

- ECOLOGIE MICROBIENNE INTESTINALE -

(Equipe 1, coordonnée par Philippe POCHART)

1 Contexte, enjeux et objectif général du projet

Longtemps négligé, l'importance de l'écosystème microbien intestinal dans certains processus physiologiques et physiopathologiques est aujourd'hui largement reconnue.

Le premier point à avoir été clairement démontré est la capacité que possède cet écosystème à s'opposer à la colonisation de l'intestin par des micro-organismes exogènes. Cette propriété, qualifiée d'effet de barrière ou de résistance à la colonisation est dévolue principalement aux populations bactériennes anaérobies strictes dominantes (Van der Waaij *et al.* 1971, Ducluzeau *et al.* 1977, Savage 1977).

Aujourd'hui, on sait que cet écosystème intervient à bien d'autres niveaux sur les fonctions intestinales. C'est ainsi, qu'en dégradant les glucides alimentaires non absorbables et osmotiquement actifs en acides organiques rapidement absorbés par la muqueuse colique, il joue un rôle de récupération énergétique et de « tampon » vis à vis de l'apparition de diarrhées (Hammer *et al.* 1989).

Récemment, il a été clairement démontré qu'il influence directement certains aspects de la fonctionnalité de la muqueuse intestinale tels que l'expression de gènes, la perméabilité, le niveau de stress oxydatif et des défenses anti-oxydantes et l'inflammation (Garcia-Lafuente *et al.* 2001, Hooper *et al.* 2001, Stappenbeck *et al.* 2002, Hooper *et al.* 2004, Pélissier *et al.* sous presse). Si aucun lien direct n'a été mis en évidence entre une espèce particulière de micro-organismes et le contrôle de certaines de ces fonctionnalités, on connaît en revanche assez bien le rôle joué par certains des métabolites sur la muqueuse, l'exemple le mieux étudié étant celui du butyrate (Blottière *et al.* 2003, Mariadason *et al.* 1997, Venkatraman *et al.* 2000, Kinoshita *et al.* 2002).

Par conséquent, toute modification de l'écosystème est susceptible d'induire des altérations au niveau de la muqueuse de l'intestin. C'est ainsi que chez les rongeurs, il a été montré que des perturbations de la flore induites par exemple par l'administration d'antibiotiques sont susceptibles d'altérer la maturation de la muqueuse intestinale (Nanthakumar *et al.* 2003, Schumann *et al.* 2005).

L'hypothèse générale du projet de l'équipe est que certaines modifications de l'écosystème induites par des facteurs exogènes peuvent altérer la fonctionnalité de la muqueuse intestinale.

Pour évaluer cette hypothèse générale, l'équipe Ecologie Microbienne Intestinale s'est fixé quatre objectifs :

1. Participer à l'élaboration des connaissances sur le fonctionnement de l'écosystème, particulièrement lors de phases importantes telles que la colonisation et la maturation.
2. Développer (en collaboration avec l'équipe 2) des outils de modélisation mathématique applicables aux écosystèmes microbiens intestinaux
3. Caractériser les modifications induites par certains facteurs alimentaires, l'administration d'antibiotiques ou de micro-organismes vivants
4. En collaboration étroite avec les équipes 4 et 5, évaluer l'impact des modifications de l'écosystème sur certaines fonctions de la muqueuse intestinale en particulier les paramètres du stress oxydatif et de la défense anti-oxydante, la perméabilité et l'inflammation intestinale.

Durant la période 2007-2010, trois grands thèmes seront traités par cette équipe :

- **La maturation de l'écosystème microbien colique : rôle de l'alimentation**
- **Les populations sulfato-réductrices de l'écosystème microbien colique**
- **L'impact de l'administration d'antibiotiques sur l'écosystème microbien colique**

D'autres perturbations importantes de l'écosystème microbien intestinal peuvent se rencontrer, c'est en particulier le cas de celles consécutives aux diarrhées aiguës. Cette thématique fait actuellement l'objet d'une collaboration entre l'EA 3199 et l'International Centre for Diarrhoeal Disease Research Center Bangladesh (ICDDR) de Dhakka avec lequel nous travaillons sur les perturbations de l'écosystème microbien intestinal au cours du choléra chez l'enfant sévèrement malnutri (travail de thèse doctorale de Monira S, en co-tutelle). Ce travail s'intéresse tout particulièrement au temps de retour à l'équilibre de l'écosystème en fonction du type d'apport glucidique (glucose, amidon résistant, riz) présent dans les différentes solutions de réhydratation utilisées (Monira *et al.* 2003, Alam *et al.* soumis, Monira *et al.* soumis).

