

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2005

N°49

THESE

pour le

DIPLÔME D'ETAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Mlle Hélène AUGER

Présentée et soutenue publiquement le 27 septembre 2005

**Probiotiques et aliments fonctionnels :
intérêt en prévention nutritionnelle**

Président : M. Jean-Marie BARD, Professeur de Biochimie

Membres du jury : M. Christophe OLIVIER, Maître de Conférences de Toxicologie
Mme Nathalie CAROFF, Maître de Conférences de Bactériologie
Mme Christine MAVIEL, Docteur en Pharmacie

SOMMAIRE

- TABLES DES MATIERES
- INDEX DES TABLEAUX
- INDEX DES FIGURES
- LISTE DES ABREVIATIONS
- INTRODUCTION
- 1^{ère} PARTIE : LES PROBIOTIQUES, DES ALIMENTS FONCTIONNELS
PARMI D'AUTRES
- 2^{ème} PARTIE : LA FLORE INTESTINALE, RÔLES ET EVOLUTIONS
- 3^{ème} PARTIE : PROBIOTIQUES ET PREVENTION NUTRITIONNELLE
- CONCLUSION
- ANNEXES
- BIBLIOGRAPHIE

TABLES DES MATIERES

INTRODUCTION.....	7
1^{ère} PARTIE : LES PROBIOTIQUES, DES ALIMENTS FONCTIONNELS PARMID’AUTRES	8
I. Notion d’aliment fonctionnel.....	8
A. Définition.....	8
B. Réglementation et allégations.....	13
1. Les allégations nutritionnelles (nutritionnelles quantitatives)	14
2. Les allégations fonctionnelles	15
3. Les allégations relatives à la santé	16
4. Allégations et publicité.....	18
C. Probiotiques	21
II. Aliments fonctionnels sur le marché alimentaire	24
A. Généralités.....	24
B. La place des probiotiques	28
2^{ème} PARTIE : LA FLORE INTESTINALE, RÔLES ET EVOLUTIONS.....	34
I. Présentation de la flore.....	35
A. La flore endogène	38
B. La flore de transit.....	39
II. Evolution et influences	40
A. Influence du site digestif	41
B. Influence de l’âge	45
C. Influence de l’alimentation.....	52
D. Autres facteurs.....	54
III. Métabolisme	57
A. Métabolisme des glucides	60
B. Métabolisme du lactate	66
C. Métabolisme de l’hydrogène	66
D. Métabolisme des protéines	67
E. Métabolisme des xénobiotiques.....	67
IV. Interactions avec la muqueuse intestinale et effet barrière	69
A. Présentation de la muqueuse intestinale	69
B. Relations avec la flore	73
C. L’effet barrière.....	74
V. Interactions avec le système immunitaire	76
A. Généralités sur le système immunitaire.....	77
B. Système immunitaire intestinal	80
3^{ème} PARTIE : PROBIOTIQUES ET PREVENTION NUTRITIONNELLE	87
I. Les probiotiques.....	87
A. Définition.....	87

B. Micro-organismes probiotiques	90
C. Choix d'un probiotique.....	94
D. Survie, adhésion des probiotiques et colonisation du tube digestif.....	96
1. Survie dans le tube digestif	97
2. Adhésion aux cellules intestinales.....	98
3. Colonisation de l'intestin par les probiotiques	100
E. Effets biologiques	102
1. Evaluation de l'efficacité des probiotiques	103
2. Effets des probiotiques	107
3. Effets sur la flore endogène – équilibre de la flore colique	109
4. Applications en gastro-entérologie.....	115
5. Stimulation de l'immunité.....	120
II. Probiotiques et prévention nutritionnelle	124
A. « Aidons nos défenses naturelles ».....	128
B. Probiotiques et alimentation infantile.....	132
1. Prévention de la diarrhée et réduction de la sévérité des épisodes diarrhéiques....	134
2. Probiotiques et atopie	139
3. Probiotiques et prématurés	149
C. Assurance qualité et sécurité d'utilisation	154
1. Identification de la souche et énumération.....	154
2. Sécurité d'emploi	157
CONCLUSION.....	163
ANNEXES.....	165
ANNEXE 1 : Définitions	165
ANNEXE 2 : Principales bactéries lactiques associées aux produits laitiers fermentés et leurs rôles	167
ANNEXE 3 : Danone Nutritopics n°29, mars 2004.....	168
ANNEXE 4 : Tableaux récapitulatifs d'essais randomisés ou contrôlés réalisés dans le domaine des maladies intestinales.....	170
BIBLIOGRAPHIE	172

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Perspectives de modulation des fonctions cibles de la physiologie intestinale - aliments fonctionnels et marqueurs possibles	23
Tableau 2: Motivations lors de l'achat d'un produit alimentaire en % [18]	25
Tableau 3: Principaux outils utilisés par les marques dans le discours santé	26
Tableau 4 : Exemples d'aliments fonctionnels et leurs allégations	27
Tableau 5 : Niveaux de population des principaux genres bactériens de la flore intestinale (log ₁₀ bactéries/g de fèces)	39
Tableau 6 : Principaux effets physiologiques de la flore intestinale.....	58
Tableau 7 : Substrats pour la fermentation bactérienne au niveau colique	60
Tableau 8 : Les bactéries coliques, leurs substrats et produits.....	65
Tableau 9 : Nombre de cellules sécrétrices d'IgA anti-rotavirus présent dans la muqueuse de l'intestin de souris hébergeant des flores intestinales différentes.....	85
Tableau 10 : Micro-organismes utilisés comme probiotiques chez l'homme, classés par ordre alphabétique dans chaque colonne	93
Tableau 11 : Pourcentage d'adhésion de 7 souches bactériennes à du mucus humain.....	99
Tableau 12 : Exemples d'aliments fonctionnels contenant des probiotiques et leurs allégations	127
Tableau 13 : Evolution du nombre de lymphocytes et de cellules CD56 après 6 semaines de prise d'Actimel® ou d'un placebo en période de stress.....	129
Tableau 14 : Exemples d'aliments contenant des probiotiques destinés au nourrisson	133
Tableau 15 : Souches probiotiques dont des études pédiatriques réalisées en double aveugle, versus placebo ont démontré une efficacité	135
Tableau 16 : Etudes randomisées contrôlées ayant rapporté un effet statistiquement significatif de probiotiques pour raccourcir la durée de gastro-entérites aiguës	136
Tableau 17 : Etudes randomisées contrôlées de probiotiques pour prévenir des gastro-entérites aiguës chez des nourrissons ou enfants	137
Tableau 18 : Conséquences de la colonisation à la naissance par E. coli sur la fréquence d'apparition d'allergies et d'infections à répétition	144
Tableau 19 : Manifestations atopiques observées à l'âge de 4 ans.....	146
Tableau 20 : Probiotiques utilisés dans certains aliments et indications sur l'emballage	155
Tableau 21 : Etudes à réaliser pour valider la sécurité de souches probiotiques	158

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Stratégie pour le développement des aliments fonctionnels.....	21
Figure 2 : Principaux genres bactériens de la flore colique classés selon leur niveau de population et leur caractère pathogène ou bénéfique	40
Figure 3 : Surface intestinale et détail d'une cellule absorbante	70
Figure 4 : La réponse immunitaire spécifique.....	77
Figure 5 : Interactions et maturation des lymphocytes T helper	79
Figure 6 : Système immunitaire intestinal.....	82
Figure 7 : Mécanismes d'action des probiotiques au niveau intestinal.....	112
Figure 8 : Mécanismes immunomodulateurs présumés de différentes souches probiotiques	123

LISTE DES ABREVIATIONS

AGCC	Acides Gras à Chaîne Courte
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AJR	Apports Journaliers Recommandés
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ATCC	American Type Culture Collection
CEDAP	Commission Interministérielle d'Etude des Produits Destinés à une Alimentation Particulière
CSAH	Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine
DGCCRF	Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FOS	Fructo-OligoSaccharides
FUFOSE	Functionnal Food Science in Europe
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue = tissu lymphoïde associé à l'intestin
GOS	Galacto-OligoSaccharides
GRAS	Generally Recognised As Safe = généralement admis comme sûr
IFN	Interféron
IL	Interleukine
LGG	Lactobacillus rhamnosus souche GG
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
OMS	Organisation Mondiale de la santé = WHO
ONU	Organisation des Nations Unies = UN
SII	Système Immunitaire Intestinal
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
ufc	unité formant des colonies (unité utilisée pour la numération des bactéries viables)
UN	United Nations
WHO	World Health Organization = OMS

INTRODUCTION

Aujourd'hui, l'argument santé est devenu un véritable enjeu dans le domaine agro-alimentaire. Le discours des marques fait de plus en plus référence à la dimension médicale et des aliments « fonctionnels » revendiquant des effets bénéfiques pour notre santé sont mis sur le marché : ces produits correspondent au concept selon lequel les aliments peuvent exercer une action sur l'organisme et participer au bien-être et à la santé. Les messages utilisés pour communiquer sur ces produits sont appelés allégations et sont soumis à une réglementation afin d'éviter des abus.

Les aliments renfermant des probiotiques sont des exemples d'aliments fonctionnels. Ils interagissent avec la flore intestinale, un écosystème très complexe dont les connaissances ne cessent d'évoluer avec le développement de nouvelles techniques d'études. La consommation de probiotiques a pour objectif de modifier la composition et/ou les activités métaboliques et enzymatiques de cette flore intestinale afin d'améliorer la santé de l'homme. Une bonne connaissance de la flore est donc indispensable pour déterminer le profil de flore à favoriser et les bénéfices à en attendre.

Les probiotiques utilisés dans les aliments fonctionnels sont principalement des bactéries lactiques et font l'objet de nombreuses études sur lesquelles les industriels peuvent s'appuyer pour justifier les allégations de leurs produits.

Dans un premier temps, nous évoquerons la place de ces aliments renfermant des probiotiques parmi les aliments fonctionnels dits « nouveaux aliments » qui revendiquent des effets sur la santé par le biais d'allégations. Il sera nécessaire de redéfinir ce qu'est la flore intestinale, comment elle évolue et dans quel contexte elle agit afin de comprendre les effets bénéfiques mis en avant par leur consommation et qui seront présentés dans une troisième partie.

1^{ère} PARTIE : LES PROBIOTIQUES, DES ALIMENTS FONCTIONNELS PARMIS D'AUTRES

Lorsqu'ils sont utilisés par l'industrie agro-alimentaire, les probiotiques entrent dans la composition d'une nouvelle classe d'aliment : les aliments dits fonctionnels. Nous allons ici détailler leurs caractéristiques spécifiques et la réglementation à laquelle ils sont soumis lors de leur élaboration et de la communication publicitaire.

I. Notion d'aliment fonctionnel

A. Définition

Il y a déjà plus de 2400 ans, Hippocrate (460-377 avant Jésus Christ) jetait les bases de la diététique en étudiant les effets des aliments sur les malades et les bien portants [1]. Longtemps, la relation entre la nutrition et la santé s'est limitée aux aspects négatifs et à l'apparition de maladies dues aux excès alimentaires. Le rôle néfaste de l'alimentation dans certaines maladies est en effet bien établi et connu de la majorité avec, par exemple, les acides gras saturés et l'athérosclérose, le sucre et le diabète, les acides nucléiques et la goutte... Depuis une vingtaine d'année, une nouvelle idée de l'impact des aliments sur notre corps se développe au côté de cette association aliment/maladie : c'est la notion d'aliment santé. Hippocrate connaissait déjà ces possibles vertus bénéfiques des aliments sur la santé lorsqu'il disait « de ta nourriture, tu feras ta première médecine ».

Ces dernières années, la nutrition est ainsi passée du statut de science permettant de prévenir d'éventuelles carences (notamment par la définition des AJR : Apports Journaliers Recommandés) à celle de science assurant la promotion du rôle de l'alimentation dans le maintien d'un état de bien-être et de bonne santé ou la réduction du risque des maladies.

La notion qui nous intéresse ici est celle d'« aliment fonctionnel » [2]. Elle vient du Japon, où dès la fin des années 80, une catégorie d'aliments ayant la capacité d'améliorer la santé publique apparaît. Un terme spécifique sera créé en 1991 : les FOSHU (Food of Specified Health Use = aliment à usage médical spécifique).

De nombreux termes apparaissent ensuite : nutraceutiques, alicaments, pharmafood... Les définitions étant très variées, un consensus européen a été établi en 1998 par 100 experts européens travaillant pour le projet FUFOSÉ (Functional Food Science in Europe) financé par l'Union Européenne [3, 4].

L'aliment fonctionnel apparaît plutôt comme un concept qu'un groupe bien défini de produits alimentaires.

Un aliment fonctionnel :

- est un produit alimentaire traditionnel et courant
- est consommé dans le cadre de l'alimentation normale et diversifiée
- a, au-delà de sa valeur nutritive traditionnelle, des effets bénéfiques sur une ou des fonctions cibles pour des quantités qui peuvent être consommées dans l'alimentation habituelle
- a la capacité de maintenir ou d'améliorer l'état de bien-être ou de santé ou de réduire le risque d'une maladie
- a une ou des allégations justifiées scientifiquement et autorisées par une instance reconnue.

Détaillons certaines de ces propriétés :

→ L'aliment fonctionnel est un produit alimentaire traditionnel et courant

Il ne se présente ni sous forme de pilule ni sous forme de gélule mais est semblable en apparence à un aliment conventionnel ou peut constituer un aliment traditionnel.

Ce peut être un aliment [2] :

- soit naturel
- soit modifié :
 - o un composant a été ajouté (ex : les produits laitiers fermentés, les margarines aux phytostérols...)
 - o un composé potentiellement délétère a été retiré (ex : les produits dits hypoallergéniques)
 - o la concentration d'un composant naturellement présent a été augmentée (ex : les compotes enrichies en vitamines, les céréales enrichies en fibres...)
 - o la biodisponibilité d'un composant a été modifiée.

Les modifications peuvent porter sur un ou plusieurs composants et une combinaison des différents procédés cités peuvent concerner un même aliment fonctionnel.

Lorsque les produits alimentaires sont enrichis d'un constituant naturel ayant un effet bénéfique sur la santé, on parle de « nouveaux aliments fonctionnels ».

Ces « principes actifs » enrichissant les aliments fonctionnels peuvent être :

- des macronutriments : par exemple, les acides gras poly-insaturés de la série des oméga 3
- des micronutriments comme les vitamines ou les minéraux
- des composés dépourvus de valeur nutritionnelle, mais qui agissent positivement sur l'organisme : des métabolites secondaires des plantes (polyphénols), des micro-organismes vivants (souches bactériennes), des fibres solubles ou insolubles...

Les aliments fonctionnels ne sont :

- ni des suppléments alimentaires qui sont définis comme des produits destinés à être ingérés en complément d'une alimentation habituelle de façon à corriger des déficiences réelles ou anticipées dans les apports journaliers
- ni des médicaments car ils n'ont pas d'effets thérapeutiques : leur rôle sera de réduire les risques d'une maladie, pas de la prévenir ni de la traiter.

→ L'aliment fonctionnel a, au delà de sa valeur nutritive traditionnelle, des effets bénéfiques sur une ou des fonctions cibles pour des quantités qui peuvent être consommées dans l'alimentation habituelle

Actuellement, les principales fonctions cibles des aliments fonctionnels sont, de façon non exhaustive :

1. développement et croissance
2. régulation du métabolisme de base
3. défense contre les stress oxydatifs
4. système cardiovasculaire
5. physiologie gastro-intestinale
6. performances cognitives et mentales
7. performances physiques.

