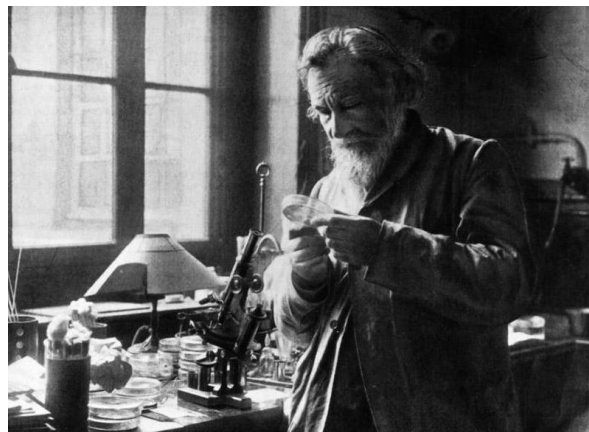


LES PROBIOTIQUES

Introduction

Les probiotiques sont des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte »¹. Depuis l'antiquité, les hommes consomment des aliments fermentés, dont on sait maintenant que les effets bénéfiques sont en partie dus aux micro-organismes probiotiques.

L'observation originale du rôle positif joué par quelques bactéries sélectionnées est attribuée à Elie Metchnikoff, prix Nobel de physiologie et de médecine en 1908, qui a suggéré que *"la dépendance des microbes intestinaux vis-à-vis des aliments rend possible l'adoption de mesures pour modifier la flore dans nos corps et remplacer les microbes dangereux par des microbes utiles"* (Metchnikoff, 1907). »²



De récents travaux scientifiques sur les propriétés et la fonctionnalité des micro-organismes dans les aliments donnent à penser que les probiotiques jouent un rôle important dans les fonctions immunologiques, digestives et respiratoires et qu'ils sont susceptibles d'aider à lutter contre les maladies infectieuses chez les enfants et d'autres groupes à risque élevé.

1 Les principaux micro-organismes probiotiques

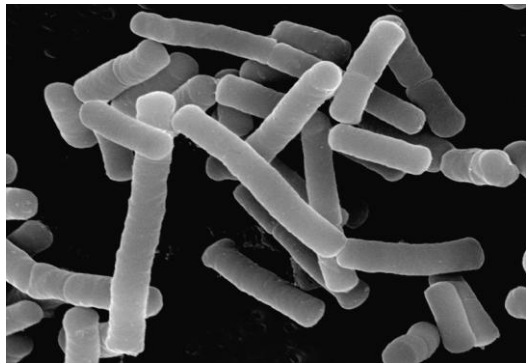
Un probiotique appartient à la flore commensale transitoire, il ne doit pas être pathogène ou carcinogène, il doit survivre dans l'aliment et le tractus intestinal.

Parmi les microorganismes utilisés comme probiotiques chez l'Homme, les bactéries lactiques, hôtes naturels de la microflore intestinale de l'Homme ou microbiote, sont souvent retrouvés. Les probiotiques les plus étudiés appartiennent aux genres : *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Saccharomyces*.

¹ Définition donnée par la FAO et l'OMS en 2006

² Metchnikoff, zoologiste russe et directeur du service microbiologie à l'institut Pasteur, a mis en évidence le mécanisme de la phagocytose, présente dans tout le règne animal.

1.1 Le genre *Lactobacillus*



Les *Lactobacillus*, bactéries Gram positif, la plupart anaérobies aérotolestants et acidophiles, sont largement utilisés comme probiotiques, notamment les espèces *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*. Leur croissance est lente et exige des milieux enrichis en facteurs de croissance. Le milieu de culture le plus utilisé est le milieu "MRS", dont la composition est donnée dans le **document A de l'annexe 1**.

1.1.1 Analyser la composition du milieu de culture "MRS" en précisant le rôle de l'extrait de levure, du glucose, du sulfate de magnésium et du sulfate de manganèse.

1.1.2 Expliquer le rôle du pH.

Pour optimiser la culture de ce probiotique, différents milieux et conditions d'incubation sont testés au laboratoire. Les résultats sont donnés par le **document B de l'annexe 1**.

1.1.3 A partir des résultats du **document B**, conclure sur le type trophique de cette bactérie vis-à-vis de la source de carbone et des besoins nutritifs spécifiques. En déduire le rôle du CO₂.

Les *Lactobacillus* ont un métabolisme fermentaire. Le **document C de l'annexe 2** présente la fermentation lactique réalisée par les bactéries du genre *Lactobacillus*.

1.1.4 Donner une définition biochimique du terme "fermentation".

1.1.5 Recopier, sur la copie, la réaction figurant sur le **document C de l'annexe 2** et compléter les légendes.

Le NAD « Nicotinamide Adénine Dinucléotide » est constitué de deux nucléotides associés par une liaison phosphoanhydride. Les éléments constituant ce coenzyme figurent sur le **document D de l'annexe 2**.

1.1.6 Donner la définition d'un coenzyme.

1.1.7 Schématiser la structure moléculaire simplifiée du NAD.

1.1.8 A l'aide du **document D de l'annexe 2**, écrire la formule développée du NAD⁺.

1.1.9 Présenter, en se limitant à la partie fonctionnelle de la molécule (nicotinamide), les formules développées des formes réduite (NADH, H⁺) et oxydée (NAD⁺) du NAD. Préciser le nombre d'électrons participant à la réaction d'oxydoréduction.

³ Photographie au microscope électronique de bactéries lactiques. Source: institut-rosell-lallemand.com

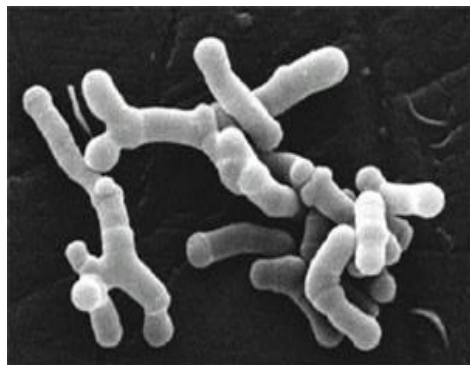
1.1.10 Donner un ordre de grandeur de la variation d'enthalpie libre standard $\Delta G'^{\circ}$ de la réaction de réduction du pyruvate, à partir des données du **document C de l'annexe 2**.

1.1.11 Indiquer, en le justifiant, si cette réaction se produit spontanément.

1.1.12 Donner le rôle de cette étape dans le processus de production d'énergie par fermentation.

1.2 Le genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* regroupe des bactéries à Gram positif, en forme de Y, ne produisant pas de spores, anaérobies strictes. De nombreuses espèces sont utilisées comme probiotiques, plus particulièrement les espèces *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium breve*.



1.2.1 Proposer une technique pour cultiver les bactéries anaérobies strictes après avoir rappelé leurs caractéristiques de culture.

Dans le genre *Bifidobacterium*, le fructose est dégradé par fermentation selon une cascade de réactions figurant à **l'annexe 3**.

1.2.2 Citer les deux produits de fermentation obtenus à partir du fructose.

1.2.3 Effectuer le bilan moléculaire de la dégradation du fructose en montrant la stœchiométrie pour les atomes de carbone, puis réaliser le bilan énergétique.

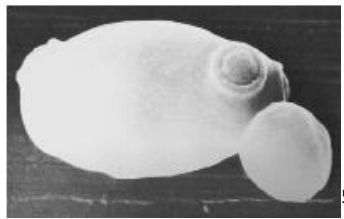
1.2.4 Certaines réactions de la fermentation du fructose par *Bifidobacterium* sont retrouvées dans la voie de la glycolyse. Relever, dans **l'annexe 3**, les numéros des réactions correspondantes.

⁴photographie au microscope électronique de bactéries du genre *Bifidobacterium*. Source: microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacter.

1.3 Les levures du genre *Saccharomyces*

Les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces boulardii*, retrouvées dans les produits fermentés comme la bière, les dérivés du lait et les yaourts, sont également des probiotiques.

Saccharomyces boulardii est une levure tropicale, découverte en Indochine en 1923 par le scientifique français Henri Boulard. Celui-ci a isolé la levure à partir de divers fruits tropicaux (lychees, papaye) après avoir constaté que la population indigène utilisait la peau de ces fruits comme médicaments anti-diarrhéiques. Le cytoplasme de *Saccharomyces boulardii* est riche en glycogène, en vitamines et en enzymes comme des lipases, des protéases, des disaccharidases.



1.3.1 Reporter sur la copie les numéros indiqués sur le schéma de structure de *Saccharomyces boulardii* donné en **annexe 4** et indiquer les légendes correspondantes.

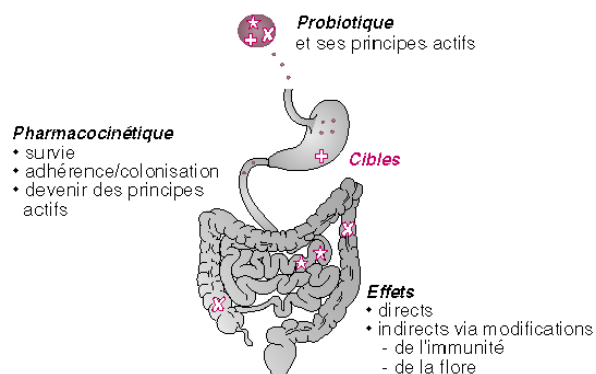
1.3.2 Justifier la classification de *Saccharomyces boulardii* parmi les eucaryotes.

La paroi de *Saccharomyces boulardii* est constituée, entre autres, de chitine dont la structure est représentée à l'**annexe 5**.

1.3.3 Indiquer la catégorie de biomolécules à laquelle appartient la chitine.

1.3.4 Reporter sur la copie les numéros de l'**annexe 5** et nommer précisément les liaisons correspondantes.

Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de véhiculer des principes actifs qu'ils contiennent jusqu'à leurs cibles d'action dans le tractus digestif.



⁵photographie au microscope électronique d'une levure du genre *Saccharomyces*. source: M. Bastide / S. Jouvert

Les concentrations de probiotiques véhiculés vivants, sont influencées par leur capacité de survie et par les quantités ingérées. *Saccharomyces boulardii* ne peut remplir ses fonctions sur le tube digestif que si les cellules de levure sont en mesure d'atteindre l'intestin grêle et le côlon en restant vivantes.

1.3.5 Commenter l'allure de l'histogramme de **annexe 6**, présentant la cinétique d'élimination fécale de cellules vivantes de *Saccharomyces boulardii*, au cours de l'administration par voie orale répétée de lyophilisat à des adultes sains.

