

Table des matières

1. Introduction.....	3
1.1 La flore intestinal infantile.....	3
1.2 L'allergie aux protéines de lait de vache	4
1.3 Les galacto-oligosaccharides	6
1.4 Les bifidobactéries et les lactobacilles	7
1.5 Hypothèses et but du travail	8
2. Matériels et Méthodes	9
2.1 Le modèle intestinal humain	9
2.1.1 L'appareil.....	9
2.1.2 Préparation du milieu.....	13
2.1.3 Ajout du complément.....	13
2.1.4 Préparation de l'inoculum fécale	13
2.1.5 La digestion in vitro	14
2.1.6 Anaérobicité du milieu	14
2.1.7 Le régime permanent	14
2.1.8 Débit de la pompe pour l'alimentation des fermentateurs.....	15
2.1.9 Décontamination de l'appareil.....	15
2.2 Suivi de la population bactérienne.....	15
2.2.1 Milieux de culture.....	15
2.2.2 Dénombrement bactérien	17
2.2.3 Solution de dilution.....	17
2.2.4 Génération de l'atmosphère anaérobie	17
2.2.5 Souches de contrôle.....	17
2.3 Chromatographie en phase gazeuse	18
2.3.1 Conditions instrumentales et expérimentales.....	18
2.3.2 Standard interne.....	18
2.3.3 Réactifs.....	18
2.3.4 Courbe de calibration	18
2.3.5 Temps de rétention	19
2.3.6 Préparation des échantillons.....	19
3. Résultats et discussion	20
3.1 Digestion du β -GOS.....	21

3.2 Digestion du P-GOS.....	24
3.2 L'ajout de complément en cas de dysbiose.....	26
3.4 Analyse des métabolites ; les acides gras à courtes chaînes.....	27
4. Conclusion	33
5. Perspectives.....	33
6. Remerciements.....	34
7. Littérature	34
8. Liste des figures.....	37
9. Annexes	38
Annexe I : Protocole de mise en marche de l'appareil.....	38
Annexe II : Protocole de changement de milieu	38
Annexe III : Protocole de l'arrêt de l'appareil pour la stérilisation	39
Annexe IV : Courbe de calibration des acides pour la GC.....	40
.....	40
Annexe V : Courbe de calibration des acides pour la GC.....	40
Annexe VI : Courbe de calibration des acides pour la GC.....	41
Annexe VII : Table des abréviations.....	41
Annexe VIII : Méthode GC	42

1. Introduction

1.1 La flore intestinal infantile

Au 21^{ème} siècle de nouvelles avancées importantes ont été réalisées dans l'étude la composition du microbiote humain, notamment grâce aux innovations dans le domaine du séquençage d'acide nucléique et des méthodologies de bio-informatiques. Ces expériences ont principalement été obtenues avec l'analyse des matières fécales. L'activité métabolique bactérienne diffère le colon ascendant et le colon descendant et les fèces donnent une indication du type de colonisation bactérienne qui se trouve dans la dernière partie de l'intestin, le rectum, mais n'indiquent pas spécifiquement ce qu'il se trouve dans le reste du tube digestif (Tannock, 2017).

La colonisation des intestins à premièrement lieu lors de la naissance de l'enfant. Lorsque celle-ci a lieu naturellement, l'enfant est en contact avec la flore vaginale de la mère et c'est à partir de cette flore que le microbiote de l'enfant se développe. Contrairement aux enfants nés par césarienne qui uniquement au contact de la flore cutanée possèdent en général un microbiote exempt de bifidobactéries (Gritz et Bhandari, 2015).

L'autre principal facteur intervenant lors du développement du microbiote infantile, est le mode d'alimentation de l'enfant. Même si les industries tentent de rapprocher au plus la composition des formules à base de lait de vache à celle du lait maternel, les deux alimentations ont tendances à sélectionner différents types de bactéries.

Les bifidobactéries sont présentes en faible quantité dans le microbiote des adultes, elles représentent environ 5% de la flore totale, contrairement aux enfants allaités au lait maternel où la présence de ces bactéries représente environ 60% du microbiote voire dans certains cas 100%. Les bifidobactéries sont également présentes dans les intestins des enfants nourris aux formules à base de lait de vache, mais dans une quantité environ 20% plus faible. En effet, le lait de vache ne possède que peu d'oligosaccharide mise à part le lactose, c'est pour cela que les intestins de ces enfants ne sont pas un endroit propice au développement des bifidobactéries. En plus de cela, les enfants allaités au lait maternel possèdent un microbiote plus diversifié avec notamment plusieurs membres de la famille des *Lachnospiraceae* et des *Erysipelotrichaceae* (Tannock, 2017).

Même si le nouveau-né est exposé à une grande gamme de différentes bactéries, celles-ci ne pourront pas s'établir dans ses intestins dans la totalité. Dans un premier lieu les bactéries qui possèdent un métabolisme oxydatif telles que les entérobactéries, les streptocoques et les staphylocoques vont proliférer (Adlerberth, 1999).

La microflore intestinale d'un adulte est un écosystème complexe qui possède environ 400 espèces de bactéries différentes. La plupart de ces espèces sont des anaérobies. Ce système est strictement réguler par deux facteurs, la compétition pour les nutriments et l'espace disponible. De plus les

bactéries tels que *Escherichia coli* et d'autres entérobactéries sont faiblement présentes dans les intestins. Puisque la microflore normale permet difficilement aux « nouvelles » bactéries de s'établir, elle est une barrière efficace contre les infections (Adlerberth, 1999).

Le maintien d'un microbiote « normal » est influencé par des facteurs internes et externes qui favorisent l'homéostasie, mais parfois même lorsque le microbiote est bien établi il peut être difficile de garder l'équilibre. Dans ces cas-là il se produit une dysbiose. La dysbiose est le phénomène perçu lorsqu'il y a changement dans la composition ou la diversité du microbiote intestinal (Gritz et Bhandari, 2015). Certains changements dans l'environnement favoriseraient la prolifération d'un certain type de bactérie au détriment d'un autre par exemple la prolifération de *Clostridium difficile* dans l'intestin de patients ayant pris des antibiotiques à long terme (Tannock, 2017).

Les corrélations entre les dysbioses intestinales et certaines maladies comme l'obésité ou maladies inflammatoires intestinales tel que le syndrome de l'intestin irritable suscitent de grands intérêts. Des études montrent une diminution quantitative et qualitative, du phylum des *Firmicutes* (Ott SJ et al., 2004). Ce groupe possède des bactéries productrices de butyrate, il possède des propriétés anti-inflammatoires ainsi que la capacité d'améliorer la fonction barrière de l'épithélium intestinal (Roediger WE, 1980).

Les pré- et probiotiques sont les solutions les plus appropriées pour rétablir la composition du microbiote, ils peuvent être utilisés individuellement ou simultanément.

Dans l'intestin grêle, la principale source d'énergie qui permet le fonctionnement de son écosystème est la fraction des composants non digérés du régime alimentaire. Par conséquent pour pouvoir corriger une dysbiose, il serait plus judicieux d'ajouter des substances, dans l'alimentation, qui stimuleraient la prolifération d'un certain groupe de bactérie (Tannock, 2017).

Les plus communs des prébiotiques sont les amidons résistants, l'inuline, les fructo-oligosaccharides ainsi que les galacto-oligosaccharides (Tannock, 2017).

1.2 L'allergie aux protéines de lait de vache

L'allergie aux protéines de lait de vache est l'allergie la plus commune chez les jeunes enfants, affectant 2% à 6% des enfants avec une forte prédominance lors de la première année (Caffarelli et al, 2010). Il est possible que l'allergie s'estompe avec le temps, dans 50% des cas au bout d'un an et dans 80-90% dans la cinquième année de l'enfant (Caffarelli et al, 2010). L'allergie aux protéines de lait de vache se manifeste en induisant une réaction immunitaire et en produisant l'immunoglobuline E (IgE) (Vitaliti et al, 2012).

Il est possible de substituer le lait de vache avec par des formules infantiles au soja mais il est possible que cette formule provoque des réactions indésirables surtout chez les enfants âgés de moins de 6 mois. Il existe aussi des formules fortement hydrolysées, qui n'induisent de réactions allergiques que chez 10% des enfants (Caffarelli et al, 2010). Les formules contenant uniquement les acides aminés sont non allergique mais ont un coût conséquent et un mauvais goût. D'autres laits de mammifères sont inadéquats d'un point de vue nutritionnel et le lait de chèvre provoque des réactions allergiques chez plus de 90% des enfants allergiques au lait de vache (Caffarelli et al, 2010). Une étude qui a comparé les microbiotes des enfants sains et ceux atteints de l'allergie à la naissance et au bout de 6 mois. Et ils ont observés qu'à la naissance les enfants allergiques possédaient quantitativement plus de bactéries que les enfants sains, en possédant un nombre plus grand en bactéries anaérobies et un nombre plus faible en levures (Thompson et al., 2010). Au bout de 6 mois les enfants allergiques possèdent une flore plus peuplée en Lactobacilles mais moins en Bifidobactéries et Entérobactéries. Cette différence peut être due au fait que les enfants allergiques ont un autre type d'alimentation notamment avec des formules très fortement hydrolysées et que leur apport en protéines de lait de vache sont réduits (Thompson et al., 2010). En comparant la production d'acide entre les enfants sains et les enfants allergiques, il est observé que les enfants allergiques ont des fèces plus concentrées en acide butyrique comparés aux enfants sains (Thompson-Chagoyan et al., 2011). Le taux de *Clostridium*, staphylocoques et *Escherichia coli* est plus haut chez les enfants allergiques qui consomment des formules de lait premier âge fortement hydrolysées et dépourvu de lactose (Francavilla et al., 2012). Dans l'étude de Francavilla et al (2012) il est démontré que l'ajout de lactose dans ces formules permettait d'augmenter significativement la population des Bifidobactéries ainsi que des Lactobacilles et de diminuer la population des Bacteroides et Clostridies.

1.3 Les galacto-oligosaccharides

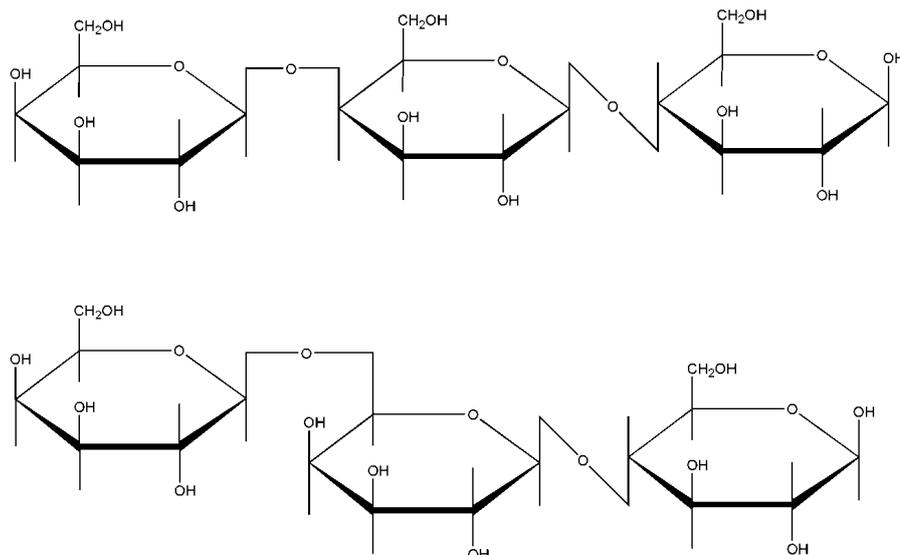


Figure 1 : Exemples de structure de galacto-oligosaccharides : en haut le 4-galactosyl lactose et en bas le 6-galactosyl lactose sont représentés, montrant les différentes liaisons galactosyl usuelles. (Souza Martins Meyer, 2015)

Les galacto-oligosaccharides (GOS) sont des glucides non digestibles, ils sont résistants à la digestion enzymatique gastro-intestinale et arrivés à l'intestin ils sont fermentés par certaines bactéries telles que les bifidobactéries. Ils possèdent une activité bifidogène (Sako *et al.*, 1999). Les β -GOS sont des prébiotiques c'est-à-dire que ce sont des aliments non digestibles qui affectent de façon bénéfiques l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'un ou d'un nombre limité de type de bactérie dans le colon. Ce qui potentiellement améliore la santé de l'hôte. Le prébiotique se différencie d'un probiotique, qui est un produit contenant des micro-organismes vivants (Tannock, 2017).

La flore de bifidobactérie crée un milieu acide inhibant ainsi le développement de bactéries indésirables (Park *et al.*, 2010). Les GOS ne sont pas sensibles à l'aide gastrique, un point critique et indispensable pour les prébiotiques, et passent à travers l'intestin grêle sans être digérés puisqu'ils ne sont pas digérables par les enzymes digestives humaines (Park *et al.*, 2010).

Technologiquement, les GOS possèdent une bonne rétention d'eau ainsi qu'une grande solubilité. Ils sont stables à haute température et à pH acide et sont légèrement hydrolysés à 180°C et/ou pH3. Ils possèdent une valeur calorifique de 1,7kcal/g (Park *et al.*, 2010). Grâce à leur stabilité les GOS peuvent être incorporés dans différents produits où ils peuvent augmenter la texture et le « mouthfeel » dans l'aliment. Ils peuvent servir comme agent de charge. On peut les retrouver dans divers produits tels que : formules infantiles, produits laitiers, sauces, soupes, céréales du petit déjeuner, boissons, crème glacée, pâtisseries, produits animaliers et en remplacement du sucre (Macfarlane *et al.*, 2008). Les préparations de GOS possèdent 1/3 de la sucrosité du sucre et un faible potentiel cariogène.

La dose recommandée afin d'obtenir des effets bifidogènes était de 10 g de GOS/jour, mais des études au Japon ont démontré que sur des adultes en bonne santé et sur les personnes âgées une dose de 2,5 g GOS/jours peuvent induire cet effet (Macfarlane *et al.*, 2008).

Quantitativement et en terme de significativité dans la physiologie de leur hôte, les acides gras à chaîne courte plus particulièrement les acétates, propionates et butyrates sont la majorité des produits obtenus lors de la fermentation bactérienne dans le gros intestin. Ils sont formés à partir de polysaccharides, oligosaccharides, protéines, peptides et de précurseurs de glycoprotéines. Ces acides sont principalement formés à partir de polysaccharides et plusieurs types d'enzymes hydrolytiques de bactéries sont synthétisés par le microbiote afin de digérer ces substances et de faciliter l'absorption de monosaccharides (Macfarlane *et al.*, 2008).

D'un point de vue microbiologique, la composition chimique, la forme physique et la quantité de substrat disponible ont un impact sur les produits finis de la fermentation. Celle-ci dépend du type et du nombre de population bactérienne du gros intestin ainsi que des interactions compétitives et coopératives entre ces groupes de bactéries (Macfarlane *et al.*, 2008). Les hydrates de carbone sont fermentés par les bactéries en acides gras à courtes chaînes en condition anaérobie dans le colon. Ces acides gras sont principalement les acides acétiques, propionique et butyrique. La concentration en acide est la plus haute dans le colon ascendant et diminue progressivement le long du colon descendant. On le remarque notamment avec le pH qui est plus bas dans le colon ascendant, environ pH=5.5, alors qu'il est de pH=6.7 dans le colon descendant, cette différence est due à la production d'acide (Tannock, 2017).

Les polysaccharides et oligosaccharides présents dans les parois cellulaires des fruits et légumes ne sont pas digérables par l'organisme humain, se sont donc des substrats fermentables pour les bactéries intestinales une fois qu'ils sont hydrolysés.

Les GOS peuvent être un mélange des produits finaux de l'hydrolyse du lactose par la β -galactosidases, il contient deux à huit unités de saccharide avec une terminaison d'une unité de glucose.

1.4 Les bifidobactéries et les lactobacilles

Les bifidobactéries et les lactobacilles ont suscité un grand intérêt ces dernières années, tout d'abord en tant que probiotiques mais également par leur stimulation de croissance par des oligosaccharides, des prébiotiques.

