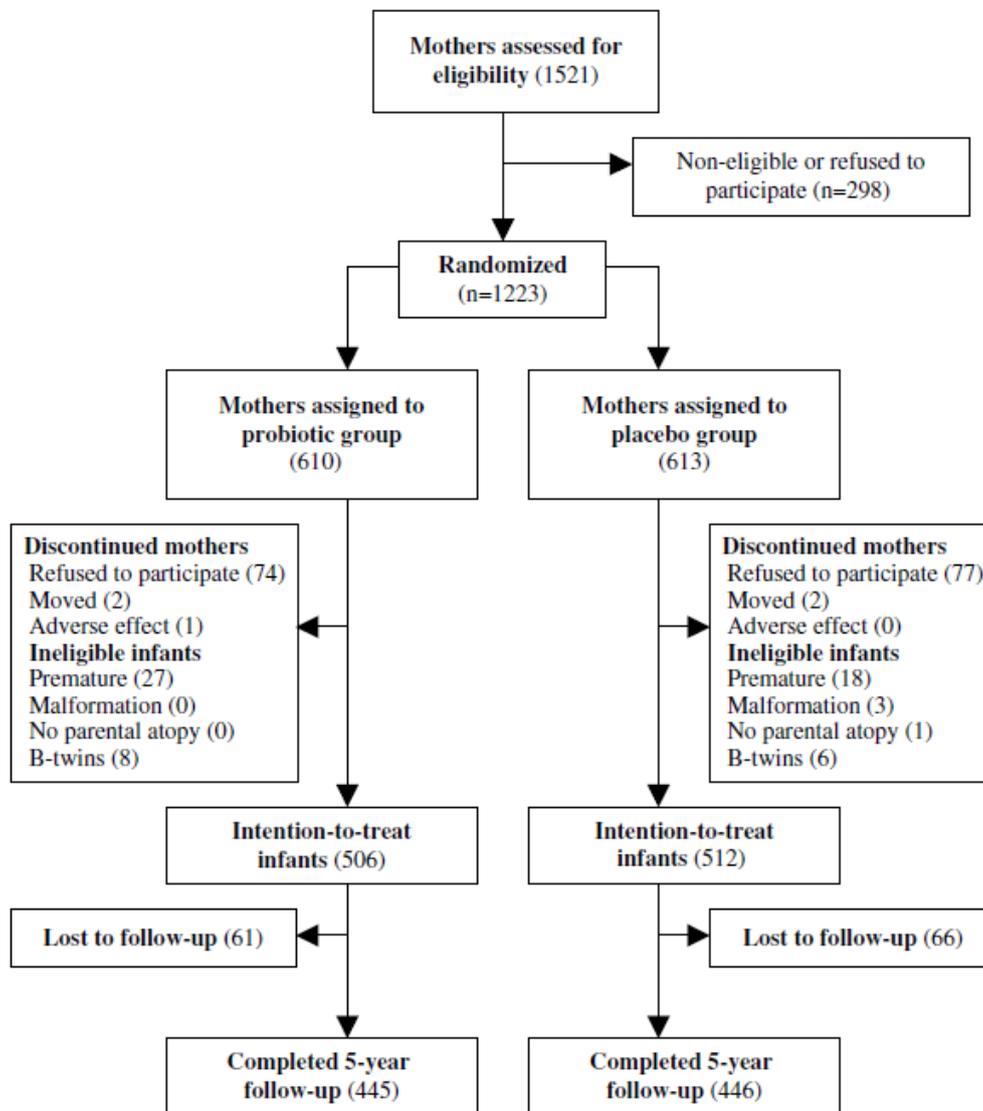


Figure 41 : Evolution de l'étude prospective en question

(55)

La figure 41 ci-dessus nous montre la complexité que comporte une telle étude prospective. Il y a eu des perdus de vue, des mères qui se sont désistées et des enfants qui ont dus être exclus de l'étude pour diverses raisons notamment pour cause de prématurité, de malformations, et pour des raisons qui les rendaient non homogènes au groupe qu'il fallait constituer pour que les résultats soient cohérents et significatifs. C'est ainsi que parmi les 1223 mères recrutées initialement pour cette étude, seulement 891 enfants ont atteint la visite des 5 années de vie dont le tableau 13 nous présente les principales caractéristiques.

Tableau XIII : Caractéristiques des enfants de l'étude

Caractéristiques	Probiotiques (n=445) %	Placebo (n=446) %
Fille	49.7	51.3
Poids de naissance (g)	3592	3586
Age de la mère (années)	30.8	31.5
Mère atopique	80.9	81.6
Père atopique	58.6	58.1
Deux parents atopiques	39.3	39.7
Césarienne	15.7	17.7
Frères et sœurs	41.4	47.3
Allaitement exclusif >3mois	47.2	43.9
Allaitement exclusif >5mois	4.0	2.9
Poursuite de l'allaitement>6mois	70.8	67.3
Mère fumeuse	14.4	11.9
Fumeur à la maison	31.5	30.3
Mère fumeuse durant la grossesse	0.7	2.0
Chats/chiens à la maison	16.6	15.5
Education universitaire de la mère	33.0	40.2
Education universitaire du père	34.8	37.8

(55)

La fréquence des allergies et la sensibilisation des IgE s'est révélée similaire dans les deux groupes : Placebo et probiotiques. Cependant, un résultat positivement significatif a été trouvé dans le cas des mères qui ont mis leur enfant au monde par césarienne. Les avantages des enfants nés par voie vaginale seraient donc rattrapés par les enfants nés par césarienne via **la supplémentation en probiotiques**. Globalement l'étude **n'a pas montré d'avantage** à supplémenter en probiotiques les mères et les nouveaux nés. Cependant il faut préciser que **les groupes ont été choisis pour être à fort risque d'atopie**. Une supplémentation plus importante, avec peut-être d'autres souches de probiotiques et pendant une plus longue période reste probablement efficace dans la prévention des allergies (55).

Une autre étude s'est penchée sur l'évolution de la flore intestinale chez des enfants présentant une dermatite atopique lors d'une supplémentation de trois mois en *Lactobacillus*

casei (56). Les participants à l'étude sont des enfants âgés de 6 à 18 mois. Leur flore fécale a été analysée avant la prise orale de *Lactobacillus casei* DN-114001, à la fin et cinq mois plus tard. L'étude a été faite en double aveugle et contre placebo comme l'étude précédemment décrite.

Le tableau 14 ci-dessous nous présente le log10 des CFU/g de fèces de différents genres bactériens retrouvés dans les selles des enfants ayant participé à cette étude.