1.3.6 En déduire la capacité de *Saccharomyces boulardii* à s'implanter dans le tube digestif.

1.4 Contrôle des souches de probiotiques à des fins industrielles

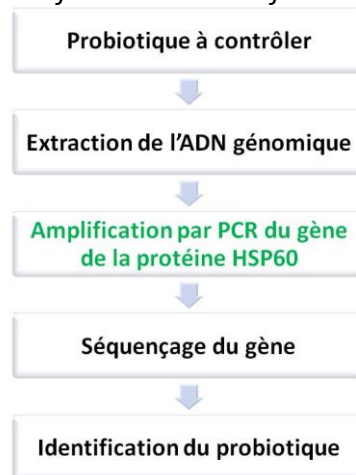
L'utilisation d'un micro-organisme comme probiotique suppose que la souche utilisée soit parfaitement identifiée, déclarée lors de la mise sur le marché de l'aliment, et régulièrement contrôlée.

Les méthodes phénotypiques sont, historiquement, les premières méthodes mises en œuvre pour caractériser les microorganismes. L'**annexe 7** présente une réaction permettant la mise en évidence d'une enzyme caractéristique de *Bifidobacterium*.

1.4.1 A l'aide de l'**annexe 7** et de l'**annexe 3**, identifier l'enzyme X.

1.4.2 Citer une méthode permettant de mettre en évidence la présence de l'enzyme X.

Les méthodes phénotypiques sont progressivement remplacées par les méthodes génotypiques. L'organigramme ci dessous présente les étapes nécessaires au contrôle d'un produit commercialisé et étiqueté *Bifidobacterium bifidum*.



La PCR, « Polymerase Chain Reaction » ou « réaction de polymérisation en chaîne », permet d'amplifier le gène de la protéine de choc thermique HSP 60 « Heat Shock Protein 60 kDa », dont la séquence est spécifique à l'espèce *Bifidobacterium bifidum*.

1.4.3 Définir la notion de gène. Exposer les principales étapes de son expression en protéine.

1.4.4 Donner les caractéristiques structurales d'une molécule d'ADN.

La technique de PCR, présentée en **annexe 8**, est réalisée dans un thermocycleur programmé en fixant les températures et les durées des étapes des cycles. Cette technique

est rendue possible grâce à la « Taq polymérase », une enzyme thermostable, active à 95°C et ayant une activité ADN polymérase ADN-dépendante.

- 1.4.5 Donner les modifications structurales de l'ADN consécutives à l'augmentation de la température lors de l'étape 1 de l'**annexe 8**. Nommer ce processus.
- 1.4.6 Indiquer les caractéristiques des oligonucléotides servant d'amorces lors de l'étape 2 de l'**annexe 8**.
- 1.4.7 Présenter sur le même graphe légendé les effets de la température sur la vitesse d'une réaction catalysée :
 - par une enzyme d'origine humaine
 - par la Taq polymérase.
- 1.4.8 Nommer le phénomène observé à l'étape 3 de l'**annexe 8**, réalisé par la Taq polymérase.
- 1.4.9 Déterminer le nombre de molécules d'ADN obtenues à l'issue des 30 cycles. Conclure sur l'intérêt majeur de cette technique.

2 Probiotiques et digestion du lactose

Le lactose est hydrolysé par une β -galactosidase présente sur les entérocytes de la bordure en brosse de l'intestin grêle. L'activité de cette enzyme, également appelée lactase, est maximale à la naissance puis diminue après le sevrage pour aboutir à un déficit partiel (hypolactasie) chez l'adulte.

Bifidobacterium possède également une β -galactosidase cytoplasmique

2.1 Lactose et bêta galactosidase

- 2.1.1 Ecrire la formule semi-développée du lactose (β -D-galactopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4) D-glucopyranose).
- 2.1.2 Écrire l'équation de la réaction catalysée par la β -galactosidase.
- 2.1.3 Expliquer le principe de la recherche d'une β -galactosidase bactérienne au laboratoire de microbiologie.

2.2 Apport des probiotiques dans l'alactasie congénitale

L'alactasie congénitale est une maladie héréditaire qui se traduit dès la naissance par des diarrhées osmotiques sévères.

- 2.2.1 Justifier le fait que l'osmolarité est augmentée dans la lumière du tube digestif d'un malade ayant consommé du lactose. Expliquer alors le mécanisme de la diarrhée.

L'arbre généalogique d'une famille dont certains membres sont atteints d'alactasie congénitale est présenté en **annexe 9**.

2.2.2 Indiquer en le justifiant si l'alactasie congénitale est une maladie autosomale ou gonosomale, récessive ou dominante.

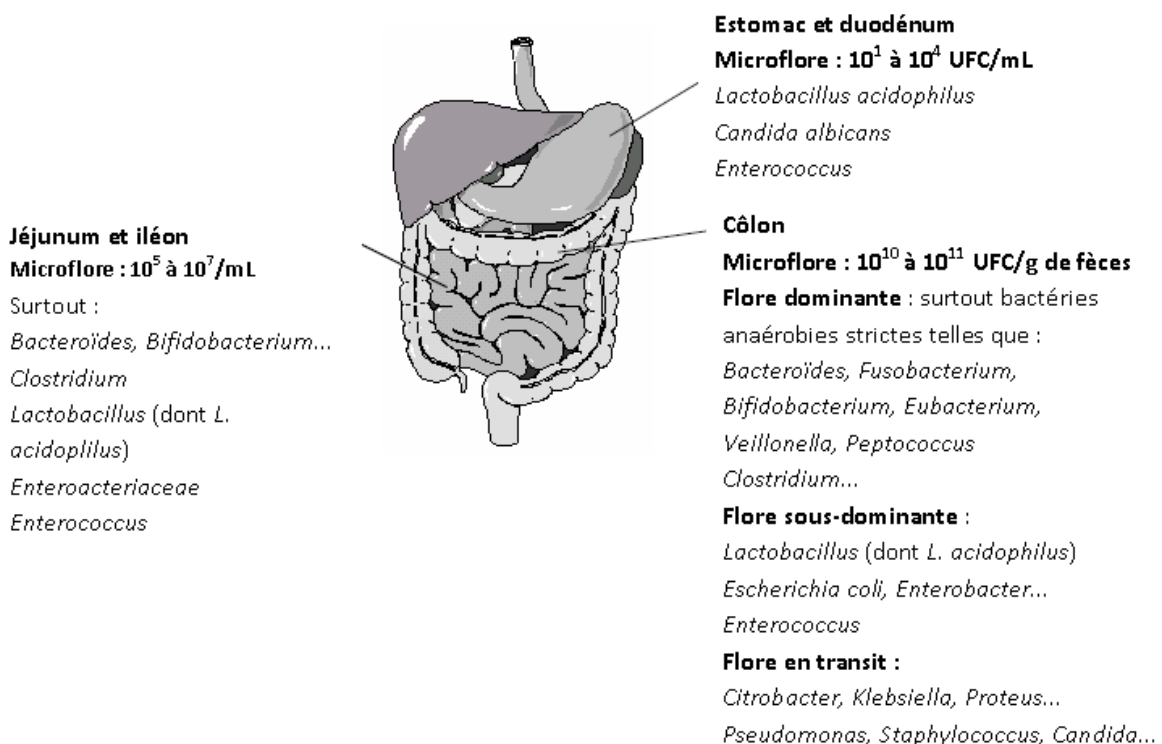
2.2.3 Déterminer la probabilité que l'enfant à naître III 3 soit atteint d'alactasie congénitale.

Les symptômes de l'alactasie congénitale sont atténués par l'administration d'un probiotique tel que *Bifidobacterium*.

2.2.4 Proposer une hypothèse pour expliquer le rôle du probiotique dans l'atténuation des symptômes.

3 Probiotiques et effet barrière dans l'intestin

L'intestin humain est la partie du corps composée de la plus large communauté de micro-organismes. Le microbiome, ensemble des gènes du microbiote, constitué par la flore commensale intestinale est partagé par plus de quatre cents espèces différentes. C'est au niveau du côlon que cette microflore est la plus abondante et la plus diversifiée.



3.1 Effet barrière du microbiote intestinal

3.1.1 Expliquer la notion de « flore commensale ».

3.1.2 Sachant qu'un individu est axénique au cours de sa vie utérine, c'est-à-dire dépourvu de micro-organismes, expliquer les origines possibles de la flore intestinale et son évolution avec l'âge grâce-au **document E** et au **document F de l'annexe 10**.

L'effet « barrière » correspond à l'ensemble des mécanismes mis en œuvre par la flore commensale permettant d'éliminer les micro-organismes indésirables potentiellement enteropathogènes.

3.1.3 Citer un exemple de bactérie entéropathogène. Décrire la voie de contamination par ces bactéries. Indiquer les conséquences sur l'organisme.

Différents mécanismes permettent d'expliquer l'effet barrière de la flore commensale : compétition pour les sites d'attachement épithéliaux, production de métabolites à effet toxique pour les bactéries ou production de substances telles que les bactériocines.

3.1.4 Décrire les structures bactériennes intervenant dans les phénomènes d'adhésion aux cellules cibles.

3.1.5 Donner un exemple de métabolite issu du métabolisme énergétique pouvant freiner la multiplication de bactéries « indésirables ».

3.1.6 Définir le terme bactériocine.

Le critère d'adhésion est largement pris en compte dans l'évaluation des "propriétés probiotiques" d'une souche bactérienne. Il est généralement admis que l'adhésion augmenterait le temps de présence du probiotique dans le tractus intestinal et entraînerait une plus forte interaction avec le système immunitaire de l'hôte.

La capacité d'adhésion d'une bactérie peut être étudiée in vitro avec des lignées cellulaires telles que CaCo-2, une lignée cellulaire cancéreuse provenant d'un carcinome du côlon. Les résultats pour certaines bactéries sont donnés par le tableau en **annexe 11**.

3.1.7 Justifier l'utilisation possible d'une souche de *Lactobacillus* en tant que probiotique pour moduler la flore intestinale à partir des résultats indiqués dans le tableau de l'**annexe 11**.

3.2 Probiotiques et traitement des diarrhées

Les probiotiques sont utilisés dans le traitement et la prévention des diarrhées infectieuses. *Clostridium difficile* est responsable de nombreux cas de diarrhées ou de « Colites Pseudo Membraneuses » consécutives à une antibiothérapie. La colonisation de la muqueuse intestinale par *Clostridium difficile* peut être due à une souche d'origine endogène ou exogène produisant deux toxines protéiques, appelées toxine A et toxine B.

3.2.1 Expliquer la notion de « souche d'origine endogène ou exogène ».

3.2.2 Préciser l'effet d'une antibiothérapie sur le microbiote intestinal.

3.2.3 *Clostridium difficile* est une bactérie sporulée dans le tube digestif. Expliquer comment, suite à une antibiothérapie, ce caractère contribue à la colonisation de la muqueuse intestinale par *Clostridium difficile*.

L'espèce *Saccharomyces boulardii* est le principal probiotique à avoir montré une réelle efficacité dans la prévention des diarrhées post-antibiotiques et les colites à *Clostridium difficile*. Elle dispose d'une AMM « Autorisation de Mise sur le Marché » de médicament.