2 Maturation de l'écosystème microbien colique : rôle de l'alimentation

Alors que chez l'adulte sain, la composition et l'équilibre de l'écosystème microbien intestinal sont considérés comme définitifs et stables, en dehors de toute perturbation majeure comme celle induite par la prise d'antibiotiques, chez l'enfant cet écosystème se constitue par complexification croissante au cours des premières années de la vie (Zoentendal *et al.* 1998, Veereman-Wauters *et al.* 2005).

Dans ce processus de maturation, deux étapes sont tout particulièrement importantes. Il s'agit d'une part de la phase de colonisation, d'autre part du sevrage. La phase de colonisation est étudiée par notre équipe chez le nouveau-né prématuré car elle revêt dans cette situation un caractère particulièrement important compte tenu du contexte d'immatunité de l'intestin. Immatunité associée à une utilisation quasi-systématique d'antibiotiques et à la présence, dans l'environnement hospitalier, de bactéries pathogènes multi-résistantes susceptibles de coloniser l'intestin de ces enfants. Le sevrage quant à lui entraîne des modifications profondes dans le régime alimentaire de l'enfant et par voie de conséquence des substrats exogènes disponibles pour l'écosystème microbien intestinal. Or Selon le mode d'alimentation adopté, l'activité fermentaire de cet écosystème peut-être modifiée de façon considérable durant cette période (Midtvedt *et al.* 1992, Parrett *et al.* 1997, Wolin *et al.* 1998, Heavey *et al.* 2003). Certains auteurs ont suggérés que ces modifications de l'écosystème microbien intestinal qui se produisent lors du sevrage pourraient être responsables en partie de l'augmentation du nombre de diarrhées que l'on observe durant cette période (revue par Foote *et al.* 2003).

Dans ces deux situations, l'impact d'un apport en prébiotique, défini comme toute « substance non-digestible qui induit un effet physiologique bénéfique pour l'hôte en stimulant de façon spécifique la croissance et/ou l'activité d'un nombre limité de populations bactériennes déjà établies dans le côlon » (Gibson & Roberfroid 1995), sera envisagé.

A- Caractérisation et évolution de l'écosystème microbien intestinal de nouveau-né prématuré

La prématurité en France représente environ 7% des naissances. L'amélioration des soins en néonatalogie au cours des trois dernières décades a permis une augmentation du taux de survie des enfants avec un faible poids de naissance mais la morbidité n'a pas significativement changé. L'entérococolite ulcéro-nécrosante, la colonisation de l'intestin par des germes multi-résistants et les infections nosocomiales concernent entre 10 et 30% des prématurés nés à un âge gestationnel de moins de 30 semaines d'aménorrhée. Responsables d'une augmentation significative non seulement du coût de la prise en charge mais aussi de la mortalité et des séquelles de la prématurité (Neu *et al.* 1999, Magne *et al.* 2005, Lin *et al.* 2006), leur prévention représente une action de santé publique essentielle dans le domaine de la périnatalogie.

Si la chronologie d'établissement de la flore intestinale chez les nouveau-nés prématurés est encore très mal connue, il est en revanche bien établi que celle-ci revêt un caractère particulièrement « atypique » comparée à ce qui est observé chez l'enfant né à terme. Nombreux sont les arguments qui suggèrent que cette flore « atypique » est associée à une augmentation de la morbidité digestive, nutritionnelle et infectieuse des nouveau-nés prématurés (Peter *et al.* 1999).

Un des faits notables est l'implantation très retardée de la flore anaérobie, en particulier du genre *Bifidobacterium* (Blakey *et al.* 1982, Stark *et al.* 1982, Rotimi *et al.* 1985, Sakata *et al.* 1985, Gewolb *et al.* 1999). Or, le rôle protecteur d'une colonisation précoce et abondante par des bactéries du genre *Bifidobacterium* a été suggéré à partir d'études sur des modèles animaux d'entérococolite ulcéro-nécrosante (Caplan *et al.* 1999, Catala *et al.* 1999). A ce défaut d'implantation de la flore anaérobie, il faut ajouter une diversité souvent extrêmement réduite de l'écosystème, l'intestin de certains enfants n'étant colonisés que par une seule espèce bactérienne (*Staphylococcus sp.*, *Enterococcus sp.*,...), comme l'ont montré récemment des études utilisant des approches moléculaires (Schwiertz *et al.* 2003, Magne *et al.* 2006).