Les bifidobactéries sont des bacilles Gram positif anaérobies présent de manière dominante dans la flore intestinale (Ferraris L *et al.*, 2010). Les lactobacilles sont des bacilles Gram positif, qui ne

forme pas de spores. Ils sont tolérants à l'acide, catalase négatif et prolifèrent le mieux sous atmosphère anaérobie (Jackson MS *et al.*, 2002).

Les bifidobactéries utilisent essentiellement un complexe d'hydrate de carbone présent dans le lait maternel pour se développer, les HMOs (Human Milk Oligosaccharides). Les HMOs sont les troisièmes plus grands composants solides du lait maternel, ils ne sont pas digérés et arrivent intact dans le gros intestin, c'est là qu'ils sont hydrolysés par le microbiote intestinal (Tannock, 2017).

1.5 Hypothèses et but du travail

Le P-GOS est un mélange de alpha-oligosaccharides issu du pois jaune (*Pisum Sativum*) et est obtenu à partir de l'hydrolyse et de l'élimination du sucre des oligosaccharides du pois. Le P-GOS issu du pois jaune est testé sur un microbiote d'un sujet âgé de moins d'un an et allergique aux protéines de lait de vache, à l'aide d'une digestion in-vitro. Cette digestion va être réalisée dans un modèle intestinal humain qui imite la digestion du colon ascendant et descendant. Le complément va être ajouté à la formule infantile en poudre hypoallergénique qui est le régime avec lequel le sujet est alimenté. Des prélèvements vont être effectués à des temps définis et analysés microbiologiquement afin de suivre l'évolution des microorganismes suivants ; les bifidobactéries, les lactobactéries, les germes totaux anaérobies ainsi que les coliformes. Une analyse GC va être effectuée afin de suivre l'évolution de la production en acides gras à chaînes courtes par les bactéries présentes dans les réacteurs. Le but de ce travail est de montrer les équivalences entre le β -GOS déjà disponibles sur le marché avec le P-GOS en répondant aux hypothèses suivantes.

Hypothèse 1 : L'ajout de 4g/l du mélange P-GOS dans le lait infantile en poudre permet de stimuler la croissance des Bifidobactéries et des Lactobacilles, entraînant une augmentation en acide propionique, acétique et butyrique dans le milieu de fermentation.

Hypothèse 2 : L'ajout de 4g/l du mélange P-GOS dans le lait infantile en poudre permet une amélioration en cas de dysbiose

2. Matériels et Méthodes

2.1 Le modèle intestinal humain

2.1.1 L'appareil

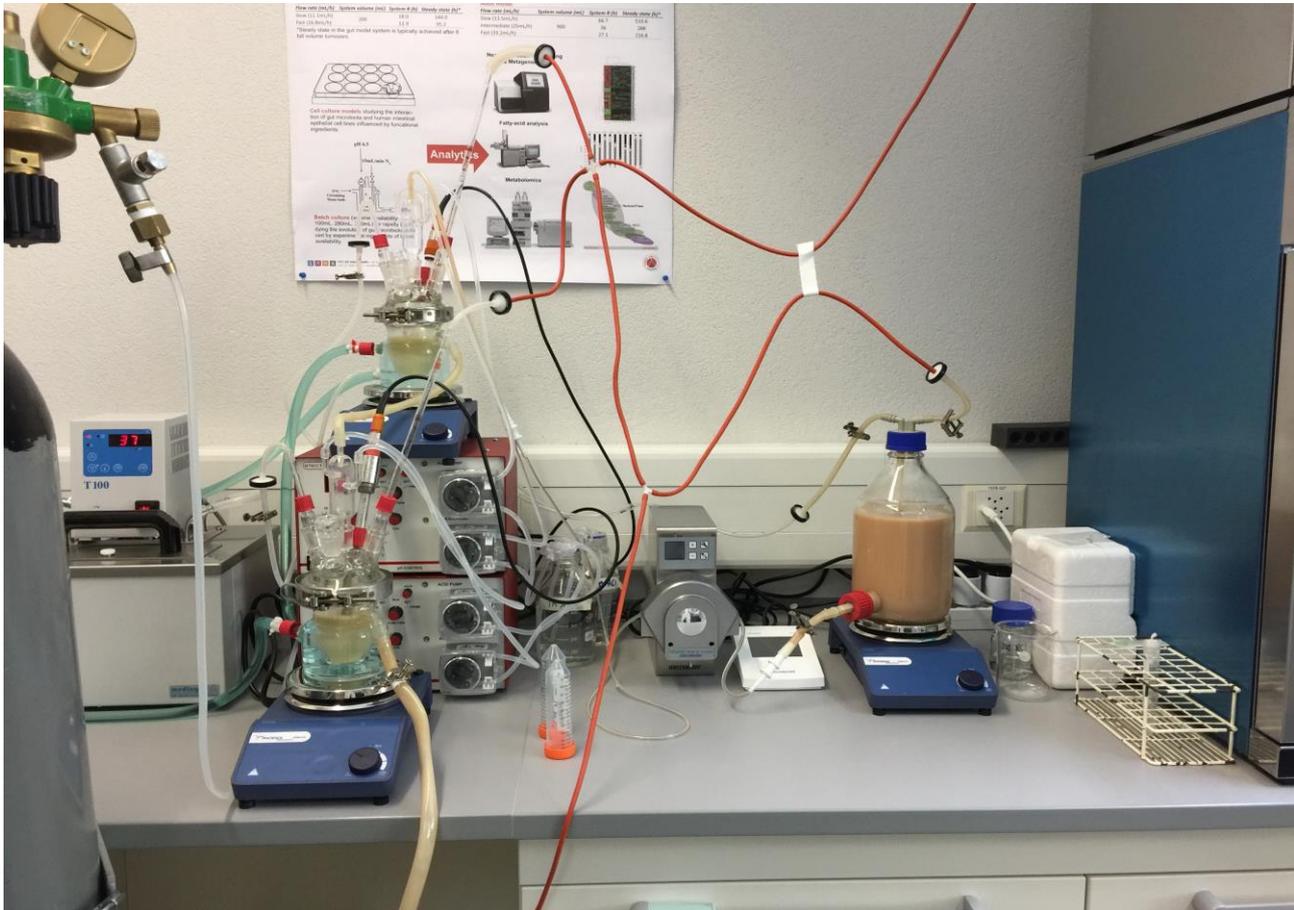


Figure 2 : Photographie représentant le modèle intestinal humain infantile mis en place pour la digestion in vitro.

Pour l'étude de la digestion des galacto-oligosaccharides par le microbiote infantile, un modèle intestinal humain a été mis en place. Ce modèle consiste à reproduire la partie intestinale du tube digestif d'un enfant âgé de dix mois à un an. Il se présente de la manière suivante.

Les différentes parties dont l'appareil est constitué seront plus précisément décrites à l'aide des figures 3 et 4 ci-dessous. Pour simplifier la compréhension du modèle, la figure 5 représente schématiquement l'installation du modèle.

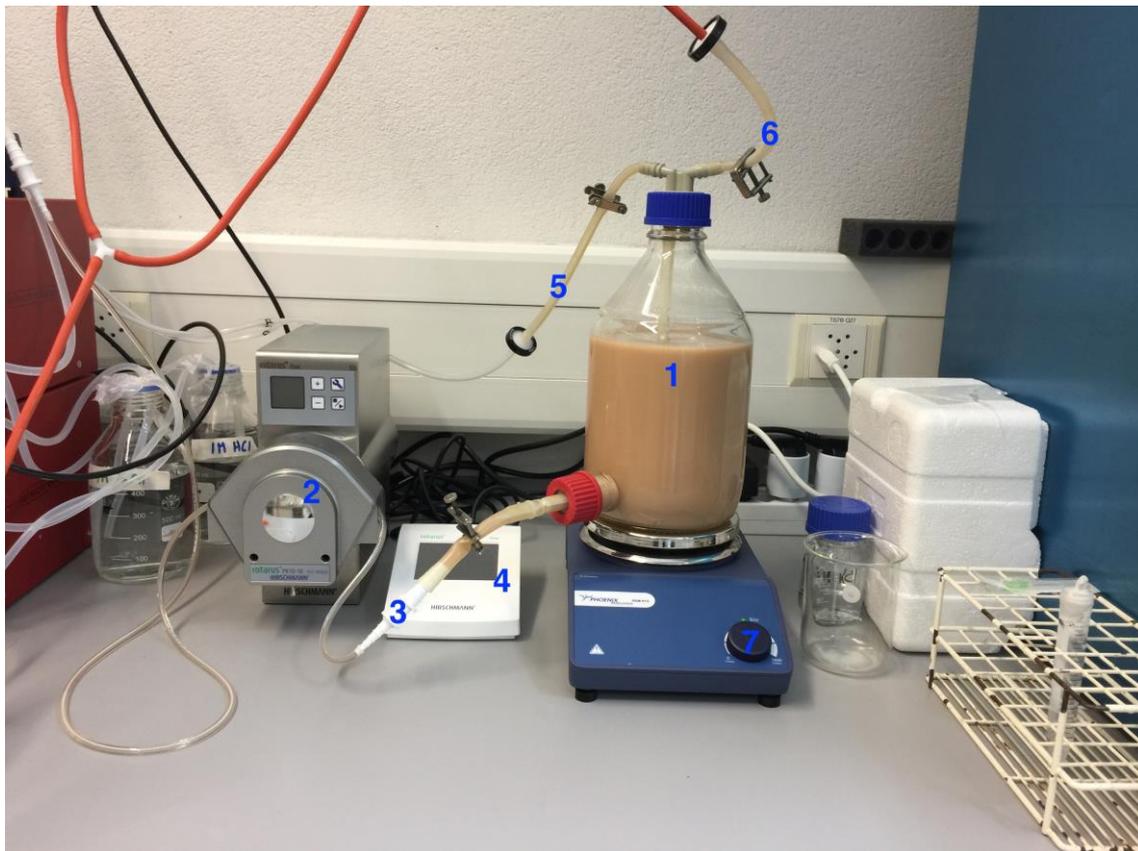


Figure 3: Photographie représentant la partie de l'alimentation du modèle intestinal humain infantile

Sur la photographie ci-dessus on observe le milieu servant à alimenter les deux récipients de fermentation. Le milieu est réalisé dans une bouteille en verre de 2 litres (1), elle comporte un bouchon où se trouve une entrée d'azote (5) et une sortie de gaz (6). Une sortie est également présente et celle-ci comporte une jonction (3) par laquelle le milieu sort et entre dans le tuyau qui alimente les fermentateurs à l'aide de la pompe péristaltique (HIRSCHMANN, Rotatus Flow, PK10-16 ref : 951 102020) (2). La pompe est paramétrée par le boîtier (4). La bouteille se situe sur un agitateur magnétique (7). Afin de filtrer l'azote entrant et les gaz sortant des filtres (Exapure, Syringe filters PTFE 0.45-25, ref : ATSY25TF4) ont été appliqués en entrée et sortie de gaz.

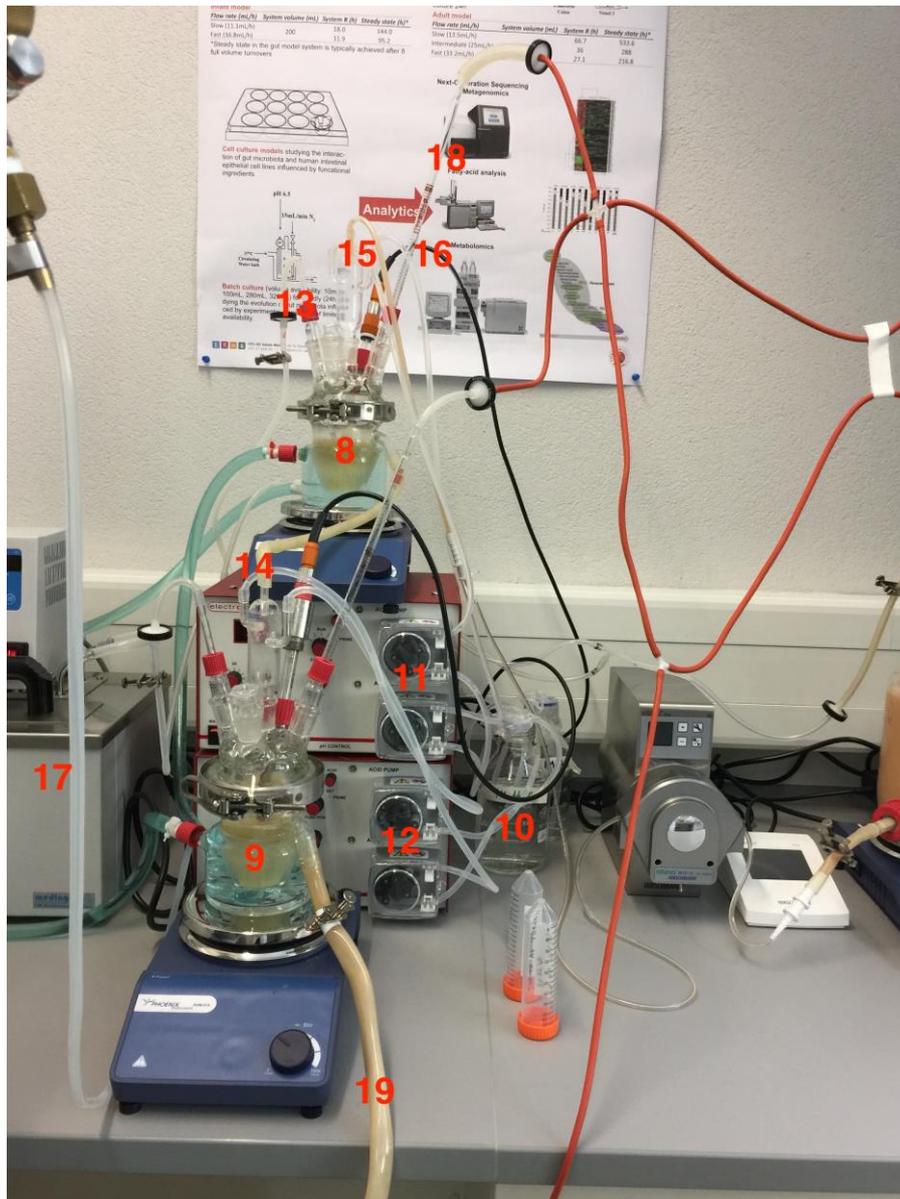


Figure 4 : Photographie représentant la partie de fermentation du modèle

Sur la photographie ci-dessus on observe deux récipients en verre de 100ml où se réalise la fermentation du milieu. Le récipient 1 (8) représente le colon ascendant avec un pH de 5.0 et le récipient 2 (9) représente le colon descendant avec un pH de 6.2. Les pH sont régulés à l'aide de solution (10) de HCl et de NaOH à des concentrations de 1M qui sont apportées aux deux récipients à l'aide de deux pompes péristaltiques (11 et 12), le pH est contrôlé à l'aide d'électrodes plongées dans les milieux (16). Les récipients, fonctionnant en anaérobie, possèdent une entrée d'azote (12) ainsi qu'une sortie de gaz (18). Les récipients sont alimentés (15) en HCl par la gauche, en NaOH par la droite et en milieu par le haut. Le récipient 1 est alimenté en milieu (15) et le récipient 2 reçoit une alimentation par le surplus du récipient 1 (14). Le surplus de liquide dans le récipient 2 est ensuite évacuer dans une bouteille à déchets (19). La température des récipients est régulée à l'aide d'un bain-marie à 37°C (17). De l'azote est continuellement injecté dans les récipients (13) et les gaz sont évacués (18) pour assurer un milieu

anaérobie. Le modèle intestinal est un bioréacteur dans lequel du milieu frais est ajouté de manière continue. La culture liquide contenant les nutriments non utilisés, les métabolites ainsi que des micro-organismes est retirée au même débit afin d'assurer un volume constant (Brück, 2017).