Différentes expériences réalisées par Castex et al (1989) sur des souris axéniques ont permis de mieux comprendre le mécanisme d'action de *Saccharomyces boulardii* sur *Clostridium difficile*. Les résultats de ces expériences sont donnés en **annexe 12**.

3.2.4 Interpréter l'étude des lésions observées dans la muqueuse intestinale des souris du groupe témoin et du groupe "*S. boulardii*" présenté dans le **document G de l'annexe 12**.

3.2.5 Analyser les **documents H et I de l'annexe 12**.

3.2.6 Proposer un mode d'action de *Saccharomyces boulardii* expliquant l'efficacité du traitement des diarrhées à *Clostridium difficile*.

Des expériences complémentaires ont montré que *Saccharomyces boulardii* agirait par l'intermédiaire de la sécrétion d'une protéase.

3.2.7 Indiquer si ce résultat est en accord avec l'hypothèse précédente.

4 Probiotiques et réaction inflammatoire

4.1 Reconnaissance spécifique des probiotiques par les cellules phagocytaires

En situation physiologique, il existe une translocation de bactéries intestinales vivantes dans le milieu intérieur en période post prandiale. Le mécanisme majeur d'élimination de ces bactéries au niveau intestinal par les cellules de l'immunité naturelle est la phagocytose. La première étape consiste en une reconnaissance d'un PAMP, « Pathogen Associated Molecular Pattern », « motif moléculaire associé aux pathogènes » hautement conservé au cours de l'évolution et absent chez l'hôte. Le LPS, les acides lipotéichoïques, le peptidoglycane, les ARN simples brin ou double brin possèdent des PAMP.

4.1.1 Représenter la structure du LPS après avoir donné la signification du sigle « LPS ».

4.1.2 Indiquer le constituant du LPS qui permet de distinguer des *serovar*.

4.1.3 Expliquer en quoi la molécule de LPS possède un ou plusieurs PAMP reconnus par les macrophages.

Les macrophages expriment à leur surface un récepteur spécifique du PAMP du LPS, le CD14.

4.1.4 Indiquer les conséquences de la liaison d'une bactérie par son PAMP au CD14. Justifier l'expression "non spécifique" pour qualifier ce type de réponse immunitaire.

4.1.5 Expliquer alors pourquoi il vaut mieux privilégier l'expression « immunité innée » ou « immunité naturelle » plutôt que « immunité non spécifique ».

4.1.6 Expliquer de la même façon pourquoi on utilisera l'expression « immunité adaptative » plutôt que « immunité spécifique ».

4.2 Translocation bactérienne et sécrétion d'IgA

La translocation bactérienne favorise la stimulation de cellules immunocompétentes propres à la muqueuse intestinale sécrétant des immunoglobulines A (IgA) dimériques. Le mécanisme par lequel les IgA sont sécrétées dans la lumière intestinal est présenté en **annexe 13**.

- 4.2.1 Présenter le rôle du macrophage dans l'activation de la réponse à un antigène bactérien.
- 4.2.2 Préciser le rôle des immunoglobulines dans la phagocytose.
- 4.2.3 Donner le nom de la cellule A en **annexe 13**.
- 4.2.4 Expliquer le devenir de l'immunoglobuline A (IgA) après avoir été sécrétée par la cellule A dans le milieu intérieur à l'aide du schéma de **l'annexe 13**. Préciser l'origine de la pièce sécrétoire de l'IgA.
- 4.2.5 Rappeler le rôle de la pepsine et son site d'action sur les immunoglobulines. Proposer une hypothèse permettant d'expliquer la persistance des IgA sécrétoires dans l'intestin, milieu riche en enzymes protéolytiques.
- 4.2.6 Expliquer comment les IgA empêchent les bactéries de franchir la muqueuse intestinale et permettent de maintenir un équilibre flore commensale-hôte en conditions physiologiques.
- 4.2.7 La flore commensale peut être altérée, par exemple par des traitements antibiotiques. Expliquer pourquoi la supplémentation de l'alimentation par des probiotiques comme *Lactobacillus rhamnosus GG* peut restaurer l'effet barrière des IgA.

5 Probiotiques et diabète de type 2

Une alimentation trop riche en glucides et en lipides peut entraîner, à long terme, un diabète de type 2. Rééquilibrer ou modifier la composition de la flore intestinale par l'utilisation de probiotiques pourrait constituer un complément thérapeutique susceptible de limiter le développement de la pathologie.

5.1 Mécanismes du diabète de type 2.

L'**annexe 14** présente la réponse insulinosécrétrice à une surcharge orale de glucose chez des sujets normaux et chez des patients souffrant de diabète de type 2.

- 5.1.1 Définir la glycémie. Donner l'ordre de grandeur de la glycémie chez un sujet sain à l'aide de **l'annexe 14**.
- 5.1.2 Analyser le **document J de l'annexe 14** et montrer l'existence d'un diabète chez les patients "DT2".

- 5.1.3 Analyser le **document K de l'annexe 14** et montrer pourquoi le diabète de type 2 est également appelé « diabète non insulino dépendant ».
- 5.1.4 Définir une hormone. Donner le mode d'action de l'insuline sur les cellules cibles. Indiquer la conséquence de l'action de l'insuline sur la glycémie.
- 5.1.5 Proposer une hypothèse permettant d'expliquer l'hyperglycémie dans le diabète de type 2.

L'**annexe 15** présente les résultats obtenus lors de l'étude de l'évolution du pancréas de souris (L) déficientes en récepteur à l'insuline. Les souris (L) développent dès l'âge de un mois des symptômes caractéristiques du diabète de type 2. Dans ces souris, les cellules cibles de l'insuline n'expriment pas le récepteur de cette hormone.

Le **document L de l'annexe 15** présente le mode opératoire et les résultats d'une technique d'immuno-histochimie obtenus sur des coupes de pancréas de souris témoin (T) et de souris (L).

- 5.1.6 A partir du **document L**, présenter, sous forme d'un schéma légendé, le principe de cette technique de marquage immuno-histochimique.
- 5.1.7 Expliquer quelles molécules sont mises en évidence par les « spots » bruns-orangés sur les photos 1 à 4 du **document L**, puis sur les photos 5 à 8 du **document L**.
- 5.1.8 Nommer et justifier le nom des cellules mises en évidence.

Le **document M de l'annexe 15** est obtenu à partir de l'observation des marquages immuno-histochimiques de différentes régions du pancréas.

- 5.1.9 Exploiter le **document M** pour comparer la structure du pancréas entre les souris témoin et les souris (L) âgées de un mois.
- 5.1.10 Le **document N de l'annexe 15** est obtenu par un marquage par immunofluorescence du pancréas. Indiquer l'évolution de la structure des îlots de Langerhans au bout de quatre mois pour les souris (L) observable par immunofluorescence du pancréas.

5.2 La théorie du LPS

Une alimentation déséquilibrée chronique favorise la translocation du LPS dans le milieu intérieur.

- 5.2.1 A partir de **l'annexe 16**, indiquer les conséquences d'un déséquilibre alimentaire chronique au niveau musculaire et hépatique.
- 5.2.2 Expliquer en quoi un déséquilibre alimentaire peut entraîner les symptômes du diabète de type 2.
- 5.2.3 A partir de **l'annexe 16**, indiquer les effets à long terme au niveau du pancréas d'un déséquilibre alimentaire chronique. Proposer une conséquence prévisible de l'action prolongée des macrophages infiltrés.

- 5.2.4 D'après **l'annexe 16**, expliquer comment une alimentation supplémentée en bifidobactéries pourrait améliorer l'évolution diabète de type 2.

6 Probiotiques et métabolisme énergétique

Le microbiote modifie le métabolisme énergétique de l'organisme hôte.

En 1983, Wostmann et al avaient observé que des rongeurs axéniques exigeaient 30% de calories en plus que des animaux non axéniques pour maintenir leur masse corporelle. Une étude relate qu'en deux semaines, des souris axéniques et colonisées avec un microbiote voient leur masse grasse augmenter de 20%, malgré une baisse de 30% de leur prise alimentaire avec une activité de la lipoprotéine lipase (LPL) très augmentée⁶.

La lipoprotéine lipase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse des triglycérides présents dans les lipoprotéines libérant des acides gras.

6.1 Théorie de la rentabilité énergétique et du FIAF

Bäckhed et al. proposent que cette augmentation de l'activité de la LPL est la conséquence de l'inhibition de l'expression d'un facteur protéique synthétisé au niveau de l'intestin : FIAF « Fasting Induced Adipose Factor ».

6.1.1 Qualifier l'action du FIAF vis-à-vis de la lipoprotéine lipase, sachant que la diminution du FIAF observée chez les souris axéniques puis colonisées, permettrait ainsi aux acides gras d'être captés par le tissu adipeux ou le muscle.

6.1.2 D'après l'ensemble des observations, montrer comment la flore commensale favorise le stockage des lipides.

L'**annexe 17** présente deux études établissant un lien entre l'obésité et la flore intestinale, parues dans Nature en 2006.

6.1.3 Montrer en quoi ces deux études semblent contradictoires.

6.2 Utilisation des prébiotiques à des fins énergétiques

D'autres expériences (Coni et al) suggèrent que la fermentation de glucides non digestibles n'augmente pas la masse grasse, mais au contraire contribue à réduire les altérations métaboliques associées à l'obésité. Ces fibres, appelées « prébiotiques », sont fermentées uniquement dans le côlon, permettant aux bactéries telles que *Bifidobacterium*, d'utiliser préférentiellement ces composés comme source énergétique pour se développer et modifier la flore intestinale. Les fructanes, également appelés FOS « fructo-oligosaccharides », sont des prébiotiques principalement issus de l'inuline dont la structure est présentée dans **l'annexe 18**. On les trouve dans les fruits, les légumes et le miel.

6.2.1 Proposer une définition des "prébiotiques".

6.2.2 Justifier l'appellation « FOS » au vue de la structure de l'inuline.

⁶ Bäckhed, PNAS 2004

- 6.2.3 Représenter le monomère sur la copie. Numéroté les carbones et repérer le carbone anomérique.
- 6.2.4 Montrer que la liaison osidique entre les monomères dans la structure de l'inuline est en configuration bêta.
- 6.2.5 Rappeler la configuration du carbone anomérique impliqué dans la liaison entre les r sids glucose de l'amidon et du glycogène.

Contrairement à l'amidon et au glycogène, les molécules de cellulose, de chitine et d'inuline, sont des polymères d'oses non digérés par les sécrétions digestives.

- 6.2.6 Expliquer cette différence d'après la structure de ces molécules.
- 6.2.7 Expliquer pourquoi les prébiotiques, associés aux probiotiques, peuvent permettre le maintien d'un microbiote équilibré en limitant une prise de poids excessive.

Conclusion

Le "microbiote" intestinal exerce un ensemble de fonctions qui amène certains auteurs à le considérer comme un « organe virtuel ». Les probiotiques permettent de favoriser le maintien de l'équilibre du microbiote.