Tableau XIV : Présentation des résultats de l'étude de la supplémentation en *Lactobacillus casei* versus placebo.

	Groupe Placebo			Groupe supplémenté en probiotiques		
	Temps (en mois)			Temps (en mois)		
	0	3	8	0	3	8
<i>Lactobacillus</i>	7.86	6.40	6.38	7.77	6.54	5.90
<i>Bifidobacterium</i>	6.15	6.89	5.57	7.11	6.43	5.36
<i>Bacteroides</i>	7.37	7.89	7.51	6.34	7.33	7.13
<i>Clostridium</i>	6.49	5.83	5.81	5.57	5.82	5.46
<i>Enterococcus</i>	6.90	7.58	6.82	7.52	6.78	6.25
<i>Enterobacteriaceae</i>	8.63	8.14	8.11	7.23	7.62	7.46

(56)

Avant la supplémentation en probiotiques, le comptage en *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* et en *Enterococcus* dans les deux groupes étudiés ne diffère pas.

Après trois mois de supplémentation, les deux groupes présentent une diminution du nombre de *Lactobacillus*. Cependant, cinq mois plus tard, seul le groupe placebo (PG) présente une baisse encore plus importante du nombre de *Lactobacillus*, tandis que le groupe supplémenté en probiotiques (DNG) voit ce nombre maintenu. Le nombre de bifidobactéries est maintenu par la prise de *Lactobacillus casei* après trois mois de traitement mais diminue ensuite de 9,4%. Dans le groupe placebo, le nombre de bifidobactéries diminue plus tôt, et de manière exponentielle. Pendant les trois mois de placebo il diminue de 9,5% pour ensuite diminuer de 24% durant les cinq mois suivants. Concernant le nombre de *Clostridium*, il diminue de 10% pendant les trois mois de prise de *Lactobacillus casei* pour ensuite être maintenu. Ce nombre n'est pas modifié par la prise de placebo et reste plus élevé par rapport au groupe traité (56).

Les résultats présentent une flore plus riche en *Bifidobacterium* et moins riche en *Clostridium*. Cependant il n'y a pas d'impact quant à la composition de la flore fécale en *Bacteroides*, *Enterococcus*, et *Enterobacteriaceae*. La population en *Lactobacillus* est stabilisée par la supplémentation et ne diminue pas. La diminution de la présence de *Clostridium* est favorable à l'hôte puisque c'est une bactérie potentiellement pathogène qui synthétise des toxines. Les enfants en bonne santé présentent un microbiote fécal riche en *Bifidobacterium* et en *Lactobacillus*, ce qui reflète un rôle protecteur de ces bactéries. A l'inverse les enfants à tendance allergique présentent une augmentation de la population de *Clostridium* et une baisse de la population de *Bifidobacterium* (56).

Les études sont cependant confrontées à un certain nombre de difficultés illustrées par la figure suivante.

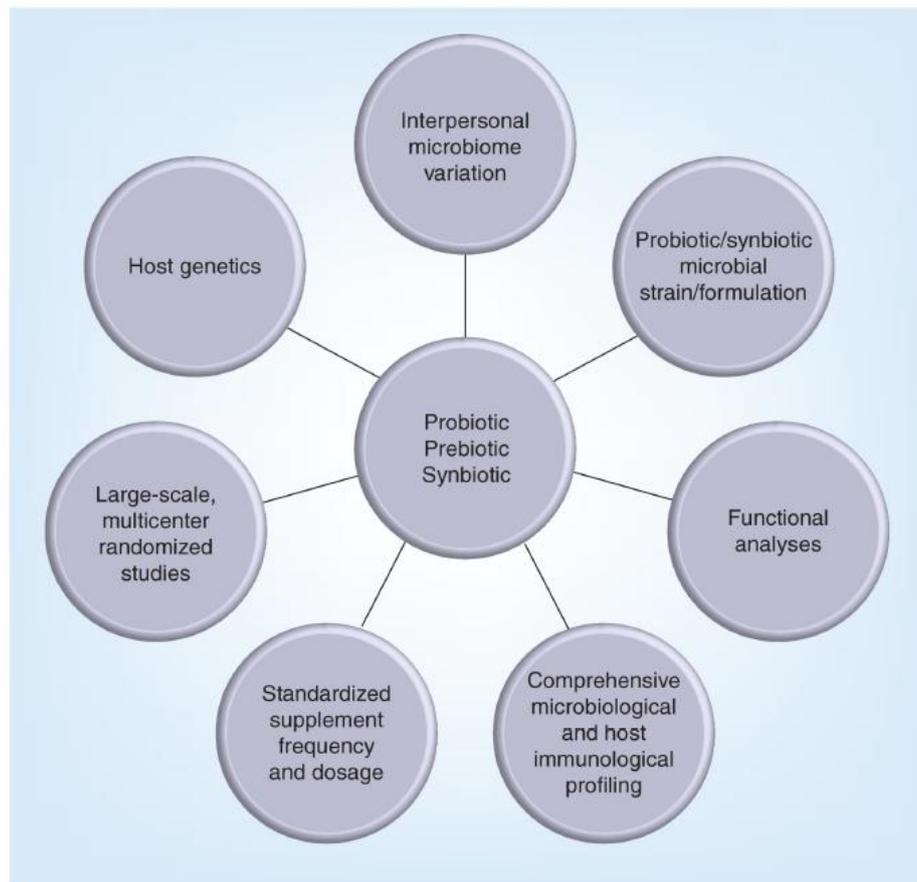


Figure 42 : Les points critiques des études actuelles concernant les bienfaits des pro-, pré- et des synbiotiques

(42)

Il existe une variabilité interindividuelle quant à la composition du microbiote intestinal (42). Ainsi chacun est susceptible de réagir différemment à une supplémentation en pro- et/ou

prébiotiques. Il est important de spécifier dans les études, quelles sont les souches de probiotiques utilisées, leurs proportions ainsi que la fréquence des administrations. Il faut recenser un maximum d'informations et standardiser au mieux les populations étudiées afin d'avoir des résultats probants et significatifs. Si la population étudiée est atteinte d'une pathologie particulière, il faudra en préciser la nature mais également le stade de progression de la maladie car les résultats ne seront pas les mêmes.