Ces fonctions ont été étudié par le FUFOSSE et les experts ont déterminés pour chacune d'elles :

- les fonctions clés
 - les marqueurs permettant de suivre ces fonctions
 - les aliments pouvant avoir une action sur ces fonctions.
-
- Les fonctions modulées par les aliments fonctionnels doivent remplir trois conditions [4] :
 - elles jouent un rôle majeur dans le maintien d'un état de santé, de bien-être et/ou la réduction du risque d'une maladie
 - on dispose de marqueurs de ces fonctions
 - il existe des composants alimentaires potentiellement intéressants pour la modulation de ces fonctions.

 - Le marqueur peut être de nature biochimique (une enzyme) ou physiologique (une fonction d'un organe). Son évaluation peut être objective (performances physiques ou psychologiques par exemple) ou subjective (comme la qualité de vie).

Pour être retenu, un marqueur doit répondre à un certain nombre de critères [3]:

- être facilement accessible et mesurable
- être valide en terme de reproductibilité, sensibilité et spécificité
- être relié de façon plausible au processus biologique étudié
- être accepté de façon générale au niveau scientifique
- l'effet mesuré par ce marqueur doit être physiologiquement et statistiquement significatif.

Il est important de souligner que dans de nombreux cas, différents marqueurs doivent être associés et que l'étude dynamique d'un marqueur peut être plus utile que son étude statique.

- Pour démontrer les effets bénéfiques des aliments fonctionnels, des études doivent être réalisées. Certains principes doivent être respectés pour que l'étude puisse être considérée comme valide. Ils permettent d'éviter que des vertus soient extrapolées de façon abusive aux aliments fonctionnels [4].
 - Les sujets sont représentatifs de la population ciblée par l'aliment fonctionnel.
 - Les sujets consomment de façon raisonnable l'aliment en terme de quantité, de fréquence, de niveau de calories. Le scénario de consommation est réaliste, compatible avec un régime alimentaire normal et cohérent avec les recommandations nutritionnelles.
 - L'étude concerne le produit fini tel qu'il sera consommé lors de sa commercialisation et non pas seulement un ingrédient.
 - L'étude est suffisamment importante pour démontrer l'effet bénéfique attendu (la taille est déterminée grâce aux formules standard utilisées en statistique).
 - La durée de l'étude est assez longue pour pouvoir justifier de l'effet bénéfique à long ou à court terme.
 - Les marqueurs utilisés sont pertinents.
 - Les résultats sont mesurés selon des procédures standardisées.
 - Les facteurs pouvant interférer avec les résultats sont pris en compte : par exemple, une autre modification du comportement alimentaire.

Ainsi, un aliment fonctionnel est un aliment relevant d'un comportement alimentaire habituel et ayant des effets bénéfiques démontrés sur la santé de ceux qui le consomment.

Pour chaque aliment fonctionnel, il faut donc [3] :

- identifier les interactions bénéfiques entre le constituant fonctionnel de l'aliment et la (les) fonction(s) cible(s)
- élucider le(s) mécanisme(s) de la modulation de ces fonctions. Les résultats de toutes sortes d'études devraient figurer : *in vitro*, cultures de cellules, modèles animaux et sur l'homme.
- identifier et valider un (des) marqueur(s) pertinent(s) de ces fonctions et de leur modulation
- s'assurer de l'innocuité des quantités ingérées nécessaires à une action sur la fonction cible et surveiller à long terme les interactions entre l'aliment et les fonctions modulées pour satisfaire aux exigences de sécurité d'utilisation
- réaliser des études nutritionnelles humaines démontrant les bénéfices réels directs ou indirects de la consommation de cet aliment et en se conformant aux règles méthodologiques habituellement mises en œuvre dans la recherche clinique.

Une autre notion doit être maintenant définie car elle est systématiquement associée à l'aliment fonctionnel : c'est l'allégation. C'est par celle-ci que l'industriel communique sur les fonctions de son produit et qu'il met en avant l'atout de ce dernier dans une optique de prévention et de santé.

B. Réglementation et allégations

Dans une volonté de communication sur les aliments fonctionnels, l'industrie agro-alimentaire a développé des messages publicitaires axés sur les constituants de ces produits et leurs effets bénéfiques sur la santé : ce sont les allégations, dont le contenu est étroitement réglementé.

Le terme « allégation » a été défini par le *Codex Alimentarius*. Cette commission internationale a été créée en 1962 par deux institutions de l'ONU (Organisation des Nations Unies) : l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et la FAO (Food and Agriculture

Organization = Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture). Elle a pour mission d'établir des normes alimentaires internationales, des lignes directrices et d'autres textes (tels que des Codes d'usage) afin de protéger la santé des consommateurs et de faciliter le commerce international des denrées alimentaires.

Les recommandations émises par la commission du *Codex* sont établies avec l'approbation de l'Union Européenne, du Japon et des Etats-Unis : elles constituent un guide pour la législation des différents pays membres mais il appartient à chaque gouvernement de décider de l'utilisation qu'il entend en faire. Il s'agit d'une démarche indicative et non impérative, visant à la régularisation progressive des échanges de denrées alimentaires par un ajustement entre les réglementations très diverses.

On désigne par allégation « tout message ou représentation, y compris une représentation sous la forme d'images, d'éléments graphiques ou de symboles, qui affirme, suggère ou implique qu'une denrée alimentaire possède des caractéristiques particulières [...] liées à son origine, ses propriétés nutritives, sa nature, sa production, sa transformation, sa composition ou toute autre qualité » [5, 6].

Aussi, aucun aliment ne doit être décrit ou présenté de façon fautive, trompeuse, mensongère ou susceptible de créer une impression erronée au sujet de sa nature.

Enfin, la personne qui commercialise l'aliment devrait être en mesure de justifier les allégations avancées.

Ces allégations se divisent en 3 catégories [7, 8] :

1. Les allégations nutritionnelles (nutritionnelles quantitatives)

Elles font référence à la composition de l'aliment en indiquant la teneur en énergie et/ou nutriments qu'il contient mais aussi qu'il ne contient pas.

Ce sont des allégations :

1. factuelles, c'est-à-dire relatives à la teneur en éléments nutritifs ou à la valeur calorique

Ex : source de fibres, riche en vitamine C, faible teneur en matières grasses...

2. comparatives lorsque l'aliment en question diffère significativement d'aliments du même groupe non modifiés.

Ex : allégée en sucres, teneur réduite en matières grasses...

Les aliments ainsi comparés doivent être clairement identifiés.

Les allégations nutritionnelles quantitatives permettent une meilleure compréhension des valeurs nutritionnelles affichées sur le produit et facilitent le choix du consommateur selon les éléments qu'il recherche ou préfère éviter dans son alimentation.

La Commission interministérielle d'Etude des Produits Destinés à une Alimentation Particulière (CEDAP) a défini des critères quantitatifs pour ces allégations : des teneurs minimales ou maximales ont été fixées à partir ou en dessous desquelles un aliment peut être qualifié de « source de... », « riche en... » ou « à teneur réduite en... ».

- Dès qu'une allégation nutritionnelle figure sur le produit, un étiquetage nutritionnel est obligatoire [9].

2. Les allégations fonctionnelles

Elles mettent en avant le rôle d'un nutriment, d'une substance contenue dans le produit en décrivant son rôle physiologique dans la croissance, le développement et les fonctions normales de l'organisme.

Ex : la vitamine D aide à mieux fixer le calcium.

Ex : le magnésium est utile à la transmission de l'influx nerveux.

Selon le *Codex Alimentarius*, l'allégation ayant trait à la fonction de l'élément nutritif doit être reconnue par la communauté scientifique et appuyée en cela par les autorités compétentes [7].

Une liste positive des allégations fonctionnelles a été rédigée et est régulièrement mise à jour par le CEDAP : ces allégations peuvent être utilisées sans justification de la part des industriels car elles font l'objet d'une reconnaissance scientifique. Le CEDAP précise aussi les expressions utilisables du type « favorise », « aide à », « contribue », « intervient dans », « participe »...

Si l'industriel veut utiliser une autre allégation, il devra pouvoir apporter la preuve scientifique de son fondement. Le dossier ne sera étudié qu'en cas de contrôle ou de litige.

- À toute allégation fonctionnelle doit être associée une mention rappelant l'importance d'une alimentation équilibrée et variée.

3. Les allégations relatives à la santé

Elles vont au-delà des allégations fonctionnelles en indiquant qu'il existe un lien entre l'aliment et un état de santé ou une modification biologique. Elles suggèrent que la consommation du produit apporte des bénéfices au-delà de ceux obtenus normalement par l'alimentation mais sans jamais faire référence à la maladie.

Ex : aliment enrichi en stérols végétaux qui réduisent significativement le cholestérol dans le cadre d'un régime adapté.

L'article R. 112-7 du Code de la consommation, prévoit que « l'étiquetage ne (*doit*) pas [...] attribuer à une denrée alimentaire des propriétés de prévention, de traitement et de guérison d'une maladie humaine, ni évoquer ces propriétés ». Il s'agirait d'une pratique illégale de la pharmacie or un aliment, même « fonctionnel » ne peut être un médicament.

Le risque de perte de chances est sous-jacent à l'utilisation d'allégations thérapeutiques ou préventives : il ne faut pas, en effet, que des allégations santé attribuées à des produits autres que les médicaments induisent une confusion de nature à négliger un traitement médicamenteux efficace [10].

Le projet de règlement européen concernant les allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires du 17 juillet 2003 [COM(2003) 424 final 2003/0165 (COD)] réaffirme cette interdiction mais il marque une ouverture pour les allégations relatives à la maladie : les allégations relatives à la modification des fonctions physiologiques seraient autorisées, mais aussi celles relatives à la réduction d'un facteur de risque de maladie. Ce projet veut en effet introduire une distinction entre « prévention d'une maladie » et « réduction d'un facteur de risque de maladie » :

- la mise en avant de la réduction d'un facteur de risque serait acceptée après autorisation ou notification
- l'étiquetage devrait également comporter une mention indiquant que les maladies ont de multiples facteurs de risque et que la modification de l'un de ces facteurs peut ou non avoir un effet bénéfique [6].

Le FUFOSÉ subdivise les allégations santé des aliments fonctionnels en deux groupes [3] :

- l'allégation fonctionnelle de type A qui fait état d'une amélioration de la fonction : la modulation de la fonction cible (génomique, biochimique, physiologique, psychologique ou comportementale) peut être mesurée quantitativement par une modification d'une concentration d'un constituant de l'organisme ou par la mesure de paramètres physiologiques (pression sanguine...) ou une amélioration de performances physiques ou intellectuelles
- l'allégation préventive de type B qui correspond à la modulation d'un processus pathologique et est associée à la diminution d'un risque d'une maladie.

Après avoir été adopté par la Commission européenne, le projet a été transmis au Conseil et au Parlement. La première lecture par le Parlement européen a eu lieu le 26 mai 2005.

La Commission européenne souhaitait:

- interdire les allégations relatives au bien-être général, aux fonctions psychologiques ou comportementales, à l'amaigrissement, ainsi que toute référence à des professionnels de santé [11]
- établir des profils nutritionnels en fonction desquels un produit pourrait faire l'objet d'une allégation ou non : le fait qu'un produit très riche en graisses puisse se vanter de favoriser la croissance des os (car il est aussi riche en calcium) ou qu'une sucette 100% sucre affiche 0% de matières grasses était considéré comme un paradoxe et un abus de confiance [12].

Lors de la première lecture de la proposition de règlement par le Parlement européen, ce dernier a jugé nécessaire d'exiger une preuve scientifique pour l'emploi d'allégations psychologiques, comportementales ou relatives à la perte de poids sans pour autant les

interdire et a refusé les dispositions relatives aux profils nutritionnels ; la deuxième lecture du texte est prévue à l'automne 2005 ou en 2006.

4. Allégations et publicité

Comme tout autre produit de consommation courante, les denrées alimentaires - en général - sont soumises à l'article L 121-1 du Code de la consommation qui interdit « toute publicité comportant, sous quelque forme que ce soit, des allégations, indications ou présentations fausses ou de nature à induire en erreur » le consommateur. L'article L 121-2 précise que « les agents de la DGCCRF (Direction Départementale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes) [...] peuvent exiger de l'annonceur la mise à leur disposition de tous les éléments propres à justifier les allégations, indications ou présentations publicitaires » [13]. Une expertise du dossier scientifique *a posteriori* peut alors être demandée à l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments).

Actuellement, une autorisation préalable de publicité est nécessaire lorsque l'allégation relative à la santé n'appartient pas à la liste dressée par le CEDAP : il y a obligation de prouver scientifiquement les mentions d'une nouvelle allégation pour obtenir le visa de publicité produit (visa PP). [8]

En avril 2003, un article du Bulletin de l'Ordre des pharmaciens intitulé « Allégations santé et définition du médicament : quelle frontière ? » pose le problème du flou entourant les allégations relatives à la santé [10].

L'article L. 5122-14 du Code de la santé publique, soumet la publicité en faveur des « produits autres que les médicaments, présentés comme favorisant le diagnostic, la prévention ou le traitement des maladies, des affections relevant de la pathologie chirurgicale et des dérèglements physiologiques, le diagnostic ou la modification de l'état physique ou physiologique, la restauration, la correction ou la modification des fonctions organiques » à des procédures de contrôle particulières.

Il organise :

- un contrôle *a priori* de la publicité grand public pour l'obtention du visa « publicité produit » ou « visa PP » après examen par une commission regroupant des représentants de l'industrie agro-alimentaire et de la DGCCRF
- un contrôle *a posteriori*, avec obligation de dépôt d'un dossier à l'AFSSAPS dans les huit jours suivant la première diffusion de la publicité. L'AFSSA est saisie et émet un avis concernant les allégations formulées.

Cet article semble autoriser expressément, sous réserve du respect des procédures de contrôle et de validation prévues, des allégations santé pour les produits autres que les médicaments, dont les produits alimentaires font partie.

Deux éléments entravent l'application de cet article :

1. La définition du médicament a été étendue au détriment des autres produits qui voyaient alors le champ des allégations pouvant leur être attribuées diminuer.

La définition du médicament telle qu'elle apparaît à l'article L 5111-1 du Code de la santé publique, s'est enrichie et le terme médicament ne définit plus seulement « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines » mais aussi « tout produit pouvant être administré à l'homme [...] en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques » [14].

Dès lors, reste-t-il une place pour les produits autres que les médicaments souhaitant revendiquer un « bénéfice santé » ? Mais il faut aussi noter que rien dans la définition des produits alimentaires ne permet d'exclure que ces produits aient des propriétés bénéfiques pour la santé.

2. Il y a dissonance entre le droit communautaire et le droit national concernant les allégations santé en faveur des produits alimentaires.

L'article R. 112-7 qui interdit toute allégation thérapeutique est issu du droit communautaire et prévaut donc sur le droit français.

- Concernant les allégations relatives aux maladies, la directive communautaire prime sur le droit français : elles sont donc interdites.

- Mais concernant les allégations relatives à la modification des fonctions physiologiques, le Code de la santé publique est plus strict et le contrôle des allégations devrait aussi avoir lieu *a priori*.