Les aliments sont actuellement de plus en plus souvent stérilisés pour des raisons d'hygiène et de conservation, ce qui les appauvrit en « probiotiques naturels ». Cela conduit les industries agro-alimentaires à supplémenter en probiotiques certains aliments comme les laits fermentés et les produits dérivés.

Tous les effets bénéfiques des probiotiques conduisent à des enjeux économiques importants. Ces effets étant « souche-dépendant », il en résulte des dépôts de brevets et le développement éventuel d'OGM.

SOMMAIRE DES ANNEXES

ANNEXE 1.	CULTURE EN MILIEU MRS	15
DOCUMENT A.	COMPOSITION DU MILIEU MRS	15
DOCUMENT B.	ÉTUDE DE LA CROISSANCE DE <i>LACTOBACILLUS</i>	15
ANNEXE 2.	FERMENTATION LACTIQUE DES BACTÉRIES DU GENRE <i>LACTOBACILLUS</i>	16
DOCUMENT C.	FERMENTATION LACTIQUE DU PYRUVATE	16
DOCUMENT D.	MOLÉCULES CONSTITUTIVES DU NAD	16
ANNEXE 3.	VOIE DU CATABOLISME DES HEXOSES DANS LE GENRE <i>BIFIDOBACTERIUM</i>.....	17
ANNEXE 4.	SCHÉMA DE L'ULTRASTRUCTURE DE <i>SACCHAROMYCES BOULARDII</i>	18
ANNEXE 5.	STRUCTURE DE LA CHITINE	18
ANNEXE 6.	CINÉTIQUE D'ÉLIMINATION FÉCALE DE CELLULES VIVANTES DE <i>SACCHAROMYCES BOULARDII</i>.....	19
ANNEXE 7.	TEST D'IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE DU GENRE <i>BIFIDOBACTERIUM</i>.....	19
ANNEXE 8.	AMPLIFICATION DU GÈNE DE LA PROTÉINE HSP60	20
ANNEXE 9.	ARBRE GÉNÉALOGIQUE D'UNE FAMILLE PRÉSENTANT DES CAS D'ALACTASIE CONGÉNITALE ..	21
ANNEXE 10.	MISE EN PLACE DE LA FLORE COMMENSALE	22
DOCUMENT E.	DIFFÉRENTES ÉTAPES DE LA COLONISATION INTESTINALE	22
DOCUMENT F.	ÉVOLUTION DE LA FLORE DU CÔLON AVEC L'ÂGE	22
ANNEXE 11.	ADHÉSION DE DIVERSES BACTÉRIES AUX CELLULES CACO-2.....	23
ANNEXE 12.	<i>SACCHAROMYCES BOULARDII</i> ET <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i>	24
DOCUMENT G.	ÉTUDE DES LÉSIONS DE LA MUQUEUSE INTESTINALE	24
DOCUMENT H.	NOMBRE DE BACTÉRIES DE L'ESPÈCE <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i>	24
DOCUMENT I.	TENEUR EN TOXINES A ET B.....	24
ANNEXE 13.	TRANSLOCATION BACTÉRIENNE INTESTINALE.....	25
ANNEXE 14.	ÉTUDE DU DIABÈTE DE TYPE 2.....	26
DOCUMENT J.	RÉPONSE GLYCÉMIQUE À UNE SURCHARGE ORALE DE GLUCOSE	26
DOCUMENT K.	RÉPONSE INSULINÉMIQUE À UNE SURCHARGE ORALE DE GLUCOSE.....	26
ANNEXE 15.	ÉTUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE DU PANCRÉAS	27
DOCUMENT L.	OBSERVATION DES COUPES DE PANCRÉAS DES SOURIS TÉMOIN (T) ET DES SOURIS DÉFICIENTES (L) ÂGÉES DE 1 MOIS.....	27
DOCUMENT M.	RÉSULTATS POUR L'ENSEMBLE DU PANCRÉAS	27
DOCUMENT N.	IMMUNOFLOUORESCENCE DIRECTE SUR LES PANCRÉAS DE SOURIS TÉMOIN (T) OU DÉFICIENTES EN RÉCEPTEUR DE L'INSULINE (L) ÂGÉES DE 4 MOIS.	28
ANNEXE 16.	THÉORIE DU LPS.....	29
ANNEXE 17.	ETUDES PORTANT SUR LE LIEN ENTRE OBÉSITÉ ET MICROBIOTE	30
ANNEXE 18.	STRUCTURE DE L'INULINE	30

ANNEXE 1.**Culture en milieu MRS**DOCUMENT A.Composition du milieu MRS

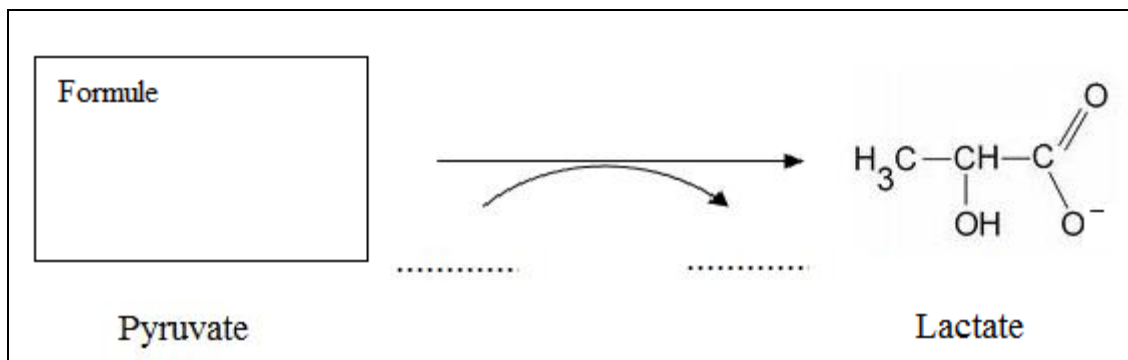
Composition	Grammes/litre
Peptone	10,0
Extrait de viande de boeuf	8,0
Extrait de levure	4,0
Glucose	20,0
Tween 80 1 mL	
Hydrogénophosphate de potassium	2,0
Acétate de sodium 3 H ₂ O	5,0
Citrate d'ammonium	2,0
Sulfate de magnésium 7 H ₂ O	0,2
Sulfate de manganèse 4 H ₂ O	0,05
Agar	10,0
pH	6,2 +/- 0,2

DOCUMENT B.Étude de la croissance de *Lactobacillus*

	Milieu A	Milieu B	Milieu C	Milieu D
Composition	MRS en atmosphère aérobie	MRS + 5 % de CO ₂	MRS sans extraits de levure + 5% de CO ₂	MRS sans source de carbone organique + 5% de CO ₂
Culture	+	++	-	-

ANNEXE 2. Fermentation lactique des bactéries du genre *Lactobacillus*

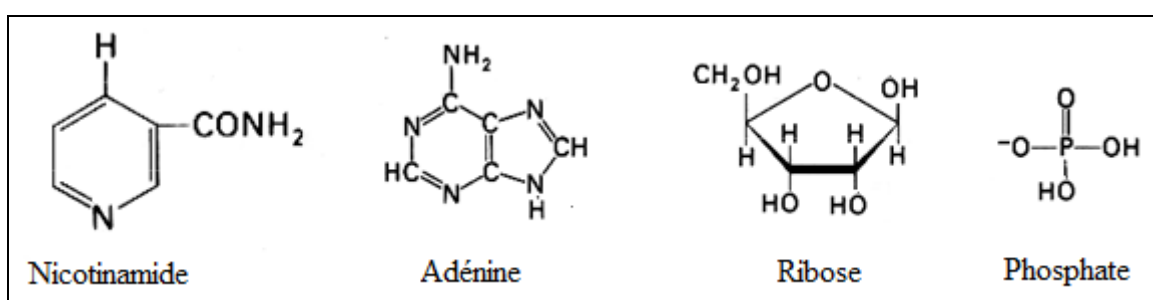
DOCUMENT C. Fermentation lactique du pyruvate



Données

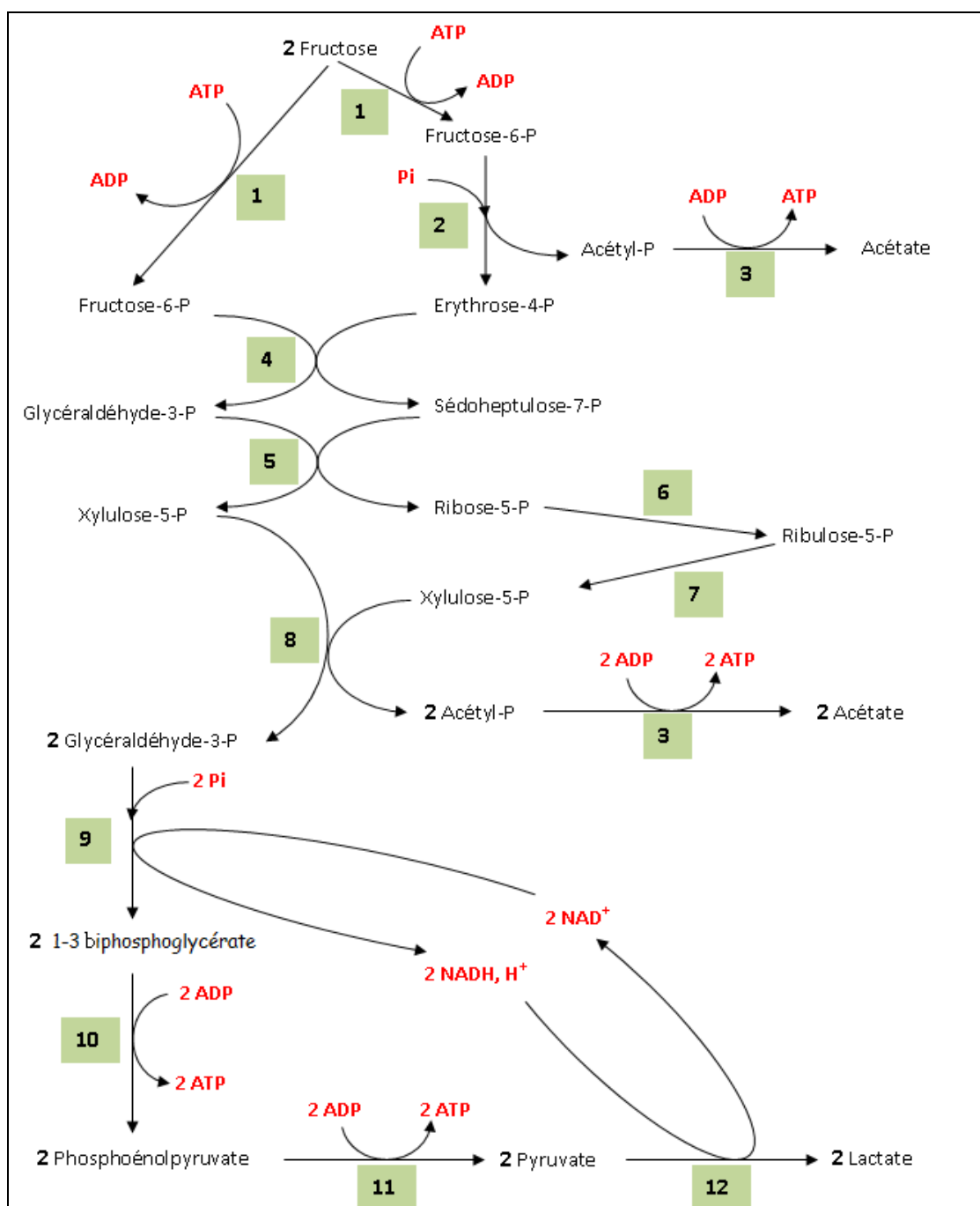
- Potentiels standards d'oxydo-réduction, E'° , des couples "red-ox" suivants :
 - Pyruvate / lactate $E'^\circ_{\text{Pyruvate / lactate}} = -0,19 \text{ V}$
 - $\text{NAD}^+ / \text{NADH}, \text{H}^+$ $E'^\circ_{\text{NAD}^+ / \text{NADH}, \text{H}^+} = -0,32 \text{ V}$
- $\Delta G'^\circ = -n F \Delta E'^\circ$ avec :
 - $F = 96\,500 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$
 - n : nombre d'électrons échangés

DOCUMENT D. Molécules constitutives du NAD



ANNEXE 3.

