HAL
open science

Comparaison de méthodes culturales d'identification de la diversité microbienne du lait maternel.

Alan Jan

To cite this version:

Alan Jan. Comparaison de méthodes culturales d'identification de la diversité microbienne du lait maternel.. Microbiologie et Parasitologie. 2018. hal-02787519

HAL Id: hal-02787519

https://hal.inrae.fr/hal-02787519v1

Submitted on 5 Jun 2020

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

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

Université de Rennes 1
U.F.R Sciences de la Vie et de l'Environnement
263 av. Du General Leclerc
35042 Rennes cedex

INRA – UMR STLO
65 Rue de Saint-Brieuc
35000 Rennes

Master 1

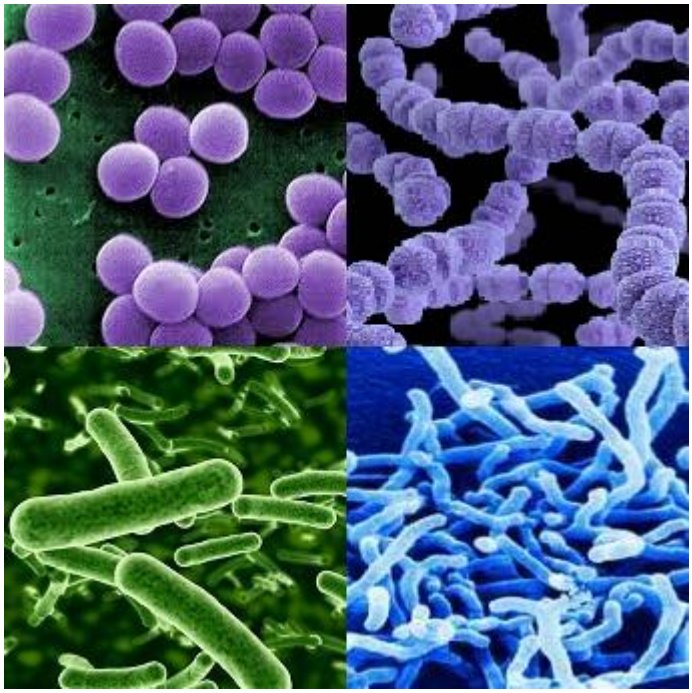
Microbiologie Fondamentale et Appliqué

2017-2018

COMPARAISON DE METHODES CULTURALES D'IDENTIFICATION DE LA DIVERSITE MICROBIENNE DU LAIT MATERNEL

Mr Alan JAN

Maitres de stage : Florence VALENCE-BERTEL et Sergine EVEN



Remerciements

En premier lieu je voudrais remercier Yves Le Loir, directeur de l'UMR STLO, de m'avoir accueilli dans son unité afin de réaliser ce stage.

Je tiens à remercier en particulier Florence Valence-Bertel et Sergine Even, mes maîtres de stage, de leur accueil au sein de l'équipe du CIRM, leur confiance, leur aide, leurs conseils avisés et leur encadrement scientifique et technique durant ce projet. Merci de m'avoir permis de réaliser ce projet si intéressant et dans une si bonne ambiance.

Merci à l'ensemble de l'équipe du CIRM pour leur accueil et leur sympathie, toujours présente face à mes questions ou problèmes. Je remercie tout particulièrement Victoria Chuat pour son encadrement technique tout au long de ce stage, pour tout le temps qu'elle m'a accordé, pour son aide technique à la rédaction et sa gentillesse.

Merci à Lucie Rault pour son temps et sa bonne humeur, à Jessica pour toute l'aide apportée durant les manipulations et sa gentillesse, à Laurence et Danielle, qui ont toujours été disponibles pour n'importe quelle question administrative et leur sympathie. Enfin je voudrais remercier de façon générale tout l'UMR STLO de m'avoir permis de passer ce stage dans la meilleure ambiance qu'il soit et pour m'avoir apporté autant de connaissances.

Table des matières

INTRODUCTION 1
MATERIELS ET METHODES 3
1) Echantillonnage 3
2) Isolement sur milieux spécifiques 4
3) Isolement non spécifique 4
4) Analyse par RAPD (Random Amplified Plymorfic DNA) 5
5) Analyse Bioinformatique RAPD 5
6) Séquençage ADN 16S 5
RESULTATS ET DISCUSSION 6
1) Isolements bactériens du lait maternel 6
2) Analyses RAPD des isolats issus des deux approches 10
2.1 Méthode « spécifique » 10
2.2 Méthode « robotisée » 10
3) Identification des clones isolés par la méthode spécifique 13
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 15

LISTE DES ABBREVIATIONS

- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- ARNr : Acide Ribonucléique ribosomal
- BHI-YE : Brain heart infusion yeast extract
- CFU : Colonie Formant Unité
- dNTP : Déoxynucléotide Triphosphate
- EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
- MLST : MultiLocus Sequence Typing
- MRS : Man, Rogosa, Sharpe
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis
- PYG : Peptone Yeast Glucose
- RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA
- TBE : Tris Borate EDTA
- UV : Ultra Violet
- WC : Wilkins-Chalgren

INTRODUCTION

Il est démontré depuis le début du XXème siècle que les enfants nourris exclusivement par allaitement au sein présentent une morbidité et une mortalité moins élevée pendant leur première année de vie, par rapport aux enfants nourris aux formules infantiles (1). Par la suite, plusieurs études ont montré qu'en plus de la baisse de mortalité et de la morbidité, les enfants présentent une baisse de l'incidence et de la sévérité des infections, en particulier respiratoires et intestinales, et des maladies liées à l'immunité pendant leur première année de vie (2, 3).

Le lait humain est un aliment complexe, qui, au-delà de son rôle nutritionnel, apporte au nourrisson, outre l'apport protéique, lipidique et glucidique nécessaire, une grande variété de composants bioactifs, immunologiques et protecteurs comme par exemple des cellules immunitaires, des immunoglobulines, des cytokines et chimiokines, des composants antimicrobiens, des oligosaccharides ou encore des facteurs de croissance (4).

Si longtemps le lait maternel a été considéré comme stérile, nous savons de nos jours qu'il comporte également un microbiote propre (5) comme le microbiote intestinal, vaginal ou encore pulmonaire (6), même si le microbiote du lait maternel est moins divers et important en terme de population totale. En effet, plus de 2000 espèces ont été identifiées par des méthodes non culturales dans les intestins pour une population totale de 10^{14} bactéries (7) contre 700 espèces identifiées dans le lait humain et une charge bactérienne de l'ordre de 10^3-10^4 cfu/mL (8). Des études sur l'origine de ce microbiote suggère un ensemencement par la peau de la mère, la bouche du nourrisson (9). Une 3e voie, appelée « axe entéro-mammaire » propose un transfert des bactéries de l'intestin de la mère vers le lait via des cellules immunitaires circulantes (10). Cette hypothèse est soutenue par le fait que le microbiote mammaire présente un profil très similaire à celui du microbiote intestinale maternel (10–12).