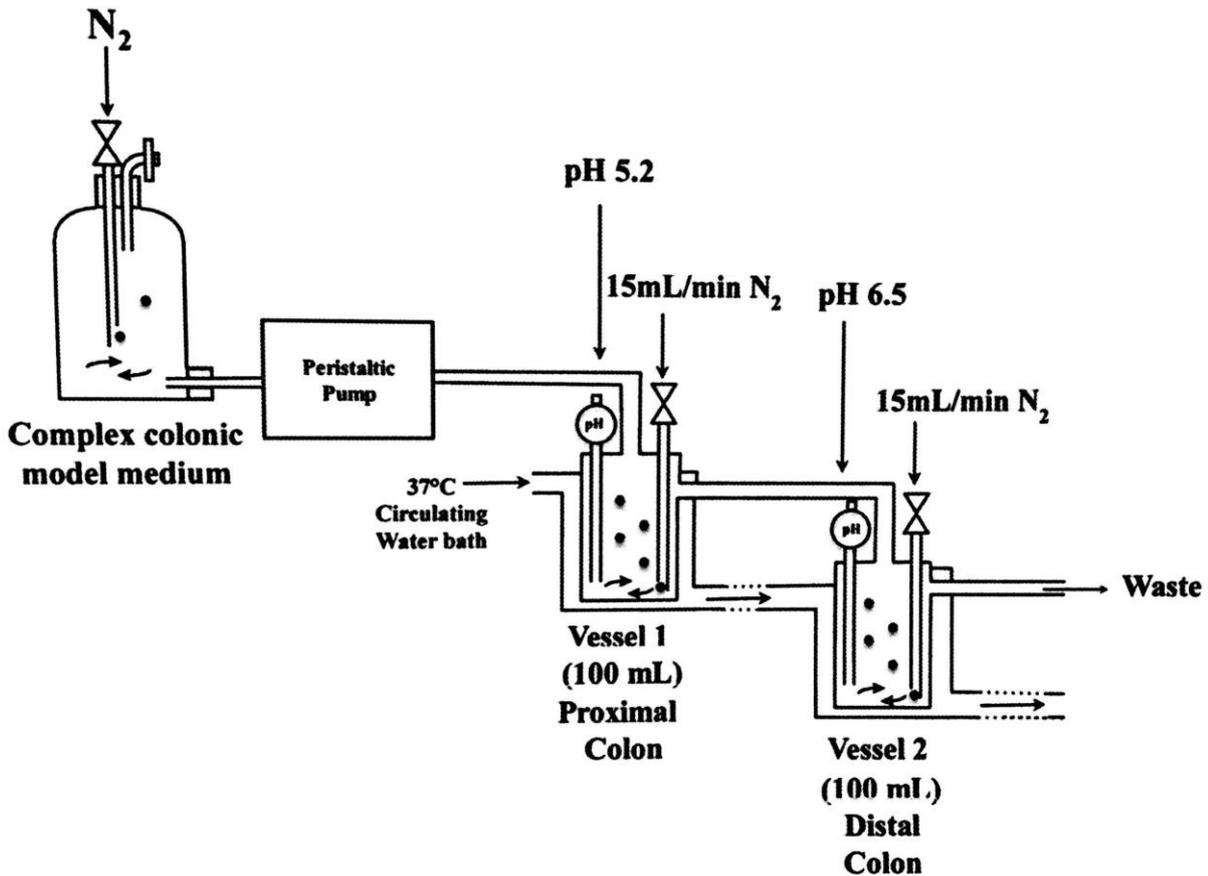


Figure 5: Schéma de l'installation du modèle intestinal infantile (Brück, 2017)

La figure 6 représente le schéma de l'installation du modèle intestinal utilisé pour la digestion. À gauche se trouve la bouteille d'alimentation en milieu contenant le lait Althéra utilisé lors des essais. Ce milieu est distribué au récipient 1 (Vessel 1) de fermentation à l'aide d'une pompe péristaltique, le récipient possède un pH, qui est continuellement contrôlé, de 5.0 et est constamment en atmosphère anaérobie grâce à l'injection continue d'azote. Les deux récipients font 100ml. Le récipient 2 (Vessel 2) est alimenté par le surplus du récipient 1 et l'excédent du récipient 2 est déversé dans la poubelle. Ce récipient 2 est également sous constant contrôle du pH et également sous constante injection d'azote afin de garantir l'anaérobicité du milieu.

2.1.2 Préparation du milieu

Le milieu utilisé pour le Gut Model était une formule en poudre du nom de Althéra, hypoallergénique fortement hydrolysée, un aliment diététique destiné à des fins médicales pour les besoins nutritionnels des nourrissons et enfants en bas âge en cas d'allergie aux protéines de lait de vache (Nestlé, lot : L-70830346HA ou L-70820346HA avec une date limite de consommation au 03/2019). La concentration en poudre choisie pour être identique au régime alimentaire du donneur, soit 30.8g de poudre par 210ml d'eau. Le milieu a été préparé dans une bouteille avec sortie de l'alimentation (voir photo 3) de la façon suivante ;

La bouteille, contenant un barreau magnétique et fermé à la sortie par un clappe, a été placée sur une balance et 271,4g +/- 0,1g de poudre y ont été introduit à l'aide d'un entonnoir puis 1850ml d'eau distillée. Pour finir 8ml de solution de rézazurine à 250mg/l ont été ajoutés dans la bouteille avant de la fermer avec le bouchon possédant les tuyaux d'entrée et de sortie de gaz clampés. Du papier aluminium a été placé sur environ 5cm de chaque extrémité (les deux tuyaux et la jonction d'alimentation) afin de préserver au plus la stérilité. La bouteille a ensuite été placée dans l'autoclave à 121°C pendant 10 minutes. Le milieu ne nécessite aucune prédigestion enzymatique puisqu'il s'agit d'une formule fortement hydrolysée.

2.1.3 Ajout du complément

Le milieu contenant 4g/l de complément alphaGOS P (Olygose, numéro de lot 20170101 avec une date limite de consommation au 01/2019), a été réalisé selon la même méthode ci-dessus en ajoutant 8g de complément avec la poudre de lait.

Le milieu contenant 4g/l de complément Organic Galacto-Oligosaccharide-CL (Nature's GOS organic food), contenant 50% de β -GOS, a été réalisé selon la même méthode ci-dessus en ajoutant 16g de complément avec la poudre de lait.

Une concentration de 4g/l a été choisi puisque c'est la concentration retrouvée dans les laits premier âge (Vandenplas *et al.*, 2015).

2.1.4 Préparation de l'inoculum fécale

Les fèces d'un seul sujet ont été utilisé afin d'ensemencer les réacteurs. Le sujet avait le long de l'étude entre 10 et 12 mois. Le sujet est un enfant allergique aux protéines de lait de vache.

La couche contenant de la matière fécale enroulée sans lingette, a été placée dans une boîte en plastique contenant un sachet générateur d'atmosphère anaérobie (Oxoid AnaeroGen, ref: AN0035A) et fermée hermétiquement jusqu'à la préparation de l'inoculum. De la matière fécale est ensuite prélevée à l'aide d'une pipette stérile et placée dans un sachet stomacher possédant un filtre. Une

solution d'eau physiologique (VL) est ensuite ajoutée dans le sachet stomacher pour obtenir un échantillon à 10% (masse/volume). Le sachet stomacher est ensuite placé dans un homogénéisateur pendant 2 minutes. En atmosphère anaérobie la préparation de l'inoculum doit prendre au maximum 15 minutes, avant l'inoculation des récipients de fermentation (Brück ,2017).

2.1.5 La digestion in vitro

La première partie de la digestion est réalisée avec le lait sans ajout de complément. Chaque fermentateur est inoculé avec 15ml d'inoculum fécale frais du donneur. Les récipients de fermentation inoculés tournent en culture batch durant une nuit avant que la pompe d'alimentation en milieu soit enclenchée. Après 8 volumes de renouvellement de milieu dans chaque fermentateurs l'établissement d'un régime stationnaire a lieu. Durant l'essai cinq échantillons de 5ml sont prélevés afin d'être analysé ; l'inoculum original (N), après équilibre (T0) avant d'allumer la pompe en alimentation, au régime stationnaire (TS). Après le temps (TS) le milieu est changé pour le milieu avec le complément à 4g/l. Un nouveau prélèvement est réalisé 24 heures après le changement de milieu (TN) et pour finir au régime stationnaire après 8 volumes de renouvellement de milieu (TSN). Lors de chaque essai il y a eu en premier lieu la digestion du lait sans complément puis la digestion du lait avec l'ajout du complément (Brück ,2017).

2.1.6 Anaérobicité du milieu

Afin de garantir l'anaérobicité du milieu, de la rézazurin à 250mg/l a été préparé et ajouté au milieu de culture à une concentration de 4ml/l. Cet ajout permet la coloration du milieu en rose si il y a présence de trop d'oxygène. De l'azote sans oxygène est continuellement injecté dans les récipients de fermentation durant la digestion (Brück ,2017).

2.1.7 Le régime permanent

Un régime physiologiquement permanent où, avec des paramètres constants, aucun changement dans le milieu n'est observé. Ce régime peut être mesuré à l'aide de la surveillance de la formation des acides gras à courtes chaines. On l'obtient en général au bout du renouvellement de 8 volumes de milieu dans les récipients (Brück, 2017).

2.1.8 Débit de la pompe pour l'alimentation des fermentateurs

Deux réglages de débits sont possibles sur le modèle intestinal infantile, ils sont tous les deux basés sur le temps de transit typique d'enfants basés au Royaume-Unis (Brück, 2017). Le débit lent de 11.1ml/h et le débit rapide de 16.8ml/h. Afin de pouvoir réaliser 4 essais complets, le débit rapide a été sélectionné et le régime stationnaire atteint au bout de 95.2 heures.

2.1.9 Décontamination de l'appareil

A la fin de chaque essai, l'appareil est désinstallé et placé dans l'autoclave pour une décontamination de 40 minutes à 120°C. Les électrodes ne sont pas placées dans l'autoclave mais placées dans une solution de nettoyage à base de RBS 25 pendant 10 minutes puis rincées et placées dans une solution de KCl à 3M. Une fois décontaminé l'installation est lavée dans du RBS et rincée à l'éthanol. L'installation est réassemblée en faisant attention de ne pas contaminer les parties en contact avec le milieu de fermentation. La bouteille en verre est également à décontaminer et à vider au maximum après 2 essais.

2.2 Suivi de la population bactérienne

2.2.1 Milieux de culture

Pour la détermination des germes totaux anaérobies le milieu Wilkins-Chalgren Agar (WCA) a été utilisé. Le milieu a été réalisé selon les directives du livre Difco&BBL Manual (2009). L'ensemencement a été réalisé selon la méthode en surface en plaçant 100µl de la dilution appropriée sur la plaque et étalé avec un râteau préalablement placé dans de l'éthanol et passé à la flamme. Les plaques ensemencées ont été incubées, en atmosphère anaérobie, 48 heures dans une étuve à 37°C (Difco&BBL Manual, 2009). Toutes les colonies présentes sur la plaque ont été dénombrées.

Pour la détermination des lactobacilles le milieu de Man, Rogosa et Sharpe (MRS) (Bioline, MRS AGAR WITH TWEEN 80, ref : 4017282, lot : CP0504) a été utilisé. Le milieu a été réalisé selon les directives HES-SO Valais SO8109 (2009). L'ensemencement a été réalisé selon la méthode en surface en plaçant 100µl de la dilution appropriée sur la plaque et étalé avec un râteau préalablement placé dans de l'éthanol et passé à la flamme. Les plaques ensemencées ont été incubées, en atmosphère anaérobie, 72 heures dans une étuve à 37°C (HES-SO Valais SO8109, 2009). Les différents types de colonies ont été observés sous le microscope et les colonies comportant des bâtonnets ont été dénombrées.

Pour la détermination des Bifidobactéries le milieu Beerens Agar a été utilisé. Le milieu a été réalisé en se basant sur les directives de Beerens H (1991) de la manière suivante ; 44.0g de Columbia base agar (Difco, ref : 279240, lot : 6315893), 5.0g d'agar (Boilife, Agar Bios Special LL, ref : 180530, lot : 76X000), 5.0g de glucose et 0.5g de L-Cystéine (Fluka, pureté >99%, lot et ref : 407972/1 43900) par litre d'eau distillée. Le milieu, dans une casserole, a été porté à ébullition durant une minute puis laissé hors du feu jusqu'à obtention d'une température de 60°C environ. Ensuite 5ml d'acide propionique (Fluka, pureté >99,5%, lot et ref : 1392796 14308246) ont été ajouté au milieu en tant qu'agent de sélectivité des Bifidobactéries puis le pH a été ajusté à 5.25 \pm 0.05 avec du NaOH 10M. Il faut compter environ 3ml de NaOH pour 800ml de milieu.

Le milieu n'a pas été stérilisé mais uniquement laissé dans un bain marie à 50°C durant 30 minutes avant d'être coulé dans les plaques de Pétri. Le milieu ne doit pas être préparé plus de 48 heures avant son utilisation. L'ensemencement a été réalisé selon la méthode en surface en plaçant 100µl de la dilution appropriée sur la plaque et étalé avec un râteau préalablement placé dans de l'éthanol et passé à la flamme. Les plaquesensemencées ont été incubées, en atmosphère anaérobie, 72 heures dans une étuve à 37°C (Beerens H, 1991). Les différents types de colonies ont été observés sous le microscope et les colonies comportant des bâtonnets en forme de Y ont été dénombrées.

Pour la détermination des Entérobactéries le milieu Violet Red Bile Lactose Agar (VRBL) (Merck, VRB-Agar, ref : 1.04030.0500, lot : VM463630 532) a été utilisé. Le milieu a été réalisé selon les directives HES-SO Valais SO8105 (2008). L'ensemencement a été réalisé selon la méthode dans la masse en plaçant 1ml de la dilution appropriée sur la plaque vide et recouvert avec une couche de 20ml de milieu puis laissé se solidifier avant de recouvrir avec une surcouche d'environ 5ml. Le milieu a été préparé frais environ 1 heure avant son utilisation et placé dans un bain marie à 50°C en attendant son utilisation. Les plaquesensemencées ont été incubées 24 heures dans une étuve à 37°C (HES-SO Valais SO8105, 2008). Les colonies rouges et rouges avec un centre jaune ont été dénombrées.

Pour la détermination des Entérobactéries le milieu Coliform Agar Enhanced Selectivity (CAES) (Merck, ref : 1.00850.0500, lot : VM011650 829) a été utilisé. Le milieu a été réalisé selon les directives Merck Microbiology Manual. L'ensemencement a été réalisé selon la méthode dans la masse en plaçant 1ml de la dilution appropriée sur la plaque vide et recouvert avec une couche de 20ml de milieu puis laissé se solidifier à température ambiante. Le milieu a été préparé frais au maximum 2 heures avant son utilisation et placé dans un bain marie à 50°C en attendant son utilisation.

Les plaques ensemencées ont été incubées 24 heures dans une étuve à 37°C (Merck Microbiology Manual). Les colonies bleues, violettes et roses ont été dénombrées.

2.2.2 Dénombrement bactérien

Chaque dilution a été réalisée à doubles pour chaque milieu utilisé. Par série de dilution, toutes les plaques dont le nombre de colonies étaient compris entre 15 et 300 ont été comptées. Le calcul de la moyenne pondérée du nombre de colonies s'est fait à l'aide de la formule de FARMILOE. Le résultat est exprimé en ufc (unité formant colonie)/ml. Pour chaque analyse 1ml d'échantillon a été prélevé dans chaque fermentateur.

2.2.3 Solution de dilution

L'eau physiologique a été utilisée comme solution de dilution (VL). Cette solution a été préparée en mélangeant 8.5g de NaCl (ACROS, ref : 207790010, lot : A0366943) et 1g de peptones (Biolife, Tryptic digest of casein, ref : 4123402, lot : 99P018) dans 1 l d'eau distillée.

2.2.4 Génération de l'atmosphère anaérobie

Les plaques incubées en atmosphère anaérobie ont été placées dans des boîtes en plastique hermétique contenant un générateur d'atmosphère anaérobie (Oxoid AnaeroGen, ref: AN0035A) ainsi qu'un indicateur d'anaérobicité contrôlé à chaque lecture de plaques. Par soucis de disponibilité des boîtes, les plaques ont également pu être placées dans des sachets en PA/PE 90 contenant des sachets générateurs d'atmosphère anaérobie (Oxoid AnaeroGen, ref: AN0035A) ainsi qu'un indicateur d'anaérobicité contrôlé à chaque lecture de plaques.