Voie du catabolisme des hexoses dans le genre *Bifidobacterium*

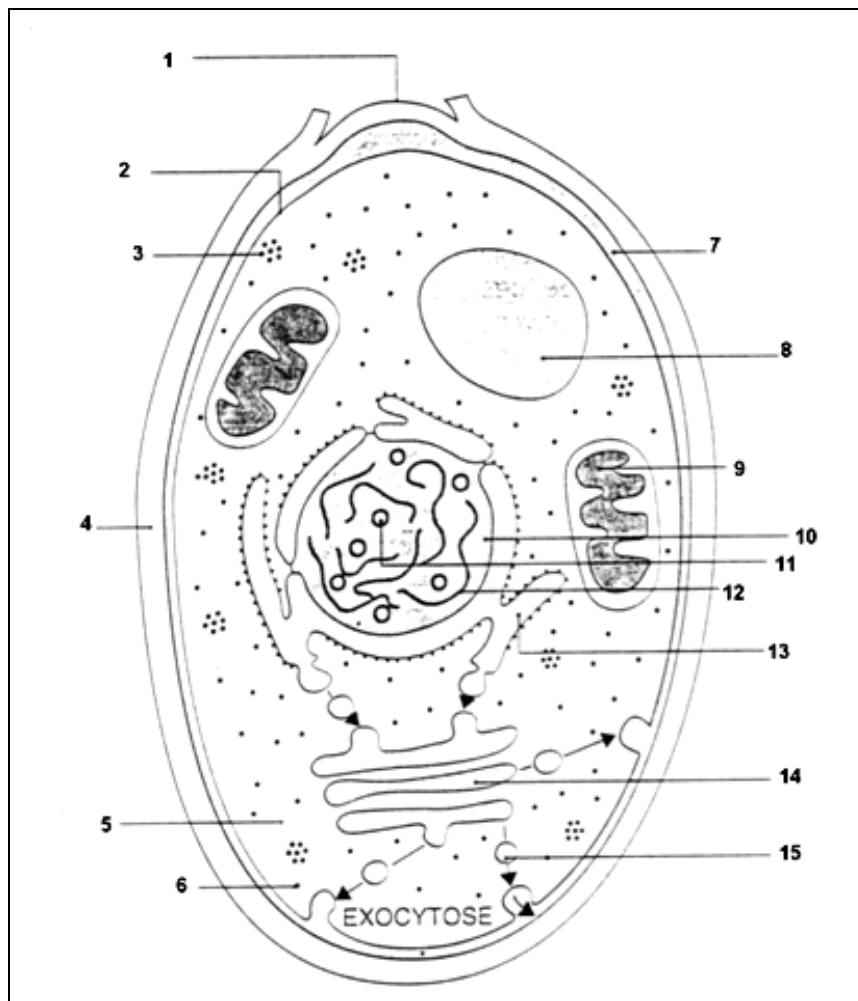


Enzymes catalysant les numéros des réactions correspondantes

1	Fructokinase	7	Ribulose-5-P 3 épimérase
2	Fructose-6-P Phosphocétolase	8	Xylulose-5-P phosphocétolase
3	Acétate kinase	9	Glycéraldéhyde-3-P déshydrogénase
4	Transaldolase	10	Enolase
5	Transcétolase	11	Pyruvate kinase
6	Ribose-5-P épimérase	12	Lactate déshydrogénase

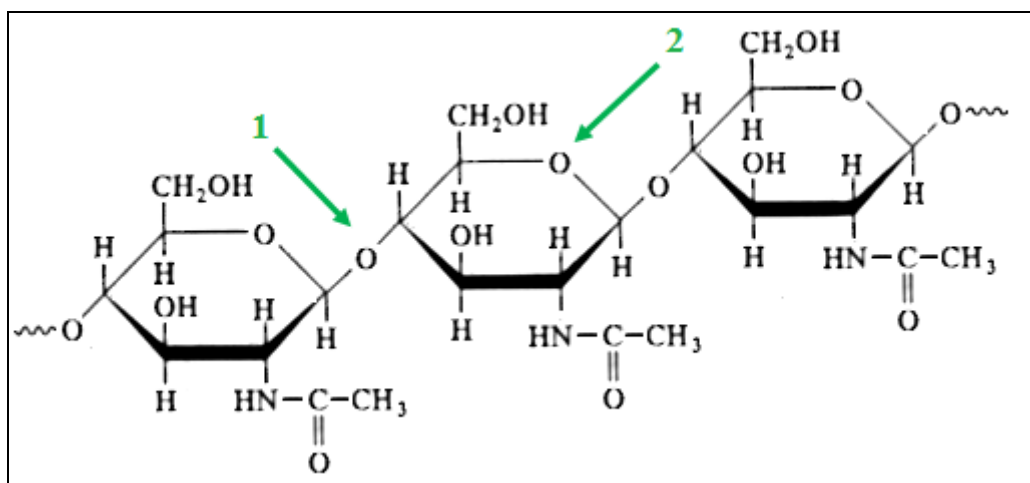
ANNEXE 4.

Schéma de l'ultrastructure de *Saccharomyces boulardii*



ANNEXE 5.

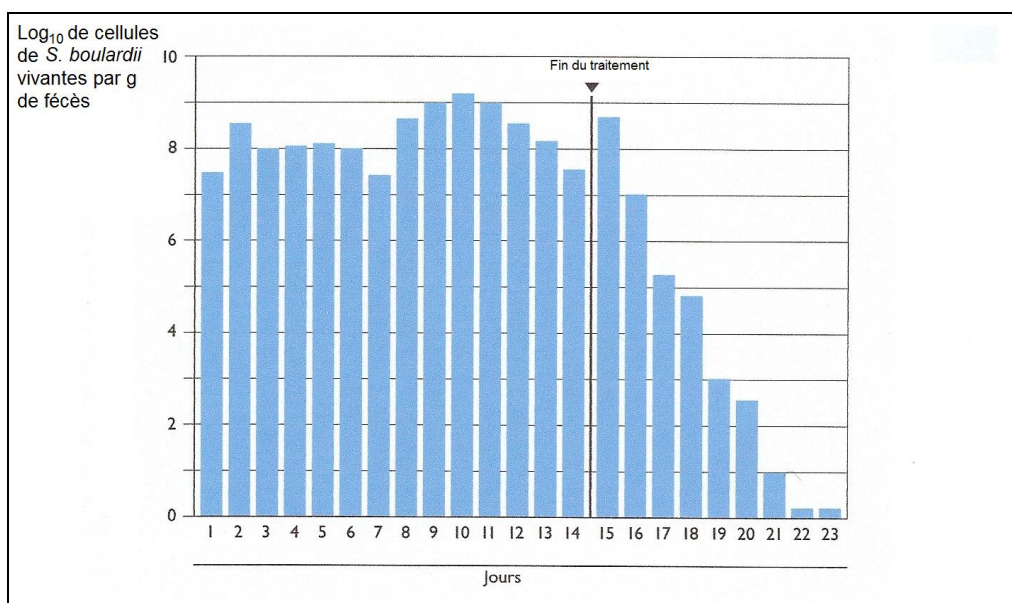
Structure de la chitine



ANNEXE 6.

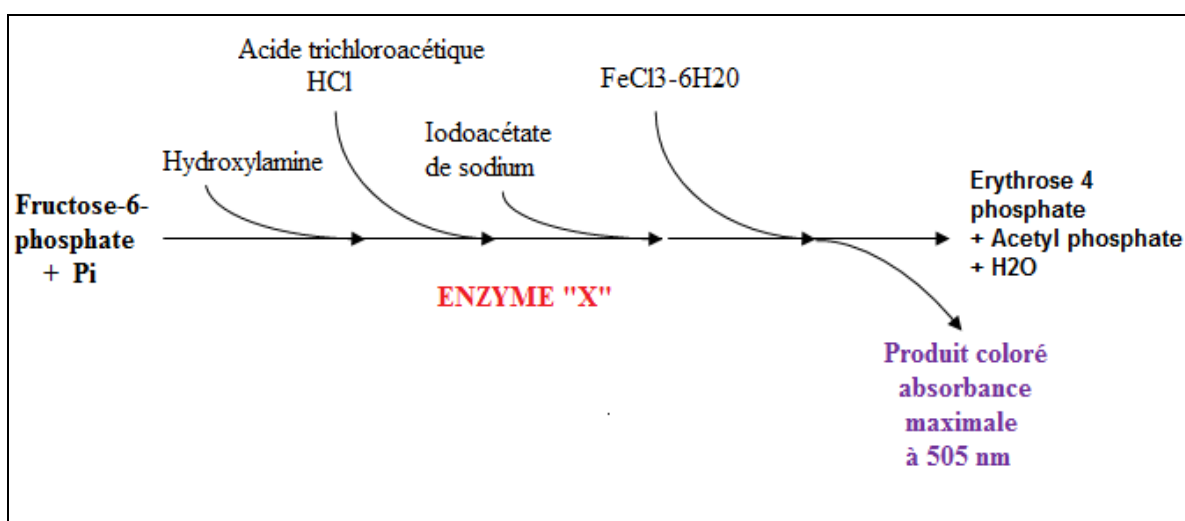
Cinétique d'élimination fécale de cellules vivantes de *Saccharomyces boulardii*

Taux d'excrétion de *Saccharomyces boulardii* dans les selles lors de l'administration orale de 1000 mg/jour (environ 4.10^{10} cellules viables par jour) pendant 14 jours. Les valeurs présentées sont des moyennes obtenues chez 8 volontaires.