L'une des approches visant à diminuer la morbidité digestive et nutritionnelle chez le nouveau-né prématuré est d'intervenir sur la colonisation et/ou la maturation de la flore intestinale par l'intermédiaire de l'alimentation. Dans ce contexte, la supplémentation naturelle en oligosides et transoligosides obtenue via la fermentation du lactose par certaines souches de *Bifidobacterium* et de *Streptococcus* a été proposée, les bactéries étant ensuite détruites par traitement thermique. En effet, ces oligosides possèderaient des propriétés prébiotiques, en particulier vis à vis des populations bactériennes appartenant au genre *Bifidobacterium* (Romond *et al.* 1998).

Cette approche a permis d'obtenir des résultats intéressants chez l'enfant né à terme, l'adaptation de ce type de formule aux nouveau-nés prématurés doit donc être considérée avec beaucoup d'intérêt (Goulet *et al.* 2001, Kremp *et al.* 2001). L'objectif est d'obtenir une colonisation plus précoce par une flore anaérobie plus diversifiée.

a- Hypothèse

L'utilisation d'un lait enrichi par fermentation en oligosides et transoligosides dans l'alimentation du nouveau-né prématuré accélère la colonisation par les populations anaérobies et augmente la diversité de l'écosystème microbien intestinal.

b- Méthodologies envisagées

Deux groupes d'enfants seront constitués, l'un recevant le lait supplémenté et l'autre une formule adaptée pour prématuré. Un échantillon de selles prélevé entre le 9^e et le 13^e jour de vie sera analysé par PCR-TTGE afin de déterminer le profil global de la flore fécale dominante. La

PCR permettra d'amplifier les gènes codant l'ARNr 16S de toutes les bactéries présentes dans l'écosystème. Le nombre des bandes (indice de la diversité) sera analysé et les profils totaux comparés par utilisation de l'indice de Dice afin d'observer si le lait supplémenté a un impact sur la microflore digestive. Enfin, les bandes les plus fréquentes seront recherchées et une analyse quantitative et qualitative des populations appartenant au genre *Bifidobacterium* sera réalisée (Mangin *et al.* 2006a, Magne *et al.* 2006b).

Les autres paramètres pouvant influencer sur la flore seront eux-aussi pris en compte: âge gestationnel, prise d'antibiotiques, naissance par césarienne ou voie basse.

c- Interactions avec d'autres équipes

Ce travail sera réalisé en collaboration avec les équipes de néonatalogie des professeurs Christophe DUPONT (Hôpital Saint-Vincent de Paul, Paris) et Bertrand LEROUX (Néonatalogie, Unité Alix de Champagne, Reims) et l'équipe de microbiologie de la professeure Marie-Josée BUTEL (EA 4065, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris V) qui prendra en charge l'analyse de l'écosystème par les techniques de culture. Le partenaire industriel (Blédina, Villefranche-sur-Saône) fournira le lait et financera l'étude.

d- Résultats attendus et perspectives

Les enfants prématurés constituent une population à risque. Une formule lactée qui permettrait l'implantation précoce d'une flore plus diversifiée avec notamment une abondance de bifidobactéries, pourrait représenter une avancée notable dans la prise en charge de l'immaturité intestinale de ces enfants.

B- Caractérisation et évolution de l'écosystème microbien intestinal de l'enfant au sevrage

La supplémentation en prébiotiques de l'alimentation de l'enfant au sevrage repose sur le fait (controversé par certains auteurs) que les bactéries considérées comme bénéfiques, en particulier celles appartenant au genre *Bifidobacterium* sont présentes en proportion plus faible dans l'écosystème microbien intestinal des enfants nourris avec des formules lactées, comparés aux enfants nourris au lait maternel (Rinne *et al.* 2005). Ceci est la conséquence des compositions différentes en glucides, les aliments artificiels ne contiennent quasi exclusivement que du lactose alors que plus de 10% des glucides du lait maternel sont constitués d'oligosides indigestibles (Coppa *et al.* 2004). Ceux-ci se retrouvent donc dans le côlon où ils sont fermentés par la flore aboutissant à la production d'acides, ce qui induit une diminution de pH de l'environnement (Delzenne 2003).

Or, il est établi que le lait maternel exerce un effet protecteur vis à vis de certaines pathologies (diarrhées, entérocolites ulcéronécrosantes...), effet protecteur que certains attribuent tout au moins en partie à cet équilibre particulier de la flore intestinale de l'enfant allaité (Mitra *et al.* 1995, Coppa *et al.* 2004).