Le projet de proposition de règlement communautaire concernant les allégations nutritionnelles, fonctionnelles et relatives à la santé à propos des denrées alimentaires se positionnait en faveur d'un contrôle *a priori* des allégations relatives à la santé par la Commission européenne, après avis de l'Autorité européenne de sécurité des aliments ; après la première lecture, le Parlement préfère une procédure de notification.

Pour conclure sur les allégations, prenons un exemple de denrée alimentaire : le lait et considérons les différentes allégations possibles :

« Naturellement riche en calcium » ou « source de calcium » sont des allégations nutritionnelles quantitatives.

« Le calcium participe au maintien du capital osseux » est une allégation fonctionnelle alors que « le calcium améliore la densité osseuse » est une allégation relative à la santé car un bénéfice pour la santé y est suggéré.

« Le calcium prévient l'ostéoporose » fait référence à une maladie et serait une allégation thérapeutique. Ce type d'allégation est interdit sur l'étiquetage d'une denrée alimentaire.

Enfin, la figure 1 récapitule les étapes nécessaires lors de l'élaboration d'un aliment fonctionnel [2].

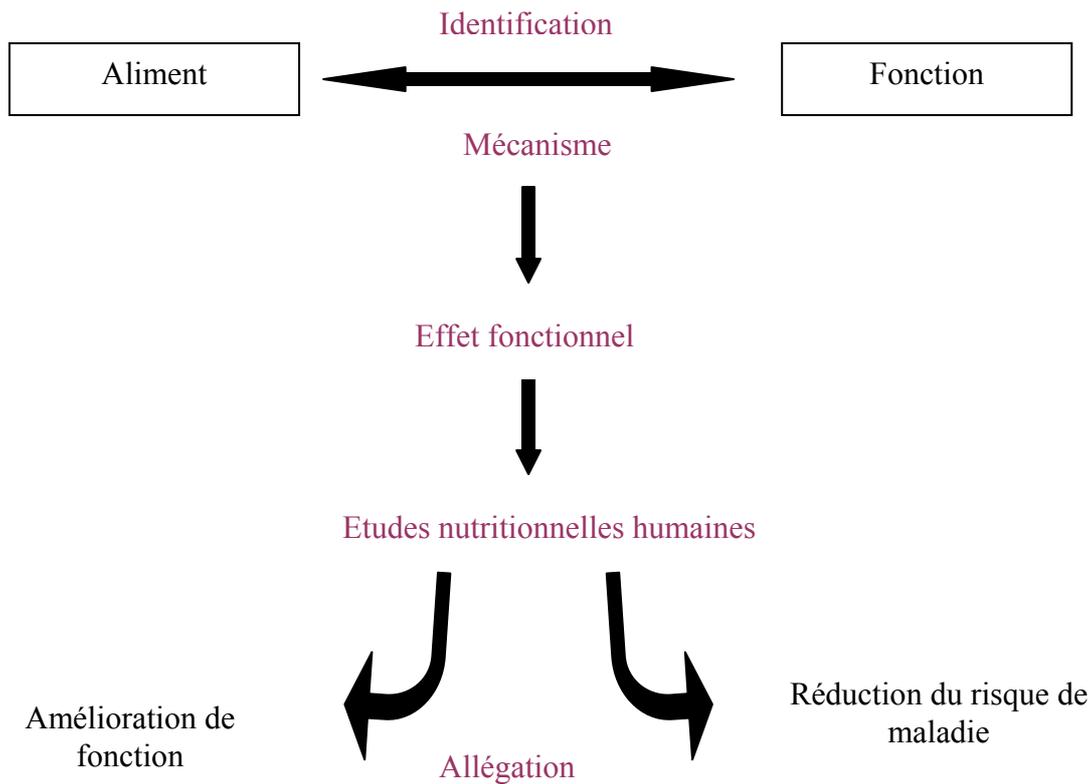


Figure 1: Stratégie pour le développement des aliments fonctionnels [2]

Parmi les aliments fonctionnels, nous étudierons plus particulièrement les probiotiques ; ils sont surtout présents dans des produits laitiers.

C. Probiotiques

Actuellement, dans les linéaires des magasins, les aliments fonctionnels ayant comme particularité de contenir des probiotiques sont nombreux. Ils peuvent être commercialisés dans le but d'améliorer certaines fonctions au niveau intestinal.

En effet, parmi les principales fonctions de l'organisme pouvant être modulées par des aliments fonctionnels, les fonctions cardiovasculaire et intestinale retiennent l'attention des scientifiques et des industriels.

Développons ici la physiologie et la fonction intestinale [3].

Les fonctions cibles de la physiologie intestinale peuvent être classées parmi :

- celles qui déterminent le temps de transit et les caractéristiques des selles
- celles qui impliquent la microflore intestinale
- celles qui sont associées au système immunitaire intestinal
- celles qui dépendent des produits issus de la fermentation de nutriments.

➤ Fonction intestinale optimale et formation des selles

Deux éléments majeurs interviennent sur cette fonction : l'intégrité du côlon et la microflore colique. Les marqueurs utilisables pour l'étude de cette fonction sont, par exemple, le temps de transit intestinal, les caractéristiques des selles (poids, consistance, fréquence).

➤ Composition de la flore du côlon

La composition de la flore colique et ses activités peuvent être considérées comme des indicateurs et des facteurs de risque des fonctions coliques. On peut alors les utiliser comme marqueurs.

➤ Contrôle des fonctions immunitaires intestinales

On peut étudier la réponse immuno-inflammatoire locale et la sécrétion d'anticorps.

➤ Contrôle des produits de fermentation

Les produits obtenus interviennent dans la croissance et la différenciation des cellules intestinales. Mesurer leurs concentrations peut alors être intéressant.

Les aliments fonctionnels ayant le plus grand potentiel, aux yeux des experts du FUFOSSE, sont ceux dont l'utilisation permettrait de modifier la composition et les activités métaboliques et enzymatique de la microflore intestinale. Il s'agit des probiotiques mais aussi des prébiotiques et des symbiotiques. Il faut d'abord définir brièvement ces termes avant de présenter leurs niveaux d'action possibles.

En 2001, la FAO (Food and Agriculture Organization) et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) ont retenu comme définition des probiotiques « des micro-organismes vivants qui,

lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, apportent un bénéfice pour la santé de l'hôte » [15].

Les prébiotiques sont des ingrédients alimentaires non digestibles, et qui influence l'hôte favorablement en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'une bactérie spécifique ou d'un nombre restreint d'espèces bactériennes du côlon et en favorisant ainsi la santé de l'hôte [16].

Les symbiotiques sont décrits comme un mélange de probiotiques et de prébiotiques ayant un effet bénéfique sur l'hôte en améliorant la survie et l'implantation de micro-organismes vivants dans le tube digestif [16].

Le tableau 1 résume les niveaux d'action possibles de ces 3 catégories d'aliments fonctionnels.

Fonctions cibles	Marqueurs possibles	Aliments fonctionnels potentiels
Fonction intestinale optimale et formation des selles	Consistance des selles Masse des selles Fréquence des selles Temps de transit	Glucides non digestibles Probiotiques Prébiotiques Synbiotiques
Composition de la flore colique	Composition Activités enzymatiques et métaboliques	Probiotiques Prébiotiques Synbiotiques
Contrôles des fonctions immunitaires	Sécrétion d'IgA Cytokines	Probiotiques Prébiotiques Synbiotiques
Contrôle des produits de fermentation	Acides gras à chaîne courte	Prébiotiques Synbiotiques

Tableau 1 : Perspectives de modulation des fonctions cibles de la physiologie intestinale - aliments fonctionnels et marqueurs possibles [3]

Qu'il s'agisse d'un probiotique, d'un prébiotique ou d'un symbiotique, il est nécessaire de connaître :

- les souches microbiennes utilisées et un outil de suivi de ces souches *in vivo*
- les principes actifs
- le procédé d'obtention
- les cibles physiologiques et les effets bénéfiques démontrés
- la sécurité d'emploi des micro-organismes et des produits finis.

D'après le règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil, du 27 janvier 1997, relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires [17], « les aliments ou ingrédients alimentaires (*visés par le présent règlement*) ne doivent pas : présenter de danger pour le consommateur, induire le consommateur en erreur [...]. Avant leur mise sur le marché, (*ils*) font l'objet d'une procédure d'évaluation communautaire à l'issue de laquelle peut être prise une décision d'autorisation ».

II. Aliments fonctionnels sur le marché alimentaire

A. Généralités

L'augmentation de l'espérance de vie, des dépenses des soins de santé, le désir d'améliorer la qualité de vie, de mieux manger ont stimulé les recherches dans le domaine de la prévention par l'alimentation.

Les industriels ont alors développé le marché des aliments fonctionnels pour répondre à un souhait des consommateurs en matière de nutrition préventive. En 2004, la question « qu'est-ce qui est primordial pour vous lors des achats alimentaires, quelque soient les produits ? », les bienfaits pour la santé arrivent en 4^{ème} position (Tableau 2) [18].

	Très important	Moyennement important	Peu ou pas important
L'aspect, la fraîcheur, la présentation	97.7	2.3	0.0
Le goût	88.5	9.9	1.8
Le plaisir de faire plaisir aux proches, aux amis	74.9	20.3	4.8
Les bienfaits pour la santé	66.9	25.2	7.9

Tableau 2: Motivations lors de l'achat d'un produit alimentaire en % [18]

(Source : Domoscope Unilever 2004 - Le groupe Unilever Bestfoods[®] comprend notamment Lipton[®], Knorr[®], Amora Maille[®])

Malgré un prix nettement plus élevé des aliments fonctionnels, la promesse de santé fait vendre alors naturellement, de nouveaux produits apparaissent. On estime que chaque année, le nombre des aliments fonctionnels double dans le monde : le Japon, les Etats-Unis et l'Europe de l'Ouest représentent 90% de ce marché [12]. En 2004, 66% des nouveaux produits alimentaires mis sur le marché français affichaient un côté « santé nutrition bien-être », contre 1 sur 3 en 1998.

Les marques cherchent des cautions médicales et scientifiques pour légitimer leur communication. Les 4 principaux outils qu'elles utilisent sont [19] :

1. l'appui de médecins ou de nutritionnistes lors des lancements des produits
2. la production d'études en partenariat avec le monde scientifique
3. l'utilisation de résultats d'études déjà produites
4. la communication et le sponsoring d'événements à caractère médical (salons, entretiens professionnels).

Quelque soit l'outil retenu, il doit être manié avec précaution pour rester crédible.

L'Iremas (Institut pour la recherche en marketing de l'alimentation santé) a pour mission de mieux codifier les rapports entre le marketing et la recherche.

Le tableau 3 dresse les avantages et les inconvénients de chaque stratégie.

Outils	Intérêts	Limites
Appui de médecins	Caution médicale acquise auprès des leaders d'opinion	Problèmes déontologiques
Etudes avec un partenaire	Solution la plus efficace et qui crédibilise la marque	Représente un investissement financier important
Reprise d'études	Coût moins élevé que la solution précédente	Nécessite le recours à des spécialistes de conseil en marketing nutritionnel et suppose que des études soient déjà réalisées sur des produits similaires
Sponsoring	Tisse des liens avec le milieu médical et y crédibilise sa marque	Efficacité moins directe, sauf si les médecins font partie de la « cible marketing »

Tableau 3: Principaux outils utilisés par les marques dans le discours santé (intérêts et limites) [19]

Comme nous l'avons déjà mentionné, les principaux aliments ou ingrédients actuellement considérés pour des allégations sont, de façon non exhaustive :

- les lipides poly-insaturés pour la protection cardio-vasculaire
- les stérols de plantes pour diminuer le taux de cholestérol
- les probiotiques pour renforcer les défenses
- les aliments enrichis en fibres, prébiotiques, vitamines et minéraux...

Le tableau 4 donne des exemples d'aliments fonctionnels et leurs allégations.

Aliment fonctionnel	Composant actif	Allégation	Cibles
Gervais aux fruits® 	Calcium, vitamine D	Fromage frais aux fruits à teneur garantie en calcium et enrichi en vitamine D. Le calcium joue un rôle essentiel dans la construction du capital osseux des enfants. La vitamine D améliore l'absorption et la fixation du calcium sur l'os.	Développement du squelette
Actimel® 	<i>L. Casei</i> defensivus (probiotique)	« Actimel® vous aide à être plus résistant » ou « Aidons nos défenses naturelles »	Défenses naturelles de l'organisme : fonctions immunes
BIO de Danone® 	<i>Bifidobacterium</i>	BIO® de Danone contient du Bifidus Actif, un ferment naturel sélectionné par Danone qui contribue à l'équilibre de notre flore intestinale. Cette flore intervient dans le bon fonctionnement de notre intestin.	Equilibre de la flore intestinale, favorise le transit
eau minérale Hépar® 	Mg	Naturellement riche en magnésium. Consommée quotidiennement, l'eau minérale naturelle Hépar® constitue pour l'organisme un complément Magnésique non négligeable.	Manque de magnésium, équilibre nerveux et musculaire lutter contre la fatigue, favoriser la digestion et faire face à l'augmentation des besoins dans certains cas (grossesse, allaitement, ménopause...)
St Hubert Oméga 3® (yaourt, margarine), Fruit d'Or Oméga 3® 	Oméga 3	« Source d'oméga 3, aide au rééquilibrage des apports en oméga 3 » « Riche en oméga 3, les oméga 3 participent au bon fonctionnement du système cardiovasculaire »	Equilibre des lipoprotéines
céréales All'Bran® 	Fibres alimentaires, Mg.	« Céréales complètes naturellement riche en fibres et magnésium »	<ul style="list-style-type: none"> • Bien être intérieur, au bon fonctionnement du transit intestinal participent naturellement à réguler notre rythme intérieur • Maintien des fonctions intestinales et formations des selles • Contrôle le cholestérol

Tableau 4 : Exemples d'aliments fonctionnels et leurs allégations

Les produits laitiers sont le domaine de prédilection du marketing santé et l'offre « santé » représente 17% des ventes de yaourts et laits fermentés. Les laits qui présentent un atout nutritionnel supplémentaire constituent 9.3% des achats en lait des ménages, avec un prix de 20 à 80% plus élevé que celui d'un lait standard.

En général, la cible d'un aliment fonctionnel porteur d'allégation tend à être la plus large possible. Cependant, un aliment fonctionnel peut ne pas l'être pour tous. Il existe certaines catégories de personnes qui nécessitent des apports particuliers et qui constituent ainsi des cibles privilégiées pour ces nouveaux aliments à allégations relatives à la santé :

- les nourrissons et plus particulièrement au moment de la diversification alimentaire
- les adolescents, dont le régime alimentaire peut être anarchique et carencé
- les femmes, qui présentent des besoins accrus en fer dès l'apparition des règles, en fer et en folates lors de la grossesse, en calcium lors de la ménopause
- les personnes âgées (pathologies associées ou diminution des apports)
- les malades soumis à un régime nutritionnel particulier, notamment lors de dyslipidémie.

B. La place des probiotiques

La plupart des aliments fermentés font intervenir des probiotiques : les bactéries lactiques, en tant qu'agent principal ou secondaire de la fermentation. Les produits laitiers constituent le domaine d'application le plus courant des fermentations lactiques du fait de la contamination fréquente de bactéries lactiques dans le lait et de leur capacité à utiliser le lactose. Le lait n'est pourtant pas un milieu de culture idéal pour les bactéries lactiques du fait de sa faible teneur en facteur de croissance (vitamine, azote non protéique) et de la présence de phages [20].