Plusieurs études ont montré la très grande variété de genres et d'espèces présentes dans le lait. Plus de 200 espèces différentes, globalement, ont pu être isolées du lait maternel même si, pour un lait donné, le nombre d'espèces isolées est beaucoup plus faible, de 2 à 18 espèces (13). L'apparition des méthodes de métagénomique a permis d'avoir une vision plus globale des taxons, cultivables et non cultivables. En effet, la population est maintenant estimée plus aux alentours de 700 espèces différentes identifiées par techniques non culturales (14).

Parmi ces espèces, sont retrouvés de façon quasi systématique les genres *Staphylococcus, Streptococcus, Serratia, Pseudomonas, Corynebacterium, Ralstonia, Propionibacterium,*

Sphingomonas, Bradyrhizobiaceae, Lactobacillus et *Bifidobacterium* (15). Certaines souches isolées du lait maternel sont utilisées comme probiotiques comme *Lactobacillus salivarius* ou *Bifidobacterium breve* (10, 16).

Nous ne pouvons pas affirmer que toutes les espèces mises en évidence par des méthodes non culturales sont présentes à l'état viable et cultivable dans le lait (13). En effet le séquençage met en évidence la présence d'ADN pouvant provenir de bactéries vivantes, mortes ou lysées (8). Des études ont montré que les bactéries mortes, via par exemple leur protéine de paroi, peuvent jouer un rôle immunomodulateur, en particulier, même mortes.

Les espèces cultivables étant présentes dans le lait maternel à une concentration moyenne de 10^3 CFU/mL, c'est donc environ près de 10^6 bactéries qui sont ingérées quotidiennement par les nourrissons allaités au sein. Il a été montré que certaines bactéries du microbiote présentes dans le lait maternel sont retrouvées dans le microbiote intestinal des enfants nourris au sein (8, 12, 14), indiquant que le microbiote du lait maternel contribue à l'établissement du microbiote intestinale néonatal (17). Parmi les différents constituants du lait maternel, le microbiote pourrait contribuer aux bénéfices santé du lait, par rapport aux formules infantiles qui ne renferment pas ce microbiote. Le microbiote du lait, via une action directe, ou indirecte sur le microbiote intestinal, serait impliqué dans le développement et la maturation du système immunitaire (18) ainsi que dans la lutte contre l'implantation d'espèces pathogènes (8).

L'allaitement n'étant pas toujours possible et restant un choix dans les autre cas, compte tenu du bénéfice santé du lait maternel par rapport aux formules infantiles, il ressort la nécessité d'améliorer la composition des formules infantiles afin de se rapprocher au maximum de la composition d'un lait maternel ou tout au moins de mimer ses effets. La composition en terme de nutriments se rapproche d'ores et déjà le plus possible du lait maternel. Cependant, d'un point de vue microbiologique, les formules infantiles contiennent au mieux une à deux espèces bactériennes comme par exemple *Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium lactis, Lactobacillus rhamnosus* ou encore *Staphylococcus thermophilus*.

L'étude présentée ici s'inscrit dans un axe d'amélioration des formules infantiles d'un point de vue microbiologie. En effet, la diversité microbienne du lait humain et le rôle de ce microbiote dans son ensemble ou de certaines composantes n'étant pas entièrement connus, beaucoup de travail reste à accomplir.

Le travail réalisé dans le cadre de mon stage constitue un prérequis à l'exploration du rôle du microbiote du lait maternel et d'amélioration de la composante microbienne des formules

infantiles. Il a pour but d'explorer la diversité bactérienne du lait maternel par deux approches culturales :

(1) Une approche culturale par isolements de la flore bactérienne sur milieux sélectifs où les milieux et conditions de croissance sont choisis en fonction des espèces attendues, qui nécessite donc une connaissance préalable sur la composition du microbiote sur la base des données issues de la littérature.

(2) Une approche culturale non ciblée utilisant un milieu de culture unique. Le but est de ne pas avoir d'a priori sur la composition du microbiote et donc de ne pas utiliser de milieux sélectifs, mais plutôt un milieu enrichi universel. Cette approche est basée sur la connaissance de la concentration bactérienne du lait. En effet, celle-ci étant de l'ordre de 10^3 cfu/mL en moyenne, notre méthode consiste à diluer le lait puis à le fractionner de façon à n'avoir qu'une seule bactérie par fraction de 1 ml et donc nous affranchit de l'étape de sélection des clones. Cette méthode a également l'avantage de pouvoir être robotisée et donc réalisée à haut débit (travail en plaque de 96 puits).

Les objectifs de ce travail sont donc de mettre en évidence les genres et espèces retrouvées par ces deux approches et de les comparer afin de déterminer laquelle de ces deux approches permet d'isoler la plus grande diversité bactérienne. L'avantage de la seconde méthode, développée spécifiquement pour ce projet, est de pouvoir être réalisée à haut débit. Nous voulions voir si elle permettait de couvrir un spectre plus large en termes d'espèces mises en évidence et ainsi d'isoler des espèces non ciblées par des milieux spécifiques.

MATERIELS ET METHODES

1) Echantillonnage

Au cours de ce stage, un seul échantillon a été analysé de manière à évaluer deux approches pour explorer la diversité bactérienne du lait maternel. L'échantillon de lait maternel a été récupéré auprès d'une mère ayant donné naissance à son 4ème enfant, 4 mois auparavant. Ni la mère, ni l'enfant n'ont eu de traitements médicamenteux pendant l'allaitement et l'enfant est exclusivement nourri au sein.

Apres désinfection de la peau et de l'aréole du sein à l'alcool puis séchage à l'aide d'une compresse stérile, environ 15mL de lait maternel ont été recueillis par expression manuelle dans un pot stérile placé en glacière pour le transport puis conservé à 4°C jusqu'à utilisation. Les analyses ont été faites dans les 24h.

2) Isolement sur milieux spécifiques

Neuf milieux de culture ont été choisis en fonction de la bibliographie et des espèces ciblées, attendues dans le lait maternel humain (Table 1). Les ensemencements sont faits à l'aide d'un ensemenceur en spirale (Interscience) réalisant un ensemencement en exponentiel, permettant d'atteindre progressivement une dilution au 1/100e de l'échantillon. Deux séries sont effectuées, une première avec 50 µL de lait non dilué et une seconde avec 50 µL dilué au 1/10. Chaque boite est incubée dans les conditions définies dans la Table 1. Au bout de 72h d'incubation, toutes les colonies apparues sont décrites morphologiquement (taille, couleur, aspect) puis ré-isolées en strie sur le même milieu pour garantir leur pureté. Les isolements d'origine sont remis à incuber 4 jours supplémentaires et les nouvelles colonies apparues sont traitées de la même façon que les premières. Après 72h à 96h, chaque clone isolé est mis en culture en milieu liquide (Table 1) et incubés à la température utilisée pour l'isolement du clone. Une observation de la croissance en tube et une observation microscopique (objectif X100, Olympus BX51) sont effectuées pour chaque clone isolé. Chaque clone est congelé à -80°C en milieu de culture glycérolé.