C'est sur cette base, qu'ont été créées des formules infantiles supplémentées en oligosides neutres tels que les fructo-oligosides (FOS) et les galacto-oligosides (GOS) qui possèdent des propriétés prébiotiques et augmentent les populations de bifidobactéries de l'écosystème microbien intestinal de l'enfant (Moro *et al.*, 2002, Knol *et al.* 2005). Toutefois si dans le lait maternel environ 85 % des oligosides sont des oligosides neutres, les 15 % restant sont constitués d'oligosides acides riches en acides sialiques (Boehm *et al.* 2003).

Il apparaît donc intéressant de tester des suppléments mimant mieux la réalité du lait maternel par adjonction d'oligosides acides. Parmi les candidats retenus, du fait de la possibilité de les obtenir industriellement, on trouve des hydrolysats de pectine qui sont constitués en majorité d'acide galacturonique. Les oligosides acides ainsi obtenus ont démontré une capacité à inhiber *in vitro* l'adhésion de bactéries entéro-pathogènes telles que *E. coli* aux cellules épithéliales de l'intestin (Guggenbichler *et al.*, 1997). Une étude clinique récente a permis également de montrer qu'ils sont parfaitement tolérés (Fanaro *et al.* 2005).

a- Hypothèse

La supplémentation en oligosides neutres et oligosides acides d'une formule infantile permet, au moment du sevrage, de conserver un équilibre des populations bactériennes, en particulier celles du genre *Bifidobacterium* quantitativement et qualitativement comparable à celui observé chez des enfants nourris au lait maternel.

b- Méthodologies envisagées

Dans notre étude, des laits artificiels enrichis avec des oligosides (FOS, GOS et oligosides acides) seront testés sur des enfants au moment du sevrage (allaitement maternel complété avec un lait artificiel). Les enfants seront suivis pendant toute la durée du sevrage et deux mois après l'arrêt du lait maternel. Des échantillons de selles seront collectés tous les 15 jours, pendant la période de sevrage et après l'arrêt complet de l'allaitement maternel. Les principaux groupes bactériens de la flore fécale de ces enfants (genre *Bifidobacterium*, entérobactéries, groupes *Clostridium cocoides*, *Atopobium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus-Enterococcus* et *Faecalibacterium prausnitzii*) seront quantifiés par hybridation *in situ* couplée à la cytométrie en flux, à l'aide de sondes ciblant l'ARN ribosomique (Rigottier-Gois *et al.* 2003)

c- Interactions avec d'autres équipes

Cette étude sera réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le service de pédiatrie du Pr. M. Touhami (CHU d'Oran, Algérie) où les enfants seront inclus. De plus, la partie clinique de cette étude doit permettre de répondre à la question de l'effet de cette supplémentation sur l'incidence des pathologies gastrointestinales au sevrage et de ses relations avec les modifications observées au niveau de l'écosystème microbien intestinal.

d. Résultats attendus et perspectives

La consommation des oligosides FOS et GOS devrait modifier la flore fécale de ces enfants et notamment augmenter la concentration des bifidobactéries. L'ajout des oligosides acides devraient également diminuer le groupe des entérobactéries. Cette étude doit de plus compléter notre connaissance de l'impact de l'arrêt de l'allaitement maternel sur la composition de l'écosystème microbien intestinal de l'enfant.

3 Les bactéries sulfato-réductrices de l'écosystème microbien colique

Les bactéries sulfato-réductrices sont retrouvées dans de très nombreux écosystèmes naturels et sont présentes à des niveaux de population variables dans l'écosystème microbien intestinal de l'homme (Pochart *et al.* 1992, Zinkevich *et al.* 2000). Ces bactéries utilisent le sulfate comme accepteur final d'électrons et produisent des sulfures (H₂S). Certains auteurs ont suggéré que ces sulfures produits dans la lumière intestinale, du fait de leur toxicité, pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie de certaines maladies inflammatoires du tube digestif, en particulier la rectocolite hémorragique (RCH) (Gibson *et al.* 1991, Roediger *et al.* 1997, Ohge *et al.* 2005).

a- Hypothèse

Des modifications des niveaux de population et/ou de l'activité des bactéries sulfato-réductrices de l'écosystème microbien intestinal chez le rat induisent des modifications de la fonctionnalité de la muqueuse intestinale.