Les bactéries lactiques, c'est-à-dire celles qui transforment les hydrates de carbone en acide lactique, comprennent les lactobacilles et les bifidobactéries qui sont les principales souches de probiotiques utilisées à l'heure actuelle (40). L'important est de retenir que leurs effets bénéfiques sont « souches et doses-dépendants ». Comme le montre la figure 43, différentes doses de probiotiques d'une même espèce n'engendrent pas les mêmes effets. Dans l'exemple suivant qui utilise pour souche de probiotiques l'espèce *Lactobacillus reuteri*, on peut voir qu'une certaine dose a pour effet principal une immunostimulation, tandis qu'avec une dose différente c'est un effet anti-inflammatoire qui prime.

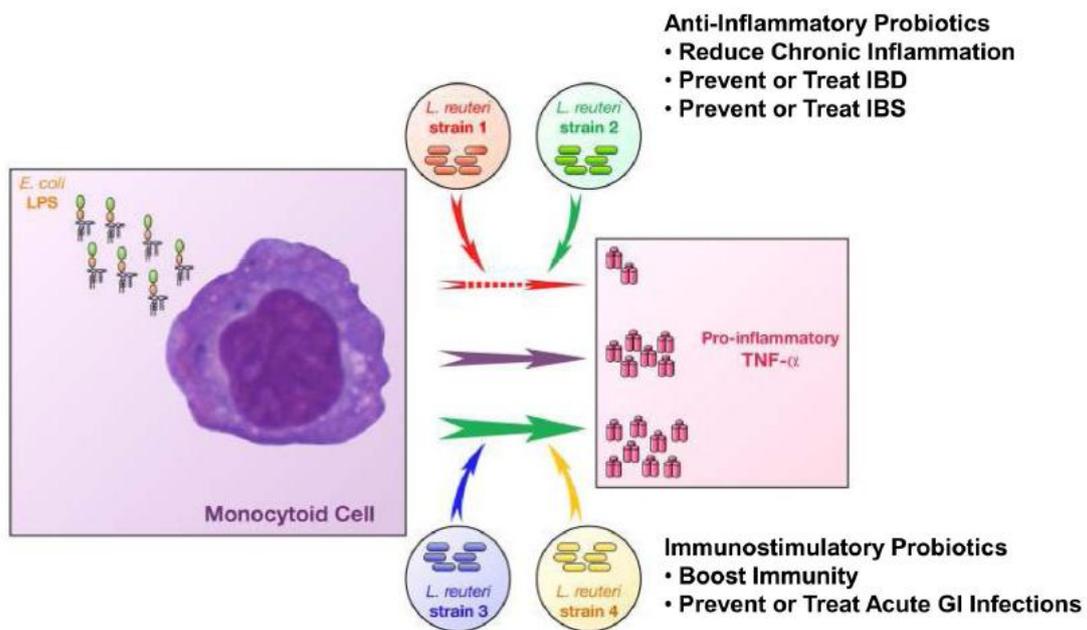


Figure 43 : Modulation du système immunitaire par les probiotiques

(54)

Une méta analyse a été effectuée en 2012 par Pelucchi et al. (57) pour rassembler les résultats d'études concernant l'impact positif des probiotiques utilisés pendant la grossesse et la petite enfance sur l'incidence de la dermatite atopique chez le jeune enfant. Le tout étant

opposé à la prise de placebo. Les documents rassemblés dans cette méta analyse sont issus de trois bases de données : Pubmed, Embase et Cochrane Library. Une sélection fine de ces données a rendu une sélection de 18 publications pour la méta analyse. Celle-ci a montré que **l'utilisation de probiotiques diminue l'incidence de la dermatite atopique. Les principales souches de probiotiques utilisées furent *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, et *Lactobacillus paracasei*.** Globalement leur utilisation a réduit la fréquence de la DA et a montré une diminution des IgE associés à la DA.

4) Rôles des prébiotiques

Les prébiotiques ont comme intérêt majeur d'augmenter la croissance des bactéries commensales natives favorables à l'hôte sans avoir besoin d'apporter une souche extérieure qui comporterait un risque, aussi faible soit-il, d'être potentiellement pathogène pour l'hôte (42). Des cas d'infections ont été répertoriés chez des patients immunodéprimés lors d'études sur l'action anti-inflammatoire des probiotiques. Les prébiotiques s'affranchissent donc de ce risque et vont simplement agir sur le microbiote déjà présent chez l'hôte, en accentuant naturellement la croissance des bactéries bénéfiques et en inhibant la croissance des bactéries potentiellement pathogènes. On dit des prébiotiques qu'ils sont bifidogènes puisqu'ils sont utilisés comme substrat de croissance par les bactéries protectrices que sont les bifidobactéries (40).

Les prébiotiques peuvent augmenter la production par la flore intestinale d'importants facteurs anti-inflammatoires. Par exemple l'oligofructose est capable d'accroître la production de butyrate dont la conséquence est une guérison plus rapide et de moindres dommages causés par un phénomène inflammatoire (42). Des études sur des patients atteints de la maladie de Crohn, de rectocolites hémorragiques ou encore d'entérocolites nécrosantes ont montré de nettes améliorations au niveau clinique lors d'une prise de prébiotiques.

L'avenir est prometteur quant à ces compléments alimentaires qui offrent une perspective optimiste chez des patients résistants à des traitements conventionnels. Pour des pathologies handicapantes telles que la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique ont été observées des rémissions ou des diminutions notables de la sévérité des symptômes (42).

Chapitre VI

Les produits et conseils en officine pour certaines pathologies courantes

Chapitre VI - Les produits et conseils en officine pour certaines pathologies courantes

1) Utilisations courantes des probiotiques et des prébiotiques

La muqueuse intestinale est fragile et facilement altérable, l'illustration suivante nous le présente. Lorsque la barrière muqueuse est rompue, on parle d'**hyperperméabilité** intestinale, présentée par la figure suivante. Cette hyperperméabilité intestinale permet le passage d'**éléments pathogènes, d'allergènes** et de toxiques, entraînant une inflammation qui va entretenir les lésions de la barrière intestinale.