***Table 1 :* Milieux d'isolement et conditions de culture utlisés dans l'étude selon le microorganisme ciblé**

Milieu 15% agar	Milieu liquide	Conditions de culture				Espèces ciblées
		Anaérobie		Aérobie		
		30°C	37°C	30°C	37°C	
MRS (BD^{TM}) additionné de 0.5g/l cystéine (Sigma) (MRSc)	MRSc		X			*Bifidobacterium*
MRS (BD^{TM}) pH 5.4	MRS	X	X	X		*Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Weissella*
Mannitol Salt Agar (MSA) (PromadisaN)	BHI-YE				X	*Staphylococcus*
Mc Conkey					X	Entérobactéries
M17 (BD^{TM})	M17			X	X	*Lactococcus, Streptococcus*
Brain Heart Infusion (BD^{TM}) additionné de 10g/l d'extrait de levure (Biokar) (BHI-YE)	BHI-YE			X	X	*Enterococcus,Staphylococcus, Corynebacterium, Rothia, Ralstonia*
PYG	PYG		X			*Propionibacterium, Prevotella, Finegoldia, Gemella*
Wilkins Chalgren Anaerobic Agar (WC) (Sigma)	PYG		X			Genres et Espèces Anaérobies
BHI-YE additionné de 0.5g/l de cystéine (Sigma) (BHI-YEc)	BHI-YEc	X	X	X	X	/

3) Isolement non spécifique

Un millilitre de l'échantillon est dilué dans 999 mL de milieu BHI additionné de 10 g/L d'extrait de levure et de 0,5 g/l cystéine (BHI-YEc) afin d'obtenir une dilution au 1/1000ème de l'échantillon. Le litre est ensuite réparti par fraction de 1 mL dans des plaques de 96 puits deepwell (ThermoScientific) à l'aide du robot de criblage STAR (Hamilton). Deux séries de plaques sont

effectuées, l'une incubée à 30°C en anaérobiose, l'autre à 30°C en aérobiose. Après 48h et 6 jours, tous les puits présentant une culture sont isolés sur milieux BHI-YEc gélosé et incubés dans les mêmes conditions que précédemment. Après 5 à 7 jours d'incubation, l'ensemble des colonies sont décrites morphologiquement (aspect, couleur, taille) et mises en culture sur BHI-YEc. Après croissance, une observation de la croissance en tube et une observation microscopique (objectif X100) sont effectuées pour chaque clone isolé. Chaque clone a été conservé à -80°C en glycérol.

4) Analyse par RAPD (Random Amplified Plymorfic DNA)

Pour chaque clone, 1 ml de chaque culture est centrifugé. Après lavage, le culot est repris dans 300 µL d'eau stérile (Sigma) puis 100 µL sont transférés dans une plaque PCR, chauffés à 95°C pendant 10 minutes puis placés à -20°C afin de lyser les bactéries. L'analyse RAPD est ensuite effectuée à l'aide de l'amorce nucléotidique M13 (5'GAGGGTGGCGGTTCT-3') (SigmaAldrich)(19). Le mélange réactionnel contient du tampon Taq 1X (avec 2 mM MgCl2) (MP Biomedical), 2.5 U d'ADN polymérase Taq (MP Biomedical), 2 mM d'amorce, 0,2 mM de dNTP, 5 µL de lysat bactérien pour un volume final de 25 µL. Le programme de PCR suivant est réalisé à l'aide du thermocycleur C1000 Thermal Cycler (Biorad): une dénaturation initiale à 94°C pendant 2 min, puis 40 cycles à 94°C pendant 1 min, 42°C pendant 20s, 72°C pendant 2 min et avec une étape d'extension finale à 72°C pendant 10 min.

Les produits de PCR sont mis à migrer sur gel d'agarose à 1% dans du tampon 0,5X TBE (Tris, Borate, EDTA 10 X, Sigma). Après migration à 100 V pendant une heure, les gels sont colorés dans un bain de gel Red (FluoProbes) pendant 15 minutes puis rincés à l'eau pendant 5 minutes avant d'être révélés sous UV à l'aide de l'appareil G : BOX (Ozyme).

5) Analyse Bioinformatique RAPD

Pour chaque gel, les profils RAPD sont analysés à l'aide du logiciel BioNumerics (Applied Math, Belgium). Une normalisation au sein de chaque gel et entre les gels est effectuée à l'aide des marqueurs de taille systématiquement présents sur tous les gels. Une comparaison de chaque profil normalisé est réalisée en utilisant le coefficient de similarité Dice, avec une optimisation de 1%. Un dendrogramme est construit en utilisant l'algorithme de clustering UPGMA.

6) Séquençage ADN 16S

Un clone de chaque cluster sélectionné d'après les résultats de l'analyse RAPD est identifié par séquençage de l'ADNr16S. Dans les cas où, pour un même cluster, des morphologies très

différentes sont observées, un clone représentatif de chaque morphotype est choisi pour un même cluster.

L'ADNr16S est amplifié à l'aide des amorces WOO1 et WOO2 (20). Le mélange réactionnel contient du tampon Taq 1X, avec 2 mM MgCl2 (MP Biomedical), 2,5 U d'ADN polymérase Taq (MP Biomedical), 1.2 mM de chaque amorce, 2 µL de dNTP, 2 µL d'ADN et de l'eau stérile sigma pour un volume final de 50 µL. Le programme de PCR suivant est réalisé à l'aide du thermocycleur C1000 Thermal Cycler (Biorad): une dénaturation initiale à 94°C pendant 4 minutes, suivie de 35 cycles à 96°C pendant 40s, 50°C pendant 30s, 72°C 1 min 30 et avec une étape d'extension finale à 72°C pendant 10 min.

Après vérification de la bonne amplification par dépôt sur gel 1.5% d'agarose, les produits PCR sont purifiés à l'aide du kit NucléoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) puis séquencés par méthode Sanger par LGC Genomics (Berlin, Allemagne). Pour chaque échantillon, les séquences brutes Forward et Reverse sont assemblées et la séquence consensus est nettoyée à l'aide du Logiciel Geneious (Biomatters), puis comparée à la base donnée NCBI à l'aide du logiciel Blastn.

RESULTATS ET DISCUSSION

1) Isolements bactériens du lait maternel

Dans cette étude, deux approches culturales différentes sont testées : La méthode culturale dite « spécifique » et la méthode culturale dite « Robotisée » résumées en Figure 1. La première méthode culturale « spécifique » est entièrement basée sur les connaissances déjà établies concernant le microbiote du lait humain et plus précisément sur la diversité microbienne qui le compose. Par le choix de milieux spécifiques et de conditions de croissance optimales, les chances d'isoler des espèces connues pour être présentes dans le lait humain sont maximisées. Un second avantage est que l'isolement est directement effectué sur milieu gélosé ce qui permet l'obtention de colonies isolées dès le début de la méthode selon la charge initiale du lait. Cependant cette approche présente un biais puisque les milieux de culture choisis limitent le nombre d'espèces pouvant être cultivées aux seules espèces recherchées. Cela peut donc représenter une barrière à la découverte d'une plus grande diversité du microbiote du lait humain pas encore décrit dans la bibliographie.