2.2.5 Souches de contrôle

Lors des différentes analyses microbiologiques des souches de contrôle ont été ensemencées et incubées dans les mêmes conditions que les échantillons. Les souches de contrôles suivantes ont été utilisées ; *Escherichia coli* DSM 787 et *Lactobacillus plantarum* DSM 20174.

2.3 Chromatographie en phase gazeuse

2.3.1 Conditions instrumentales et expérimentales

L'analyse a été réalisée avec une chromatographie en phase gazeuse (GC) 6890 (vérifier le nom du GC) équipée d'une colonne polaire Zebron 7HG-G009-11 ZB-FFAP (30m*0.25mm*0.25µm) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Un volume de 1µl d'échantillon est injecté dans l'entrée. Le reste des paramètres est indiqué dans l'annexe VIII.

2.3.2 Standard interne

Une solution d'acétonitrile contenant 4.3mmol/l d'acide 2-ethylbutyrique (Sigma-Aldrich, 99%, ref : 101802872, lot : STBG622) a été ajoutée aux échantillons en tant que standard interne. Ce standard permet d'éviter l'expansion des pics causée par la présence d'eau dans l'échantillon à analyser.

2.3.3 Réactifs

Afin de réaliser la courbe de calibration, un mix contenant les acides formique, acétique, propionique, isobutyrique, butyrique, isovalerique, valerique, isocaproïque, hexanoïque et heptanoïque a été utilisé (Sigma-Aldrich, Volatile Free Acid Mix, 1x100ml, 10mM dans de l'eau déionisée, ref : CRM46975, lot : XA22621V).

Les temps de rétention de ces acides ayant été déterminés par analyse HPCL, des solutions standards individuelles d'acide ont été réalisées. Les réactifs utilisés sont les suivants ; acide DL-lactique 90% (Aldrich, ref : 101845662, lot : BCBS1772V), acide butyrique 99.5% (Fluka, ref : 1343845 31908147), acide isobutyrique 99.5% (Fluka, ref : 101265293, lot : 1323470V), acide isovalerique 99% (Aldrich, ref : 101261868, lot : BCBG1133V), acide valerique 99% (Aldrich, ref : 101242216, lot : STBC8426V), acide 4-methylvalerique 99% (Aldrich, ref : 101205431, lot : 82396PJV), acide hexanoïque 98% (Merck, ref : 800198), acide propionique 99.5% (Fluka, lot et ref : 1392796 14308246)

2.3.4 Courbe de calibration

Une courbe de calibration a été réalisée avec un mix d'acide contenant 10mM des acides suivants ; formique, acétique, propionique, isobutyrique, butyrique, isovalerique, valerique, isocaproïque, hexanoïque et heptanoïque. Une solution d'acide lactique à 10mM a également été réalisée et ajoutée dans les différents standards à concentration équivalente aux autres acides du mix.

L'analyse a été faite dans les mêmes conditions que pour les échantillons.

Les annexes IV, V et VI représentent les courbes de calibrations obtenues pour les acides acétique, propionique et butyrique avec les concentrations suivantes ; 0.04, 0.1, 0.15, 0.2, 0.4, 1.0 et 2.5mM.

2.3.5 Temps de rétention

Afin de s'assurer des temps de rétention de chaque acide, des solutions individuelles de 10mM des acides suivants ; acétique, propionique, isobutyrique, butyrique, isovalerique, valerique, isocaproïque, hexanoïque et heptanoïque ont été réalisés et injectés séparément dans la colonne dans les mêmes conditions que les échantillons.

2.3.6 Préparation des échantillons

1ml d'échantillon est placé dans un tube Eppendorf de 1,5ml (Axygen, ref : MCT-175-C) et centrifugé à 13'000 g durant 5 minutes. Le surnageant est ensuite filtré à l'aide d'une seringue de 2ml (ONCE, ref : 62.2201) et avec un filtre en polycarbonate de 0,2µm de diamètre (MACHEREY-NAGEL, CHROMAFIL Xtra PET-20/13, ref : 729222) et ajouté à quatre parts de standard interne. Un blanc a été réalisé avec uniquement le standard interne. Les échantillons sont ensuite placés dans des vials de 1.5ml (BGB, ref : 887052116001012)

3. Résultats et discussion

Lors de ce travail pratique l'évolution de quatre types de bactéries a été suivie, tout au long de la digestion, à l'aide de culture sur des milieux sélectifs. Pour chaque analyse des contrôles positifs et négatifs ont été réalisés, afin de pouvoir valider les résultats du dénombrement comme indiqué dans la partie méthode. Ces contrôles sur les milieux et le contrôle de l'anaérobicité lors de chaque ensemencement, respectivement incubation, se sont retrouvés conformes c'est pour cela que les résultats suivants ont pu être traités.

Au début du travail, la culture des entérobactéries a été faite sur le milieu VRBL mais lors du premier essai les dilutions réalisées n'étaient pas convenables, malgré la grande gamme de dilutions établies allant de 10^{-7} à 10^{-12} , et la population des entérobactéries dans les fermentateurs n'a pas pu être déterminée. Ensuite un second essai sur les entérobactéries avec ce même milieu a été réalisé avec des dilutions appropriées mais ces résultats n'ont pas été pris en compte puisqu'il a été décidé de changer de milieu en choisissant un sélectif des coliformes. Le milieu CAES, où la sélectivité du milieu est enrichi et une différenciation entre les coliformes et *Escherichia coli* est possible, a été choisi pour les deux derniers essais de digestion avec les deux compléments différents. Seul les valeurs obtenues sur ce milieu ont été traitées dans les résultats et de la façon suivante ; les valeurs pour les trois premiers prélèvements qui correspondent à la digestion du lait sans complément ont été traitées en réalisant une moyenne et les valeurs des deux derniers prélèvements correspondant à la digestion des compléments ne possèdent qu'une seule valeur.

Les graphiques 7, 8, 9 et 10 ci-dessous représentent l'évolution des quatre populations de bactéries suivies lors de la digestion in vitro. En axe des abscisses, il peut être observé les temps de prélèvement réalisés. Avec le temps (N) correspondant à l'analyse de l'échantillon ensemencé, le temps (T0) qui correspond au temps d'équilibre après une nuit dans le système de fermentation tournant en tant que batch, (TS) le temps du régime stationnaire de la fermentation du lait sans ajout de complément. Ensuite le prélèvement (TN) 24 heures après le changement de milieu, milieu qui contient le β -GOS où le P-GOS à une concentration de 4g/l et pour finir le temps (TSN) qui correspond au régime stationnaire de la fermentation avec le complément. Les trois premiers prélèvements sont identiques aux quatre essais puisqu'il s'agit de la digestion du lait sans ajout de complément, les deux dernières colonnes représentent les prélèvements après l'ajout du complément. La digestion du β -GOS n'a été réalisée qu'une unique fois pour pouvoir être comparée à la littérature.

3.1 Digestion du β -GOS

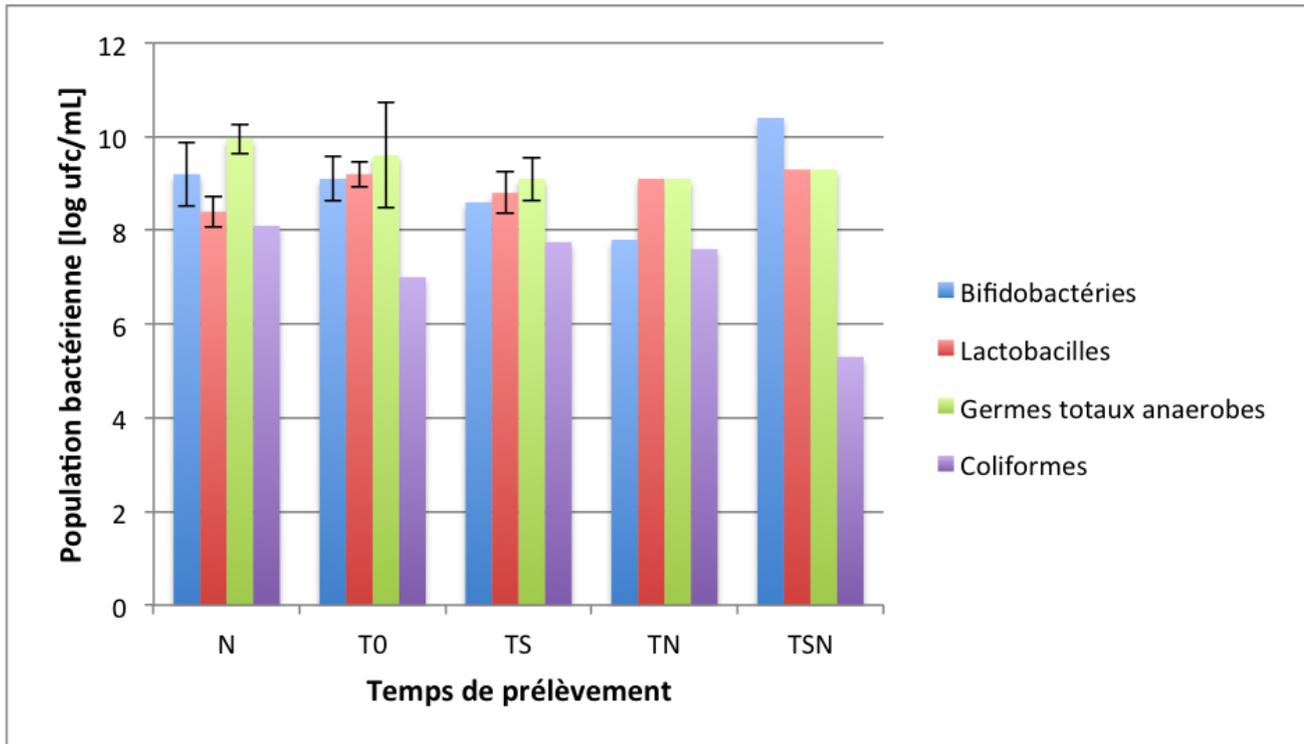


Figure 6 : Evolution de la population des Bifidobactéries, Lactobacilles, germes totaux anaérobies et coliformes dans le récipient de fermentation 1 en fonction du temps de prélèvement lors de la digestion du β -GOS.

Lors de l'essai de la digestion du β -GOS une dysbiose s'est produite dans le fermentateur 1 au temps (TS) à cause d'un arrêt prolongé de l'alimentation, ce qui a entraîné une diminution du nombre de bifidobactéries passant de 9.5 log(ufc/ml) au temps (T0) à 6.5 log(ufc/ml) au temps (TS). C'est pour cette raison que dans ce graphique 6 on observe une augmentation de la population alors que ceci est uniquement dû à la dysbiose survenue. En ce qui concerne la population des germes totaux anaérobies ainsi que des lactobacilles celles-ci restent stables tout au long de l'essai. En effet ces deux populations n'ont pas été affectées par le manque d'alimentation. En ce qui concerne les coliformes leur nombre varie entre 8.1 et 7 log(ufc/ml) et lorsque la population des bifidobactéries revient à sa valeur initiale les coliformes diminuent passant de 7.6 à 5.3 log(ufc/ml). Puisque l'étude de la population des coliformes n'est pas complète avec uniquement deux valeurs pour la digestion du lait et une unique valeur pour la digestion du complément β -GOS, il ne peut pas être affirmé qu'avec l'ajout de ce complément cette population diminue. Mais cela reste une hypothèse possible, car comme il peut être observé dans l'étude de Chen *et al.* (1999), des sujets ont consommé un yogourt enrichi en *Bifidobacterium bifidum* et les résultats ont montré que lorsque le taux de bifidobactéries a augmenté la population de coliformes a diminué. Ce qui corrobore avec les résultats ci-dessus où lors d'une forte augmentation en bifidobactéries il suit une diminution, voir une suppression dans leur cas, en coliformes. Une seconde étude tend vers la même observation, lors d'une ingestion de

probiotiques contenant *Bifidobacterium lactis* une augmentation de cette bactérie est observée dans les selles des sujets ainsi que simultanément une diminution des entérobactéries (Ahmed *et al.*, 2007).

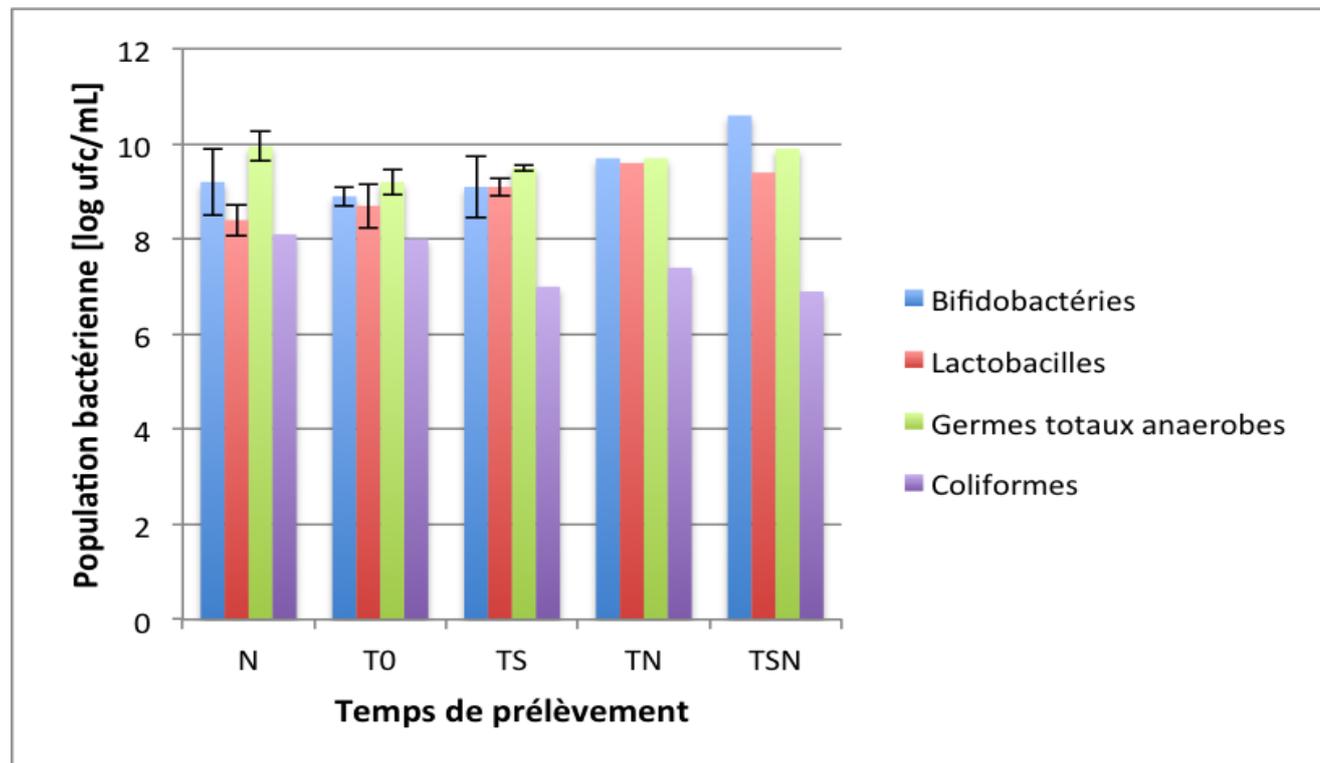


Figure 7 : Evolution de la population des Bifidobactéries, Lactobacilles, germes totaux anaerobes et coliformes dans le récipient de fermentation 2 en fonction du temps de prélèvement lors de la digestion du β -GOS.

Tout d'abord la population des bifidobactéries (colonnes bleues) est observée, lors des trois premiers prélèvements la population n'évolue pas lors de la digestion du lait sans complément, avec respectivement comme moyenne sur quatre essais pour (N), (T0) et (TS) de 9.2, 8.9 et 9.1 log(ufc/ml) et un écart-type maximal au temps (N) de 0.7, ce qui est attendu puisque le sujet suit ce même régime alimentaire. L'écart-type le plus grand est de 0.7 au temps (N) c'est pour cela qu'entre 9.2 +/- 0.7 log(ufc/ml) toutes les valeurs obtenues seront considéré comme stable. Au temps (TSN) la population est à 10.6 log(ufc/ml) ce qui signifie qu'une augmentation d'au moins 0.7 Log est observée.