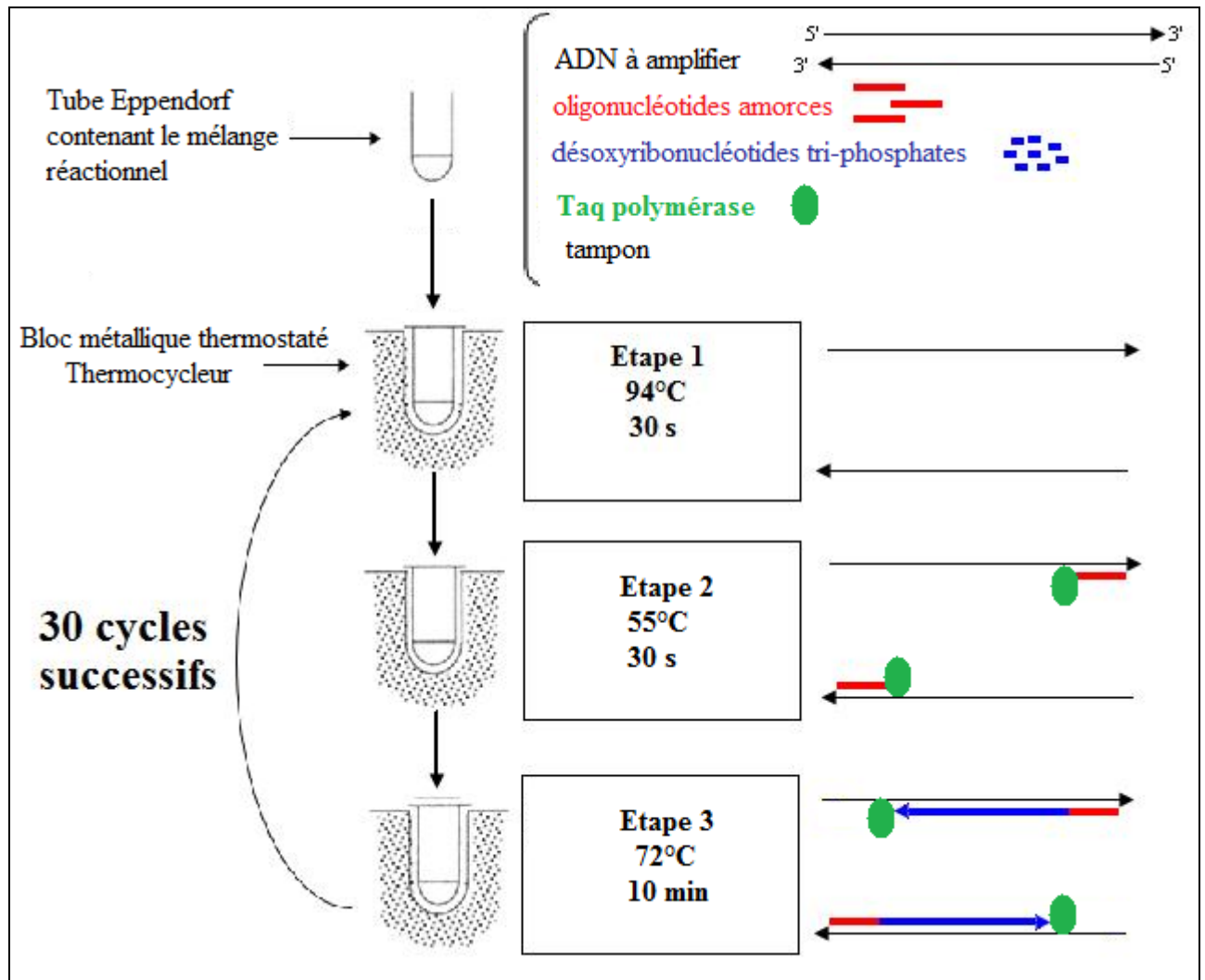
ANNEXE 7.

Test d'identification biochimique du genre *Bifidobacterium*



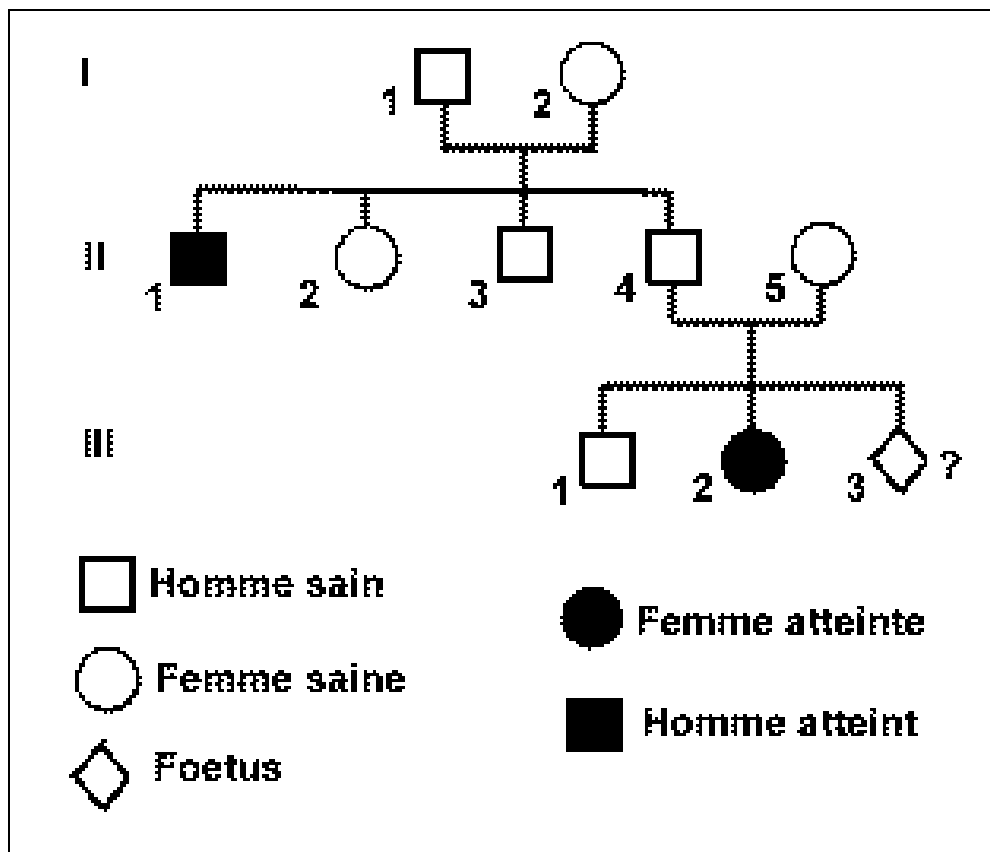
ANNEXE 8.

Amplification du gène de la protéine HSP60



ANNEXE 9.

Arbre généalogique d'une famille présentant des cas d'alactasie congénitale

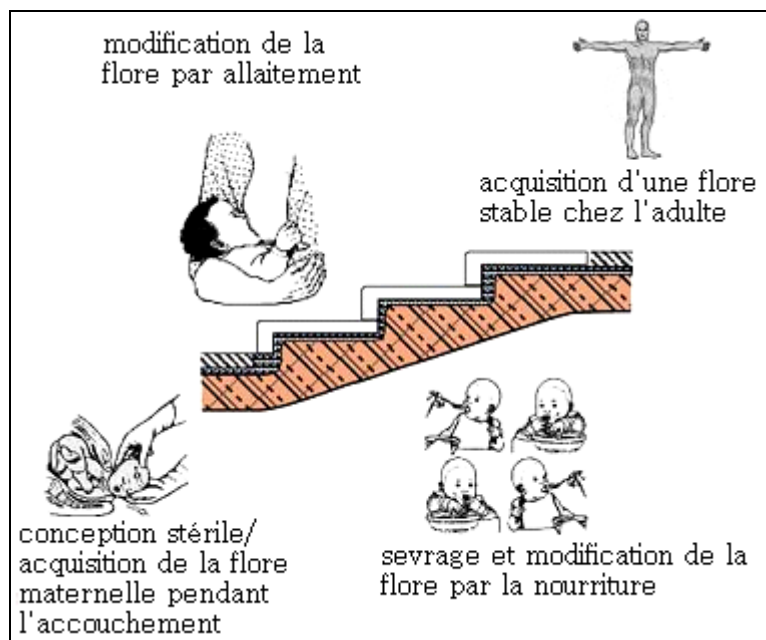


ANNEXE 10.

Mise en place de la flore commensale

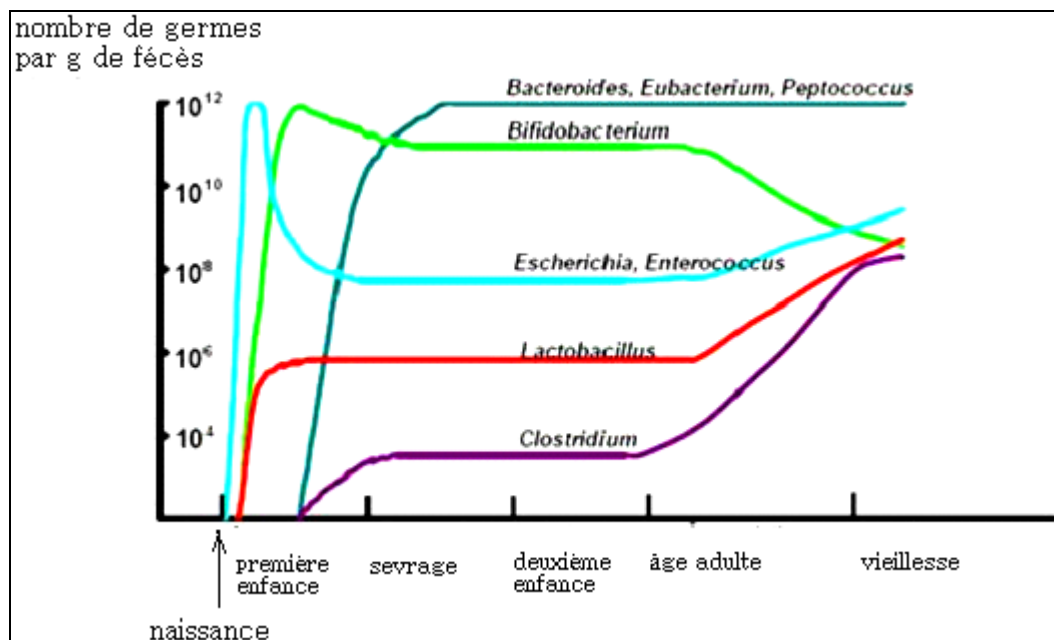
DOCUMENT E.