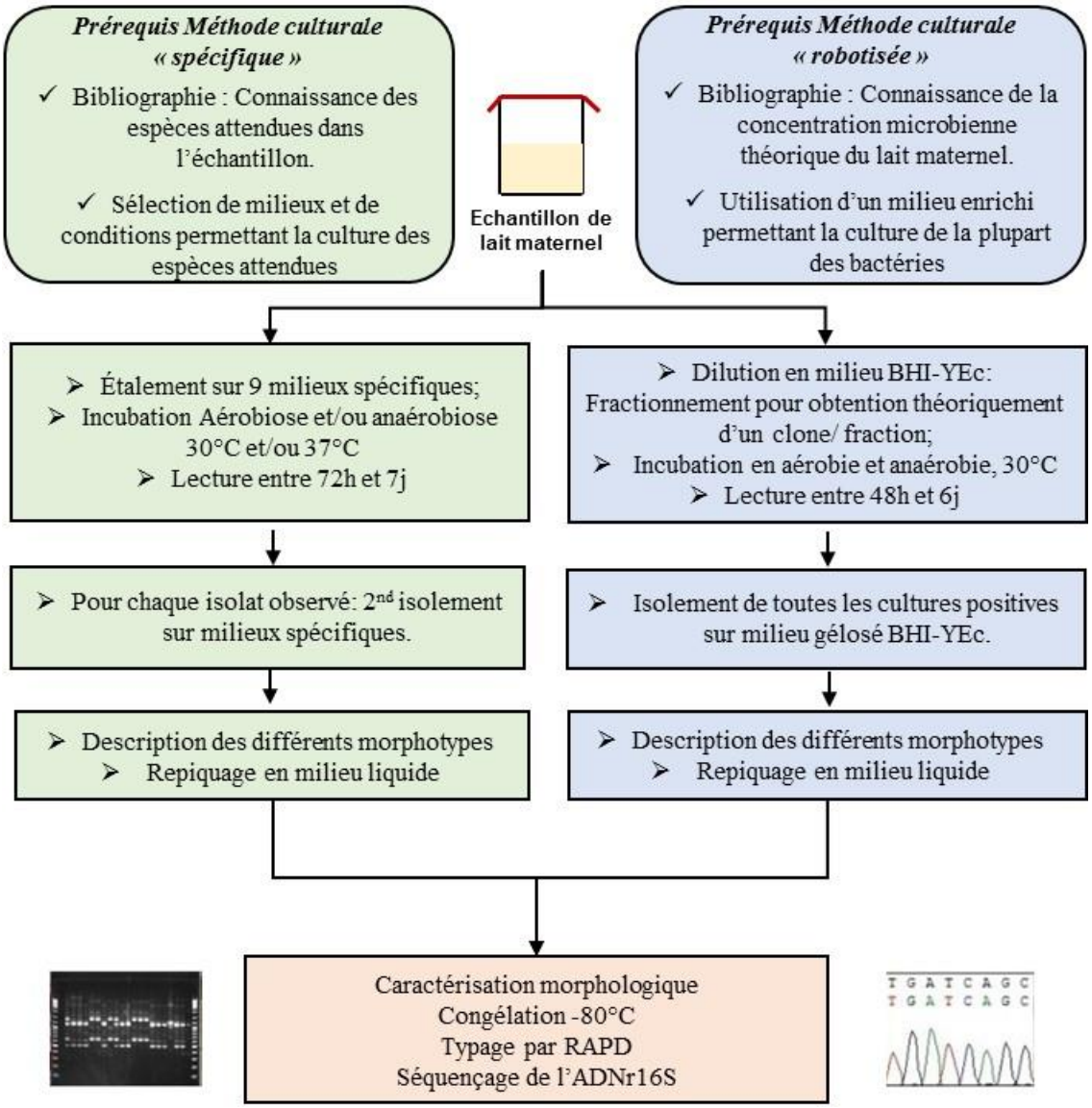


***Figure 1 :* Schéma récapitulatif des deux méthodes employées.**

La seconde méthode culturale « Robotisée » repose en grande partie sur l'estimation de la concentration bactérienne de l'échantillon étudié afin de diluer et fractionner l'échantillon de façon à avoir théoriquement une seule bactérie par fraction. Cette donnée peut être tirée de la bibliographie mais évaluée par une numération de l'échantillon de lait à étudier. L'intérêt de cette approche est l'obtention de bactéries directement isolées, d'éviter des problèmes d'inhibition par compétitions et ainsi de permettre l'isolement d'espèces peu représentées ou sous-dominantes pouvant être inhibées par les espèces majoritairement représentées dans la première méthode. Cette méthode diffère également par l'utilisation d'un seul milieu de culture riche le moins stringent possible, choisi pour permettre la culture d'une grande diversité d'espèces et ainsi avoir une vision plus globale et moins ciblée de la diversité bactérienne de l'échantillon sans a priori sur sa composition. Il est cependant possible que l'utilisation d'un seul milieu ne permette pas la

culture des bactéries les plus exigeantes nécessitant l'utilisation de milieux spécifiques. L'intérêt de cette approche réside essentiellement dans la possibilité de robotiser la méthode.

La méthode spécifique a permis de récupérer 91 isolats sur l'ensemble des milieux et conditions testées (Table 2). La répartition des isolats est très variable selon les milieux utilisés avec une majorité isolée sur le milieu BHI-YEc, milieu non sélectif utilisé également pour la seconde méthode, et sur le même milieu non supplémenté en cystéine (BHI-YE). Au total, ces deux milieux non sélectifs ont permis de recueillir 56 des 91 isolats collectés, soit plus de la moitié. Cela s'explique par le fait que ces milieux ne favorisent pas un genre ou une espèce donnée mais un grand nombre d'espèces différentes. Les milieux plus spécifiques ont permis la récupération d'un nombre plus limité d'isolats, voire pour certains milieux d'aucun isolat. Les deux milieux spécifiques ayant permis de recueillir le plus d'isolats sont les milieux PYG ciblant principalement les Propionibactéries (10 isolats) et le milieu Wilkins-Chalgren, ciblant les flores anaérobiques strictes (11 isolats). Par contre, le milieux spécifique MRS pH 5,4 classiquement utilisé pour l'isolement des *Lactobacillus* et *Leuconostoc*, et le milieu Mac Conkey, ciblant les Entérobactéries n'ont permis de récupérer aucun isolat (Table 2).

Concernant la méthode robotisée, 111 puits sur 971 en aérobiose et 214 sur 973 en anaérobiose ont présenté une croissance après 2J ou 7J d'incubation soit au total 325 fractions sur les 1944 qui ont abouti à une culture. Les cultures correspondantes étaient étalées sur boite, conduisant majoritairement à des colonies homogènes sauf quelques cultures qui ont nécessité une étape de purification supplémentaire. La culture en anaérobiose a donc permis l'obtention d'un plus grand nombre d'isolats ce qui est en accord avec la bibliographie nous indiquant que la plupart des espèces présentes dans le lait sont cultivables en anaérobie (8).

A l'issue de cette première étape, c'est donc 91 isolats issus de la méthode spécifique et 325 isolats issus de la méthode robotisée qui sont récupérés, soit un total de 419 isolats. Une analyse RAPD a ensuite été réalisée dans le but d'effectuer une première caractérisation entre ces 419 isolats afin de former des groupes sur la base de la similarité de leur profil RAPD et ensuite sélectionner les isolats à identifier par séquençage du 16S.