Lors de cette expérience il n'y a pas eu de dysbiose et la population des bifidobactéries n'a pas évolué c'est pour cette raison qu'il n'est observé aucune diminution des coliformes lors de l'ajout de complément. En effet comme le graphique le montre, au temps (TS) le nombre de coliformes est de 7 log(ufc/ml) puis, au temps (TSN) le temps stationnaire lors de la digestion du β -GOS, de 6.9 log(ufc/ml).

Donc l'ajout de β -GOS lorsque le microbiote est à l'équilibre ne provoque aucun changement dans les populations suivies. Mise à part une légère augmentation en bifidobactéries qui ne peut être confirmée puisque cette augmentation inférieure à 1 log et qu'il faudrait réaliser plusieurs essais. Il est

retrouvé également la même conclusion dans l'étude sur des probiotiques de McFarland (2014), où un groupe ayant un microbiote « sain » ne présentait aucun changement dans celle-ci lors de la prise de probiotiques. C'est également le cas pour les prébiotiques, comme le montre l'étude de Gibson *et al.*(2004), la réponse à la prise de prébiotiques dépend du microbiote initial, plus la population en bactéries est grande plus la réponse sera faible et inversement.

En ce qui concerne la population des lactobacilles, entre le temps (TS) et le temps (TSN) la population passe de 9.1 à 9.4 log(ufc/ml), elle reste donc stable. Ce qui est également le cas pour les germes totaux anaérobies dont la population passe de 9.5 à 9.9 log(ufc/ml) dans le même temps. Cette augmentation n'est pas prise en compte puisque lors de la digestion du lait sans complément, la population passe de 10 log(ufc/ml) au temps (N) à 9.5 log(ufc/ml) au temps (TS). Ceci montre donc que des variations de près d'un demi-Log ont lieu sans changement de nutriment.

Ces deux graphiques montrent donc dans un premier temps que lorsqu'une dysbiose apparaît et que la population des bifidobactéries est touchée, l'ajout du β -GOS permet la stimulation de leur croissance et pendant cette croissance il y a également, d'après les résultats et au vue des études trouvées, une inhibition de la croissance des coliformes. Deuxièmement, lorsque la flore est à l'équilibre, l'ajout du complément β -GOS n'a pas d'effet sur le microbiote.

3.2 Digestion du P-GOS

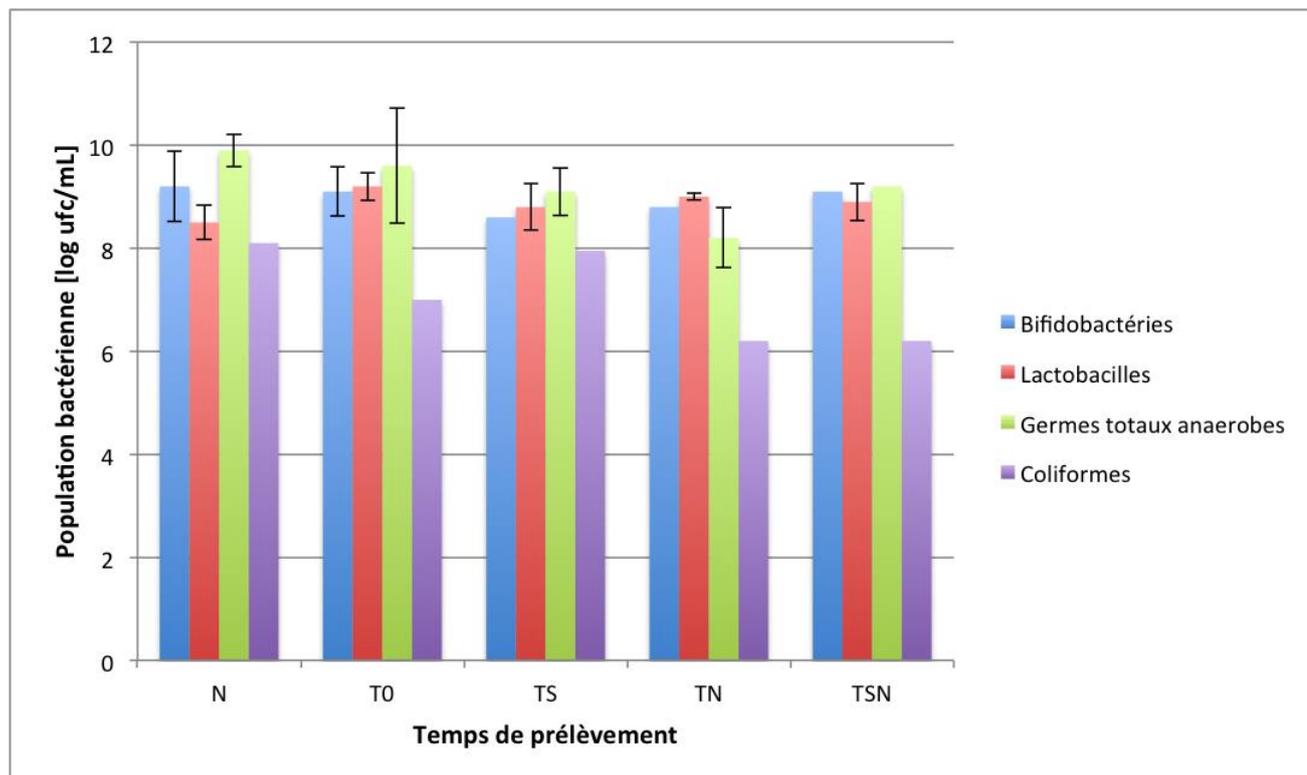


Figure 8 : Evolution de la population des Bifidobactéries, Lactobacilles, germes totaux anaerobes et coliformes dans le récipient de fermentation 1 en fonction du temps de prélèvement lors de la digestion du P-GOS.

Trois essais de digestion du complément P-GOS ont été réalisés, les résultats pour le suivi des bifidobactéries, dans le récipient 1, ainsi que des coliformes ne possèdent pas d'écart-type puisque lors d'un essai une dysbiose s'est produite au moment (TS) entraînant une diminution en bifidobactéries et ces résultats n'ont donc pas été traités dans ce graphique, les valeurs observées sont donc obtenues en faisant la moyenne de deux essais. Pour les coliformes les valeurs sont obtenues en faisant la moyenne des deux essais où le dénombrement a été réalisé sur le milieu CAES.

Il est possible d'observer que la population des bifidobactéries n'évolue pas au cours de la digestion du P-GOS, passant d'un maximum au temps (N) de 9.2 à 8.6 log(ufc/ml) au temps (TS), alors que la différence entre (TS) et (TSN) est de 0.5 log, ce qui montre que des variations dans une fourchette de 1 log sont dues à des variations aléatoires sans modifications intentionnelles de l'environnement et que cela ne peut être considéré comme une diminution ou augmentation de la population. En ce qui concerne la population des germes totaux anaérobies ainsi que des lactobacilles aucune évolution n'est observable. Avec une différence pour les germes totaux anaérobies ainsi que les lactobacilles entre (TS) et (TSN) de 0.1 log.

Dans ce cas également on remarque une diminution des coliformes passant de 8 à 6.2 log(ufc/ml) mais cette fois-ci non associée à l'augmentation des bifidobactéries.

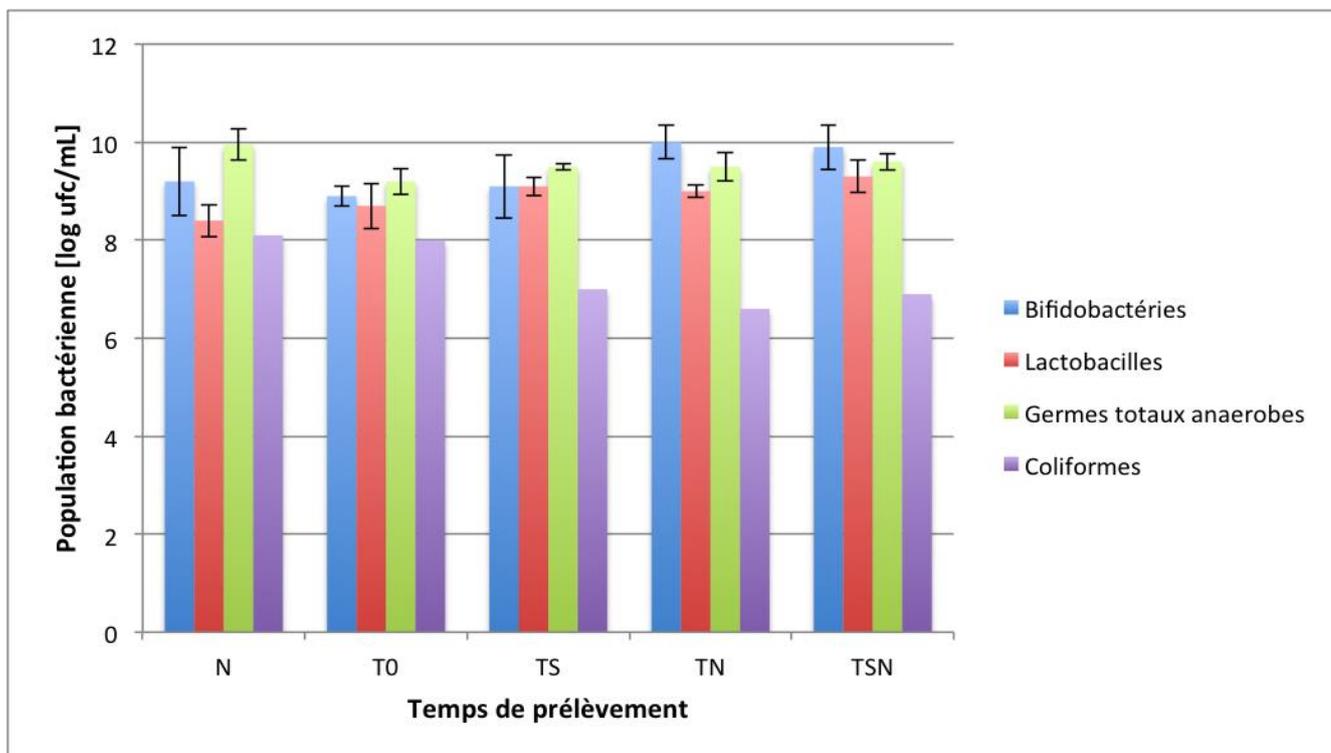


Figure 9 : Evolution de la population des Bifidobactéries, Lactobacilles, germes totaux anaerobes et coliformes dans le récipient de fermentation 2 en fonction du temps de prélèvement lors de la digestion du P-GOS.

La figure 10 montre l'évolution des bactéries étudiées tout au long de la digestion du P-GOS. Il est remarqué que la population des lactobacilles n'augmente pas entre le temps (TS) et le temps (TSN) passant de 9.1 à 9.3 log(ufc/ml). Il en est de même pour la population des germes totaux anaérobies qui n'augmente que de 0.1 log. En ce qui concerne les bifidobactéries il y a une augmentation de 0.8 log entre le temps (TS) et le temps (TSN).

Ici il est également observé une diminution dans la population des coliformes sauf que celle-ci se produit déjà au temps (TS) avec une population passant du temps (N) à 8.1 à 7 log(ufc/ml) au temps (TS). La population reste ensuite stable entre le temps (TS) et (TN) ne baissant que de 0.1 log. Donc cette diminution ne peut être attribuée au complément puisqu'elle se produit déjà avant son ajout. Ceci explique probablement la diminution observée dans le graphique 8, qui pourrait n'être due qu'à une variation aléatoire.

A la suite des parties 3.1 et 3.2 où les évolutions des populations bactériennes durant les digestions des deux compléments ont été réalisées, il peut être observée diverses similitudes. Premièrement une légère augmentation de la population des bifidobactéries est observée dans le récipient 2 lors de la digestion des compléments. Ensuite une diminution des coliformes a également lieu dans les récipients 1 lors des digestions des deux compléments. Malgré cela cette diminution ne peut pas être confirmée au vue du trop faible nombre de répétition de l'analyse.

3.2 L'ajout de complément en cas de dysbiose

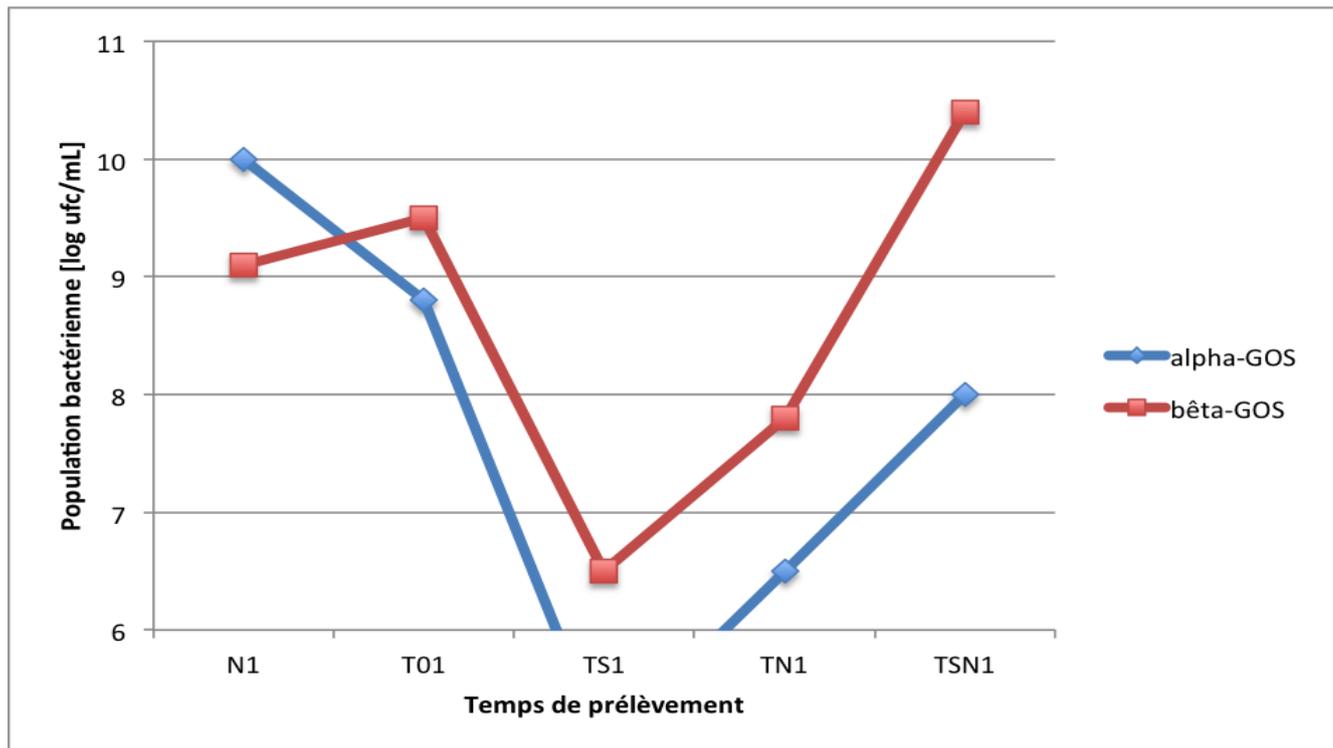


Figure 10 : Evolution de la population des Bifidobactéries dans le récipient de fermentation 1 en fonction du temps de prélèvement lors de la digestion du P-GOS (en bleu) et du β-GOS (en rouge).

Lors de deux digestions une coupure dans l'alimentation en milieu s'est produite dans le récipient de fermentation 1, ce qui a conduit à une simulation de dysbiose. Sur le graphique 10 ci-dessus on remarque au temps (TS) que la population en bifidobactéries, la seule population touchée lors de la coupure en alimentation, a chuté à moins de 6 log(ufc/ml) avant d'ajouter de complément P-GOS (alpha-GOS). 24 heures après l'ajout du complément, au temps (TN), dans le milieu la population est remontée à 6.5 log(ufc/ml) puis au régime stationnaire (TSN) la population était de 8 log(ufc/ml). L'augmentation était donc de plus de 3 log.

Une autre dysbiose s'est également produite avant l'ajout du β-GOS où la population a chuté jusqu'à 6.5 log(ufc/ml) puis au bout de 24 heures (TN) a remonté à 7.8 log(ufc/ml) pour arriver à 10.4 log(ufc/ml) au moment du régime stationnaire (TSN). Soit une augmentation de 3.9 log.