Différentes étapes de la colonisation intestinale⁷



DOCUMENT F.

Évolution de la flore du côlon avec l'âge⁸



⁷ <http://www.jle.com/fr/revues/medecine/stv/e-docs/00/04/4E/33/article.md?fichier=images.htm>

⁸ d'après Mitsuoka, 1990

ANNEXE 11. Adhésion de diverses bactéries aux cellules CaCo-2⁹

Test réalisé en double

Souches testées	Bactéries adhérentes / 100 cellules CaCo-2	
	Test 1	Test 2
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	40	25
<i>Enterococcus faecium</i>	15	16
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	87	67
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	>500	>500
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LB	177	184
<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i> CNRZ 205	20	26

⁹ d'après NUTRI-THEMA – Ecosystème digestif Octobre 2005

ANNEXE 12.

Saccharomyces boulardii et *Clostridium difficile*

Expérience

Castex et al. (1989) ont traité des souris axéniques avec *Saccharomyces boulardii* puis ont infecté les souris avec *Clostridium difficile*.

L'expérience a été réalisée avec :

- **un groupe témoin**, groupe de souris axéniques qui n'avait pas été traité par *Saccharomyces boulardii*
- **un groupe appelé "S. boulardii "**, groupe de souris axéniques traité au préalable par *Saccharomyces boulardii*.

L'étude des lésions de la muqueuse intestinale a ensuite été effectuée. Le nombre de bactéries de l'espèce *Clostridium difficile* et la teneur en toxines A et B dans un échantillon de muqueuse intestinale prélevé au niveau du côlon de chaque groupe de souris ont été déterminés.

Les résultats sont présentés dans les documents G, H et I:

DOCUMENT G.

Étude des lésions de la muqueuse intestinale

Dans le **groupe témoin** :

- tous les animaux sont morts
- on observe la présence d'importantes lésions au niveau de la muqueuse intestinale, plus particulièrement au niveau du côlon.

Dans le **groupe "S. boulardii "** :

- 70 % des souris infectées par *Clostridium difficile* ont survécu
- on n'observe pratiquement pas de lésions de la muqueuse intestinale induites par *Clostridium difficile*

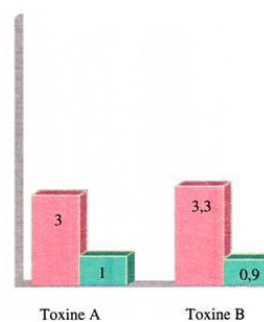
DOCUMENT H.

Nombre de bactéries de l'espèce
Clostridium difficile
(log bactéries viables / g d'échantillon de muqueuse intestinale)



DOCUMENT I.

Teneur en toxines A et B
(log ng de toxine / g d'échantillon de muqueuse intestinale).



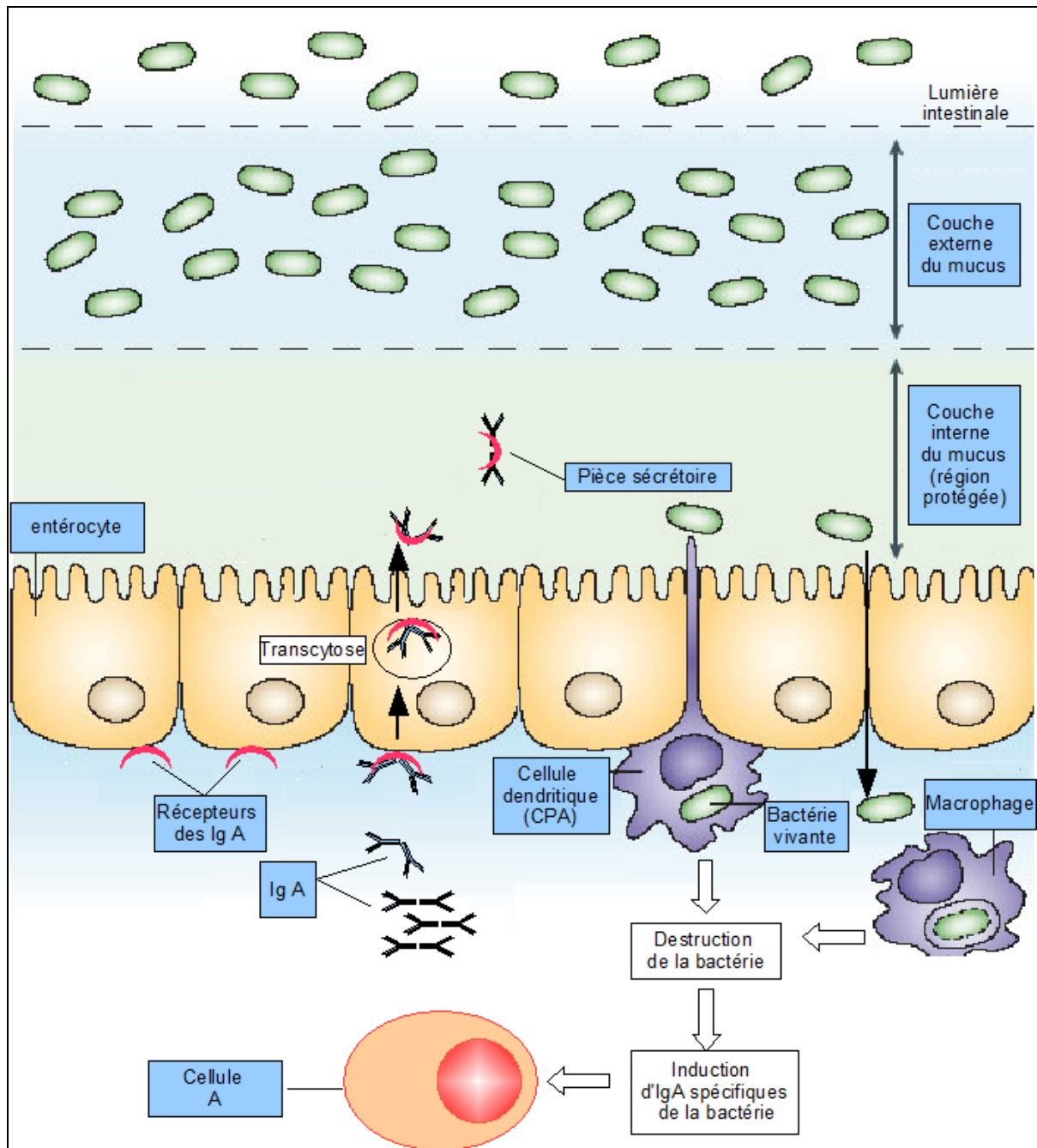
Groupe témoin



Groupe "S. boulardii"

ANNEXE 13.

Translocation bactérienne intestinale



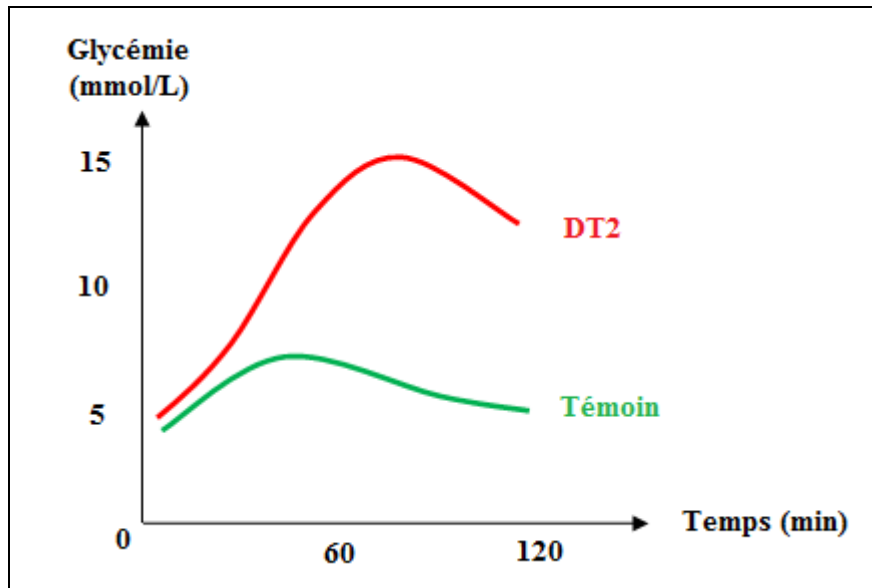
ANNEXE 14.

Étude du diabète de type 2

Réponse à une surcharge orale de glucose chez des sujets normaux (**Témoin**) et chez des patients souffrant de diabète de type 2 (**DT2**) au stade débutant de la maladie.

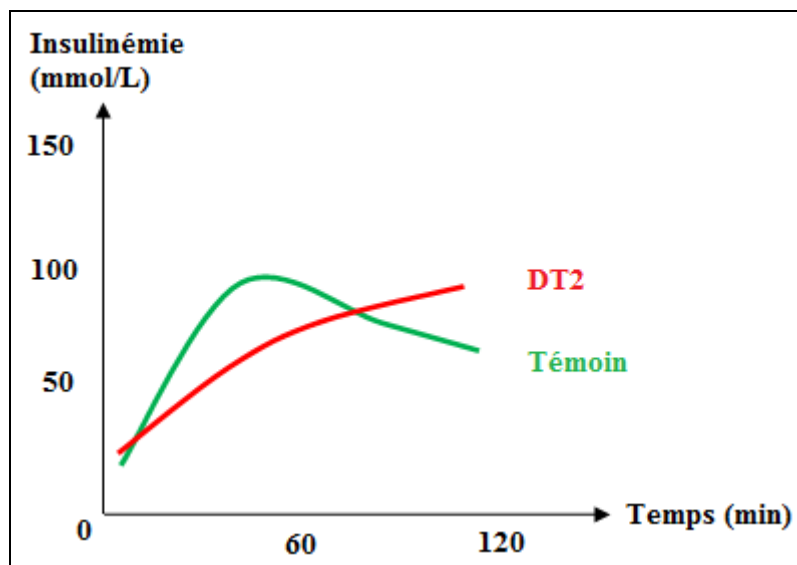
DOCUMENT J.
Réponse glycémique à une surcharge orale de glucose

Réponse glycémique à une surcharge orale de glucose



DOCUMENT K.
Réponse insulinémique à une surcharge orale de glucose

Réponse insulinémique à une surcharge orale de glucose



ANNEXE 15.