<u>Table 2 :</u> Isolement, caractérisation (morphologie et profils RAPD) et résultats d'identification obtenus par séquençage de l'ADNr16S des souches isolées par les 2 méthodes mises en œuvre dans le cadre de cette étude.

Milieu spécifique	Condition	Nombre de morphologie (état frais)	Nombre d'isolat	Nombre de profils de RAPD uniques	Espèces trouvées
MRS cysteine	37°C -An	2	5	4	*Streptococcus salivarius/Streptococcus equinus, Streptococcus salivarius, Staphylococcus epidermidis, Enterococcus faecalis*
MRS pH 5,4	37°C -An	0	0	0	/
MSA	37°C -Aé	1	4	1	*Staphylococcus epidermidis*
Mac Conkey	37°C -Aé	0	0	0	/
M17	30°C-Aé	NR	2	2	*Staphylococcus warneri/Staphylococcus pasteuri, Staphylococcus epidermidis*
	37°C-Aé	2	4	2	*Streptococcus salivarius/ Streptococcus equinus, Staphylococcus epidermidis*
BHI-YE	30°C-Aé	2	10	3	*Staphylococcus epidermidis*
	37°C-Aé	4	8	4	*Staphylococcus jenttensis/Staphylococcus petrasii, Rothia mucilaginosa/Rothia dendocariosa, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus salivarius*
PYG medium	37°C -An	3	9	7	*Streptococcus pneumoniae/Streptococcus mitis, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus salivarius,Virgibacillus halodenitrificans/Propionibacterium acnes,*
Wilkins–Chalgren	37°C -An	3	11	7	*Virgibacillus halodenitrificans/Propionibacterium acnes, Streptococcus salivarius/Streptococcus equinus, Streptococcus salivarius, Staphylococcus epidermidis, Actinomyces odontolyticus*
BHI-YE-cysteine	30°C-Aé	3	6	3	*Streptococcus salivarius/ Streptococcus equinus*
	37°C -Aé	3	9	4	*Staphylococcus hominis/Staphylococcus epidermis, Rothia mucilaginosa/Rothia dendocariosa*
	30°C -An	2	7	5	*Streptococcus pneumoniae/Streptococcus mitis, Virgibacillus halodenitrificans/Propionibacterium acnes*
	37°C -An	5	16	11	*Staphylococcus hominis, Staphylococcus epidermidis,Actinomyces odontolyticus, Propionibacterium granulosum, Virgibacillus halodenitrificans/Propionibacterium acnes, Streptococcus salivarius/Streptococcus equinus*
	Total		**91**	**38**	

Méthode robot	Condition	Nombre d'isolat	Nombre de profils de RAPD
Milieu BHI-YEc	30°C -Aé	111	25
	30°C-An	214	43
	Total	**325**	**63**

2) Analyses RAPD des isolats issus des deux approches

2.1 Méthode « spécifique »

Pour cette première méthode, sur 91 isolats, nous avons pu obtenir 38 profils différents de RAPD, numérotés de P1 à P38 avec globalement peu de redondance puisque sur ces 38 profils distincts, 26 profils correspondent à un isolat unique, comme par exemple P2 ou P28. A l'inverse, 12 profils regroupent plusieurs isolats allant de 2 isolats pour, par exemple, P6 à 29 isolats pour P13 (Figure 2).

Nous avons exploré un possible lien entre les 38 profils RAPD obtenus et le milieu d'isolement des isolats constituant chaque profil (Figure 3). Le milieu permettant l'obtention du plus grand nombre de profils différents est le BHI-YEc dont les isolats se répartissent dans 18 profils différents sur 38. Ce milieu apporte donc près de la moitié de la diversité en termes de profils de RAPD différents. Les milieux PYG, WC et BHI-YE permettent quant à eux d'obtenir 6 à 7 profils RAPD différents, tandis que les milieux M17 et MRSc permettent d'en obtenir 4, le milieu MSA 1 seul profil RAPD. L'analyse des profils spécifiques de chaque milieu révèle là encore l'intérêt du milieu BHI-YEc, qui permet d'obtenir 13 profils RAPD non partagés avec les autres milieux. Les milieux PYG, WC et MRSc permettent également d'obtenir respectivement 6, 5 et 5 profils RAPD non partagés avec les autres milieux. A l'opposé, certains milieux n'apportent que peu, voire pas de diversité comme le milieu MSA qui ne fait ressortir qu'un seul profil unique commun avec le milieu BHI-YEc. En regardant ces résultats dans leur globalité, il apparait que l'utilisation de seulement quatre milieux (BHI-YEc, PYG, WC et MRSc) permet l'obtention de près de 68% des isolats et près de 90% des profils. Le milieu WC est déjà connu pour permettre la culture d'un grand nombre de bactéries, en particulier anaérobies, dans le cadre d'isolement depuis un échantillon de lait maternel (21). Les 3 autres milieux ne sont par contre que très peu cités dans la bibliographie, mais présentent un intérêt évident pour l'isolement de la diversité dans le lait maternel.

2.2 Méthode « robotisée »

La même démarche a été effectuée pour les 325 isolats obtenus par la méthode « Robotisée ». Compte tenu du nombre d'isolats, le dendrogramme résultant n'est pas présenté dans ce rapport. Mais les résultats sont analysés ci-dessous.