Il a été important de noter que lors de la première dysbiose le nombre exact de bifidobactéries n'était pas connu puisque les dilutions de plaques s'étaient arrêtées à 10^{-6} et qu'aucune colonie n'a été dénombrée sur cette dilution. Donc, au mieux, l'échantillon contenait $1 \cdot 10^5$ ufc/ml et l'augmentation de 3 log est en réalité plus grande.

Grâce à ce graphique, il peut être observé, que la capacité à lutter contre la dysbiose ainsi que le rétablissement d'une flore normale est un effet commun aux deux compléments. Cette aptitude est un des effets principal recherché lors de la prise d'un prébiotique. En effet comme de nombreuses études tendent à l'indiquer une flore possédant une population en bifidobactéries conséquente, a de

nombreux avantages, comme par exemple la régulation faite par les bifidobactéries sur des autres types de bactéries tels que *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* et de même que sur les Salmonelles, *Listeria*, *Campylobacter* et *Shigella* (Gibson, 1994). Un autre exemple dans l'étude de Rivière *et al.*(2016) où il est décrit les différents rôles fonctionnels qu'ont les bifidobactéries dans le colon, tel que la production et/ou la libération de vitamine B, antioxydants, polyphénols ainsi que l'aide à la maturation du système immunitaire chez les jeunes enfants ou encore des fonctions qui veillent au bon fonctionnement du colon.

Plusieurs facteurs peuvent être responsables d'une dysbiose, tel que le pH du suc gastrique, la disponibilité des nutriments comme dans notre cas, l'âge et la santé de l'hôte et d'autres encore (Saikh, 2014).

3.4 Analyse des métabolites ; les acides gras à courtes chaînes

Les acides acétique, propionique et butyrique sont les acides principaux que l'on retrouve dans le microbiote intestinal (Wang *et al.*, 2017). Puisque plus de 95% de SCFAs sont absorbés dans l'organisme, leur quantification de ces métabolites dans les selles apporte peu dans l'étude de la fermentabilité des différents glucides dans l'intestin. Les études *in vitro* utilisant le microbiote fécal, sont des modèles intéressants pour étudier les processus de fermentation puisque les acides se retrouvent dans le milieu. A des concentrations de 10g/l, les GOS ont augmenté la production d'acétate et de butyrate dans les fermentateurs à pH contrôlés avec des accumulations transitoires de lactate et de succinate (Macfarlane *et al.*, 2008). Un grand nombre de bactéries présentes dans l'intestin produisent du succinate et d'autres bactéries comme les *Bacteroidetes* et quelques *Firmicutes*, à l'aide de la décarboxylation, le transforme en acide propionique (Tannock, 2017). L'acide butyrique est lui produit par certains *Firmicutes* (tel que *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia spp.*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium hallii* et *Anaerostipes spp.*) à partir du butyryl-CoA et avec l'aide de l'acétate CoA transférase (Tannock, 2017).

Dans les graphiques 12, 13, 14 et 15 ci-dessous une quantification en acide acétique, propionique et butyrique a été réalisée à l'aide d'un GC. L'acide propionique présent à une concentration de moins de 1mM ne peut être pris en compte pour l'analyse qui suit, les valeurs étant trop faibles et avec un écart-type aussi grand que la moyenne obtenue sur les quatre essais. En ce qui concerne l'acide butyrique parfois, comme au temps (TS) du récipient 2 où la moyenne de concentration sur quatre essais est de 1.06mM alors que l'écart-type est de 0.83, les résultats sont difficilement discutables et vont être laissés de côté. Une discussion à propos de la méthode utilisée se trouvera à la fin de cette partie 3.4.

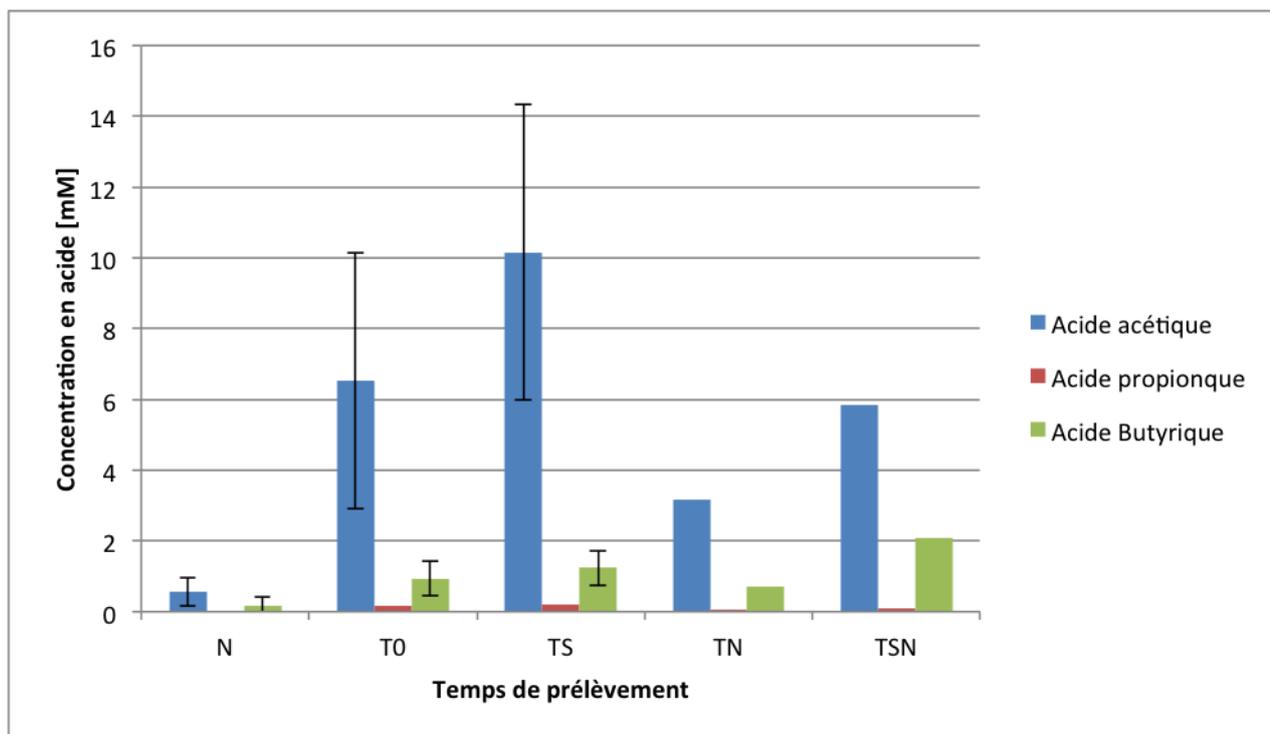


Figure 11 : Evolution de la concentration en acide acétique, propionique et butyrique dans le récipient de fermentation 1 en fonction du temps de prélèvement lors de la digestion du β -GOS.

Ce graphique montre l'évolution des trois principaux acides dans le fermentateur 1 et on peut déjà remarquer que la quantité d'acide au temps (N) est très faible, ce qui est attendu puisque plus de 95% des acides présents dans le colon sont absorbés par la muqueuse et donc qu'une très faible quantité se retrouve dans les selles (Macfarlane *et al.*, 2008). Ensuite la concentration augmente progressivement entre le temps (T0) et (TS) cela montre que, lorsque le milieu a étéensemencé, une quantité de moins de 1mM en acide acétique, moins de 0.5mM en acide butyrique et nulle en acide propionique a été ajouté au milieu et les bactéries lors de leur développement ont produit dans le milieu les trois acides. Avec des écart-types aussi grands sur quatre essais, il n'est pas possible de juger la diminution ou l'augmentation de la production en acide. Malgré cela, une faible quantité en acide acétique de 3.2mM au temps (TN), les bifidobactéries étaient présentes en faible quantité dans le milieu à ce moment-là 7.8 log(ufc/ml) alors qu'en général en moyenne la population est de 9 log(ufc/ml), cette valeur est basse à cause de la dysbiose. Au temps (TSN) la concentration en acide acétique augmente à 5.1mM tout comme la population de Bifidobactéries à 10.4 log(ufc/ml). Cette observation est appuyée par le fait que les bifidobactéries sont des bactéries productrices d'acide acétique (Fukuda *et al.*, 2012). Plusieurs études ont montrées un lien entre cette production d'acide par les bifidobactéries et la protection contre les infections entéro-pathogéniques dues à *Escherichia coli* O157:H7 a été démontré. En effet l'acétate produit agirait sur les cellules épithéliales de l'hôte dans le but de promouvoir les fonctions de défenses de celles-ci (Fukuda *et al.*, 2012).

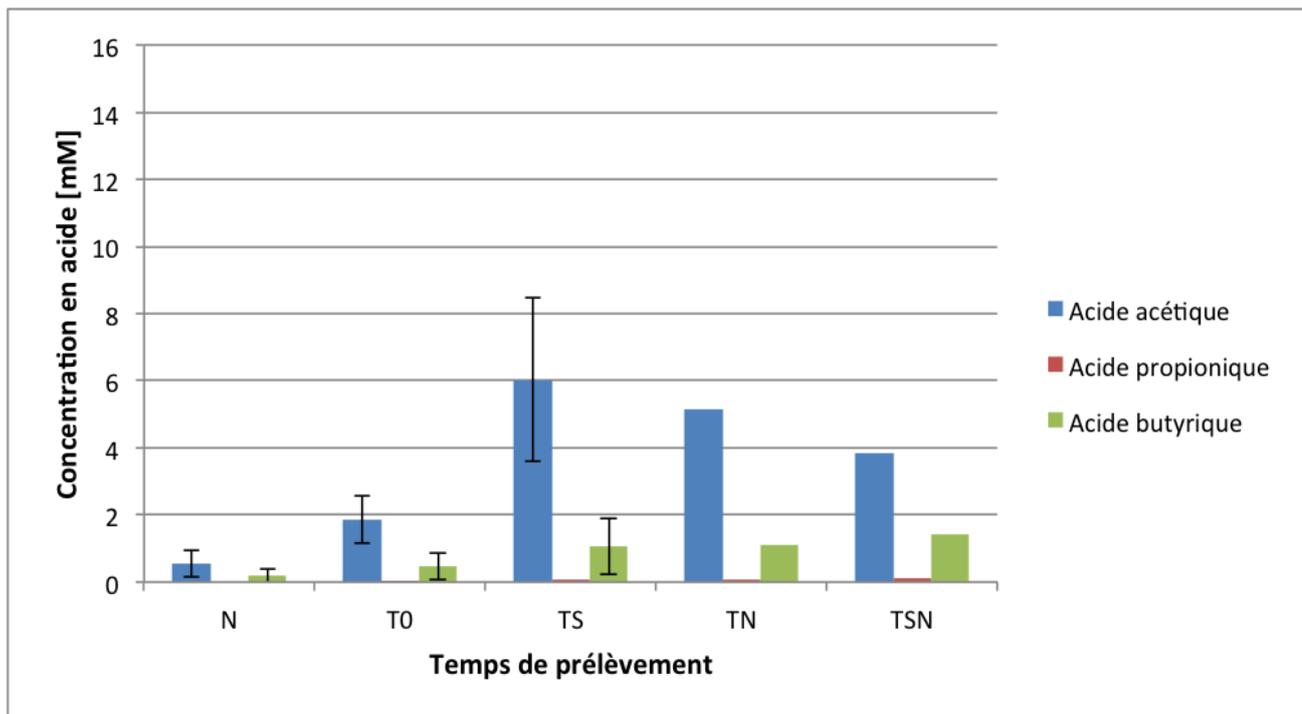


Figure 12 : Evolution de la concentration en acide acétique, propionique et butyrique dans le récipient de fermentation 2 en fonction du temps de prélèvement lors de la digestion du β -GOS.

Dans le fermentateur 2 les concentrations en acide sont globalement plus faibles que dans le fermentateur 1, avec au temps (TS) une moyenne de concentration en acide acétique à 6mM alors que dans le fermentateur 1 cette même valeur était de 10mM, c'est également ce qui se passe dans le colon puisque la concentration en acide est la plus haute dans le colon ascendant et diminue progressivement le long du colon descendant. Ceci est remarqué notamment avec le pH qui est plus bas dans le colon ascendant, environ pH=5.5, alors qu'il est de pH=6.7 dans le colon descendant, cette différence est due à la production d'acide (Tannock, 2017). D'après les résultats du temps (TS) pour la concentration en acide butyrique, aucune évolution n'est visible au temps (TN) et (TSN). De même que dans le fermentateur 1, une augmentation en acides du temps (N) au temps (TS) est observée. Suite à cela on remarque une diminution de concentration en acide acétique entre le temps (TS), où la concentration est de 6mM, et le temps (TSN) avec une concentration de 3.8mM. Cette concentration n'est pas vraiment une baisse puisque la valeur la plus basse obtenue sur les quatre essais au temps (TS) est de 3.1mM.

Dans les études réalisées, l'ajout du GOS dans l'alimentation augmente les concentrations en acide acétique, butyrique et propionique (Pan *et al*, 2009). Toujours selon Pan *et al* (2009), en nourrissant des souris pendant 14 jours avec du GOS la concentration retrouvée dans les selles en acétate passe de 30.08 à 45.97 μ mol/g, la concentration en acide propionique passe de 7.43 à 8.82 μ mol/g et la concentration en butyrate passe de 2.59 à 6.02 μ mol/g. Les concentrations sont exprimées en μ M car ce sont des concentrations issues de selles et comme dit plus haut 95% des SCFAs sont absorbées

par la muqueuse intestinale et ne se retrouve pas dans les selles. Mais en même temps la population bactérienne augmente également notamment chez Lactobacilles dont la population passe de 7.6 à 9.0 log(ufc/g) de selles humides et la population des Bifidobactéries passe de 5.8 à 6.9 log(ufc/g) de selles humides. Donc l'augmentation de la concentration en acide est liée à l'augmentation de la population de ces bactéries. Au temps (TSN) la population de Bifidobactéries était de 10.6 log(ufc/ml) alors que au temps (TS) elle était de 9.1 log(ufc/ml) en moyenne. Ce qui veut dire que, même avec une augmentation en Bifidobactéries plus grande la concentration en acide reste tout de même assez basse. Une explication possible à ce résultat est que d'autres bactéries présentes dans le fermentateur aient consommé l'acide acétique produit. Des études montrent en effet des mécanismes de « cross-feeding » c'est à dire qu'une bactérie se nourrit de ce qu'une autre a produit lors d'une fermentation (Rios-Covian *et al*, 2016). Certaines bactéries tels que *Faecalibacterium prausnitzii* et *Roseburia sp.* consomment de l'acétate et forment du butyrate (Rios-Covian *et al*, 2016). D'autres études in vitro ont montrées que l'acétate produit par *Bifidobacterium* lors d'un développement en présence d'oligofructose, qui est également un prébiotique, est consommé par les membres du genre *Roseburia*, *Eubacterium* et *Anaeroestipes* (Ducan *et al.*, 2004). Au temps (TSN) la concentration du butyrate est de 1.4mM alors que la concentration moyenne au temps (TS) est de 1.2mM. Cette hypothèse est donc que peu démontrable.