Au début du XX^{ème} siècle, Metchnikoff émettait l'idée que la consommation de bactéries vivantes favorisait la longévité et permettait la détoxification des substances putréfactives. Le premier produit probiotique commercialisé pour ses bactéries lactiques vivantes était un lait fermenté à base de « Lactobacilline ». Il a été lancé à Paris au début du XX^{ème} siècle et contenait les probiotiques isolés par Metchnikoff : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [21]. Devant son succès, l'incorporation de

probiotiques dans les aliments s'est focalisée sur les produits laitiers et aujourd'hui, les probiotiques sont majoritairement commercialisés en France sous forme de laits fermentés.

Le lait fermenté est défini comme étant le produit obtenu par fermentation du lait avec des bactéries lactiques et/ou des levures [22]. Son origine remonte à des millénaires et se situe au Moyen Orient, où il constituait le moyen de conserver le lait pendant plusieurs jours. Le yoghourt bulgare, le biokyss tchèque, le laktorol des pays de l'Est, le zabady égyptien, le laban libanais et égyptien, le kéfir et le koumiss des ex-républiques soviétiques, le langfill et le lattfil scandinaves, le buttermilk (ou lait ribot) américain, le miru-miru et le mil-mil japonais ou encore le dahi indien, sont autant d'exemples de laits fermentés. Ils peuvent s'obtenir à partir de lait de vache, de chèvre, de brebis, ou de jument, bufflesse, ânesse, chamelle...

Aujourd'hui, la dénomination « lait fermenté » est réglementée et est réservée au produit laitier préparé avec des laits ayant subi un traitement thermique au moins équivalent à la pasteurisation etensemencés avec des micro-organismes appartenant à l'espèce ou aux espèces caractéristiques de chaque produit. Les paramètres de fermentation (température, durée) varient selon les espèces de micro-organismes. La coagulation est seulement obtenue grâce à l'activité des micro-organismes et les micro-organismes du produit final doivent être viables et abondants.

Selon la législation française, l'appellation « yaourt » ou « yoghourt » est réservée au produit obtenu et conservé par la seule fermentation lactique réalisée par *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, à l'exclusion de toute autre bactérie. Ces bactéries doivent demeurer vivantes jusqu'au dernier jour de la DLC (Date Limite de Consommation) et les ferments vivants doivent être au minimum de 10 millions par gramme de yaourt soit 10^7 ufc/g [23].

A ces ferments du yaourt sont parfois ajoutées d'autres bactéries lactiques d'origine intestinale qui ne participent pas au processus de fermentation.

Deux grands types de ferments lactiques sont utilisés en France pour la fabrication des laits fermentés :

1. les lactobacilles : *Lactobacillus acidophilus* et *L. casei*

- *L. acidophilus* se développe assez lentement dans le lait donc il est généralement associé à d'autres ferments.
- *L. casei* peut être employé seul ou non.

Ces deux bactéries sont normalement présentes dans la flore intestinale humaine et peuvent bien résister aux sécrétions gastrique et biliaire.

2. les bifidobactéries : *Bifidobacterium bifidum* et *B. longum*

Ces bactéries sont souvent associées aux ferments lactiques du yaourt (mais les produits obtenus n'ont plus droit à l'appellation yaourt).

Elles font aussi partie de la flore normale de l'homme et possède une bonne résistance à l'acide gastrique et aux sels biliaires.

L. casei apporte un goût légèrement acide et très rafraîchissant au lait fermenté et les bifidobactéries lui donnent une saveur assez douce.

Les laits fermentés peuvent être additionnés d'extraits d'aromates, d'arômes naturels et, dans la limite de 30% en poids du produit fini, de sucres et d'autres denrées alimentaires conférant une saveur. Il existe ainsi des laits fermentés pour tous les goûts : nature, aux fruits, aromatisé. L'incorporation de matières grasses ou protéiques d'origine non laitière est interdite.

L'idée d'améliorer la santé en modifiant la flore intestinale a ensuite ré-émergé à la fin du XX^{ème} siècle et des produits variés sont actuellement commercialisés avec cette ambition.

Citons le plus connu des probiotiques sur le marché : Actimel[®] de Danone[®]. Ce lait fermenté contient les deux ferments caractéristiques du yaourt (2×10^9 ufc de *Lactobacillus bulgaricus*, 2×10^{10} ufc de *Streptococcus thermophilus*) et « 10 milliards d'unités par petite bouteille de son ferment exclusif : *Lactobacillus casei* Defensis » (2×10^{10} ufc de *Lactobacillus casei* DN-114 001).



« Ce ferment agit au cœur de l'organisme, dans l'intestin » et ainsi « Actimel participe à renforcer les défenses naturelles de l'organisme dans le cadre d'une consommation quotidienne ». Les messages publicitaires diffusés en France s'appuient sur le slogan « aide nos défenses naturelles » et les spots visent tantôt les jeunes enfants ou les adultes.

Bio[®] est un produit contenant les 2 ferments du yaourt associé à un autre ferment : le « Bifidus actif » (*Bifidobacterium animalis* DN-173 010). Sa communication est axée sur le confort intestinal et l'équilibre de la flore intestinal. Danone[®] réalise avec ce seul produit 7% des ventes du rayon ultra-frais en France : chaque jour, 2.4 millions de pots sont ainsi vendus et consommés dans 10 millions de foyers [24].

En novembre 2005, Bio[®] sera remplacé dans les linéaires par Activia[®]. Un règlement européen impose en effet à Danone[®] de changer le nom de sa marque (qui peut prêter à confusion avec les produits issus de l'agriculture biologique) avant le 1^{er} juillet 2006 : l'industriel a opté pour « Activia » déjà en usage en Belgique, au Portugal et, prochainement, en Espagne.

Le nombre de laits fermentés contenant des probiotiques ne cesse d'augmenter et les enseignes de la grande distribution étoffent leurs gammes de produits laitiers en lançant des produits similaires à travers leurs « marques de distributeurs ».

Ex : Yaourts au bifidus actif commercialisés dans les magasins Leclerc[®] ou U[®]

Laits fermentés à boire à base de *Lactobacillus casei* présents dans les magasins Carrefour[®], Leclerc[®], Auchan[®], U[®] ...



Le lait infantile Gallia Calisma[®] est un lait obtenu grâce à la fermentation par deux bactéries lactiques : *Bifidobacterium breve* C50 (présent dans le flore des nourrissons en bonne santé nourris au sein) et *Streptococcus thermophilus* 065 (présent dans le yaourt) et contenant des oligosaccharides. Il constitue un cas à part car les bactéries ont été inactivées après la fermentation. Il a été conçu pour reproduire certains effets bénéfiques du lait maternel en contribuant à rééquilibrer l'écosystème intestinal et en favorisant le développement de l'immunité intestinale.

Des bactéries probiotiques sont aussi présentes dans le beurre et la crème, des fromages frais, à pâte molle, persillée ou pressée. L'annexe 2 présente les principales bactéries lactiques associées aux produits laitiers fermentés et leurs rôles.

Mais les probiotiques ne se limitent pas aux produits laitiers fermentés : la fermentation lactique acide était le plus simple - mais souvent aussi le plus sûr - moyen de conserver la nourriture en Europe jusqu'à la Révolution industrielle. Dans la plupart des produits fermentés, les souches de bactéries sont ajoutées comme ferments.

Ainsi, beaucoup d'aliments traditionnels en dehors des produits laitiers sont obtenus par fermentation lactique mais ils sont rarement considérés comme des vecteurs de probiotiques. Des exemples d'aliments contenant des concentrations importantes de *Lactobacilli* sont les olives et concombres en saumure, la choucroute, le salami, des céréales fermentées : les levains de panification contiennent des *Lactobacilli* (*L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei* par exemple) mais ceux-ci ne seront pas consommés vivants puisque le produit est cuit au préalable. En revanche, certains produits céréaliers obtenus par fermentation lactique sont consommés sans traitement thermique après la fermentation, c'est le cas du togwa de Tanzanie, de l'ogi nigérian (tous deux à base de sorgho ou de maïs) ou du kocho éthiopien [21].

Si *L. paracasei* et *L. rhamnosus* sont généralement associées à des produits laitiers, *Lactobacillus plantarum* se trouve dans des aliments fermentés d'origine végétale : elle supporte un pH bas et est donc souvent l'espèce dominante au dernier stade d'un processus naturel de fermentation. Elle est notamment présente dans les levains de panification, la choucroute, les olives vertes, des vins et bières [25].

- En vinification, les bactéries lactiques interviennent dans la fermentation malolactique qui permet de stabiliser le vin. Le processus implique essentiellement des bactéries lactiques du genre *Leuconostoc* et *Oenococcus*. En cidrerie, cette fermentation se produit dans une moindre mesure et elle implique des *Leuconostoc* et des *Lactobacillus* [20].
- Les bactéries lactiques interviennent dans la préparation de produits végétaux fermentés dont l'exemple le plus connu est la choucroute. Les bactéries *Leuconostoc*

mesenteroides, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus brevis* présentes naturellement à la surface du chaud se développent en conditions d'anaérobiose dans la cuve et du fait de l'inhibition des flores concomitantes par le sel. [20]

- Les bactéries lactiques interviennent aussi comme agents de fermentation dans les préparations des viandes salées, épicées et ne subissant aucun traitement thermique d'assainissement comme les saucissons. Les bactéries lactiques ajoutées sont des *Lactobacillus* - avec *L. sake*, *L. curvatus* et *L. plantarum* – et des *Pediococcus* : *P. damnosus*, *P. pentosaceus*, *P. acidilactici* [20].

En 1994 en Suède, un produit contenant des probiotiques mais n'appartenant pas aux produits laitiers a été commercialisé sous le nom de ProViva[®] : il s'agit d'une soupe à la farine d'avoine fermentée par *L. plantarum* 299v (5×10^{10} ufc/L) et mélangée à un jus de fruit avec un rapport 5/95. Les bactéries résistent à l'acidité du jus de fruit et le produit se conserve plus d'un mois au réfrigérateur.

Au-delà des bénéfices annoncés sur la santé, il convient aussi de jeter un coup d'œil sur la qualité nutritionnelle de ces produits. C'est ce qu'a fait le Dr Jean-Michel Cohen - médecin nutritionniste et auteur de « Savoir bien manger » [26] - pour le magazine « 60 millions de consommateurs » [12] : il regrette un apport en sucre beaucoup trop important de certains laits fermentés (ex : Actimel[®] de Danone[®]). Une version allégée en sucre en utilisant des édulcorants et sans matière grasse existe mais elle coûte plus cher.

2^{ème} PARTIE : LA FLORE INTESTINALE, RÔLES ET EVOLUTIONS

Chez l'homme, les bactéries commensales sont étroitement liées à l'organisme au niveau de la peau, de la cavité buccale, du tube digestif ou encore de l'appareil génital de la femme. Bien connaître la flore intestinale est une étape indispensable pour aborder le concept des probiotiques et comprendre leur influence aux différentes étapes de la vie. L'étude de l'évolution de la flore, de ses rôles physiologiques, de son métabolisme, de ses interactions avec la muqueuse et le système immunitaire permet de déterminer les sites d'action et les cibles d'intervention de ces aliments fonctionnels.

L'intestin est un écosystème très complexe dont il reste encore beaucoup à découvrir et à comprendre. C'est la plus grande interface entre le milieu extérieur et l'organisme et il constitue l'organe lymphoïde le plus important du corps humain.

Avec près de 300 millions d'entérocytes et un système de villosités pour multiplier sa surface, la superficie de l'intestin atteint de 250 à 400 m² (soit l'équivalent d'un court de tennis !) [25]. La majorité des cellules intestinales sont remplacées après 3 à 4 jours ; le renouvellement des cellules se fait à partir des cryptes situées à la base des villosités et en seulement 4 à 6 jours, toutes les cellules de l'épithélium intestinal humain sont remplacées.

L'intestin doit remplir deux missions opposées :

- digérer les aliments et absorber les nutriments indispensables au bon fonctionnement de l'organisme
- repousser les éléments toxiques pour ce dernier.

Son système de défense de l'organisme contre les agressions extérieures - appelé barrière intestinale - se base sur 3 éléments qui dialoguent en permanence entre eux [27] :

- la flore intestinale qui vit en parfaite harmonie avec l'organisme
- la muqueuse et la couche de mucus qui « piège » les corps étrangers

- le système immunitaire intestinal, qui concentre 70% des cellules lymphoïdes de l'organisme.

I. Présentation de la flore

Le tube digestif de l'homme constitue l'habitat naturel d'une large communauté bactérienne : chez un adulte, il compte environ 10^{14} micro-organismes, soit 10 fois le nombre de cellules humaines du corps entier !

Le tube digestif de l'homme héberge des micro-organismes dans tous les compartiments qui le composent mais le taux de colonisation bactérienne varie selon les segments. Cette colonisation touche essentiellement les parties terminales de l'intestin grêle, et le côlon où on retrouve de 10^{10} à 10^{11} bactéries par gramme de contenu intestinal (par exemple, au niveau du cæcum et du rectum).

Selon Freter, les bactéries du tube digestif peuvent occuper quatre habitats différents [28] :

1. la surface des cellules épithéliales (en adhérant grâce à des organites spécifiques tels que des fimbriae)
2. les cryptes de l'iléon, du cæcum et du côlon (colonisées par des bactéries mobiles)
3. le mucus qui recouvre l'épithélium
4. la lumière intestinale : sa composition en bactéries dépend surtout du transit intestinal (la densité est faible au niveau de l'intestin grêle et abondant au niveau de la lumière colique).

La répartition des bactéries est en rapport notamment avec les nécessités de l'anaérobiose. Ainsi au niveau colique, l'oxygène du sang diffuse facilement à travers la muqueuse intestinale mais certaines bactéries collées à la muqueuse consomment cet oxygène et permettent le maintien d'une atmosphère strictement anaérobie au niveau de la lumière intestinale [29].

La microflore intestinale est complexe et difficile à étudier : le problème majeur est l'impossibilité de l'observer dans son environnement naturel. Par défaut, la flore fécale est souvent considérée comme représentative de la flore colique car l'accès à cette flore est aisé et possible à grande échelle. L'étude de la flore des segments intestinaux sus-jacents nécessite

un recueil direct d'échantillons par sonde, jusqu'à ce que de techniques non-invasives issues de la nanotechnologie soient mises au point [30].

Chaque bactérie est caractérisée par un genre, une espèce et une souche.

- ✓ Les espèces d'un même genre ont des génomes dont le degré de similarité est compris entre 30 et 70%. Pour la classification, une espèce type fait référence pour chaque genre bactérien [31].
- ✓ Une espèce bactérienne est définie par un ensemble de souches considérées comme semblables. Pour chaque espèce, une souche type est arbitrairement désignée parmi les premières souches isolées.
Au moins 70% de similarité sont nécessaires pour que des souches appartiennent à la même espèce. A cette valeur correspond une similarité de séquences des gènes codant pour les ARN ribosomiaux d'environ 98%.
- ✓ Une souche bactérienne correspond à l'ensemble des micro-organismes issus d'une seule cellule (isolée). Chaque souche est conservée en collection et un code lui est attribué.