b- Méthodologies envisagées

Les modifications seront induites grâce d'une part à une supplémentation en sulfates dans l'eau de boisson (Deplancke *et al.* 2003), d'autre part par administration orale de subsalicylate de bismuth (Fabrizis *et al.* 1998, Ohge *et al.* 2003). Les modifications des populations sulfato-réductrices seront analysées par PCRq et TTGE (Leloup *et al.* 2003, Geets *et al.* 2006). Les paramètres de stress oxydatif et de défenses anti-oxydantes seront mesurés ainsi que la perméabilité de la muqueuse caecale.

c. Interactions avec d'autres équipes

Cette étude sera réalisée en collaboration avec l'équipe interne 4, et avec l'équipe interne 5 qui réalisera un essai clinique sur l'effet de la supplémentation en sulfate par l'eau de boisson chez des sujets adultes sains.

d. Résultats attendus et perspectives

Bien que les populations sulfato-réductrices de l'écosystème microbien intestinal de l'homme représentent une population bactérienne dominante retrouvée chez tous les sujets, et qu'elles aient été mises en cause par certains auteurs dans la RCH, on ne possède que très peu d'informations sur leur écologie, en particulier sur les facteurs exogènes susceptibles de modifier leurs proportions et/ou leur activité. De plus, il n'existe aucune donnée sur l'impact *in vivo* de ces populations sur la muqueuse intestinale. Ce projet est associé à un projet de recherche clinique ce qui nous permettra de valider chez l'homme un certain nombre de résultats obtenus chez le rat.

4 Impact de l'administration d'antibiotiques sur l'écosystème microbien intestinal

Au cours d'un traitement antibiotique, celui-ci va exercer son activité non seulement sur les bactéries présentes au site de l'infection mais également sur l'ensemble des bactéries qui cohabitent avec l'hôte, en particulier dans le tube digestif. L'équilibre de l'écosystème microbien intestinal peut ainsi être rompu sous l'effet de l'activité antibiotique qui parvient dans la lumière intestinale et qui provient de la fraction de la dose administrée qui est excrétée par voie biliaire ou sécrétée par la muqueuse à laquelle s'ajoute en cas d'administration orale, la fraction non absorbée.

Notre hypothèse générale est que l'administration d'antibiotiques, au-delà des conséquences connues (diarrhées, prolifération de *C. difficile*, sélection de souches résistantes), en modifiant profondément les équilibres des différentes populations microbiennes de l'écosystème intestinal induirait des effets au niveau de la muqueuse intestinale qui pourraient avoir des conséquences positives ou négatives sur la muqueuse.

Cette hypothèse n'a jusqu'à présent fait l'objet que de très peu d'études (Schumann *et al.* 2005). Dans notre équipe, nous avons montré que chez l'animal sain, l'administration de métronidazole entraîne une diminution des indicateurs de stress oxydatif au niveau de la muqueuse colique (Pélissier *et al.* sous presse).

A- Effet d'un traitement oral par l'amoxicilline sur la composition des populations fécales du genre *Bifidobacterium* chez l'enfant

On estime qu'à 2 ans, un enfant acquiert une microflore résidente "mature" constituée de nombreuses espèces bactériennes qui vont s'établir et peu évoluer au cours du temps. Cette flore comprend notamment des populations bactériennes appartenant au genre *Bifidobacterium*, populations considérées comme bénéfiques pour la santé de l'hôte. L'amoxicilline qui est un antibiotique très fréquemment prescrit chez l'enfant, est active *in vitro* sur la plupart des souches de bifidobactéries (Moubareck *et al.* 2005). Cependant, peu d'études décrivent les effets de l'amoxicilline sur la flore totale de l'enfant (Brunser *et al.*, 2005).

a. Hypothèse

Notre hypothèse est qu'un traitement usuel par l'amoxicilline chez l'enfant, induit des modifications quantitatives et qualitatives des populations du genre *Bifidobacterium* présentes dans sa microflore fécale.

b. Méthodologies envisagées

Des enfants nés à terme, âgés de 12 à 24 mois, n'étant plus allaités et souffrant de bronchite aiguë pour laquelle un traitement oral par amoxicilline (50 mg/kg/jour en 3 doses) pendant 7 jours a été prescrit seront inclus dans cette étude (n=30). Seront exclus des enfants ayant pris des antibiotiques dans les 4 semaines précédant l'étude, ou bien ceux dont l'état nécessite un traitement d'une durée supérieure à 7 jours. Un groupe contrôle sera constitué par des enfants témoins appariés sur l'âge et le sexe, ne recevant pas d'amoxicilline.