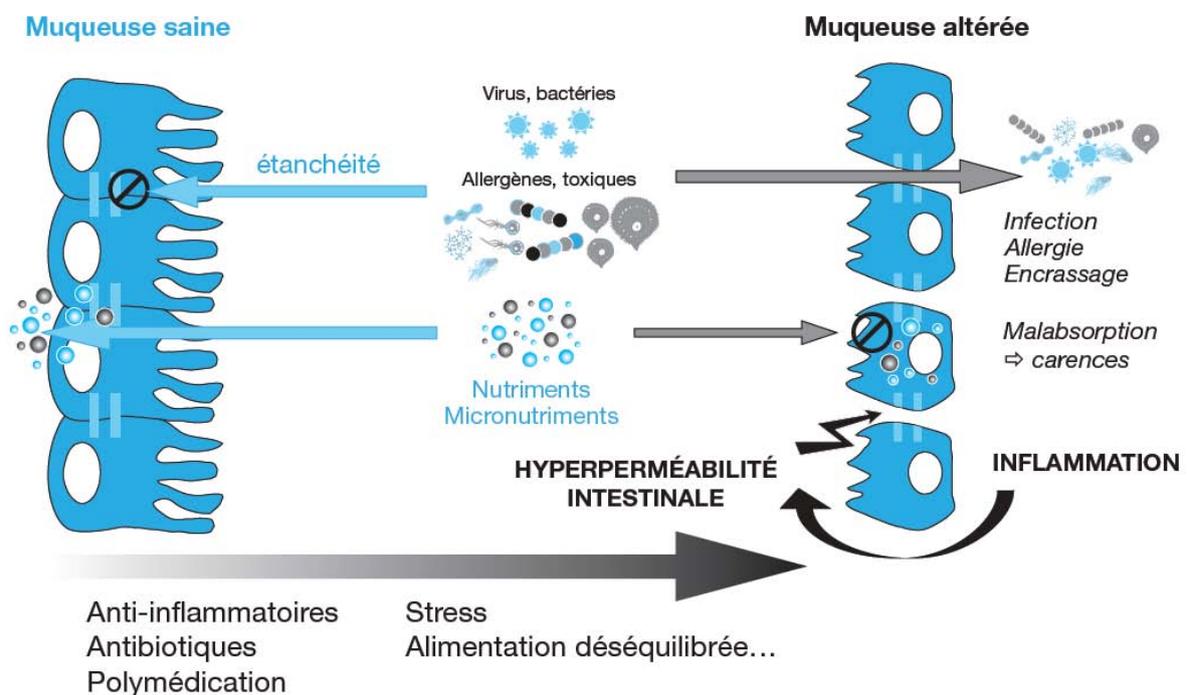


Figure 44 : Causes et conséquences d'une hyperperméabilité intestinale

(40)

Les probiotiques permettent de restaurer la perméabilité intestinale en augmentant la production d'acides gras à chaîne courte -qui assurent l'apport énergétique aux cellules de la muqueuse intestinale-, ainsi qu'en augmentant la réponse IgA -les IgA étant les immunoglobulines principalement présentes au niveau des muqueuses-. La barrière intestinale se trouve alors renforcée et la perméabilité se restaure progressivement.

Des déséquilibres de la flore intestinale peuvent survenir chez l'adulte via des excès alimentaires -notamment des excès de protéines qui favorisent une flore de putréfaction au

détriment d'une flore de fermentation-, via l'usage de certains médicaments comme les antibiotiques et les anti-inflammatoires, via un stress également. Ce déséquilibre entraîne au **niveau clinique des symptômes plus ou moins importants. La clinique s'étend d'une légère diarrhée à une inflammation chronique au niveau intestinal entraînant à la fois des inconforts digestifs, des douleurs intestinales, des diarrhées chroniques...**

Les probiotiques permettent d'agir au niveau de la constipation en fermentant les fibres non digérées. Cela augmente la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC) et acidifie le milieu. Le péristaltisme intestinal est également activé et le transit accéléré. *Lactobacillus plantarum* et *Bifidobacterium longum* sont des souches ayant démontrées une efficacité dans cette indication, avec une augmentation du nombre de selles ainsi qu'une amélioration des symptômes de la constipation après quinze jour de supplémentation (40).

En ce qui concerne les diarrhées, *Lactobacillus rhamnosus* GG et *Lactobacillus casei* réduisent les diarrhées infectieuses, LGG prévient les diarrhées post-antibiotiques ainsi que la diarrhée du voyageur.

Une administration continue de probiotiques a également un intérêt pour les patients victimes du **syndrome de l'intestin irritable (SII)**. Ce syndrome englobe des désordres **intestinaux chroniques se manifestant par un éventail d'éléments cliniques désagréables que sont les douleurs abdominales, les ballonnements, l'alternance de phénomènes de diarrhée et de constipation**. On estime que 15% de la population occidentale en est victime (40). Une supplémentation en probiotiques permet de palier à ces désagréments en diminuant **l'hypersensibilité intestinale. Les souches ici utilisées sont *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium longum***. Les avantages rencontrés sont une diminution des douleurs, une réduction de la production des gaz dans le côlon, une **régulation du transit, une modulation positive de l'immunité et une diminution de l'inflammation** (40).

Chez les enfants, la théorie hygiéniste **met en cause l'asepsie générale, tant au moment de l'accouchement que dans la vie quotidienne, l'usage trop fréquent d'antibiotiques et l'absence d'allaitement maternel** (42). Les conséquences sont un équilibre rompu au niveau de la flore intestinale, nommé dysbiose, et une mauvaise orientation du système immunitaire au profit de la réponse Th2 responsable des phénomènes allergiques. Cette théorie explique **l'expansion dans les pays développés de phénomènes allergiques tels que sont l'eczéma atopique, l'asthme et la rhinite allergique.**

Toujours à l'aide d'un rôle de stimulation des défenses immunitaires -notamment innées, avec une accentuation de la production d'IgA sécrétoires dans la lumière intestinale-, de restauration de la barrière intestinale et de sa perméabilité, ainsi que de rééquilibrage de la flore en faveur de la flore protectrice, les probiotiques ont un intérêt majeur dans la diminution de la symptomatologie allergique. Les souches principalement concernées sont ici *Lactobacillus acidophilus* et LGG. Les manifestations allergiques sont en augmentation partout en Europe : **Le nombre d'asthmatique a triplé ces vingt dernières années, 25 % des adolescents sont victimes de rhino-conjonctivite et 3% de la population souffre d'allergie alimentaire (5).** Les allergies sont classées au quatrième rang des maladies les plus fréquentes par l'Organisation Mondiale de la santé (OMS) et elles touchent **35% des français (5)**. Dans le cadre de **la grossesse, quand l'un ou les deux parents présentent un risque ou un terrain atopique, l'administration de LGG pendant le dernier trimestre de la grossesse et pendant les six premiers mois de vie, tout en associant une diversification alimentaire tardive et un allaitement maternel prolongé, réduit significativement le risque chez l'enfant de développer des pathologies allergiques (5).**

Durant l'enfance, la souche *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) est bénéfique dans la prévention de la dermatite atopique avec une diminution significative de son incidence via **une administration pendant la grossesse et l'allaitement ainsi que durant les six premiers mois de vie. Cette même souche réduit la sévérité des symptômes de l'allergie aux protéines du lait de vache en favorisant la production de cytokines de type Th1 telles que l'IL-2.** Ces cytokines participent à la réponse immunitaire cellulaire. Le troisième intérêt présenté par la souche LGG est sa protection contre les diarrhées aiguës du nourrisson causées par les rotavirus. Cette protection est le résultat de l'activation d'une réponse sérologique spécifique constituée par la production d'IgM et d'IgA dirigées contre les rotavirus (40).