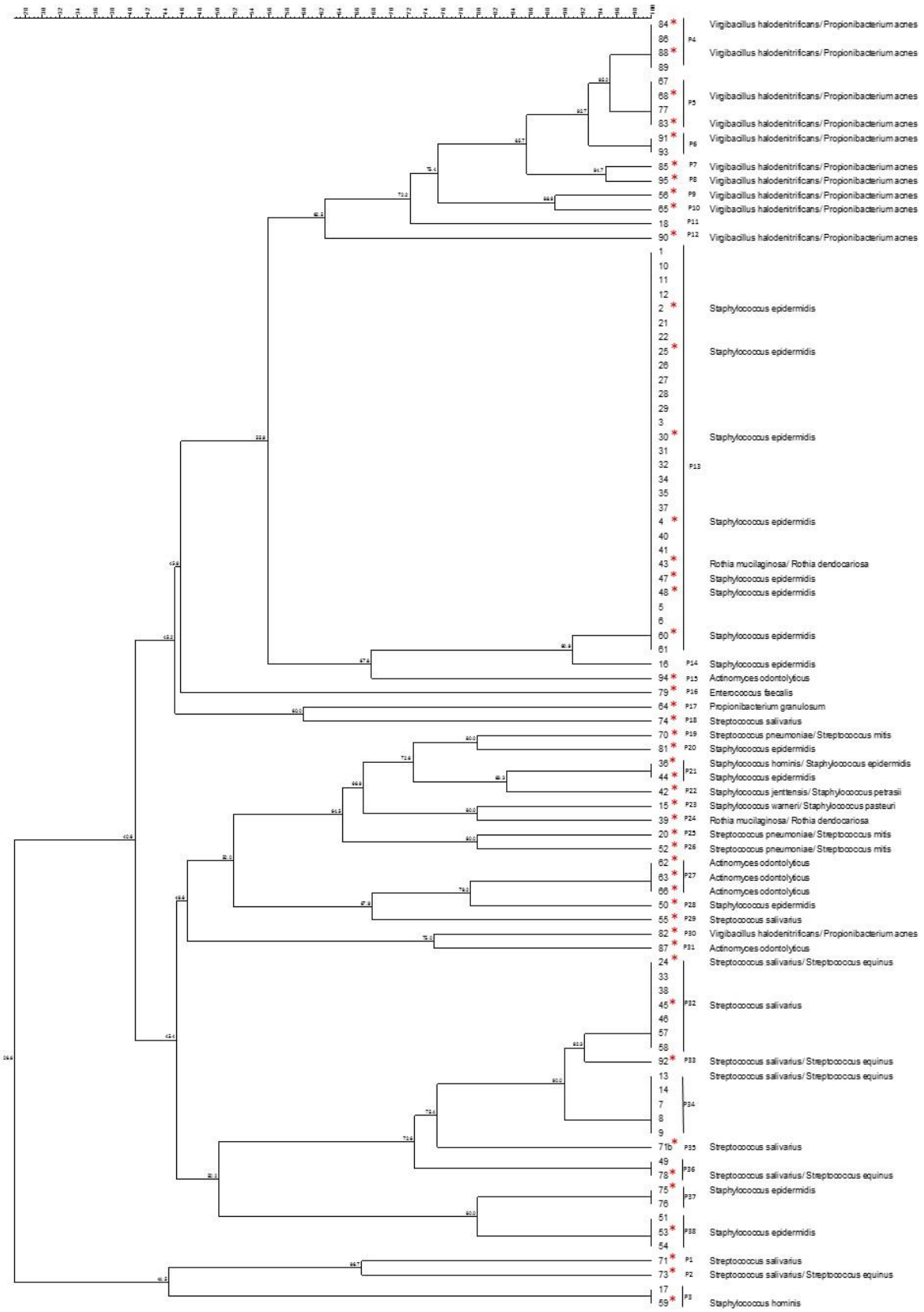
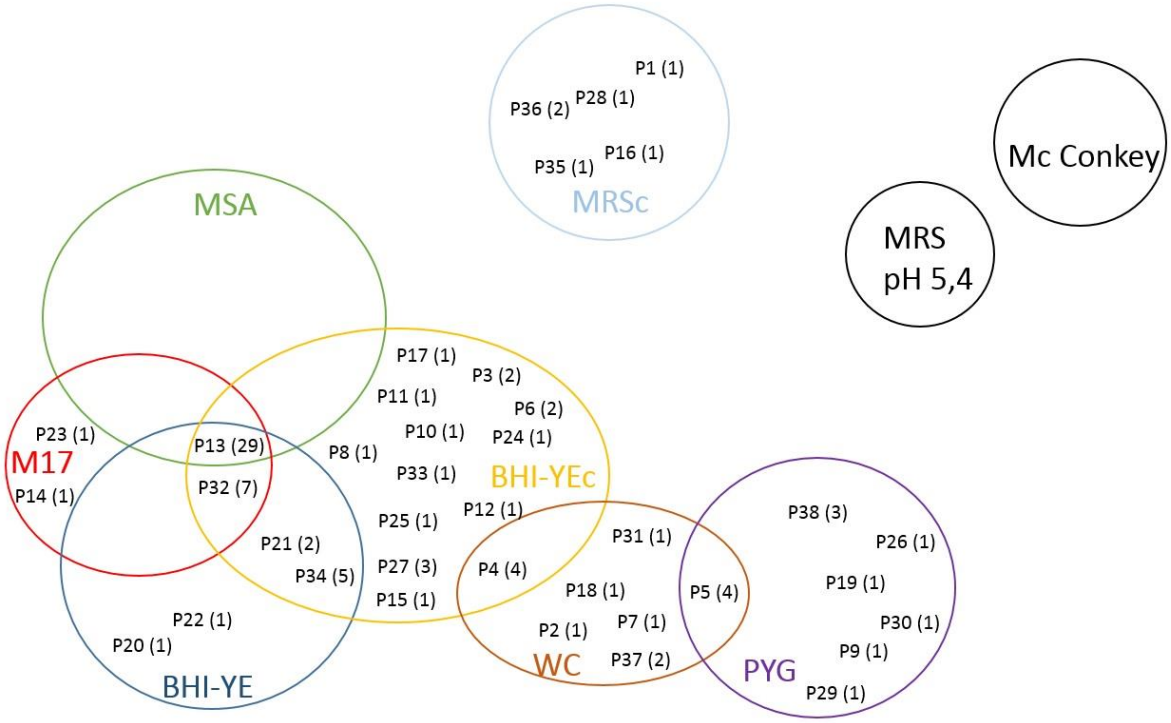


Figure 2 : ***Dendrogramme des profils RAPD pour les isolats issus de la méthode spécifique.***
**** : souches sélectionnées pour le séquençage ARNr 16S avec l'identification obtenue. P1 à P38 correspondent aux 38 profils différents issus de l'analyse***



<u>Figure 3 :</u> Diagramme de Venn représentant la répartition des profils RAPD en fonction du milieu d'isolement. P1 à P38 correspondent aux profils indiqués sur le dendrogramme RAPD. Les cercles de couleurs représentent les différents milieux utilisés.

Sur ces 325 isolats, 63 profils différents de RAPD ont été obtenus. Les rapports entre le nombre de profils différents et le nombre total d'isolats sont similaires en aérobiose et anaérobiose. En effet, en aérobiose, 25 profils différent sont obtenus pour 111 isolats au final soit 22,5 %. En anaérobiose, 43 profils différents sont obtenus pour 214 isolats de départ soit 20%. Il n'y a donc pas une condition qui apporte un nombre de profils plus important qu'une autre, si ce nombre de profils est rapporté au nombre d'isolats. Sur ces 63 profils, 37 profils sont représentés par un seul clone. A l'inverse, 26 profils regroupent plusieurs isolats allant de 2 à 72 isolats pour un même profil ce qui laisse supposer une forte redondance. Certains profils sont spécifiques d'une seule condition d'aérobiose il n'y a donc pas de redondance dans ce cas présent.

La méthode spécifique permet donc de récupérer un plus grand nombre de profils différents proportionnellement au nombre d'isolats récupérés par rapport à la méthode robotisée puisque le rapport entre les deux est de 40% (38 profils différents sur 91 isolats) contre 20% (63 profils différents sur 325 isolats) pour la méthode robotisée donc il y a plus de redondance pour la méthode robotisée ce qui laisse penser que celle-ci est moins sélective. Cependant, lorsque les profils de RAPD des deux méthodes sont comparés (données non présentées), seul 3 profils sont partagés

par les deux méthodes. Il est donc probable que les deux méthodes permettent de récupérer des genres ou espèces différentes.

Cette étude se portant sur une durée de 2 mois, il a été décidé dans un premier temps de se concentrer sur les isolats issus de la première méthode spécifique pour la suite des analyses et l'identification des genres et espèce présentes.