Les effets sur l'hôte d'une bactérie sont ceux d'une souche et ne peuvent en aucun cas être extrapolés à une autre souche ou à une autre espèce du même genre bactérien.

Actuellement, la caractérisation de la flore peut se faire par :

- microscopie
- culture
- analyse moléculaire.

Le nombre d'espèces de la flore fécale est estimé entre 400 et 500 mais cette valeur est probablement inférieure à la réalité car certaines espèces sont encore mal ou non connues compte tenu des problèmes de culture ou d'identification.

La plupart des données disponibles ont été obtenues par mise en culture car ce procédé constitue l'approche classique pour identifier et quantifier les bactéries de la flore. Mais cette

technique est laborieuse, demande du temps, peut manquer de précision et malgré le développement de milieux de culture de plus en plus spécifiques et l'amélioration des techniques de culture anaérobie, seulement 10 à 40% des bactéries observées au microscope sont cultivables [32].

Les connaissances sur la flore intestinale sont en complète mutation : la bactériologie, initialement basée sur le phénotype des organismes (type de cellule : Gram positif/négatif, forme : bacille/cocci) et les fonctions biochimiques, a subi une révolution avec le développement de méthodes d'analyse basées sur la détection de l'ARN (Acide RiboNucléique) ou de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) ribosomal 16S après amplification par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction). Une grande proportion des séquences d'ADN retrouvées lors de séquençages n'avait jamais été décrite auparavant : seul un quart des séquences correspondent à des séquences connues [30].

Les séquences codant pour l'ARN ribosomal comprennent des domaines très conservés parsemés de régions plus variables. La connaissance des séquences d'ADN et le développement d'amorces et de sondes spécifiques permettent d'amplifier à partir de l'ADN total les gènes recherchés : l'amplification est soit spécifique des bactéries en général si l'on utilise des amorces universelles, soit spécifique d'un genre, d'une espèce ou d'une souche [33].

On peut ensuite quantifier et caractériser des espèces jusqu'alors non identifiées car ayant des besoins nutritionnels difficiles à satisfaire *in vitro* ou étroitement dépendantes d'autres partenaires.

La technique de PCR en temps réel est de plus en plus sensible et elle permet de mesurer des populations allant de 10^1 à 10^8 ufc (unité formant colonie) [32]. Cependant, les méthodes d'analyse moléculaire sont potentiellement biaisées lors de l'extraction, de l'amplification, de l'hybridation et demeurent délicates car on ne peut observer les bactéries dans leur environnement naturel où les interactions sont nombreuses : entre les différentes espèces, avec le tube digestif (épithélium et sécrétions)...[31]

Les différentes approches de caractérisation de la flore demeurent ainsi complémentaires.

Nous allons maintenant voir qu'il existe deux types de flores : la flore endogène et la flore de passage.

A. La flore endogène

La flore « normale » dite autochtone, endogène, saprophyte, physiologique ou résidente comprend l'ensemble des espèces microbiennes présentes de façon constante dans l'écosystème digestif et capables de s'y multiplier [34].

Bacteroides, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* sont par ordre décroissant les micro-organismes les plus rencontrés. La majorité de la flore est composée de bactéries Gram négatif anaérobies strictes.

Cette microflore digestive résidente se classe en deux groupes : la flore dominante et la flore sous-dominante.

1. Flore dominante

La flore dominante chez l'homme adulte correspond à des populations bactériennes représentant plus de 1% de la microflore totale. Elle comprend quatre genres bactériens majeurs dont les concentrations dépassent 10^9 ufc par gramme de fèces : *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* [32]. Ils représentent à eux seuls plus de 80% de la flore totale.

Au niveau du côlon, 10 à 20 espèces cohabitent à des niveaux de population élevés allant de 10^9 à 10^{11} ufc [34].

2. Flore sous-dominante

Elle se situe à des taux inférieurs à ceux de la flore dominante compris entre 10^6 et 10^9 ufc par gramme de contenu intraluminal. Cette flore comprend des bactéries aérobies anaérobies facultatives appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactobacillus*, des entérobactéries (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*) et en moindres quantités, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Bacillus* et des levures [32].

Des fluctuations importantes de cette flore sont possibles et sous l'influence de l'alimentation ou de la physiologie de l'hôte, ces bactéries peuvent devenir dominantes. Lorsque cette flore

dépasse les 10^7 à 10^8 ufc par gramme de contenu, les effets physiologiques sont minimes pour une bactérie non pathogène mais des diarrhées aiguës peuvent apparaître avec des souches pathogènes [34].

Le tableau 5 montre les niveaux de population des principaux genres bactériens de la flore intestinale [35].

<i>Bacteroides</i>	10-11
<i>Bifidobacteria</i>	10-11
<i>Fusobacteria</i>	7-10
<i>Eubacteria</i>	7-10
<i>Lactobacilli</i>	7-9
<i>Streptococci</i>	6-8
<i>Clostridia</i>	6-10
<i>Enterobacteria</i>	6-8

Tableau 5 : Niveaux de population des principaux genres bactériens de la flore intestinale (\log_{10} bactéries/g de fèces) [33]

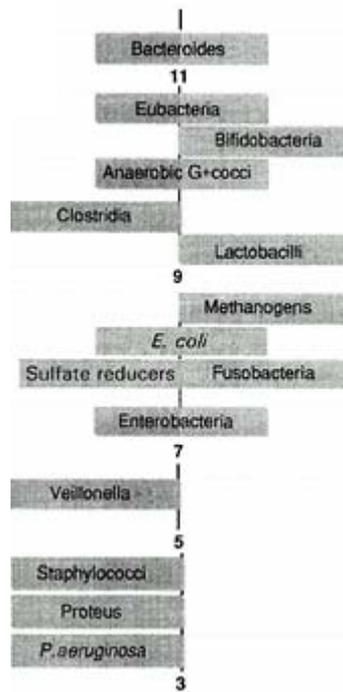
B. La flore de transit

La flore de passage ou allochtone, exogène, transitoire correspond aux espèces bactériennes qui, sauf circonstances pathologiques, traversent le tube digestif sans pouvoir le coloniser.

Cette flore polymorphe est présente à des taux largement inférieurs : 10^5 à 10^6 ufc par gramme. Elle peut provenir de l'alimentation (laits fermentés, fromages...) ou de prescription médicamenteuse mais elle est aussi constituée par des micro-organismes potentiellement pathogènes : entérobactéries (*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*), bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Staphylococcus* et des levures telles que *Candida albicans*. En dehors de conditions très particulières, leur présence n'a aucune signification pathologique car la flore dominante les empêche d'exprimer leur toxicité [34].

Les bactéries constitutives de la flore résidente et de transit peuvent être classées en 2 catégories selon leurs effets sur l'hôte plutôt bénéfiques ou nuisibles (Figure 2) [36].

**Bactéries
potentiellement
pathogènes**



Nombre d'ufc/g de fèces (log₁₀)

Figure 2 : Principaux genres bactériens de la flore colique classés selon leur niveau de population et leur caractère pathogène ou bénéfique [36]

II. Evolution et influences

L'établissement et le maintien de la flore commensale sont des processus complexes, multifactoriels et encore partiellement compris.

Chez un adulte sain, la composition de la flore est stable et seulement environ 25 espèces forment la flore dominante d'un individu. Les flores dominantes de deux individus varient énormément en terme d'espèces et de souches et le nombre d'espèces communes à plusieurs individus est restreint. Cette différence serait liée en partie à l'alimentation. L'intervention d'un facteur génétique dans la composition de la flore a été proposée après l'étude des flores de jumeaux homozygotes et dizygotes [37].

Différents facteurs influencent la microflore intestinale d'un individu. Les principaux sont :

- le site digestif
- l'âge
- l'alimentation.

A. Influence du site digestif

La totalité du tube digestif héberge des micro-organismes mais leur répartition y est irrégulière car les conditions physiologiques sont très variées. La composition de la flore digestive varie quantitativement et en terme de germe dominant entre toutes les parties du tube digestif : bouche, estomac, parties haute et basse de l'intestin et les selles [34]. La disponibilité en substrats, le pH et le potentiel d'oxydo-réduction sont des facteurs déterminants de sa composition [30].

Plus on s'éloigne de la bouche, plus l'oxygène manque : les micro-organismes fonctionnent alors plutôt en anaérobiose. Au niveau intestinal, la majorité des bactéries ont un métabolisme anaérobie strict et les espèces aérobies ou anaérobies facultatives sont présentes à des taux largement inférieur : les bactéries anaérobies l'emportent en nombre sur les bactéries aérobies avec un facteur 100 à 1000 [29].

L'estomac et l'intestin grêle ne contiennent que quelques espèces de bactéries adhérant à l'épithélium et quelques autres en transit. La rareté des bactéries dans le compartiment supérieur du tube digestif est due :

- à la composition du contenu luminal (acide, bile, sécrétions pancréatiques) qui tue la plupart des micro-organismes ingérés
- à l'activité motrice propulsive vers l'iléon qui gêne une colonisation stable par les bactéries
- à un turn-over très rapide des entérocytes (tous les 2 ou 3 jours).

Dans l'intestin grêle, les niveaux de population varient de 10^3 à 10^7 ufc par millilitre alors que la densité microbienne est de 10^8 à 10^{11} micro-organismes par gramme de contenu au niveau du côlon transverse et gauche. L'activité de la flore est la plus forte au niveau du côlon qui

héberge en effet un écosystème bactérien complexe et dynamique de haute densité qui constitue près de 60% de la masse fécale.

1. Cavité buccale

Différents habitats sont possibles tels que les joues, la langue, le palais, les gencives, la plaque dentaire et le liquide salivaire.

Les bactéries de ce segment appartiennent à des genres aérobies et anaérobies polymorphes - *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae* - et sont présentes à des niveaux de populations allant de 10^5 à 10^7 ufc par gramme de liquide.

L'hygiène buccale, l'alimentation sont responsables de grandes variations... [34]

2. Estomac

Compte tenu de la forte acidité qui règne au niveau de l'estomac ($\text{pH} \approx 1$), très peu de bactéries y survivent. Le suc gastrique a un pouvoir bactéricide pH-dépendant et dès que le pH dépasse 3-4, la croissance bactérienne reprend. C'est le cas lors de la vidange gastrique : une petite partie de la charge bactérienne représentée par les bactéries de l'alimentation et celles de la flore oropharyngée déglutie survit et passe le sphincter du pylore [27].

Chez des sujets normo-chlorhydriques, la flore dépasse rarement 10^4 à 10^5 ufc par millilitre de liquide gastrique. En cas d'hypochlorhydrie, la colonisation de l'estomac par des bactéries provenant de la cavité buccale est facilitée.

La flore permanente de l'estomac est aérobie et Gram positif : les bactéries appartiennent aux genres *Streptococcus*, *Staphylococcus* et *Lactobacillus*.

3. Intestin grêle

L'intestin grêle est une zone de transition : le nombre de bactéries augmente progressivement et les germes aérobies font place aux espèces anaérobies.

Il est constitué de trois segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléum.

- ✓ Au niveau du duodénum (le segment le plus proximal de l'intestin grêle), les bactéries sont dans un environnement neutre ($\text{pH} \approx 7$). En postprandial, la population est multipliée par 100 à 1000 mais elle diminue rapidement sous l'effet du péristaltisme intestinal, des sels biliaires et des enzymes protéolytiques des sécrétions pancréatiques [34].

Ce sont des bactéries de la flore de passage et elles varient en genre et en nombre selon l'individu. Le taux est inférieur à 10^4 à 10^5 ufc par millilitre et la flore essentiellement composée de *Streptococci*, *Staphylococci* et *Lactobacilli*.

Sauf situation pathologique (dénutrition, achlorhydrie) il ne semble pas qu'elles puissent s'implanter.

Les bactéries qui ont résisté aux différentes attaques au niveau duodéal se multiplient et atteignent le jéjunum puis la valvule iléocaecale, porte d'entrée du côlon.

- ✓ Au niveau du jéjunum prédominent les genres *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*.

Le niveau de population est de l'ordre de 10^5 à 10^6 ufc par millilitre.

- ✓ Au niveau de l'iléon : en post-prandial, la population varie de 10^3 à 10^7 ufc par millilitre puis diminue rapidement. Il s'agit de bactéries présentes dans le jéjunum et surtout de bactéries anaérobies (*Clostridium*, *Bacteroides*) et d'entérobactéries [34].

Les phénomènes d'absorption au niveau de l'intestin grêle se font donc en l'absence de prolifération bactérienne significative. Le métabolisme bactérien n'a de signification par rapport à l'organisme que si la population atteint des taux de 10^7 à 10^8 ufc par gramme.

Chez des sujets en bonne santé, le temps de transit de la bouche à l'anus est compris entre 55 et 72 heures dont seulement 4 à 6 heures de la bouche au cæcum et de 54 à 56 heures dans le côlon. Le court séjour à travers l'intestin grêle n'a pas permis une croissance importante des bactéries mais au niveau du côlon le temps de transit beaucoup plus long et la présence de nutriments leur permettent d'atteindre des niveaux de populations importants [27].

4. Côlon

C'est le segment du tube digestif le plus riche en bactéries : il contient jusqu'à 10^{11} - 10^{12} bactéries par gramme de contenu et les régions les plus riches sont le cæcum, le côlon droit et le rectum. D'autres micro-organismes – protozoaires, champignons – participent aussi à la flore colique.

Par défaut, la flore fécale est souvent considérée comme représentative de la flore colique alors qu'elle ne représente que la microflore luminale des parties distales du côlon. Seulement 30 à 40 espèces bactériennes représentent plus de 99% de la flore fécale cultivable [28].

La microflore y est très diversifiée avec une cinquantaine de genres bactériens et près de 400 espèces, dont plus de 99% anaérobies strictes [34] : *Bacteroides* est le genre le plus présent, il constitue environ 30% de la flore fécale. Mais le côlon contient aussi des *Bifidobacteria*, *Eubacteria*, *Clostridia*, *Lactobacilli*, *Staphylococci*, *Enterobacteria*, *Streptococci*, *Peptostreptococci* [28]. Au niveau du cæcum, les populations d'*Escherichia coli*, d'*Enterococci* et de *Lactobacilli* sont très élevées et joueraient un rôle important dans les fermentations [38].

Entre la partie proximale du côlon et sa partie distale, les concentrations en bactéries anaérobies, en *Bifidobacteria* et *Bacteroides* sont multipliées par 100.

Dans le côlon proximal, la croissance des bactéries est très rapide car elles disposent d'une abondante réserve de nutriments issus de l'alimentation ; au niveau distal, la disponibilité en substrats est diminuée et la croissance des bactéries y est plus lente.

Le maintien d'un nombre stable de bactéries dans le côlon exige l'intervention de facteurs de régulation de la croissance bactérienne : compétition pour les substrats, facteurs d'inhibition et bactéricides ...

On a longtemps pensé que la flore colique était identique dans tous les segments du côlon et que c'était la quantité et la qualité des substrats qui déterminait l'expression des activités enzymatiques bactériennes. On sait aujourd'hui qu'il existe des variations entre la flore du côlon droit et du côlon gauche. Dans le côlon gauche on peut ainsi noter la présence significative de bactéries méthanogènes telles que *Methanobrevibacter smithii* [29].