La souche *Lactobacillus fermentum* augmente la production de cytokines Th1 et d'IgA, et **diminue ainsi la sévérité et l'étendue de la DA chez les enfants.**

La souche *Bifidobacterium infantis* présente une action anti-inflammatoire et réduit douleurs et ballonnements.

L'association de Lactobacilles et de Bifidobactéries présente une synergie d'action anti-inflammatoire et son administration diminue significativement les entérocolites nécrosantes du nouveau-né (ECUN). **L'entérocolite nécrosante du nouveau-né a une prévalence d'environ 2% et constitue l'urgence médico-chirurgicale digestive la plus commune de la période néonatale.** Les signes sont parfois peu spécifiques (intolérance alimentaire, arrêt du transit, diarrhée et vomissements) ou parfois alarmants (selles sanglantes, défense abdominale,

détresse respiratoire et hypotension artérielle). Sa physiopathologie réside en une nécrose ischémique et hémorragique pouvant toucher plusieurs parties du tractus digestif, le tout pouvant aboutir à des ulcérations voire à des perforations **digestives**. **L'un des facteurs favorisant cette maladie est l'immaturation de la barrière intestinale**, et donc la prématurité. De plus le lait maternel aurait un effet protecteur (58).

Toujours en référence au laboratoire Nutergia, la figure 45 nous présente les différentes souches de probiotiques utilisées dans leurs spécialités ainsi que leurs indications.

	ERGYPHILUS® Plus		ERGYPHILUS® Confort		ERGYPHILUS® Enfants		L. rhamnosus GG		L. acidophilus		B. bifidum		L. paracasei		L. plantarum		B. longum		L. fermentum		B. infantis		S. Boulardii	
en M	3	1,3	0,75	0,7	0,37	0,7	1,88	2	1,3	1	1													
Ballonnements, douleurs			+++					+++												+++				
Constipations								+++	+++															
Diarrhées	+++ <small>infectieuses et antibiothérapie</small>				++		++		+++														+++	
Défenses immunitaires	+++		++		+		++	++	+	+++										+++		+++		+
Allergies	+++		+++							+++										+++				
Hyperperméabilité intestinale	+++		+		+		+	+	+	+									+			+		
Intolérance lactose			+++				+++															+++		

Figure 45 : Souches de probiotiques et cibles d'action

(40)

2) Quelques spécialités à demander à votre pharmacien à l'officine

Je vais me baser sur deux gammes spécifiques de produits disponibles en pharmacie dans cette partie. Nutergia et Pilège. Pourquoi celles-ci ? **Car ce sont les premières que j'ai pu découvrir** au cours de mon évolution dans le monde pharmaceutique. Il existe cependant de nombreux autres laboratoires de recherche qui fabriquent des compléments alimentaires à base de probiotiques. Je citerais par exemple le laboratoire Lescuyer, le laboratoire Motima ainsi que le laboratoire Bion.

Pilège est le fruit de réflexion d'un médecin généraliste, le Docteur Christian Leclerc, qui s'intéresse notamment à la santé digestive. Une concertation avec d'autres médecins a permis

la création de la marque en 1991. L'idée principale est une médecine de santé complémentaire à l'allopathie. Grâce à un service de recherche scientifique pluridisciplinaire relié à des professionnels de santé, l'aboutissement est de pouvoir agir là où l'allopathie est défailante, inadaptée ou bien présente une iatrogénie trop importante (59).

Le laboratoire de micro nutrition Nutergia, qui a pour directeur général le Docteur Antoine Lagarde, se base sur le concept de Nutrition Cellulaire Active (NCA). Ce concept restaure l'équilibre de notre organisme via deux principes : la détoxination et la nutrition optimale de nos 20 000 milliards de cellules par l'apport de micronutriments spécifiques, sélectionnés et contrôlés (60).

Les souches utilisées doivent répondre à des normes de qualité et d'innocuité, ainsi qu'à des normes d'identification par des critères phénotypiques comme la morphologie, les tests biochimiques et les exigences particulières de croissance, et par des critères génotypiques. Ces souches doivent également résister aux contraintes rencontrées dans le tractus gastro-intestinal comme l'acidité de l'estomac, les acides biliaires et les enzymes pancréatiques afin d'atteindre l'intestin grêle ainsi que le côlon sous forme viable. Les procédés de fabrication doivent être rigoureusement suivis afin de garantir la viabilité des souches. Les lots suivent des contrôles qualité de manière systématique (59).

1. Pour les enfants

- ✓ Lactibiane Enfants (Pilèje)

Ce complément alimentaire destiné à l'enfant se compose de vitamine D et de 5 souches microbiotiques : *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium longum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus rhamnosus*. Il se présente sous forme de sachets qui se diluent dans l'eau et dont la posologie est d'un par jour. Chaque sachet comporte 4 milliards de ferments lactiques. La cure est de 30 jours, renouvelable. La conservation des sachets doit se faire dans un endroit frais et sec.

- ✓ Ergyphilus Enfants (Nutergia)

Ergyphilus Enfants se compose de 3 souches : *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus fermentum* issu du lait maternel et *Bifidobacterium infantis* qui est une souche dominant le microbiote intestinal des enfants allaités. Il est indiqué dans la prévention des terrains atopiques, en cas de troubles digestifs (constipation, diarrhée, gaz, coliques du nourrisson, régurgitations), en cas de traitement antibiotique et pour les enfants non allaités.

Conçu spécialement pour les enfants âgés de zéro à six ans, sa forme sachet peut se diluer dans le premier biberon tiède d'un enfant et par la suite peut se diluer simplement dans un demi-verre d'eau. La conservation doit se faire à +4°C. Chaque sachet renferme 3 milliards de ferments lactiques et la posologie est d'un sachet par jour.

2. Pour les adultes

✓ Ergyphilus Plus (Nutergia)

Ergyphilus Plus est conseillé dans les terrains allergiques, en prévention hivernale comme stimulant de l'immunité, et permet de restaurer l'équilibre de la flore intestinale en cas de diarrhées, de traitement antibiotique, de troubles vaginaux à répétition chez la femme. La forme gélule se conserve à +4°C. Une gélule renferme 6 milliards de ferments lactiques. La posologie va de 2 à 4 gélules par jour, de préférence le matin et en dehors des repas. Les 4 souches présentes sont *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium bifidum*.