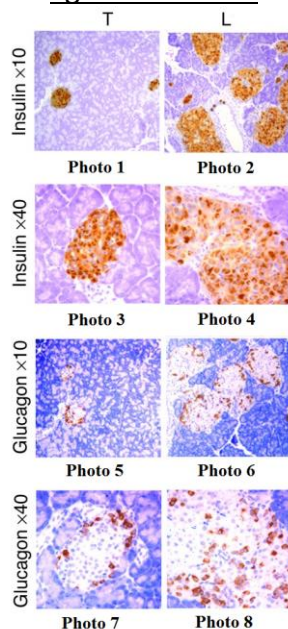
Étude immunohistochimique du pancréas

Technique d'immunohistochimie :

- Les pancréas de souris "témoin" (T) d'une part et de souris déficientes en récepteur de l'insuline (L) d'autre part sont fixés dans une solution de Bouin et inclus dans de la paraffine afin d'en obtenir des coupes fines de 5 μ m d'épaisseur.
- Les coupes de pancréas sont marquées, selon les besoins de l'expérience avec des anticorps de souris dirigés contre l'insuline (photos 1, 2, 3 et 4) ou contre le glucagon (photos 5, 6, 7 et 8).
- Après lavage avec un tampon, un anticorps secondaire spécifique de la partie Fc des anticorps de souris et couplé avec la biotine, est rajouté à la préparation.
- Un second lavage est réalisé.
- De la streptavidine couplée à la peroxydase est ajoutée. La streptavidine est un ligand très spécifique de la biotine.
- Après lavage, un substrat chromogène est ajouté ; la réaction est arrêtée par ajout d'une solution acide. Le chromophore produit est brun -orangé.
- La lame est ensuite observée au microscope optique.

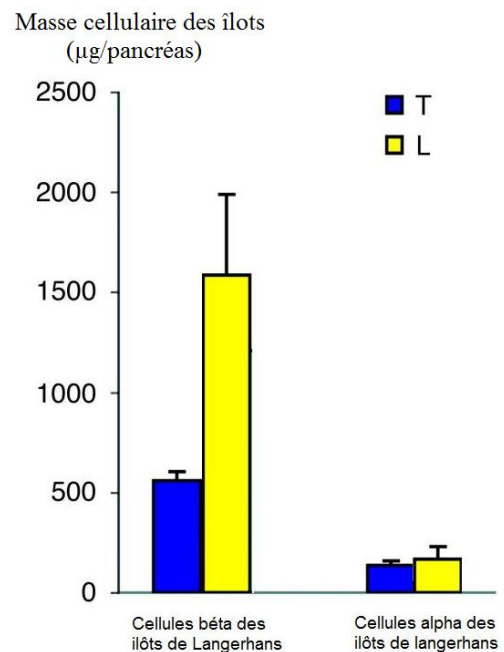
DOCUMENT L.

Observation des coupes de pancréas des souris témoin (T) et des souris déficientes (L) âgées de 1 mois



DOCUMENT M.

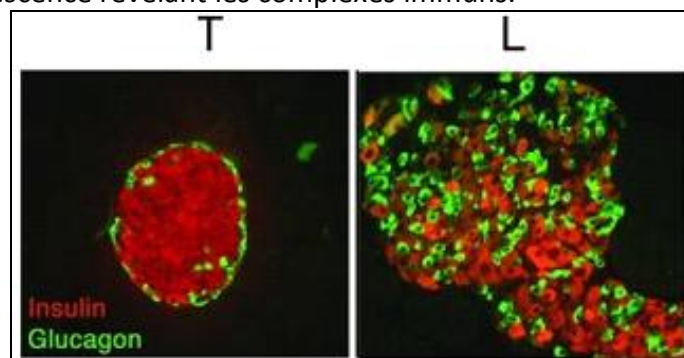
Résultats pour l'ensemble du pancréas

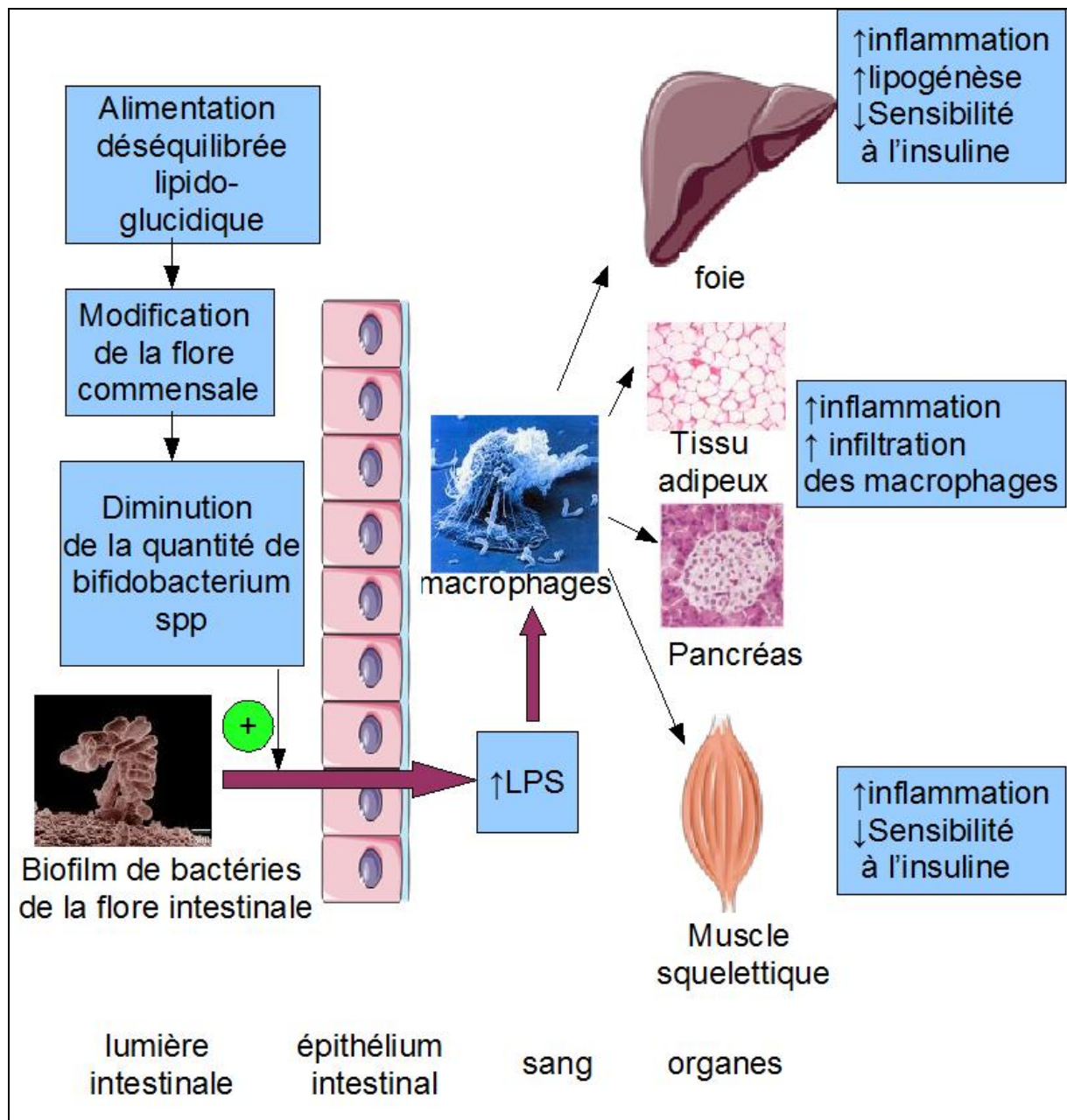


DOCUMENT N. Immunofluorescence directe sur les pancréas de
souris témoin (T) ou déficientes en récepteur de l'insuline (L) âgées de 4
mois.

Les pancréas des souris témoin(T) ou déficientes en récepteur de l'insuline (L) sont fixés dans une solution de Bouin et inclus dans de la parafine afin d'en obtenir des coupes fines de 5 μm d'épaisseur.

Les coupes déparaffinées et réhydratées sont marquées avec des anticorps de souris dirigés contre l'insuline ou le glucagon, couplé avec un fluorochrome (pour l'insuline : rhodamine, rouge ; pour le glucagon : fluorescéine, vert). Après lavage, la lame est observée au microscope à fluorescence révélant les complexes immuns.





ANNEXE 17.

Etudes portant sur le lien entre obésité et microbiote

Première étude

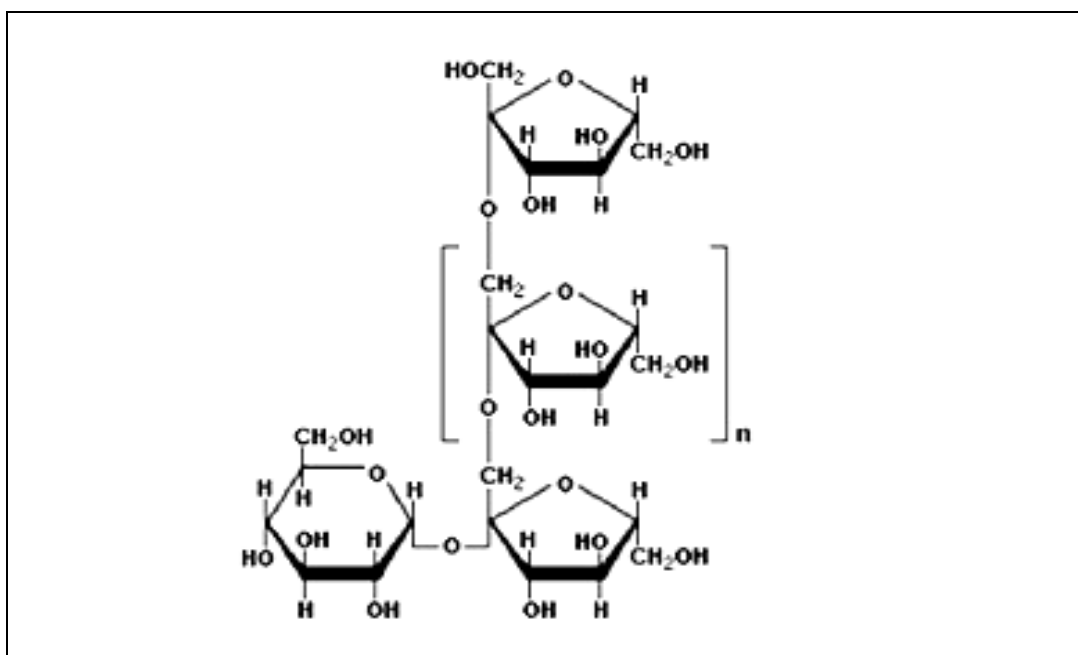
Ley et ses collaborateurs¹⁰ ont montré que les sujets obèses possédaient deux fois moins de *Bacteroidetes* et plus de *Firmicutes* que les sujets minces. Chez les sujets obèses, la perte de poids a permis de restaurer un profil bactérien similaire à celui des sujets minces et ce indépendamment du type de régime instauré.

Deuxième étude

Turnbaugh et son équipe¹¹ ont réalisé un transfert de la flore intestinale de souris obèse (ob/ob) à des souris minces axéniques. Celles-ci voient en deux semaines leur poids corporel augmenté.

ANNEXE 18.

Structure de l'inuline



¹⁰ Nature 2006

¹¹ Nature 2006