3) Identification des clones isolés par la méthode spécifique

Sur les 91 isolats, 51 ont été sélectionnés pour une identification par séquençage de l'ARNr 16S (Figure 2). La sélection a été effectuée de manière à avoir au moins un représentant de chaque profil de RAPD différent séquencé. Dans le cas où, pour un même profil, nous observons plusieurs morphotypes différents, un isolat de chaque morphotype a été sélectionné pour être envoyé au séquençage. Sur les 51 isolats envoyés au séquençage, nous avons obtenus une séquence analysable pour 50 isolats. Avec un pourcentage de similarité ≥ à 97%, l'identification a permis de faire ressortir 6 groupes dont l'identification descend jusqu'au rang de l'espèce et 7 groupes dont l'identification donne le genre mais ne permet pas de trancher entre 2 espèces possibles, soit un total de 13 espèces potentielles (Figure 2).

Comme le montre le dendrogramme, les différents profils se regroupent selon différents clusters, mais seul le cluster incluant les profils P4 a P12 semble former un cluster spécifique d'espèces. En effet, mis à part l'isolat du profil P30, l'ensemble des 9 profils correspondent tous à *Virgibacillus halodenitrificans/ Propionibacterium acnes*. En ce qui concerne les autres groupes de profils dont les pourcentages de similarité sont proches, aucune espèce ou genre n'est spécifique à l'un des groupes. On observe que les différents isolats identifiés comme étant de la même espèce peuvent présenter des profils de RAPD différents pouvant être de similarité proche ou très éloignée. Ceci laisse supposer que pour une espèce donnée, il existe autant de souches que de profils, et que les pourcentages de similarité ne peuvent être utilisés pour estimer l'appartenance à un genre ou une espèce. De plus, le profil P13 contient 2 isolats de genre différent : l'un *Staphylococcus* appartenant au phylum des Firmicutes et l'autre de genre *Rothia* appartenant au phylum des Actinobactéries (Figure 2).

Les 6 espèces identifiées sans ambigüités sont *Actinomyces odontolyticus, Enterococcus faecalis, Propionibacterium granulosum, Staphylococcus hominis, Staphylococcus epidermidis* et *Streptococcus salivarius.* Les 7 groupes où il subsiste des ambiguïtés entre 2 espèces sont : *Staphylococcus warneri/ Staphylococcus pasteuri, Staphylococcus hominis / Staphylococcus epidermis, Staphylococcus jenttensis / Staphylococcus petrasii, Streptococcus pneumoniae/*

Streptococcus mitis, Streptococcus salivarius / Streptococcus equinus, Virgibacillus halodenitrificans / Propionibacterium acnes, et *Rothia mucilaginosa / Rothia dendocariosa*.

Concernant les genres et espèces identifiées, il s'agit de genres et espèces connues pour être présents dans le lait maternel mis à part *Virgibacillus halodenitrificans/ Propionibacterium acnes.* En effet, *Propionibacterium acnes* est connu pour être présent dans le lait maternel et plus globalement le genre *Propionibacterium* qui fait partie d'un des genres les plus retrouvés dans le lait maternel. A l'inverse, le genre *Virgibacillus* n'est pas connu comme étant présent dans le microbiote du lait maternel, mais dans des biotopes (alimentaires et environnementaux) à fortes teneurs en sel. De plus, c'est une bactérie mobile, ce qui n'a pas été observé à l'état frais. De ce fait, il est fort probable que les isolats identifiés dans ce groupe correspondent à *Propionibacterium acnes*. Ceci montre les limites de l'identification par séquençage de l'ARNr 16S qui ne permet pas dans tous les cas de descendre jusqu'à l'espèce et même dans le cas présent de différencier le genre. La réalisation d'une méthode d'identification complémentaire moléculaire ou phénotypique devra être réalisée afin de lever cette ambiguïté. La même observation peut être faite pour les genres *Streptococcus* et *Staphylococcus* où l'ARNr 16S ne permet pas toujours la différenciation entre deux espèces du même genre.

Les genres les plus représentés sont *Staphylococcus* et *Streptococcus* qui correspondent respectivement à 34% et 26% des isolats séquencés et ainsi que le genre *Propionibacterium* avec *Propionibacterium acnes* représentant 22% des isolats séquencés. Ces résultats sont en accord avec les données bibliographiques déjà établies qui montrent que ces 3 espèces sont les plus représentées dans le microbiote du lait maternel (8, 15). Il est par contre très étonnant de ne pas retrouver par cette méthode la présence du genre *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* qui sont d'après la littérature retrouvés de façon quasi systématique dans le microbiote du lait maternel (ref). Concernant *Bifidobacterium,* son absence parmi les espèces identifiées peut être due au fait que ce genre soit un anaérobie strict et que la simple utilisation de jarre n'ait pas suffi à sa croissance. Les bifidobactéries, très sensibles à l'oxygène, peuvent également avoir succombé au transport du lait avant analyse. L'autre hypothèse, qui concerne les deux genres, est que ceux-ci sont présents en concentration trop faible pour pouvoir être récupérés par cette méthode. L'identification des isolats de la méthode robotisée pourra éventuellement répondre à cette question.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Sur la base des seuls profils RAPD, la méthode dite culturale permet une meilleure efficacité en terme de récupération de la diversité, proportionnellement au nombre d'isolats récoltés. Bien que la diversité en termes de profils RAPD soit plus importante, la diversité d'espèces semble cependant peu élevée avec seulement 5 genres identifiés. Ceci peut être dû à la difficulté, liée à la méthode, de mettre en évidence les populations sous-dominantes pouvant être masquées par les espèces dominantes. Cependant, l'existence de multiples profils de RAPD différents pour une même espèce laisse supposer l'existence d'une diversité intra-spécifique qui reste à explorer par des techniques plus discriminantes comme la PFGE (Pulsed field gel electrophoresis) ou une technique de séquençage multiple telle que la MLST (Multi Locus Sequence Typing). Il sera également nécessaire de mettre en place des méthodes d'identification complémentaires au séquençage de l'ARNr 16s afin de descendre au rang de l'espèce pour l'ensemble des groupes d'identification et lever les ambiguïtés. Concernant la méthode robotisée, bien que la diversité par rapport au nombre d'isolats collectés semble moins importante sur la base des profils RAPD, il ne nous est pas possible de conclure sans avoir les résultats d'identification de ces isolats. En effet, le séquençage de ces isolats pourrait révéler la présence d'espèces différentes de celle obtenues par la méthode culturale, en particulier pour les populations sous dominantes. Il est donc nécessaire d'effectuer l'identification des isolats obtenus par la méthode robotisée afin de déterminer si ces isolats sont redondants en terme d'espèce par rapport à la méthode spécifique ou si les deux méthodes sont complémentaires et permettent une vision plus globale lorsqu'elles sont associées. Une conclusion finale sur la comparaison des deux méthodes ne peut donc être apportée en l'absence de ces résultats. Concernant la technique RAPD celle-ci ne s'est pas montrée entièrement satisfaisante car moyennement discriminante, ne permettant pas de mettre en évidence des clusters d'espèces. L'utilisation de couples d'amorces différentes pourrait permettre d'optimiser cette spécificité. Concernant la méthode spécifique, les résultats obtenus montrent que le nombre de milieux mis en œuvre pourrait être réduit à simplement 4 milieux sans perte importante de diversité. Au contraire, la méthode robotisée est limitée par le fait qu'elle n'utilise qu'un seul milieu de culture. Compte tenu du fait que cette méthode est à haut débit on peut envisager de tester plusieurs milieux en parallèle afin de déterminer si un autre milieu ne serait pas plus adapté à l'identification d'un maximum de diversité dans le lait maternel. Près de 200 espèces ont pu être mises en évidence dans le microbiote du lait maternel grâce à des méthodes culturales, ces 200 espèces n'ont jamais été identifiées dans un seul et même échantillon mais correspondent à un rassemblement de données de multiples études antérieures. Il sera donc intéressant d'analyser