✓ Ergyphilus Confort (Nutergia)

Cette spécialité associe des souches de probiotiques destinées à rééquilibrer la flore intestinale et sont indiquées spécialement en cas d'inconfort intestinal, pour réguler le transit, pour faciliter la digestion du lactose et pour améliorer la digestion et l'assimilation des nutriments et des minéraux. Ces souches se composent de *Lactobacillus plantarum*, de LGG, de *Bifidobacterium longum*, de *Lactobacillus acidophilus* et de *Bifidobacterium bifidum*. Une gélule renferme 6 milliards de ferments lactiques. La posologie reste de 2 à 4 gélules par jour, de préférence le matin et en dehors des repas, et la conservation se fait à +4°C.

✓ Lactibiane Référence (Pilèje)

Composée de 4 souches probiotiques, cette spécialité permet de maintenir l'équilibre de la flore et d'améliorer le confort digestif. Soit sous forme de sachets ou sous forme de gélules, la posologie est d'un par jour à prendre toujours avant un repas en cure de 30 jours renouvelable et la conservation se fait dans un endroit frais et sec. Les souches utilisées sont ici *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium longum*, *Lactococcus lactis* et *Streptococcus thermophilus*. Chaque sachet ou gélule renferme 10 milliards de ferments lactiques.

✓ Lactibiane Protect (Pilèje)

Cette spécialité renferme l'unique souche *Lactobacillus rhamnosus* LA801. Chaque gélule renferme 6 milliards de ferments lactiques. La posologie est de 2 gélules par jour pendant 7 jours renouvelables et la conservation se fait au frais et au sec.

✓ Lactibiane Tolérance (Pilèje)

Cette spécialité qui existe en sachets ou en gélules se compose de 5 souches microbiotiques : *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius* et *Bifidobacterium lactis*. Chaque sachet ou gélule renferme 10 milliards de ferments lactiques. La posologie est d'une gélule ou d'un sachet par jour en cure de 30 jours. La conservation se fait toujours au frais et au sec.

✓ Lactibiane Voyage (Pilèje)

L'intérêt de cette spécialité réside en la capacité de résistance des souches qui la compose de un mois à +40°C. Cet avantage permet aux voyageurs de l'emporter dans leurs bagages et de l'utiliser en prévention de la diarrhée du voyageur. Cette forme gélule se compose de 3 souches : *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus plantarum*. Une gélule renferme 20 milliards de ferments lactiques. La posologie est d'une gélule par jour à prendre avant un repas et pendant la durée du séjour.

✓ BactiVit (Lescuyer) (61)

L'intérêt de cette spécialité et qu'elle regroupe au sein d'un même sachet des probiotiques et des prébiotiques pour une synergie d'action. Les 4 souches de probiotiques ici utilisées sont *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus delbrueckii spp. Bulgaricus*. Les prébiotiques utilisés sont des fructo-oligosaccharides (FOS), c'est-à-dire des fibres naturellement présentes dans les fruits, les céréales complètes et les légumes. Chaque sachet renferme 1,5 milliards de ferments lactiques actifs et 5 grammes de FOS. La posologie est d'un sachet par jour pendant 8 à 15 jours puis d'un sachet 2 à 3 fois par semaine pendant plusieurs semaines. Le sachet est dilué dans un verre d'eau et la prise se fait toujours à distance des repas ou par exemple le matin avant de prendre le petit déjeuner. La conservation des sachets se fait au frais et au sec.

En conclusion de ce dernier chapitre, il faut reconnaître l'intérêt de la découverte de ces compléments alimentaires d'un bénéfice notable et d'une relative innocuité envers la santé humaine. Les souches de probiotiques utilisées et répertoriées dans la littérature sont nombreuses et variées. Il faut se fier aux études cliniques et aux normes de qualité strictes qui

se développent dans les laboratoires actuels. Les médecins et les pharmaciens, en tant que professionnels de santé, vont être amenés à conseiller ces produits. Pour cela il est intéressant que chacun se porte sur le rôle essentiel de notre microbiote intestinal.

Conclusion

Les modifications du mode de vie et les changements dans l'environnement sont responsables depuis 1960 d'une flambée des manifestations allergiques telles que sont l'asthme, la rhinite allergique, l'eczéma atopique ou encore l'intolérance à certains aliments. Un médecin anglais de la fin du XIX^e siècle, le Docteur Backley, avait déjà constaté que le rhume des foins était plus fréquent chez les citadins à haut niveau socio-économique que chez les paysans pauvres (5). **Il avait émis l'hypothèse que parallèlement au développement du niveau de vie, les maladies allergiques allaient prendre de plus en plus d'ampleur et aller toucher de plus en plus la population. C'est bel et bien le cas à l'heure actuelle et c'est pour cause qu'il faut que les Pharmaciens, en tant que professionnels de santé, en aient conscience afin d'accompagner ces nombreux patients et les aider à surmonter au mieux les symptômes allergiques auxquels ils sont confrontés. La compréhension du lien entre le microbiote intestinal et l'état de santé des individus est un élément incontournable. La littérature est riche mais il faut reconnaître des points de divergences. Notamment les techniques d'étude employées manquent de standardisation. Nous pouvons également retrouver certaines contradictions quant aux effets des probiotiques et des prébiotiques sur notre état de santé. Durant mon travail de recherche bibliographique, j'ai pu constater que certains auteurs ont démontré leurs effets bénéfiques sur l'état de santé, tandis que d'autres n'ont trouvé aucun effet. En conclusion nous retiendrons que ce terrain d'étude est vaste et qu'il mérite qu'on lui accorde énormément d'attention. Le travail restant à fournir est conséquent.**