B. Influence de l'âge

A la naissance, des bactéries vont très rapidement coloniser le tube digestif stérile du nouveau-né. Elles atteignent un niveau de population aussi élevé que celui de l'adulte mais cette flore est qualitativement très différente. De nombreux facteurs interviennent lors de l'établissement de la flore intestinale : ils peuvent être extrinsèques (environnement, flore maternelle, alimentation, mode de délivrance, traitement médicamenteux de la mère...) ou liés à l'hôte (facteurs physiologiques : développement anatomique du tube digestif, péristaltisme, acides biliaires, pH intestinal, réponses immunitaires ; interactions entre les micro-organismes, récepteurs sur la muqueuse, médicaments...) [28].

En dehors de toute infection materno-fœtale, le tube digestif du nouveau-né est stérile à la naissance. Il est immédiatement exposé à des millions de micro-organismes : d'abord, la flore maternelle (vaginale, fécale et buccale) puis les bactéries de l'environnement (personnel soignant, entourage). Seulement quelques espèces s'implantent et constituent une flore simple qui va s'enrichir au cours des semaines. L'acquisition de la flore adulte définitive prendra ensuite plusieurs semaines ou mois.

La colonisation initiale a lieu essentiellement à partir de la flore intestinale de la mère et de l'environnement car la flore vaginale ne s'établit habituellement pas dans le tube digestif de l'enfant né par voie basse [28].

Les conditions spontanées de transfert de la flore microbienne des mères aux enfants ont été profondément modifiées par les techniques actuelles. L'enfant n'est plus exposé à la flore vaginale s'il naît par césarienne, il est rapidement séparé de sa mère, il est ensuite soumis à de stricts soins d'hygiène et éventuellement hospitalisé à la naissance (10% des nourrissons) dans un environnement riche en micro-organismes potentiellement pathogènes.

Ainsi, la composition de la flore dépendra :

- de la flore maternelle
- de l'environnement
- du mode d'accouchement
- de l'âge gestationnel à la naissance

- de l'état de santé à la naissance
- de la prise d'antibiotiques par la mère ou par le nouveau-né en période périnatale : cela concerne 17% des femmes enceintes et 8% des nouveaux-nés [39]
- probablement de facteurs génétiques.

Les premières bactéries à s'implanter, dans les 24 à 48 heures après la naissance, sont des bactéries aérobies anaérobies facultatives appartenant aux entérobactéries (surtout *Escherichia coli*), aux Entérocoques et aux Staphylocoques. Les entérobactéries sont d'origine maternelle ou environnementale et leur concentration atteint déjà 10^9 ufc/g de fèces. La consommation progressive de l'oxygène intestinal par les bactéries aérobies modifie l'écosystème : la diminution du potentiel d'oxydo-réduction permet l'établissement d'une flore plus diversifiée. Au deuxième ou troisième jour, apparaissent des bactéries anaérobies appartenant aux genres *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* [34].

La concentration en bifidobactéries et *Lactobacilli* augmente progressivement et atteint 10^9 à 10^{11} ufc par gramme de fèces après 10 jours ; celles des *Bacteroides* et *Clostridia* restent moins importantes.

Cette première étape de la colonisation serait indépendante du mode d'alimentation : au 4ème jour, la flore est hétérogène et aucun micro-organisme ne prédomine, quelque soit le type d'alimentation [28].

Cas particuliers :

Chez un nourrisson né par césarienne (près de 20% des accouchements en France), les bactéries de l'environnement jouent un rôle beaucoup plus important car les bébés ne sont pas en contact avec la flore vaginale et fécale de la mère et peuvent être séparés à la naissance de leur mère pendant une longue période. La colonisation initiale par des micro-organismes anaérobies sera nettement retardée par rapport à un enfant né par voie basse, les nourrissons nés par césarienne ont une population moins importante de lactobacilles et de bifidobactéries [28] et à 6 mois, on observera toujours une différence dans la composition de sa flore et celle d'un nouveau-né né par voie basse avec notamment un taux inférieur de *Bacteroides*.

Chez des nouveau-nés traités par antibiotiques, les seuls organismes anaérobies retrouvés sont des *Clostridia*. Les populations de genres aérobies anaérobies facultatifs tels que *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* sont augmentées et celle d'*E. coli* diminuée [28].

Chez les prématurés, de nombreux facteurs extrinsèques sont différents d'un enfant né à terme par voie basse : le mode de délivrance, l'alimentation, les traitements antibiotiques agressifs et ils influent peut-être plus que l'âge gestationnel à la naissance. Les genres *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Clostridium* sont très fréquents.

Schwartz *et al.* ont comparé par analyse moléculaire le développement de la flore intestinale chez 29 prématurés (nés par césarienne ou par voie basse et ayant passé au moins 4 semaines en couveuse) et 15 enfants nés à terme par voie basse et nourris au sein [33].

Chez les enfants prématurés, les profils de flore sont simples jusqu'au 3^{ème} jour. Au 10^{ème} jour, les espèces présentes se stabilisent et celles qui sont majoritaires sont au nombre de 5 à 20 selon les bébés : *E. coli*, *Enterococcus* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Citrobacter freundii* sont fréquemment retrouvées. Après 2 semaines, les différences interindividuelles s'estompent dans ce groupe : ce phénomène est dû selon les auteurs à l'hospitalisation et à la transmission croisée des bactéries. En revanche, chez les enfants nés à terme, la flore est plus diversifiée, et peu de similarités existent entre les enfants.

La première étape de l'implantation de la flore était indépendante du régime alimentaire mais à la fin de la première semaine de vie, c'est le type d'allaitement qui semble jouer un rôle déterminant dans l'évolution de la composition de la flore intestinale.

Jusqu'à 7 jours environ, entérobactéries et streptocoques sont toujours présents, accompagnés irrégulièrement de *Bifidobacterium* puis un équilibre beaucoup plus dépendant de la nature du lait s'établit : vers 1 mois, des différences nettes entre les flores fécales de nouveau-nés allaités au sein et celles de nouveau-nés allaités artificiellement ont été observées.

- Les enfants recevant le lait maternel ont une flore généralement plus stable et dominée exclusivement par le genre *Bifidobacterium*, les autres composants de la flore étant nettement moins abondants : les autres espèces de bactéries anaérobies strictes sont plus rares et *E. coli* reste la seule entérobactérie présente en dominance mais souvent moins abondante que *Bifidobacterium*.
- Chez les enfants recevant des préparations lactées infantiles, la flore est plus complexe et cette phase de dominance nette des *Bifidobacterium* n'apparaît pas. La

diversification y est très précoce et une flore anaérobie stricte très hétérogène et proche de celle de l'adulte apparaît avec, comme genres bactériens les plus fréquents, *Bacteroides* et *Clostridium* (*C. difficile* est présent à des concentrations largement supérieures à celles de l'enfant ou de l'adulte mais la présence de ce groupe bactérien ne semble pas liée à un risque pathologique chez les nouveau-nés [31]) et *Enterococcus*. Aussi, d'autres espèces d'entérobactéries (par exemple, *Klebsiella*) s'ajoutent à *E. coli* [40].

Peu d'études ont examiné la flore fécale du point de vue des espèces et des souches. Certaines études sont en faveur de la présence des mêmes espèces chez les enfants nourris au sein et ceux recevant une préparation lactée : *Bifidobacterium breve* domine alors ; d'autres concluent que cette espèce domine chez les enfants nourris au sein mais que *B. adolescentis*, *B. bifidum* et *B. longum* – caractéristiques de la flore adulte - dominant chez des enfants recevant une préparation lactée infantile [28].

Harmsen *et al.* (2000) ont analysé, par des méthodes moléculaires, la composition de la flore de 12 nourrissons, nés à terme, entre 1 et 20 jours.

Six étaient nourris au sein et les six autres recevaient une préparation lactée classique. La composition initiale de la flore était comparable dans les deux groupes : le pourcentage moyen de bifidobactéries était inférieur à 40% à la naissance, les *Bacteroides* étaient compris entre 0 et 80% et *E. coli* entre 0 et 30% [31].

Au 4ème jour, la flore de tous les enfants nourris au sein était dominée par des bifidobactéries (de 60 à 91% de la flore). Les autres genres bactériens occupaient une position sous-dominante dans le même temps. Chez les enfants nourris avec une préparation, l'évolution était différente : chez 3 enfants sur 6, les bifidobactéries ne devenaient pas dominantes. Elles représentaient entre 28 et 75%, avec une moyenne d'environ 50%. Chez un des enfants, elles n'étaient même pas détectables. Chez la majorité des enfants, les *Bacteroides* diminuaient à partir du 4ème jour, mais augmentaient à nouveau vers le 20ème jour, atteignant un niveau compris entre 35 et 61%.

Les bifidobactéries sont considérées comme les plus favorables à cet âge : ces bactéries anaérobies diminuent en effet la colonisation par des germes pathogènes et seraient associées à un risque plus faible d'infections gastro-intestinales chez les enfants nourris au sein.

Ces différences de composition de la flore intestinale et les effets bénéfiques qui leur sont associés sont dus à certaines particularités du lait maternel. Des tentatives pour « materniser » le lait de vache et favoriser l'implantation de souches bénéfiques chez le nouveau-né ont donc été entreprises et il s'agit notamment de l'adjonction aux préparations lactées infantiles de facteurs « bifidogènes ».

Les composants bénéfiques contenu dans le lait maternel sont [35] :

- des cellules immunocompétentes : macrophages et lymphocytes
- des agents immunostimulants : les cytokines
- des agents anti-inflammatoires et anti-oxydants
- des agents anti-microbiens de nature glucidique (oligosaccharides), protéique (lactoferrine, lysozyme, immunoglobulines) ou lipidique (acides gras) dont l'activité est clairement démontrée *in vitro* mais plus incertaine *in vivo* :
 - Les oligosaccharides et les glycoconjugués naturellement présents dans le lait humain peuvent prévenir l'adhésion d'entéropathogènes en jouant le rôle de récepteurs homologues.
 - Le lysozyme peut lyser certaines bactéries ; la lactoferrine a un effet bactériostatique à l'égard d'*E. coli* en captant le fer nécessaire à sa croissance et cet effet est potentialisé par l'addition d'immunoglobulines.
 - Certains lipides présents dans le lait maternel ont la capacité d'inhiber les micro-organismes : l'acide linoléique a ainsi un effet inhibiteur *in vitro* sur la croissance de *Lactobacillus acidophilus* [40].
- des promoteurs de la croissance de certaines bactéries tels que des facteurs bifidogènes [38] :
 - des facteurs glycopeptidiques composant la caséine κ et contenant la N-acétyl-glucosamine
 - divers monosaccharides (glucose, galactose, fucose) isolés ou engagés dans des glycopeptides
 - de faibles teneurs en protéines et en phosphore couplées à une concentration élevée en lactose.

Il en résulterait un faible pouvoir tampon au niveau de la lumière intestinale : le pH abaissé - aux environs de 5 - contribuerait alors à la croissance d'une flore essentiellement composée

de bifidobactéries qui entretiendraient l'acidification du milieu par leurs importantes sécrétions d'acide lactique et acétique. De plus la croissance des bactéries putréfactives est inhibée par ce pH abaissé.

Ces facteurs bifidogènes peuvent exercer leur action au niveau de l'intestin grêle mais plus au niveau colique car ils sont digérés ou absorbés avant. Cependant dans le côlon, les mucines et la desquamation des cellules intestinales peuvent être de bons promoteurs de la croissance des bifidobactéries.

Tant que l'alimentation est exclusivement lactée, la flore est relativement constante, mais avec le sevrage et la diversification alimentaire, la composition globale de la microflore colique s'uniformise quelle que soit l'alimentation antérieure [34]. Les bactéries du genre *Bacteroides* et d'autres bactéries Gram négatif deviennent dominantes et les genres bactériens se diversifient. On observe une augmentation des populations d'*Escherichia coli*, *Enterococci* et *Clostridia*.

Au moment de la diversification alimentaire, l'intestin du nourrisson poursuit aussi son développement. On ne sait dans quelle mesure la modification de la flore intestinale peut être attribuée à l'introduction de glucides complexes différents ou à l'évolution du tube digestif sous l'influence de facteurs génétiques, immunitaires...

A la fin de la première année et pendant la deuxième, le jeune enfant acquiert progressivement une flore analogue à celle de l'adulte. Les concentrations en *E. coli* et *Enterococci* atteignent les 10^6 à 10^8 germes par gramme de selles, la concentration en *Clostridia* diminue. Les espèces anaérobies se diversifient et les populations de *Fusobacteria* ou *Eubacteria* augmentent de façon très importante. Aussi, la flore putréfactive augmente et ce en raison d'un apport important en protéines et phosphore.

Une autre catégorie de personnes peut voir sa flore intestinale évoluer : les personnes âgées. Chez celles-ci, on observe une diminution de la sécrétion gastrique et une perméabilité augmentée de la muqueuse intestinale. Parallèlement le fonctionnement du système immunitaire décline : les réponses immunitaires cellulaires et humorales sont moins efficaces, les anticorps circulants dirigés contre les bactéries de la flore plus nombreux [41].

De nouvelles populations bactériennes peuvent s'établir et l'équilibre bactérien intestinal semble se modifier avec :

- une diminution des bifidobactéries qui deviennent sous-dominantes et un changement de leurs espèces présentes
- une augmentation des entérobactéries, des clostridies - *C. difficile* est plus fréquemment isolé chez des personnes âgées en bonne santé [41] - et des bactéries lactiques (notamment le genre *Lactobacillus*).

L'équipe de MJ Hopkins a étudié la flore intestinale d'enfants (de 16 mois à 7 ans), d'adultes, de personnes âgées en bonne santé et de personnes âgées atteintes de diarrhée à *C. difficile* [41]. Les analyses se sont basées sur des méthodes moléculaires, des cultures de cellules et le profil des acides gras synthétisés.

Concernant l'étude de la flore des enfants,

1. les résultats des méthodes de comptage cellulaire étaient :
 - a. une plus forte présence de bifidobactéries et de clostridies chez les enfants que chez les adultes
 - b. un niveau de population chez les enfants 100 fois supérieur à celui des adultes pour les entérobactéries
2. les techniques d'analyse moléculaire ont montré une grande importance des entérobactéries, bifidobactéries et du groupe *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella* chez les enfants, montrant que leur flore est moins complexe du point de vue bactériologique.

Concernant la flore des sujets âgés, les méthodes de culture cellulaire et d'analyse moléculaire ont conclu à une diminution de la population anaérobie et une augmentation des entérobactéries. Le nombre de bifidobactéries était réduit dans les deux groupes de personnes âgées et celui des *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella* diminué uniquement chez les patients atteints de diarrhées à *C. difficile*. Dans ce dernier groupe, le nombre de lactobacilles et de clostridies était plus important que dans les trois autres groupes.

C. Influence de l'alimentation

L'hypothèse selon laquelle l'alimentation puisse influencer la composition et/ou l'activité de la flore intestinale est naturelle puisque les aliments constituent une grande partie des substrats disponibles pour les bactéries. Deux éventualités sont possibles :

1. Une modification du régime alimentaire aurait pour conséquence une modification de l'apport en nutriments et pourrait influencer les niveaux de populations des différentes espèces présentes. Cependant, malgré la diversité des habitudes alimentaires, l'écosystème bactérien est relativement stable et l'alimentation n'influence que peu les populations de la flore dominante de l'homme [34]. Des différences de composition de la flore intestinale sont observées entre les différentes ethnies de la planète mais elles ne peuvent être attribuées à la seule alimentation : le patrimoine génétique et l'environnement sont aussi à considérer.
2. Certains aliments pourraient moduler l'expression d'une fonction bactérienne sans pour autant modifier le niveau de population.