Des échantillons de selles seront collectés stérilement à J0 et à J7 et conservés congelés jusqu'à l'analyse. Deux techniques moléculaires développées au laboratoire seront utilisées: la PCR compétitive (PCRc) pour quantifier les populations appartenant au genre *Bifidobacterium* et l'électrophorèse en gradient de dénaturation thermique au cours du temps (TTGE) spécifique du genre *Bifidobacterium* dans le but de mettre en évidence des modifications qualitatives de ces espèces au cours du traitement antibiotique (Mangin *et al.* 2006, Magne *et al.* 2006b).

c. Interactions avec d'autres équipes

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Martin Gotteland qui dirige le laboratoire de Microbiologie de l'INTA (Institute of Nutrition and Food Technology) de Santiago du Chili. Les enfants seront recrutés à Santiago. L'équipe médicale de l'INTA suivra les paramètres cliniques (symptômes gastro-intestinaux: diarrhées, gaz, douleurs abdominales, nausées, vomissements), notre équipe ayant en charge l'analyse microbiologique.

d. Résultats attendus et perspectives

Ce traitement antibiotique étant courant dans la vie des enfants, notre étude permettra de connaître son impact sur les bifidobactéries des enfants. Une diminution du genre *Bifidobacterium* est attendue les premiers jours, puis selon la sensibilité à l'antibiotique, des souches de bifidobactéries résistantes pourraient apparaître après 7 jours de traitement antibiotique. Elle s'accompagnera ou non de modifications au niveau des espèces. Les mêmes espèces seront-elles retrouvées chez tous les enfants traités? Ce changement d'espèces pourrait avoir un impact sur la flore résidente voire sur la santé de l'enfant. Une collaboration avec d'autres équipes pourrait alors être envisagée pour évaluer l'impact sur la santé de ce changement de flore.

B- Effet d'un traitement oral par le métronidazole sur l'écosystème microbien intestinal

Le métronidazole (MTZ) est un antibiotique qui, dans le cadre de l'inflammation intestinale est utilisé pour traiter la pouchite et diminuer la récurrence post opératoire chez les patients atteints de la maladie de Crohn. Une étude précédente réalisée au sein de notre laboratoire a montré pour la première fois que le MTZ (1 mg/ml) administré dans l'eau de boisson pendant une semaine entraîne chez le rat sain une diminution du stress oxydatif spécifiquement au niveau du côlon, mais est sans effet sur l'intestin grêle et le foie (Pélissier *et al*, sous presse). Ce qui suggère que l'effet observé est lié aux modifications induites par le MTZ sur l'écosystème microbien intestinal.

Des travaux préliminaires nous ont permis d'une part de confirmer que le MTZ exerçait un effet anti-oxydant spécifique au niveau du côlon, d'autre part de mettre en évidence une augmentation des populations de bifidobactéries au cours de ce traitement. Ce phénomène est vraisemblablement lié à la résistance de nombreuses souches de bifidobactéries à cet antibiotique (Moubareck *et al*. 2005).

a. Hypothèse

Chez le rat, l'administration orale de MTZ modifie qualitativement et quantitativement les populations de bifidobactéries de l'écosystème microbien intestinal.

b. Méthodologies envisagées

Des rats seront traités par le MTZ (1 mg/ml) pendant une semaine, puis sacrifiés et les prélèvements nécessaires seront effectués afin d'étudier au niveau du caecum et du côlon d'une part la flore luminale, d'autre part la flore associée à la muqueuse.

Les populations de bifidobactéries au niveau luminal seront quantifiées par PCR compétitive et les différentes espèces présentes seront caractérisées par électrophorèse en gradient de dénaturation thermique au cours du temps (PCR-TTGE) spécifique du genre *Bifidobacterium* (Mangin *et al*, 2006). Enfin, la détection et la quantification des bifidobactéries au sein de la microflore associée à la muqueuse du côlon seront réalisées par hybridation *in situ* couplée à l'analyse d'image (Vasquez *et al.*, sous presse).

c. Interactions avec d'autres équipes

Cette étude sera réalisée en collaboration avec l'équipe interne 4.

d. Résultats attendus et perspectives

En fonction des résultats obtenus, nous projetons de déterminer si une augmentation induite par administration orale d'une souche de bifidobactéries, et non plus par un traitement au MTZ, permet chez le rat sain de reproduire la diminution des paramètres du stress oxydatif au niveau du caecum et du côlon que nous observons avec le MTZ.

Un projet permettant de caractériser l'impact d'un traitement par le MTZ chez l'homme est en discussion dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe interne 5.