Bibliographie

1. **HAMADY M., KNIGHT R.** *Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges*. Colorado : Genome Research, 2009.
2. **CINQUIN, C.** *Développement et validation d'un nouveau modèle de fermentation colique in vitro avec cellules immobilisées*. Québec : Thèse de recherche, 2005.
3. **ANDERSSON Anders F., LINDBERG M., JAKOBSSON H. et al.** *Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing*. Stockholm : Niyaz Ahmed, 2008.
4. **HARRIS J.K., WAGNER B.D.** *Bacterial identification and analytic challenges in clinical microbiome studies*. 2012.
5. **Association Française de Médecine Orthomoléculaire, équipe scientifique de Nutergia.** *Les allergies: Prévention par la Nutrition Cellulaire Active*. Paris : AFMO, 2003.
6. ADN: Les plus grosses molécules du monde vivant. *EXPERTADN.FR*. [En ligne] 2013. <http://expertadn.fr/adn-les-plus-grosses-molecules-du-monde-vivant/> (octobre 2013).
7. **SEKSIK, Philippe.** Le microbiote intestinal [En ligne] (octobre 2013).
8. **Elissa, KHAMISSE.** *Etude du microbiote susceptible de persister sur les surfaces d'un atelier de la filière viande bovine*. Paris : s.n., 2012.
9. **LUNARDI, Joel.** Méthode d'études de biologie moléculaire. [En ligne] 2011. http://www.uvp5.univ-paris5.fr/wikinu/docvideos/Grenoble_1011/LUNARDI_Joel/lunardi_Joel_P08/lunardi_Joel_P08.pdf (octobre 2013).
10. **ACADEMIC.** Hybridation fluorescente in situ. *ACADEMIC* [En ligne] (octobre 2013).
11. **DESCOMBES, P.** Les microarrays: technologie pour interroger le génome. [En ligne] <http://tecfa.unige.ch/perso/lombardf/bist/ressources/genomique-descombes-24Xi06.pdf> (octobre 2013).
12. **Pédagogie, Gnis.** L'amplification de fragments d'ADN in Vitro : la PCR. *Gnis Pédagogie*. [En ligne] 2013. <http://www.gnis-pedagogie.org/biotechnologie-biologie-amplification-fragment-adn.html> (octobre 2013).
13. **Ingénierie éducative, Réseau lyonnais.** La PCR. [En ligne] <http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/principe/anim/presentation.htm> (octobre 2013).
14. **Louis Malardé, Institut.** PCR en temps réel. *ILM* [En ligne] (octobre 2013).

15. **ILM.** PCR en temps réel. *ILM.* [En ligne] (octobre 2013). <http://www.ilm.pf/PCRtempsreel>.
16. **FAHIME, EL.** Evolution des techniques de séquençage. *Les technologies de laboratoire.* [En ligne] 2007. <http://www.technolabo.ma/TL5-1.pdf> (octobre 2013).
17. **PETROSINO Joseph, HIGHLANDER Sarah et al.** *Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification.* 2009.
18. La technique RFLP. *Les emprunts génétiques en médecine légale.* [En ligne] 2013. <http://www.univ-rouen.fr/ABISS/L1/WEB/empreinte/RFLP.html> (octobre 2013).
19. **Pédagogie, Gnis.** Les Marqueurs RFLP. *Gnis Pédagogie.* [En ligne] 2013. <http://www.gnis-pedagogie.org/biotechnologie-amelioration-marqueur-rflp.html> (octobre 2013).
20. **WIKIPEDIA.** Temperature gradient gel electrophoresis. *WIKIPEDIA.* [En ligne] 2013. http://en.wikipedia.org/wiki/Temperature_gradient_gel_electrophoresis (octobre 2013).
21. **Dreamstine.** Dreamstine. *Dreamstine.* [En ligne] 2013. <http://fr.dreamstime.com/image-stock-hmatopose-image28798261> (octobre 2013).
22. **FINANCE, C.** *La réponse immune.* NANCY : Faculté de Pharmacie de Nancy, 2009.
23. **AUSTIN, AUSTIN IMMUNITY COLLEGE.** Immune system, Body defenses. [En ligne] <http://www.austincc.edu/apreview/PhysText/Immuno.html#3types> (octobre 2013).
24. **AUSTIN, AUSTIN COMMUNITY COLLEGE.** Immune system. [En ligne] <http://www.austincc.edu/apreview/EmphasisItems/Inflammatoryresponse.html> (octobre 2013).
25. **Farabee, M.J.** LYMPHATIC SYSTEM AND IMMUNITY. [En ligne] 2010. [http://www2.estrellamountain.edu/faculty/farabee/biobk/biobookimmun.html#Table of Contents](http://www2.estrellamountain.edu/faculty/farabee/biobk/biobookimmun.html#Table_of_Contents) (octobre 2013).
26. **John Libbey, Eurotext.** L'essentiel de l'information scientifique et médicale. [En ligne] <http://www.jle.com/e-docs/00/03/F8/01/article.phtml?fichier=images.htm> (octobre 2013).
27. **PROUST, B.** *Complexe majeur d'histocompatibilité et immunité adaptative.* NANCY : Faculté de Pharmacie de Nancy, 2010.
28. **FINANCE, C.** *Les cytokines.* NANCY : Faculté de Pharmacie de Nancy, 2009.
29. Cytokines and Inflammatory Response. *GeneCopia.* [En ligne] 2013. http://www.genecopia.com/product/search/pathway/h_inflamPathway.php (octobre 2013).

30. **FINANCE, Chantal.** *Le système du complément.* Nancy : Faculté de Pharmacie de Nancy, 2010.
31. **GUGLIELMI, L.** Immunité des muqueuses. [En ligne] http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle_1/PCEM2/mod-base/MB7_Bio_Med/Ressources_locales/IMMUNO/PCEM2_MB7_Immuno_Immunodeficiences.pdf (octobre 2013).
32. **MARTIN R., NAUTA A. J. et al.** *Early life: gut microbiota and immune development in infancy.* Utrecht : Wageningen Academic Publishers, 2010.
33. **AMLAN Biswas, TANJA P-O et al.** *Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity.* Boston : NIH Public Access, 2012.
34. **LATHROP S.K., BLOOM S.M. et al.** *Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota.* Saint Louis, USA : NIH Public Access, 2012.
35. **BRANDT K., TADDEI C. R. et al.** *Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in Brazilian newborns.* Sao Paulo : Clinical Science, 2012.
36. **TERRAT S., CHRISTEN R., et al.** *Diversité taxonomique microbienne.* Dijon : INRA de Dijon, 2013.
37. **GRALL J., COIC N.** *Synthèse des méthodes d'évaluation de la qualité du benthos en milieu côtier.* Bretagne : LEMAR Laboratoire des sciences de l'Environnement Marin, 2006.
38. **GRALL J., HILY C.** *Traitement des données stationnelles (faune).* Faune : LEMAR, 2003.
39. **MARTIN, F.** *Exploration de la biodiversité bactérienne dans un sol pollué par les hydrocarbures.* Grenoble : Biodiversity, 2011.
40. **Association Française de Médecine Orthomoléculaire, équipe scientifique de Nutergia.** *L'écosystème intestinal de la naissance à l'âge adulte: évolution, équilibre et perturbations.* 2010.
41. **PENDERS J., THIJS C. et al.** *Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy.* Maastricht : American Academy of Pediatrics, 2006.
42. **FUJIMURA K.E., SLUSHER N.A. et al.** *Role of the gut microbiota in defining human health.* California, San Francisco : NIH Public Access, 2011.
43. **BJORKSTEN B., NAABER P. et al.** *The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children.* Linköping, Sweden : Blackwell Science Ltd, 1999.
44. **ASP, Agence Science Presse.** Actualité en périnatalité, A la découverte des cellules du lait maternel. *Agence Science Presse.* [En ligne] (octobre 2013).