Ici, un problème prend toute son ampleur : la flore de l'intestin est assimilée à celle contenue dans les selles. Or, les nutriments issus de l'alimentation sont normalement consommés avant même d'atteindre le sigmoïde et la partie terminale du côlon ; il est alors difficile de connaître le réel impact de l'alimentation sur la flore du cæcum et du côlon droit.

Pour accéder aux modifications de la flore, on peut :

- mesurer l'activité enzymatique fécale qui diffère selon les genres, les espèces et même les souches bactériennes [42]
- utiliser comme marqueurs des métabolites présents dans les selles ou l'urine et corrélés à une diminution/augmentation des niveaux de la population bactérienne intestinale (phénols urinaires, acides biliaires).

Mais il faut les interpréter avec précaution car, par exemple, l'influence du lactulose sur le métabolisme du cholestérol et la déshydroxylation des acides biliaires peut très bien être attribuée à son effet sur le pH au niveau du cæcum plutôt qu'à des changements de la flore.

De même, une augmentation des fibres provoque une diminution des phénols urinaires mais elles accélèrent aussi le transit et donc diminuent le temps de contact bactéries/substrats [42].

L'éventuelle influence de l'alimentation sur la microflore a été beaucoup étudiée mais de nombreuses études utilisent des modèles animaux. Chez l'homme, l'action des graisses, des fibres ont été étudiées et surtout les effets de la consommation de lait, d'origine bovine ou humaine, chez le nouveau-né [35]. Des études réalisées chez des sujets iléostomisés ont montré qu'une augmentation de la ration en fibres augmentait la population bactérienne. Une augmentation des graisses augmentait les bactéries anaérobies non sporulées et diminuait les bactéries lactiques alors qu'une augmentation de la teneur en protéines du régime augmentait ces mêmes bactéries lactiques.

Les types et quantités de composés fermentescibles présents dans l'intestin influence la microflore mais on ne sait pas si cette influence s'exerce sur la seule composition qualitative et quantitative de la microflore ou aussi sur son activité métabolique.

En culture, la croissance des bactéries impliquées dans le processus de putréfaction est favorisée lorsque le régime est riche en nutriments protéiques, les organismes fermentant le lactose sont avantagés lorsque ce sucre est présent en grande quantité.

Si un glucide non digéré favorise la croissance de la flore colique sans stimuler sélectivement une espèce, il se comporte en simple aliment colique : c'est un aliment qui pénètre dans le côlon, sert de substrat aux bactéries endogènes et fournit ainsi indirectement à l'hôte de l'énergie, des substrats métaboliques et des micro-nutriments essentiels.

Lorsque le substrat est spécifique à certains genres ou espèces, il s'agit d'un prébiotique. Ce terme est dérivé du grec et signifie « avant la vie ». Il a été introduit pour la première fois par Gibson et Roberfroid en 1995 et désigne « des aliments non digestibles qui ont un effet bénéfique sur l'hôte en stimulant sélectivement la prolifération et/ou l'activité d'une ou d'un nombre limité de bactéries déjà présentes dans le côlon et dotées du potentiel d'améliorer la santé de l'hôte » [43].

Les prébiotiques développés jusqu'ici sont des glucides à chaîne courte dirigés vers la croissance des bactéries lactiques aux propriétés bénéfiques pour la santé (bifidobactéries, lactobacilles) : ce sont des oligosaccharides non digestibles, notamment les oligofructanes,

naturellement présents dans des aliments ou incorporés à des boissons, des produits laitiers, des produits de boulangerie-pâtisserie.

Par exemple, lorsque des FOS ou Fructo-OligoSaccharides sont ajoutés à l'alimentation, ils sont utilisés par les bactéries coliques, notamment par les bifidobactéries, comme source de glucides pour leur métabolisme et leur croissance et on observe une augmentation de la population de *Bifidobacterium* associée à une diminution de celle en *Bacteroides*.

Cependant, une nouvelle classe de composés actifs existe : les hydrocarbures fonctionnels. Ils correspondent aux glucides complexes ayant des effets sur la flore pathogène. Par exemple, la cellobiose pourrait atténuer la virulence de *Listeria monocytogenes* en inhibant son adhésion à la muqueuse intestinale [44].

D. Autres facteurs

1. Facteurs liés à l'hôte :

➤ besoins nutritionnels

En cas de malnutrition protéino-énergétique, les sécrétions digestives, la trophicité de l'épithélium intestinal et la réactivité du système immunitaire sont affectées. Les modifications de populations concernent surtout l'intestin grêle où les entérobactéries et les anaérobies sont plus nombreux. La translocation des bactéries serait aussi favorisée [34].

➤ acides biliaires, temps de transit

En cas de stase d'un segment du grêle, il peut y avoir une colonisation ascendante à partir du côlon.

➤ facteurs émotionnels et psychologiques

➤ statut immunitaire de l'hôte et susceptibilité aux infections, radio- et chimiothérapie

En cas de déficit immunitaires, certaines bactéries persistent de façon anormale dans le tube digestif : par exemple le germe intracellulaire *Salmonella*, des mycobactéries atypiques, *Clostridium difficile* [34].

➤ diarrhées aiguës, traitements antibiotiques

L'antibiothérapie altère la flore de barrière et des bactéries exogènes ou endogènes - de la flore sous-dominante, telles que les entérobactéries, *Pseudomonas* ou clostridies - peuvent émerger. *Clostridium difficile* responsable de la colite pseudo-membraneuse en est un exemple. La concentration de l'antibiotique dans la lumière intestinale est importante : les antibiotiques les plus actifs sur la flore sont ceux administrés par voie orale et peu absorbés, ceux administrés par voie parentérale mais subissant un cycle entéro-hépatique ou étant éliminés par voie biliaire. L'association de plusieurs antibiotiques accroît aussi le risque de déséquilibre de la flore et les perturbations sont d'autant plus importantes que l'antibiotique a un large spectre et est actif sur les germes anaérobies.

La flore de barrière est éradiquée de façon transitoire ou sa croissance seulement inhibée car l'équilibre se rétablit à l'arrêt du traitement. Mais dans certains cas, la reconstitution de l'effet barrière peut être plus long ou impossible : sujet immunodéprimé, diabète, bactéries résistantes [34].

➤ maladies inflammatoires

Des maladies chroniques peuvent modifier la flore en induisant des réponses inflammatoires : les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, des allergies.

2. Facteurs liés aux micro-organismes par interaction entre les différents composants de la flore :

➤ Production :

- de métabolites toxiques
- de bactériocines : ce sont des substances produites par des bactéries et empêchant la croissance d'autres genres bactériens.

➤ disponibilité des matières fermentescibles (compétition nutritionnelle)

➤ potentiel d'oxydoréduction, pH (pH acide <5 favorable aux *Lactobacillus*), teneur en oxygène

➤ distribution dans le tube digestif des espèces et compétition pour l'espace.

La microflore intestinale peut être considérée comme un « organe » à part entière tant ses fonctions physiologiques sont nombreuses.

Trois fonctions majeures lui sont attribuées [30, 45] :

1. une activité métabolique :

- ✓ la digestion et l'absorption des nutriments (fermentation de résidus non digestibles, absorption d'ions)
- ✓ la synthèse de produits terminaux de fermentation bénéfiques ou non (butyrate, acétaldéhyde) qui interviennent aussi dans la valeur du pH
- ✓ le métabolisme de composants alimentaires bénéfiques (phytoestrogènes, vitamines)
- ✓ la transformation ou l'excrétion de substances toxiques (acides biliaires, nitrosamines, amines hétérocycliques)

2. une action au niveau de la muqueuse intestinale :

- ✓ un rôle trophique : contrôle de la prolifération et de la différenciation de l'épithélium intestinal en accélérant le turn-over des cellules et en leur fournissant de l'énergie
- ✓ une action protectrice contre les pathogènes : « l'effet barrière » en empêchant la colonisation de l'intestin par des micro-organismes pathogènes (en renforçant la fonction de barrière physique ou en entrant en compétition pour des sites d'attache)
- ✓ en communiquant au niveau moléculaire avec l'épithélium intestinal (*B. thetaiotaomicron*)

3. une interaction avec le système immunitaire intestinal : elle participe au développement du système immunitaire et à son homéostasie en régulant la fonction immunitaire (avec, par exemple, le phénomène de tolérance orale).

Ces trois activités vont être successivement abordées mais il faut aussi noter que la flore commensale de l'intestin augmente la masse fécale et diminue ainsi le temps de transit et d'exposition aux substances toxiques présentes dans la lumière intestinale. Des éléments indiquent qu'elle joue aussi un rôle dans la carcinogénèse colorectale (positif pour *E. coli* entérotoxigène et négatif pour *B. fragilis*).

III. Métabolisme

Grâce à leur génome distinct de celui de l'hôte, les bactéries sont susceptibles de lui apporter un éventail de nouvelles activités métaboliques. Du point de vue du nombre de réactions biochimiques, la capacité métabolique de la flore intestinale est similaire à celle du foie. Etant donné qu'il faut que la population bactérienne atteigne 10^7 à 10^8 ufc/g de contenu intestinal pour que son métabolisme ait des répercussions sur l'hôte [34], cette intense activité métabolique a principalement lieu au niveau du côlon ; elle concerne la petite fraction des nutriments non absorbés par l'intestin grêle et comprend [38] :

1. la dégradation des polysides et la fermentation des oses
2. la protéolyse et la fermentation des acides aminés
3. la réutilisation de l'hydrogène fermentaire
4. le métabolisme des acides biliaires
5. la transformation des xénobiotiques
6. la production de mutagènes.

Elle fournit de l'énergie et des substrats absorbables par l'hôte mais aussi de l'énergie et des nutriments nécessaires à la croissance et la prolifération bactérienne.

Même s'il existe une forte diversité interindividuelle dans la composition en espèces de la flore, ses activités métaboliques globales sont homogènes d'un individu à l'autre.

L'activité métabolique varie en fonction du site intestinal, elle est particulièrement intense au niveau du côlon (Tableau 6) : ce dernier est très riche en bactéries et les résidus alimentaires y séjournent pendant un temps suffisant pour qu'elles exercent leur travail d'hydrolyse.

FONCTIONS ET EFFETS	SITE PRÉFÉRENTIEL
Modification du contenu intestinal - Variation du pH luminal selon la concentration en AGCC - Abaissement du potentiel d'oxydo-réduction	Grêle, côlon Côlon
Modification des fonctions coliques - Augmentation de l'absorption hydro-sodée - Stimulation de la motricité intestinale	Côlon droit
Digestion - absorption des nutriments - Hydrolyse des amidons complexes et des fibres alimentaires - Hydrolyse des protéines peu digestibles - Hydrolyse des lipides	Côlon droit et transverse Côlon gauche Côlon gauche
Production - Acides gras volatils : ac. acétique, butyrique, propionique - Gaz : CO ₂ , H ₂ , méthane, ammoniaque - Acide folique et vitamines K, B	Côlon droit Côlon droit et gauche Grêle et côlon droit
Transformations Déconjugaison et déshydroxylation des sels biliaires	Grêle et côlon droit Grêle et côlon droit
Synthèse d'amines actives et de polyamines (histamine, tyramine...)	
Actions sur les xénobiotiques Glycosides cardiotoniques, imipramines, antibiotiques, sénosides	Côlon

Tableau 6 : Principaux effets physiologiques de la flore intestinale [44]

La diversité bactérienne au niveau du côlon s'expliquerait par la grande diversité de substrats et de sources d'énergie disponibles à ce niveau. Ces substrats fermentescibles peuvent être exogènes ou endogènes.

Les substrats d'origine **exogène** sont constitués principalement par les glucides apportés par l'alimentation et non digérés dans la partie supérieure du tube digestif.

Ils comprennent :

- des polysaccharides
 - a. amidons résistants : chaînes linéaires, amidon cru ou transformé par la cuisson et le refroidissement

- b. fibres alimentaires fermentescibles : cellulose, hémicellulose, pectines, gommes
- des oligosaccharides ayant échappé à la digestion
- des alcools (par exemple, des polyols utilisés comme édulcorants) et des sucres non absorbés.

La contribution des protéines et lipides alimentaires est moindre car ils sont presque totalement digérés et absorbés au niveau de l'intestin grêle.

Les substrats d'origine alimentaire ne doivent pas être considérés d'un seul point de vue nutritif car ils sont aussi à l'origine de la synthèse par la microflore de substances bénéfiques ou néfastes pour l'homme.

- Les acides gras obtenus à partir des glucides sont plutôt bénéfiques : ils ont une action sur le métabolisme colique, fournissent de l'énergie aux cellules et jouent un rôle dans la régulation hépatique des lipides et des sucres.
- Cependant, les bactéries peuvent aussi induire des effets négatifs tels que la production de substances potentiellement carcinogènes, de métabolites toxiques ou l'inactivation de médicaments [27].

Les substrats **endogènes** proviennent

- de l'hôte :
 - a. sécrétions de l'intestin grêle (enzymes biliaires et pancréatiques, mucines...). Les enzymes pancréatiques constituent une source importante d'azote organique disponible.
 - b. cellules épithéliales coliques (mucopolysaccharides, mucines...). Les cellules desquamées sont un substrat important pour la microflore colique car le renouvellement de l'épithélium colique est très rapide.
- des bactéries :
 - a. produits de lyse des bactéries
 - b. métabolites issus de leurs activités enzymatiques.

Le tableau 7 classe les différents substrats selon leur origine et indique les quantités journalières de chaque type de substrats [37].

SUBSTRATS	QUANTITE (g/jour)
Origine alimentaire	
Amidons résistants	8 - 40
Polyosides végétaux (cellulose, hémicellulose, pectines)	8 - 18
Oligosides (3<n<10)	2 - 8
Oses non absorbés et sucres-alcools	2 - 10
Protéines et peptides	12
Origine endogène	
Enzymes pancréatiques et sécrétions gastro-intestinales	4 - 6
Mucines de l'intestin grêle	2 - 3
Cellules épithéliales desquamées	non définie

Tableau 7 : Substrats pour la fermentation bactérienne au niveau colique [35]

Une des principales fonctions de cette microflore colique est la dégradation et la fermentation des glucides endogènes et exogènes. Cette activité est essentielle au fonctionnement et à la stabilité de l'écosystème car les acides gras à chaîne courte (AGCC) produits seront une source d'énergie majeure pour les entérocytes, participeront au maintien de l'intégrité de la muqueuse et se comporteront comme régulateurs de la motricité intestinale [37].

A. Métabolisme des glucides

Dans le cas d'une alimentation occidentale, près de 10% de l'amidon consommé résiste à l'action des amylases pancréatiques et arrive non digéré au niveau du côlon. Le deuxième apport majeur d'origine alimentaire est constitué par les polyosides des parois des végétaux (cellulose, hémicelluloses, pectines) : environ 50% de la cellulose des légumes verts sera fermentée au niveau du côlon.

Le métabolisme des glucides commence par une dégradation des molécules glucidiques qui permet ensuite la fermentation.