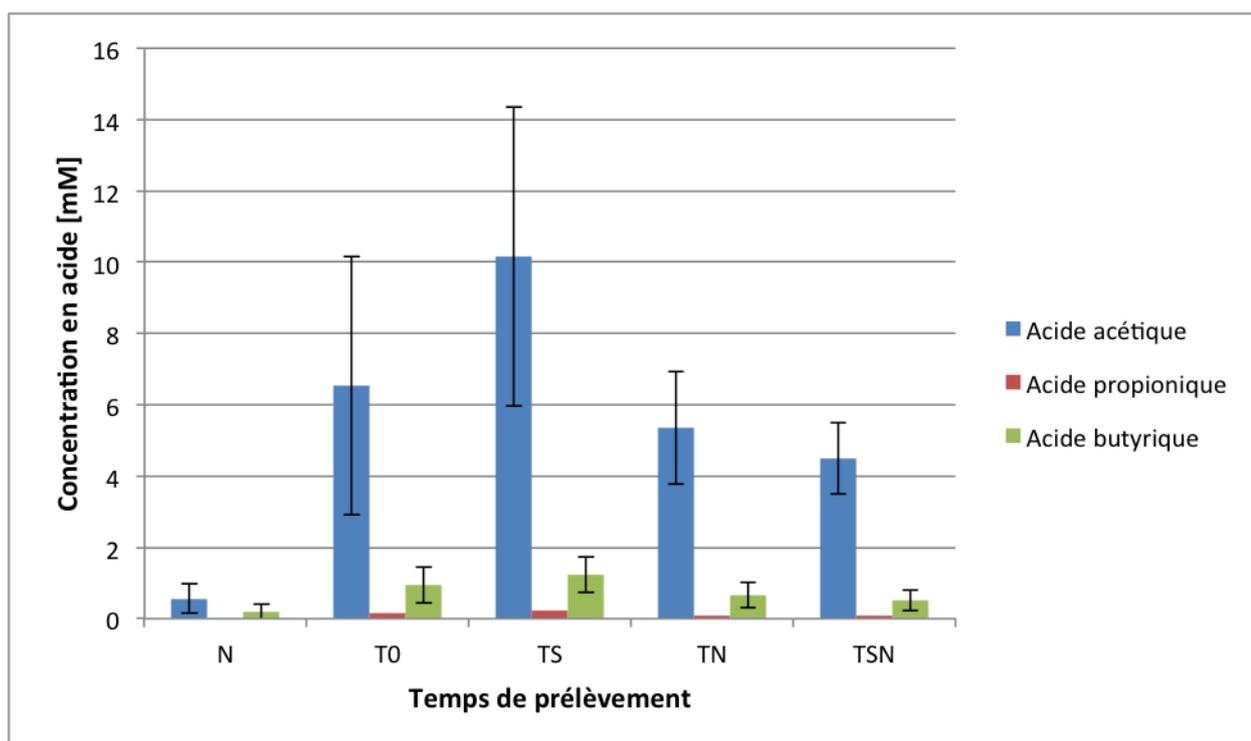


Figure 13 : Evolution de la concentration en acide acétique, propionique et butyrique dans le récipient de fermentation 1 en fonction du temps de prélèvement lors de la digestion du P-GOS.

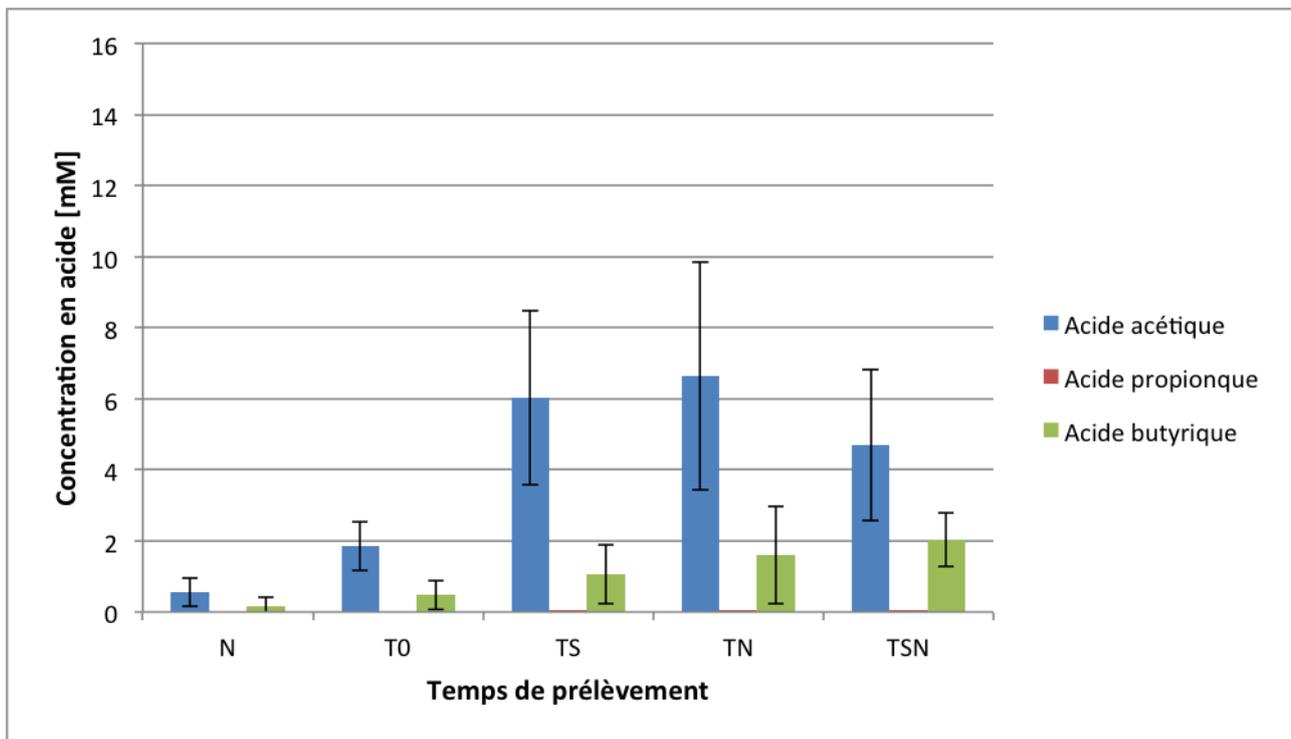


Figure 14 : Evolution de la concentration en acide acétique, propionique et butyrique dans le récipient de fermentation 2 en fonction du temps de prélèvement lors de la digestion du P-GOS.

Les figures 14 et 15 correspondent à l'évolution des métabolites issus de la fermentation du P-GOS. Le graphique 14 correspond à l'évolution de la concentration en acide acétique, propionique et butyrique dans le fermentateur 1. Comme pour les résultats obtenus et représentés dans les graphiques 12 et 13, il n'est pas possible de suivre l'évolution de la concentration en acide propionique. Il peut cependant être observé que dans le fermentateur 1 les acides acétiques et butyrique passant respectivement de 10.2 +/- 4.2 mM au temps (TS) à 4.5 +/- 1.0 mM au temps (TSN) et de 1.2 +/- 0.5 mM à 0.5 +/- 0.3 mM. La diminution est peu éloquent due aux écart-type très larges. On observe également que dans les fermentateurs 2, les concentrations en acide sont globalement plus faibles que dans les fermentateurs 1, c'est également ce qui se passe dans le colon puisque la concentration en acide est la plus haute dans le colon ascendant et diminue progressivement le long du colon descendant. On le remarque notamment avec le pH qui est plus bas dans le colon ascendant, environ pH=5.5, alors qu'il est de pH=6.7 dans le colon descendant, cette différence est due à la production d'acide (Tannock, 2017). Toujours dans le fermentateur 2, la concentration la plus haute en acide acétique se trouve au temps (TN), ceci est une différence avec la digestion du β -GOS puisque dans le fermentateur 2, la concentration maximale se trouve toujours au temps (TS).

Lors de ces analyses plusieurs problèmes sont survenus. Tout d'abord la concentration du mélange d'acide utilisé pour les standards n'était pas assez grande sachant que la solution devait au minimum être diluée 4 fois pour se trouver dans les mêmes conditions de préparation que les échantillons. La concentration du standard le plus élevé était de 2.5mM alors que certains échantillons avaient une concentration en acide acétique de plus de 14mM. Les résultats ont tout de même été analysés car les courbes de calibrations possédaient des R^2 de 0.99 mais sans savoir jusqu'à quelle concentration la relation entre l'aire et la concentration restait linéaire.

La détermination de la concentration en acide lactique n'a pas pu être déterminée à l'aide de cette méthode GC car il a été mis en évidence dans une analyse que le pic correspondant au standard interne sortait au même moment que le pic correspondant à l'acide lactique. Cette mise en évidence a été réalisée de la manière suivante, ne voyant pas sortir le pic de l'acide lactique, deux solutions d'acide lactique à une concentration de 2.5mM ont été préparées. La première contenait le standard interne et l'autre était simplement diluée dans les même proportions mais avec de l'acétonitrile. Et il a pu être observé que l'acide lactique et le standard interne possédait le même temps de rétention c'est pour cela que la quantification de l'acide lactique n'a pas pu être déterminée.

Pour l'analyse des SCFAs d'autres méthodes sont disponibles, comme par exemple celle de Rodriguez-Colinas *et al.* (2013) qui utilise l'HPLC pour la quantification des acides. Son étude montre que lorsque la population des bifidobactéries augmente, la concentration en acétate dans le milieu augmente également.

L'acétate, le butyrate et le propionate peuvent aussi être analysés par H-RMN comme dans l'étude de Grimaldi *et al.* (2017) qui a également traité sur in fermentation in vitro du β -GOS.

4. Conclusion

Le but de ce travail était de déterminer les équivalences entre les β -GOS, déjà utilisés dans les poudre de lait premier âge et issu de l'hydrolyse du lactose et les P-GOS issu du pois jaune. C'est à l'aide des deux hypothèses posées que la problématique a pu être traitée. Il est démontré dans plusieurs études sur le β -GOS que l'ajout de celui-ci dans la l'alimentation permet de stimuler la croissance des bifidobactéries et des lactobacilles. Cette stimulation entraîne également la production d'acide acétique, propionique et butyrique dans le colon. Le dénombrement bactérien sur les milieux sélectifs a permis d'observer l'évolution de la population de ces bactéries durant la digestion du P-GOS et il a été observé que la population des bifidobactéries augmentait de 0.5 log dans le récipient 1 et de 0.8 log dans le récipient 2. La population des lactobacilles quant à elle n'a pas évoluée. La production en acide n'a pas non plus augmenté. Ces résultats seraient liés au fait que dès le départ la population de ces bactéries était excellente, la flore du sujet était équilibrée donc l'ajout du complément P-GOS n'a apporté aucun changement à cette flore. Le même résultat a été observé lors de la digestion du β -GOS.

Deuxièmement, c'est lors d'une flore non équilibrée, qui possède une dysbiose que les effets du complément P-GOS ont été observés. Lors de la digestion du lait la population en Bifidobactéries a chuté à moins de 10^6 ufc/ml et après l'ajout du P-GOS la population est remontée à 10^8 ufc/ml. Ce phénomène a également été observé avec l'ajout du β -GOS lors d'une dysbiose où la population en Bifidobactéries a chuté à $3.2 \cdot 10^6$ ufc/ml et est remontée à $2.5 \cdot 10^{10}$ ufc/ml.

Ces résultats ont permis de mettre en évidence la similitude des effets des compléments β -GOS et P-GOS sur le microbiote du sujet.

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

5. Perspectives

L'étude réalisée n'a traité que sur le microbiote d'un seul sujet et seulement trois essais ont été réalisés pour la digestion du complément P-GOS. Afin d'approfondir et de confirmer les premiers résultats obtenus, il serait judicieux de réaliser les essais sur plusieurs donneurs et de réaliser au moins cinq essais pour la digestion du P-GOS.

Pour finir il a été montré dans ce travail que l'analyse des métabolites comportait des points à améliorer afin de pouvoir traiter les résultats. Une méthode plus robuste pour l'analyse des acides organiques en solution aqueuse permettrait d'assurer des résultats plus exploitables.

6. Remerciements

Par ces mots, je voudrais exprimer mes remerciements aux personnes qui m'ont épaulée, soutenue et conseillée durant ces semaines de travail de diplôme. Tout d'abord j'adresse mes remerciements à M. Wolfram Brück, professeur à la HES-SO // Valais – Wallis, pour son suivi et son expertise. Un grand merci à Bruno, Chantale et Martine pour leurs conseils et leur aide. Merci encore à Pascal qui m'a grandement aidé pour la compréhension et la pratique de la chromatographie. Et pour finir, merci à Percevent qui répondait toujours présent lorsque j'ai eu besoin d'aide.

7. Littérature

Adlerberth I (1999), Establishment of a normal intestinal microflora in the newborn infant, Nestlé Nutrition Workshop Series, 42: 63-78

Ahmed M, Prasad J, Gill H, Stevenson L, Gopal P (2007), Impact of consumption of different levels of *Bifobacterium lactis* HN019 on the intestinal microflora of elderly human subjects, J Nutr Health Aging, 11(1) : 26-31

Beerens H (1991), Detection of Bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent, Applied and Environmental Microbiology, 2418-2419

Brück W (2017), Human Gut Model System: user guide 1.0

Caffarelli C, Baldi F, Bendandi B, Calzone L, Marani M, Pasquinelli P (2010), Cow's milk protein allergy in children : a practical guide, Ital J Pediatr, 36:5

Chen R.M, Wu J.J, Lee S.C, Huang A.H, Wu H.M (1999), Increase of intestinal *Bifidobacterium* and suppression of coliform bacteria with short-term yogurt ingestion, J Dairy Sci. 82(11) : 2308-2314

Ducan SH, Holtrop G, Lobley GE, Calder AG, Stewart CS, Flint HJ (2004), Contribution of acetate to butyrate formation by human fecal bacteria, BR J Nutr., 91(6) :915-23

Ferraris L, Aires J, Waligora-Dupriet AJ, Butel MJ (2010), New selective medium for selection of bifidobacteria from human feces, Aerobe 16:469-471

Francavilla R, Calasso M, Calace L, Siragusa S, Ndagijimana M, Vernocchi P, Brunetti L, Mancino G, Tedeschi G, Guerzoni E, Indrio F, Laghi L, Miniello VL, Gobbetti M, De Angelis M (2012), Effect of lactose on gut microbiota and metabolome of infants with cow's milk allergy, Pediatr Allergy Immunol., 23(5):420-7

Fukuda S, Toh H, Taylor TD, Ohno H, Hattori M (2012), Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters, Gut Microbes, 3(5):449-54

Gibson G, Probert P, Van Loo J, Rastall R, Roberfroid B (2004), Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics, Nutrition Research Reviews, 17:259-275

- Gibson G, Wang X (1994), Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria, *J Appl Bacteriol*, 77(4):412-20
- Grimaldi R, Cela D, Swann JR, Vulevic J, Gibson GR, Tzortzis G (2017), In vitro fermentation of B-GOS: impact on faecal bacterial populations and metabolic activity in autistic and non-autistic children, *FEMS Microbiol Ecol*, 93(2):fiw233
- Gritz E and Bhandari V (2015), The human neonatal gut microbiome: a brief review, *frontiers in pediatrics*
- HES-SO Valais SO8105 (2008), Dénombrement des Enterobacteriaceae ISO 17025
- HES-SO Valais SO8109 (2009), Lactobacilles et Streptocoques thermophiles ISO 17025
- Jackson MS, Bird AR, McOrist AL (2002), Comparaison of two selective media for the detection and enumeration of *Lactobacilli* in human faeces, *Journal of Microbiological Methods*, 51:313-321
- Macfarlane G.T, Steed H, Macfarlane S (2008), Bacterial metabolism and health related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics, *Journal of Applied Microbiology*, 104(2):305-44
- Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Folsch UR, *et al.*(2004), Reduction in diversity of the colon mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease, *Gut*, 53:685-693
- Pan X, Chen F, Wu T, Tang H, Zhao Z (2009), Prebiotic oligosaccharides change the concentrations of short-chain fatty acids and the microbial population of mouse bowel, *J Zhejiang Univ Sci B*, 10(4) :258-263
- Park AR, Oh DK (2010), Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81 : 1279–1286.
- Rios-Covian D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilan C, Salazar N (2016), Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health, *Front Microbiol.*, 7 :185
- Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L (2016), Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut, *Front Microbiol*, 7:979
- Rodriguez-Colinas D, Kolida S, Baram M, Ballesteros AO, Rastall RA, Plou FJ (2013), Analysis of fermentation selectivity of purified galacto-oligosaccharides by in vitro human faecal fermentation, *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(13):5743-52
- Roediger WE (1980), Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man, *Gut*, 21:793-798
- Saikh MAA (2014), Dysbiosis, probiotics, synbiotics and human health, *Austin J Nutri Food Sci*, 2(8):1044
- Sako T, Matsumoto K, Tanaka R (1999), Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides, *International Dairy Journal*, 9 :69-80.

Souza Martins Meyer T, Samir Melim Miguel A, Rodríguez Fernández DE, Dellamora Ortiz GM (2015), *Biotechnological Production of Oligosaccharides — Applications in the Food Industry*, Food Production and Industry.