45. **PFEFFERLE P. I., PRESCOTT S. L., PhD et al.** *Microbial influence on tolerance and opportunities for intervention with prebiotics/probiotics and bacterial lysates.* Marburg, Lübeck and Perth : Clinical reviews in allergy and immunology, 2013.
46. **Mc Loughlin R., PhD et al.** *Influence of gastrointestinal commensal bacteria on the immune responses that mediate allergy and asthma.* Dublin : American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, 2011.
47. **CANDELA M., RAMPELLI S., et al.** *Unbalance of intestinal microbiota in atopic children.* Milan : BMC microbiology, 2012.
48. **FORNO E., ONDERDONK A. et al.** *Diversity of the gut microbiota and eczema in early life.* Boston : BioMed Central, 2008.
49. **WANG M., KARLSSON C. et al.** *Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema.* Berlin, Rome, Göteborg, London : American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, 2008.
50. **WATANEBE S., NARISAWA Y. et al.** *Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects.* Tokyo, Otsu, Tokushima : Dermatologic and ocular diseases, 2003.
51. **ABRAHAMSSON T.R., JAKOBSSON H.E. et al.** *Low diversity of the gut microbiota in enfants with atopic eczema.* Stockholm : American Academy of Allergy, 2011.
52. **GATES, DOCTOR.** Skin Prick Testing. *Doctor Gates.* [En ligne] 2013. <http://doctorsgates.blogspot.fr/2010/09/skin-prick-testing.html> (octobre 2013).
53. **OZDEMIR, O.** *Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: an update from laboratory and clinical data.* Istanbul : Clinical & Experimental Immunology, 2010.
54. **HSIEH M.H., VERSALOVIC J., et al.** *The human microbiome and probiotics: Implications for pediatrics.* Houston : National Institutes of Health Public Access, 2010.
55. **KUITUNEN M., KUKKONEN K., et al.** *Probiotics prevent IgE-associated allergy until age 5 years in cesarean-delivered children but not in the total cohort.* Helsinki and Tampere : American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, 2008.
56. **KLEWICKA E., CUKROWSKA B. et al.** *Changes in gut microbiota in children with atopic dermatitis administered the bacteria Lactobacillus casei DN-114001.* Warsaw : Polish Journal of Microbiology, 2011.
57. **PELUCCHI C., CHATENAUD L. et al.** *Probiotics supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of atopic dermatitis.* Milan : Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

58. **MASSON, Florence.** *Entérocolite ulcéro-nécrosante*. 2012.
59. **LECLERC, Christian.** Groupe Pileje. *Groupe Pileje*. [En ligne] 2013. <http://www.groupepileje.fr/>(octobre 2013).
60. **LAGARDE, Claude.** Laboratoire Nutergia. *Laboratoire Nutergia*. [En ligne] 2013. <http://www.nutergia.fr/index.php?sMenu=0&menu=0> (octobre 2013).
61. **LESCUYER.** Laboratoire LESCUYER. *Laboratoire LESCUYER*. [En ligne] 2013. <http://www.laboratoire-lescuyer.com/> (octobre 2013).

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 8 Janvier 2014

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

présenté par : GROSDEMANGE ANNE

Sujet : IMPACT DU MICROBIOTE INTESTINAL
SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE DE L'ENFANT

Jury :

Président : M. Raphaël DUVAL
Directeur : M. Raphaël DUVAL
Juges : M. BOOB, Mme FLORENTIN-BALLEE, M.
TROCKLE

Vu,

Nancy, le

24 novembre 2013

Le Président du Jury Directeur de Thèse

Professeur R. DUVAL

Vu et approuvé,

Nancy, le 9.12.13

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Lorraine,

Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le 16 DEC. 2013

Le Président de l'Université de Lorraine,

Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 6722

N° d'identification :

TITRE

IMPACT DU MICROBIOTE INTESTINAL SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE DE L'ENFANT

Thèse soutenue le 8 janvier 2014

Par Anne GROSDÉMANGE

RESUME :

L'intestin constitue une sorte de frontière entre l'organisme et l'environnement extérieur. Son rôle est crucial tant dans la protection contre les éléments étrangers et potentiellement pathogènes dont les bactéries, les virus et les produits toxiques, que dans la tolérance alimentaire. **La flore bénéfique qu'il renferme se compose d'environ 10^{14} bactéries qui sont nécessaires de la naissance à l'âge adulte aux fonctions de digestion des aliments, de maintien de l'immunité et de contrôle de l'inflammation.** Sa mise en place commence dès la naissance. La compréhension du rôle du microbiote intestinal, de sa composition et des facteurs pouvant la modifier, peut fournir de nouvelles cibles thérapeutiques. Effectivement, il existe **une homéostasie entre la charge bactérienne et la réponse immunitaire de l'organisme.** **Lorsqu'un déséquilibre est créé, on parle de dysbiose, le risque pathologique s'installe, tout comme le risque allergique.** Le déséquilibre de cette flore, de plus en plus important depuis **les deux derniers siècles en raison des évolutions du mode de vie et de l'alimentation, a fragilisé notre système immunitaire et a favorisé le développement de maladies dites « de civilisation »** que sont les intolérances alimentaires notamment aux protéines de lait de vache, les phénomènes allergiques telle que la dermatite atopique, et les maladies inflammatoires chroniques que sont par exemple la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. **C'est pour pallier ces évolutions néfastes que les chercheurs scientifiques se sont penchés sur l'étude des probiotiques et des prébiotiques. Ainsi l'équilibre intestinal, indispensable à notre santé, peut être retrouvé via leur utilisation en permettant la restauration de la barrière intestinale et un développement efficace du système immunitaire.**

MOTS CLES : IMMUNITE, SYSTEME IMMUNITAIRE, MICROBIOTE INTESTINAL, FLORE INTESTINALE, ATOPIE

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
M. Raphaël DUVAL	Microbiologie clinique	Bibliographique

Thème : Biologie