différents échantillons de lait maternel une fois la méthode la plus adéquate choisie pour l'exploration de la diversité afin d'élargir nos connaissances sur celle-ci. Enfin il est intéressant de noter, que pour un échantillon de lait donné, le nombre d'espèces décrites par les méthodes culturales est compris entre 2 et 18. Avec un nombre de 13 espèces potentiellement identifiées par la méthode spécifique nous sommes en accord avec la littérature en nous positionnant dans la fourchette haute. Les résultats d'identification de la méthode robot seront donc déterminants pour valider de manière définitive la méthode la plus adéquate. Une fois tous les essais complémentaires envisagés réalisés, nous devrions être en mesure de caractériser la diversité bactérienne du lait maternel et ainsi répondre à notre objectif premier qui est l'amélioration des formules infantiles d'un point de vue microbiologique.

REFERENCES

1. Hosea Blewett HJ, Cicalo MC, Holland CD, Field CJ. 2008. The Immunological Components of Human Milk, p. 45–80. *In* Advances in Food and Nutrition Research. Elsevier.

2. Kramer MS, Guo T, Platt RW, Sevkovskaya Z, Dzikovich I, Collet J-P, Shapiro S, Chalmers B, Hodnett E, Vanilovich I, Mezen I, Ducruet T, Shishko G, Bogdanovich N. 2003. Infant growth and health outcomes associated with 3 compared with 6 mo of exclusive breastfeeding. The American Journal of Clinical Nutrition 78:291–295.

3. Ladomenou F, Moschandreas J, Kafatos A, Tselentis Y, Galanakis E. 2010. Protective effect of exclusive breastfeeding against infections during infancy: a prospective study. Archives of Disease in Childhood 95:1004–1008.

4. Ballard O, Morrow AL. 2013. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. Pediatr Clin North Am 60:49–74.

5. Weiss JE, Rettger LF. 1938. Taxonomic Relationships of Lactobacillus Bifidus (B. Bifidus Tissier) and Bacteroides Bifidus. Journal of Infectious Diseases 62:115–120.

6. Gupta N, Kumar R, Agrawal B. 2018. New Players in Immunity to Tuberculosis: The Host Microbiome, Lung Epithelium, and Innate Immune Cells. Front Immunol 9.

7. Thursby E, Juge N. 2017. Introduction to the human gut microbiota. Biochem J 474:1823–1836.

8. Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. 2015. Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. Nutrition Reviews 73:426–437.

9. Rodríguez JM. 2014. The Origin of Human Milk Bacteria: Is There a Bacterial Entero-Mammary Pathway during Late Pregnancy and Lactation?1234. Adv Nutr 5:779–784.

10. Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, Rodríguez JM. 2013. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. Pharmacological Research 69:1–10.

11. Freitas AC, Hill JE. 2018. Bifidobacteria isolated from vaginal and gut microbiomes are indistinguishable by comparative genomics. PLoS ONE 13:e0196290.

12. Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Rochat F, Chassard C. 2014. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding: Mother-neonate bacterial transfer. Environmental Microbiology 16:2891–2904.

13. Jeurink PV, van Bergenhenegouwen J, Jiménez E, Knippels LMJ, Fernández L, Garssen J, Knol J, Rodríguez JM, Martín R. 2013. Human milk: a source of more life than we imagine. Beneficial Microbes 4:17–30.

14. Murphy K, Curley D, O'Callaghan TF, O'Shea C-A, Dempsey EM, O'Toole PW, Ross RP, Ryan CA, Stanton C. 2017. The Composition of Human Milk and Infant Faecal Microbiota Over the First Three Months of Life: A Pilot Study. Scientific Reports 7:40597.

15. Fitzstevens JL, Smith KC, Hagadorn JI, Caimano MJ, Matson AP, Brownell EA. 2017. Systematic Review of the Human Milk Microbiota. Nutrition in Clinical Practice 32:354–364.

16. Martín R, Jiménez E, Olivares M, Marín ML, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM. 2006. Lactobacillus salivarius CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother–child pair. International Journal of Food Microbiology 112:35–43.

17. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turroni F, Mahony J, Belzer C, Delgado Palacio S, Arboleya Montes S, Mancabelli L, Lugli GA, Rodriguez JM, Bode L, de Vos W, Gueimonde M, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M. 2017. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. Microbiology and Molecular Biology Reviews 81:e00036-17.

18. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. 2012. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. Nature 489:231–241.

19. Huey B, Hall J. 1989. Hypervariable DNA fingerprinting in Escherichia coli: minisatellite probe from bacteriophage M13. J Bacteriol 171:2528–2532.

20. Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, Habouzit F, Moletta R. 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digestor as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. Appl Environ Microbiol 63:2802–2813.

21. Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. 2013. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. British Journal of Nutrition 110:1253–1262.

Résumé

Plusieurs études montrent que les enfants nourris par allaitement bénéficient d'un avantage santé, par rapport aux enfants nourris par des formules infantiles. Si le rôle des composants bioactifs et immunologiques contenu dans le lait a été depuis longtemps mis en évidence, le microbiote du lait et son rôle chez le nourrisson n'est pas à négliger. De nos jours les formules infantiles ne reproduisent pas la composition bactérienne du lait maternel. Dans un objectif d'amélioration des formules infantiles, cette étude vise donc à explorer la composition bactérienne du lait maternel par deux approches culturales d'analyse de la diversité bactérienne : l'une utilisant des milieux spécifiques, l'autre un seul milieu riche, et pouvant être robotisée. A la vue des résultats obtenus, la méthode robotisée semble permettre l'obtention d'une plus grande diversité, mais celle utilisant les milieux spécifiques semble plus efficace si l'on ramène cette diversité obtenue aux nombres d'isolats traités. Il reste à déterminer si la seconde méthode est complémentaire de la première ou apporte seulement de la redondance en termes d'espèces identifiées.

Mots clés : Microbiote, lait maternel, identification, probiotiques

Abstract

Several studies reported that breast-fed children have a health benefit, compared to those fed with infant formulas. While the key role of bioactive and immune components of maternal milk are well known, its microbiota should be carefully taken into account. Infant formulas nowadays do not reproduce the maternal milk bacterial part. In order to improve infant formulas, this study aimed at exploring the bacterial component of maternal milk using two distinct approaches. The first one used several selective media. The other one used only one rich medium, and can be robotised. Considering the results obtained, the "robotised" method allowed to obtain a higher diversity but the "selective media" method allowed to obtain a higher biodiversity relatively to the number of isolates. It remains to determine whether the second method is complementary to the first or only provides redundancy in terms of identified species.

Key words: microbiota, maternal milk, identification, probiotics