Tannock G.W. (2017), *Understanding the gut microbiota*, Wiley

Thompson-Chagoyan OC, Fallani M, Maldonado J, Vietes JM, Khanna S, Edwards C, Doré J, Gil A (2011), Faecal microbiota and short-chain fatty acid levels in faeces from infants with cow's milk protein allergy, *Int Arch Allergy Immunol.*, 156(3):325-32

Thompson-Chagoyan OC, Vieites JM, Maldonado J, Edwards C, Gil A (2010), Changes in faecal microbiota of infants with cow's milk protein allergy- a Spanish prospective case-control 6-month follow-up study, *Pediatr Allergy Immunol*, 21 :e394-e400

Vandenplas Y, Zakharova I, Dmitrieva Y (2015), Oligosaccharides in infant formula: more evidence to validate the role of prebiotics, *British Journal of Nutrition*, 113:1339-1344

Vitaliti G, Cimino C, Coco A, Pratico AD, Lionetti E (2012), The immunopathogenesis of cow's milk protein allergy (CMPA), *Ital J Pediatr*, 38:35.

Wang L, Guo HH, Huang S, Feng CL, Han YX, Jiang JD (2017), Comprehensive evaluation of SCFA production in the intestinal bacteria regulated by berberine using gas-chromatography combined with polymerase chain reaction, *Journal of Chromatography B*, 1057 :70-80

8. Liste des figures

Figure 1 : Exemples de structure de galacto-oligosaccharides : en haut le 4-galactosyl lactose et en bas le 6-galactosyl lactose sont représentés, montrant les différentes liaisons galactosyl usuelles. (Souza Martins Meyer, 2015)	6
Figure 2 : Photographie représentant le modèle intestinal humain infantile mis en place pour la digestion in vitro.	9
Figure 3: Photographie représentant la partie de l'alimentation du modèle intestinal humain infantile	10
Figure 4 : Photographie représentant la partie de fermentation du modèle	11
Figure 5: Schéma de l'installation du modèle intestinal infantile (Brück, 2017).....	12
Figure 6 : Evolution de la population des Bifidobactéries, Lactobacilles, germes totaux anaérobies et coliformes dans le récipient de fermentation 1 en fonction du temps de prélèvement lors de la digestion du β -GOS.	21
Figure 7 : Evolution de la population des Bifidobactéries, Lactobacilles, germes totaux anaérobies et coliformes dans le récipient de fermentation 2 en fonction du temps de prélèvement lors de la digestion du β -GOS.	22
Figure 8 : Evolution de la population des Bifidobactéries, Lactobacilles, germes totaux anaérobies et coliformes dans le récipient de fermentation 1 en fonction du temps de prélèvement lors de la digestion du P-GOS.	24
Figure 9 : Evolution de la population des Bifidobactéries, Lactobacilles, germes totaux anaérobies et coliformes dans le récipient de fermentation 2 en fonction du temps de prélèvement lors de la digestion du P-GOS.	25
Figure 10 : Evolution de la population des Bifidobactéries dans le récipient de fermentation 1 en fonction du temps de prélèvement lors de la digestion du P-GOS (en bleu) et du β -GOS (en rouge).	26
Figure 11 : Evolution de la concentration en acide acétique, propionique et butyrique dans le récipient de fermentation 1 en fonction du temps de prélèvement lors de la digestion du β -GOS.	28
Figure 12 : Evolution de la concentration en acide acétique, propionique et butyrique dans le récipient de fermentation 2 en fonction du temps de prélèvement lors de la digestion du β -GOS.	29
Figure 13 : Evolution de la concentration en acide acétique, propionique et butyrique dans le récipient de fermentation 1 en fonction du temps de prélèvement lors de la digestion du P-GOS.	30
Figure 14 : Evolution de la concentration en acide acétique, propionique et butyrique dans le récipient de fermentation 2 en fonction du temps de prélèvement lors de la digestion du P-GOS.	31

9. Annexes

Annexe I : Protocole de mise en marche de l'appareil

- Installer les récipients complets sur les agitateurs.
- Placer de la paraffine sur les trous où seront placées les sondes.
- Brancher l'arrivée d'eau sur l'emplacement du bas du récipient 1 et brancher le tuyau de jonction sur l'emplacement du haut et sur l'emplacement du bas du récipient 2.
- Brancher le retour d'eau sur l'emplacement du haut du récipient 2.
- Compléter l'eau dans le bain marie jusqu'au maximum et enclencher le afin de remplir les récipients.
- Sur le récipient 1 en haut, placer le tuyau de gauche, dans la première pompe puis dans la bouteille d'acide.
- Faire de même avec le tuyau de droite et le placer dans la base.
- Répéter les deux opérations ci-dessus pour le récipient 2.
- Placer de la paraffine sur le dessus des bouteilles.
- Calibrer les électrodes à l'aide de tampon à pH=7 et pH=4
- Remplir les récipients en milieu et enclencher l'injection d'azote.
- Ensemencer avec l'inoculum.

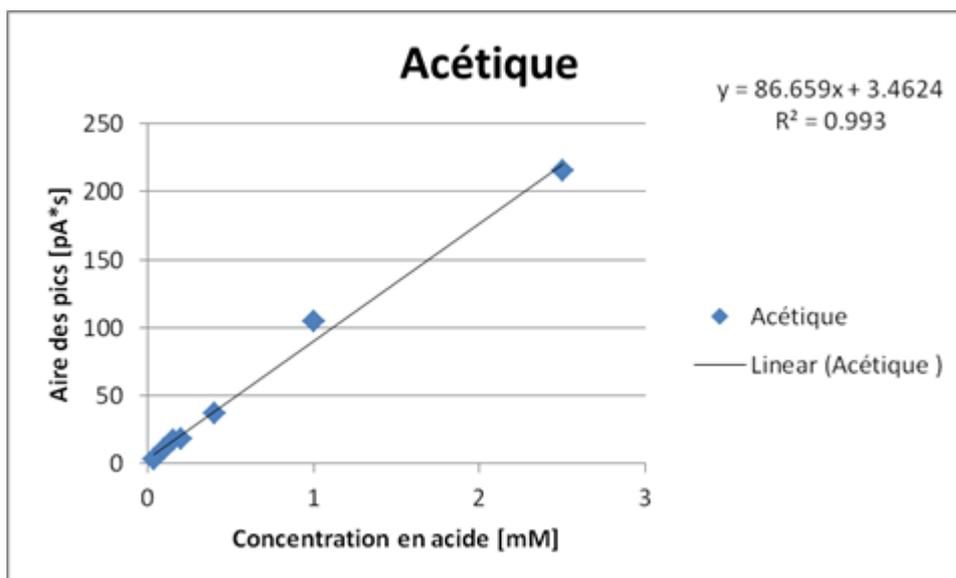
Annexe II : Protocole de changement de milieu

- Arrêter la pompe.
- Clamper la sortie d'alimentation du milieu avant la jonction.
- Détacher l'entrée et la sortie d'air à partir des filtres.
- Mettre de nouveaux filtres.
- Placer le nouveau milieu sur l'agitateur.
- Réenclencher la pompe.
- Vérifier bien que l'arrivée d'azote dans le milieu soit fermée par un clapet.

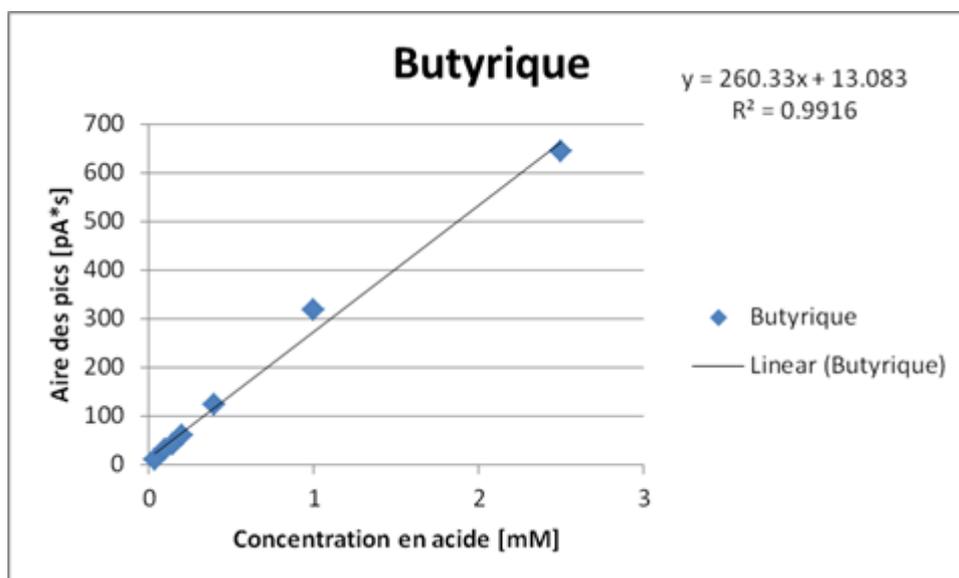
Annexe III : Protocole de l'arrêt de l'appareil pour la stérilisation

- Eteindre toute l'installation
- Débrancher le tout à partir des filtres. Les jeter.
- Retirer les sondes pH, les mettre dans une solution de nettoyage quelques minutes, les rincer et les placer dans la solution de KCl 3M.
- Mettre de la paraffine pour boucher les trous. Ne pas oublier de l'enlever avant de mettre les récipients à l'autoclave.
- Retirer les tuyaux des pompes à pH.
- En vérifiant qu'il n'y ait plus de produit dans les tuyaux, fixés les à l'aide d'un ruban indicateur de stérilisation pour autoclave sur le récipient.
- Clamper l'arrivée de produit avant la jonction.
- Ouvrir le tuyau d'alimentation après la jonction et laisser couler le surplus du tuyau dans un bécher.
- Fixer le tuyau d'alimentation comme précédemment les tuyaux d'acide et de base.
- Retirer la sortie d'eau du récipient 2 et vider d'eau dans un bassin.
- Clamper le tuyau de liaison d'eau entre les deux récipients.
- Ouvrir l'entrée de l'eau du récipient 2 et vider le reste d'eau du récipient et du tuyau.
- Déclamper l'arrivée d'eau et laisser s'écouler l'eau du récipient 1.
- Retirer le tuyau de jonction et ouvrir l'entrée d'eau du récipient 1.
- En faisant particulièrement attention, pencher le récipient 1 afin que le produit qu'il contient s'écoule dans le récipient 2.
- Faire de même avec le récipient 2 afin que le produit s'écoule dans la poubelle.
- Retirer, au niveau du récipient 2, le tuyau qui le lie à la poubelle puis bien avec du ruban adhésif fixer le bout du tuyau sur la bouteille d'azote.
- Mettre le tout à l'autoclave afin de stériliser l'installation à 121°C pendant 40 minutes.
- Attention les sondes pH ne doivent pas être placées dans l'autoclave.

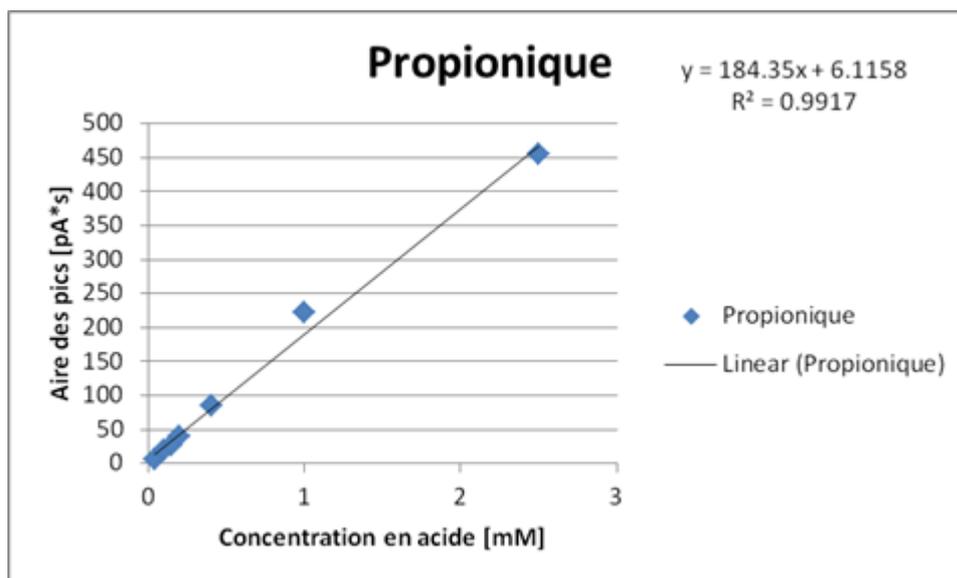
Annexe IV : Courbe de calibration des acides pour la GC



Annexe V : Courbe de calibration des acides pour la GC



Annexe VI : Courbe de calibration des acides pour la GC



Annexe VII : Table des abréviations

SCFAs	Acide gras à courtes chaînes
GOS	Galacto-oligosaccharide
GC	Gaz chromatographie
mM	Milimolaire (mmol/l)
μ M	Micromolaire
HCl	Acide chlorydrique
NaOH	Hydroxyde de sodium
HPLC	Haute performance liquide chromatographie
ref	Référence/ numéro de production

Annexe VIII : Méthode GC

Injection Source and Location

Injection Source: GC Injector

Injection Location: Front

=====

6890 GC METHOD

=====

OVEN

Initial temp: 40 'C (On)

Maximum temp: 240 'C

Initial time: 0.00 min

Equilibration time: 0.50 min

Ramps:

#	Rate	Final temp	Final time
1	5.00	100	0.00
2	10.00	230	5.00
3	0.0(Off)		

Post temp: 0 'C

Post time: 0.00 min

Run time: 30.00 min

FRONT INLET (SPLIT/SPLITLESS)

BACK INLET (UNKNOWN)

Mode: Splitless

Initial temp: 250 'C (On)

Pressure: 157.0 kPa (On)

Purge flow: 10.4 mL/min

Purge time: 0.00 min

Total flow: 14.4 mL/min

Gas saver: On

Saver flow: 20.0 mL/min

Saver time: 2.00 min

Gas type: Helium

COLUMN 1

COLUMN 2

Capillary Column

(not installed)

Model Number: Zebron 7HG-G009-11

-FFAP

Max temperature: 250 'C

Nominal length: 30.0 m

Nominal diameter: 250.00 um

Nominal film thickness: 25.00 um

Mode: constant flow

Initial flow: 1.0 mL/min

Nominal init pressure: 157.0 kPa

Average velocity: 31 cm/sec

Inlet: Front Inlet

Outlet: Front Detector

Outlet pressure: ambient

FRONT DETECTOR (FID)

BACK DETECTOR (NO DET)

Temperature: 320 'C (On)

Hydrogen flow: 45.0 mL/min (On)

Air flow: 450.0 mL/min (On)

Mode: Constant column+makeup flow

Combined flow: 45.0 mL/min

Makeup flow: On

Makeup Gas Type: Nitrogen

Flame: On

method: D:\CHEM32\1\METHODS\TANJA_FFAP.M
Modified on: 27.06.2017 at 14:42:15
Electrometer: On
Lit offset: 2.0

SIGNAL 1

Data rate: 20 Hz
Type: front detector
Save Data: On
Zero: 0.0 (Off)
Range: 0
Fast Peaks: Off
Attenuation: 0

SIGNAL 2

Data rate: 20 Hz
Type: front detector
Save Data: Off
Zero: 0.0 (Off)
Range: 0
Fast Peaks: Off
Attenuation: 0

COLUMN COMP 1

Derive from front detector

COLUMN COMP 2

Derive from front detector

POST RUN

Post Time: 0.00 min

TIME TABLE

Time	Specifier	Parameter & Setpoint
------	-----------	----------------------

GC Injector

Front Injector:

Sample Washes	3
Sample Pumps	5
Injection Volume	1.00 microliters
Syringe Size	10.0 microliters
PreInj Solvent A Washes	3
PreInj Solvent B Washes	0
PostInj Solvent A Washes	5
PostInj Solvent B Washes	0
Viscosity Delay	0 seconds
Plunger Speed	Fast
PreInjection Dwell	0.00 minutes
PostInjection Dwell	0.00 minutes

Back Injector:

No parameters specified