L'activité de **dégradation** anaérobie au niveau du côlon fait intervenir différents groupes bactériens complémentaires par leurs activités métaboliques. La diversité génétique de la microflore fournit des enzymes variées et des réactions métaboliques qui n'existent pas chez l'hôte de façon constitutive. Une véritable chaîne trophique se met en place : avec en son début des bactéries hydrolytiques qui fragmentent des polymères en éléments plus petits alors accessibles aux bactéries fermentaires.

Les principales espèces hydrolytiques appartiennent au genre *Bacteroides* parmi lequel *B. ovatus* et *B. thetaiotaomicron* possèdent les plus grandes capacités hydrolytiques, et aux genres *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et quelques espèces de *Clostridium* et *Eubacterium* [37]. Ces bactéries sont capables de synthétiser des types d'enzymes non produites par l'homme parmi les polysaccharidases et glucosidases. Il est intéressant de noter que la phase d'hydrolyse est assurée par des enzymes sécrétées par les bactéries mais aussi par des « endoenzymes » libérées lors de la lyse bactérienne (c'est le cas pour l'hydrolyse de la cellulose) [29].

La plupart des espèces majeures (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*) du côlon humain sont capables d'utiliser l'amidon comme source d'énergie alors que la dégradation des parois végétales semble nécessiter plusieurs espèces bactériennes complémentaires [37]. Par exemple, l'activité cellulolytique n'est retrouvée que chez les genres *Bacteroides*, *Ruminococcus* et *Clostridium*.

Certaines *Bifidobacteria* sont aussi capables de dégrader l'inuline, la gomme arabique.

Vient ensuite la flore glycolytique qui utilise les fragments libérés par la flore précédente dite hydrolytique ou saccharolytique. Ces bactéries sont incapables de dégrader les glucides polymériques directement et leur croissance dépend donc de la disponibilité en substrats. Les espèces pouvant utiliser différents oligosides telles que les bifidobactéries seront avantagées.

Malgré la diversité des substrats et des espèces, les voies métaboliques utilisées lors du processus anaérobie de **fermentation** sont peu nombreuses. Ce sont majoritairement la

glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas et la voie des pentoses phosphates qui sont utilisées [37]. Elles aboutissent toutes les deux à la production de pyruvate qui sera converti en une série de produits terminaux :

- des acides gras à chaîne courte AGCC tels que l'acétate (60%), le propionate (25%), le butyrate (15%) [34]
- des gaz : hydrogène H₂, dioxyde de carbone CO₂, et accessoirement méthane CH₄. L'hydrogène est majoritairement réutilisé *in situ* par des micro-organismes hydrogénotrophes.

La plupart des espèces prédominantes de la flore colique produisent lors de la fermentation des glucides de l'acétate par décarboxylation oxydative du pyruvate : *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Propionibacterium*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Butyrivibrio* ...

Le propionate est principalement synthétisé par des bactéries appartenant aux genres *Bacteroides*, *Propionibacterium* et *Veillonella*. Le butyrate est produit par un nombre restreint d'espèces appartenant aux genres *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* et *Butyrivibrio* [37].

Le rôle le plus important des AGCC est leur effet trophique sur la muqueuse intestinale : ils stimulent tous les trois la prolifération et la différenciation de l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon.

L'acétate et le propionate pourraient moduler le métabolisme du glucose et diminuer la glycémie. Ils seront ensuite métabolisés par le foie (propionate) ou les muscles (acétate).

Il est presque entièrement consommé par l'épithélium colique et constitue la principale source d'énergie des colonocytes (70%).

Des métabolites intermédiaires sont aussi produits mais ils seront rapidement métabolisés par d'autres espèces bactériennes [37] :

1. le succinate
2. le lactate
3. l'éthanol (réutilisé par *Clostridium*)
4. le formate
5. l'hydrogène
6. le dioxyde de carbone

Lors de l'absorption de sucres inhabituels (par exemple des polyols), des troubles intestinaux peuvent apparaître les premiers jours puis ils s'estompent. Le substrat favoriserait le développement de bactéries capables de le métaboliser : les fermentations seraient alors plus rapides et plus efficaces. Environ une semaine après l'ingestion d'un sucre « perturbateur », les conditions d'équilibre sont atteintes [29]. Ce phénomène d'adaptation bactérienne est beaucoup moins facile à montrer lorsque l'on provoque des variations d'apport dans les glucides alimentaires usuels.

La concentration des AGCC conditionne le pH de la lumière colique et influence l'activité de différentes enzymes bactériennes [34] :

- Au niveau du cæcum et du côlon droit, le processus de fermentation des glucides est très intense avec une production d'AGCC importante, un pH acide entre 5 et 6, une croissance bactérienne rapide.
- Au niveau du côlon gauche, les substrats sont moins disponibles, le pH presque neutre, les processus de putréfaction plus importants et la population bactérienne presque stable.

Chez le nourrisson, le profil des AGCC est différent de chez l'adulte : jusqu'à l'âge de 1 mois, ce sont les acides acétique et lactique qui dominent car la flore du nouveau-né n'a pas les capacités de produire l'acide butyrique et l'acide propionique. A l'âge de 1 et 3 mois, les principaux acides sont les acides acétique et propionique. A 2 ans, la quantité totale en AGCC de l'adulte est atteinte mais des différences quant aux proportions des acides peuvent subsister.

L'activité métabolique de la flore intestinale du nourrisson est sensiblement moins diversifiée que celle de l'adulte. La maturation est progressive et pourrait dépendre de l'environnement. Ainsi, jusqu'à la diversification alimentaire, la capacité fermentaire de la flore diffère selon le type d'alimentation du nourrisson [46] : les nouveau-nés exclusivement nourris au sein montreraient une maturation plus lente des capacités métaboliques de leur flore.

Chez le nourrisson allaité, les acides acétique et lactique dominent et le pH des selles est bas mais chez un nourrisson qui reçoit une préparation lactée [47, 48] :

1. la concentration en acides acétique et lactique est plus faible

2. la proportion d'acides propionique et butyrique est plus forte
3. le pH des selles est plus élevé, proche de la neutralité.

Un pH bas, une concentration en AGCC plus faible et une importante proportion en acide lactique sont des conditions favorables au développement de bifidobactéries chez le nourrisson nourri au sein.

Au début de la diversification alimentaire, une part importante de l'amidon ingéré arrive au niveau du côlon : ceci est dû à une mastication partielle des aliments et à une fonction pancréatique exocrine encore immature. Cependant, la flore du nourrisson est encore peu variée et donc sa capacité fermentaire est limitée : les glucides complexes sont peu utilisés alors que les oligosaccharides à chaîne courte comme le glucose sont facilement dégradés et constitue alors le principal substrat pour la formation d'AGCC.

Chez des enfants nourris au sein, la capacité à fermenter des glucides complexes apparaît plus tardivement que chez des enfants ayant reçu des préparations lactées. Ceci peut être corrélé à la flore plus variée observée chez les enfants recevant une préparation lactée [48].

Le tableau 8 récapitule les substrats et produits de fermentation des bactéries [36].

Bactérie	Type	Concentration (log ₁₀ ufc/g)	Substrats	Produits de fermentation
<i>Bacteroides</i>	Bacille Gram-	11.3	Saccharolytique	A, P, S
<i>Eubacteria</i>	Bacille Gram+	10.7	Saccharolytique, quelques espèces fermentant les acides aminés	A, B, L
<i>Bifidobacteria</i>	Bacille Gram+	10.2	Saccharolytique	A, L, f, é
<i>Clostridia</i>	Bacille Gram+	9.8	Saccharolytique, espèces fermentant les acides aminés	A, P, B, L, é
<i>Lactobacilli</i>	Bacille Gram+	9.6	Saccharolytique	L
<i>Ruminococci</i>	Cocci Gram+	10.2	Saccharolytique	A
<i>Peptostreptococci</i>	Cocci Gram+	10.1	idem <i>Clostridia</i>	A, L
<i>Peptococci</i>	Cocci Gram+	10.0	Acides aminés	A, B, L
<i>Methanobrevibacter</i>	Cocobacille Gram+	8.8	Chémolithotrophe	CH ₄
<i>Desulfovibrios</i>	Bacille Gram-	8.4	Variés	A
<i>Propionibacteria</i>	Bacille Gram+	9.4	Saccharolytique, fermente le lactate	A, P
<i>Actinomyces</i>	Bacille Gram+	9.2	Saccharolytique	A, L, S
<i>Streptococci</i>	Cocci Gram+	8.9	Glucides et acides aminés	L, A
<i>Fusobacteria</i>	Bacille Gram-	8.4	Acides aminés et glucides	B, A, L
<i>Escherichia</i>	Bacille Gram-	8.6	idem <i>Streptococci</i>	Mélange d'acides

A : acétate ; P : propionate ; B : butyrate ; L : lactate ; S : succinate ; f : formate ; é : éthanol ; CH₄ : méthane.

Tableau 8 : Les bactéries coliques, leurs substrats et produits [34]

Certaines bactéries synthétisent ainsi un autre métabolite : l'acide lactique.

B. Métabolisme du lactate

Les espèces bactériennes transformant majoritairement les oses en lactate sont communément appelées bactéries lactiques. Leur métabolisme exclusivement fermentaire les conduit à produire à partir du glucose des quantités importantes d'acide lactique, accompagné dans certains cas d'autres métabolites. Chez l'homme, elles appartiennent aux genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Enterococcus*, *Ruminococcus* et *Fusobacterium* [37].

Lorsque l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose, les bactéries sont dites homofermentaires et lorsque la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique et d'autres composés : éthanol, CO₂, autres acides organiques, les bactéries lactiques sont hétérofermentaires [20].

Certains glucides non digestibles tels que l'inuline ou les fructo-oligosaccharides (FOS) sont capables de promouvoir sélectivement la croissance de certaines bactéries du genre *Bifidobacterium*.

Ces substrats seront en effet très rapidement utilisés par ces bactéries alors que les autres espèces ne les fermentent pas ou beaucoup plus lentement.

Le lactate produit sera ensuite utilisé par des bactéries appartenant aux genres *Veillonella*, *Propionibacterium* ou *Clostridium*.

C. Métabolisme de l'hydrogène

L'hydrogène produit lors de ces processus fermentaires sera majoritairement réutilisé *in situ* par des micro-organismes hydrogénotrophes et une partie sera excrétée par voie pulmonaire et anale.

L'hydrogène principalement produit par les genres *Clostridium*, *Ruminococcus* et *Eubacterium* sera utilisé selon trois voies [37] :

- La méthanogénèse par des *Archea* méthanogènes du côlon gauche (30 à 50% de la population occidentale est méthano-excrétrice)
- la sulfatoréduction – principalement par *Desulfovibrio* - qui conduit à la formation de sulfure d'hydrogène potentiellement toxique pour les cellules eucaryotes. Les sulfates

réduits proviennent soit de substrats alimentaires sulfatés, soit de sécrétions endogènes.

- l'acétogénèse réductrice : cette voie d'élimination de l'hydrogène est particulièrement importante chez les individus non méthano-excréteurs.

D. Métabolisme des protéines

Les substrats protéiques présents dans le côlon sont de plusieurs origines et comprennent [29] :

- des protéines d'origine alimentaire non digérées dans l'intestin grêle (élastine, collagène)
- des enzymes pancréatiques et intestinales
- des cellules épithéliales desquamées
- la partie protéique des glycoprotéines
- des produits bactériens : enzymes secrétées et corps cellulaires des bactéries lysées
- de l'urée qui diffuse à travers la paroi colique.

Les protéines sont d'abord hydrolysées par des hydrolases bactériennes spécifiques (dont le genre *Clostridium* est particulièrement riche) et les acides aminés obtenus sont ensuite dégradés. Le métabolisme anaérobie des peptides et des protéines par les bactéries, appelé putréfaction, produit aussi des AGCC mais accompagnés de substances potentiellement toxiques telles que l'ammoniac, des amines, des phénols, thiols et indols.

Certains métabolites peuvent être réabsorbés par le côlon et être réutilisés par l'organisme (ammoniac et acides organiques) mais les sous-produits issus des putréfactions sont surtout réutilisés par les bactéries elles-mêmes.

E. Métabolisme des xénobiotiques

Les xénobiotiques naturels des végétaux exercent leur action sur l'organisme humain directement ou après leur métabolisme par des enzymes de la microflore colique ou

endogènes. Cela aboutit à la synthèse de substances très variées appartenant aux alcaloïdes, flavonoïdes, glucosinolates, saponines, terpènes, coumarines, dérivés soufrés ... ayant des effets biologiques bénéfiques ou néfastes. Par exemple, la digoxine est transformée par les bactéries en sous-produits peu actifs sur le cœur ; à l'inverse, les plantes laxatives contiennent des anthraquinones glycoconjuguées dont les bactéries libèrent dans le côlon le produit actif [29].

Les micro-organismes de la flore jouent aussi un rôle dans la synthèse des vitamines (K et B₉), l'absorption du calcium, du magnésium et du fer. L'absorption des ions dans le cæcum est augmentée par la fermentation des glucides et la production d'AGCC, en particulier l'acétate, le propionate et le butyrate.

Les effets de la microflore sont le plus souvent bénéfiques pour l'hôte mais elle est aussi suspectée de jouer un rôle dans la pathogénésie des maladies inflammatoires de l'intestin et des cancers coliques.

Certaines bactéries peuvent produire des substances putréfiantes telles que l'ammoniac, le sulfure d'hydrogène, des amines, des phénols, des indols et des acides biliaires secondaires qui peuvent attaquer l'intestin et avoir un effet pathogène. C'est le cas des *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Clostridia* et *Veillonella*.

D'autres peuvent jouer un rôle dans l'initiation des cancers coliques par la production de carcinogènes, cocarcinogènes et procarcinogènes ou leur libération des acides biliaires auxquels ces composés ont été liés dans le foie.

La flore colique est très active métaboliquement et produit de nombreuses enzymes qui peuvent faciliter les transformations des précarcinogènes en carcinogènes actifs : bêta-glucuronidase, bêta-glucosidase, bêta-galactosidase, nitroréductase, azoréductase, 7-alpha-déshydroxylase, cholestérol déshydrogénase [29].

Au-delà de son implication dans l'activité métabolique de l'intestin, la microflore est en étroite relation avec la muqueuse.

IV. Interactions avec la muqueuse intestinale et effet barrière

A. Présentation de la muqueuse intestinale

Outre ses fonctions de digestion des aliments et d'absorption des nutriments, la muqueuse intestinale joue un rôle essentiel de barrière dans la défense de l'organisme grâce à la couche de mucus, aux cellules épithéliales et au système immunitaire intestinal.

La couche de mucus et l'épithélium agissent comme une barrière physique contre les bactéries, le système immunitaire intestinal et le mucus riche en immunoglobulines sécrétées de classe A (les IgAs) comme une barrière immunologique.

L'épithélium intestinal est une couche monocellulaire comportant différentes populations de cellules :

- des cellules cylindriques absorbantes principalement : les entérocytes et les colonocytes
- des cellules caliciformes sécrétrices de mucus
- des cellules entéro-endocrines.

Les cellules épithéliales sont reliées par des structures spécifiques appelées « tight junctions » : elles renforcent l'épithélium et régulent les mouvements intercellulaires sous le contrôle de signaux provenant de la lumière intestinale, de la *lamina propria* ou de l'épithélium.

Le schéma qui suit (Figure 3) représente la surface de la muqueuse intestinale [49].

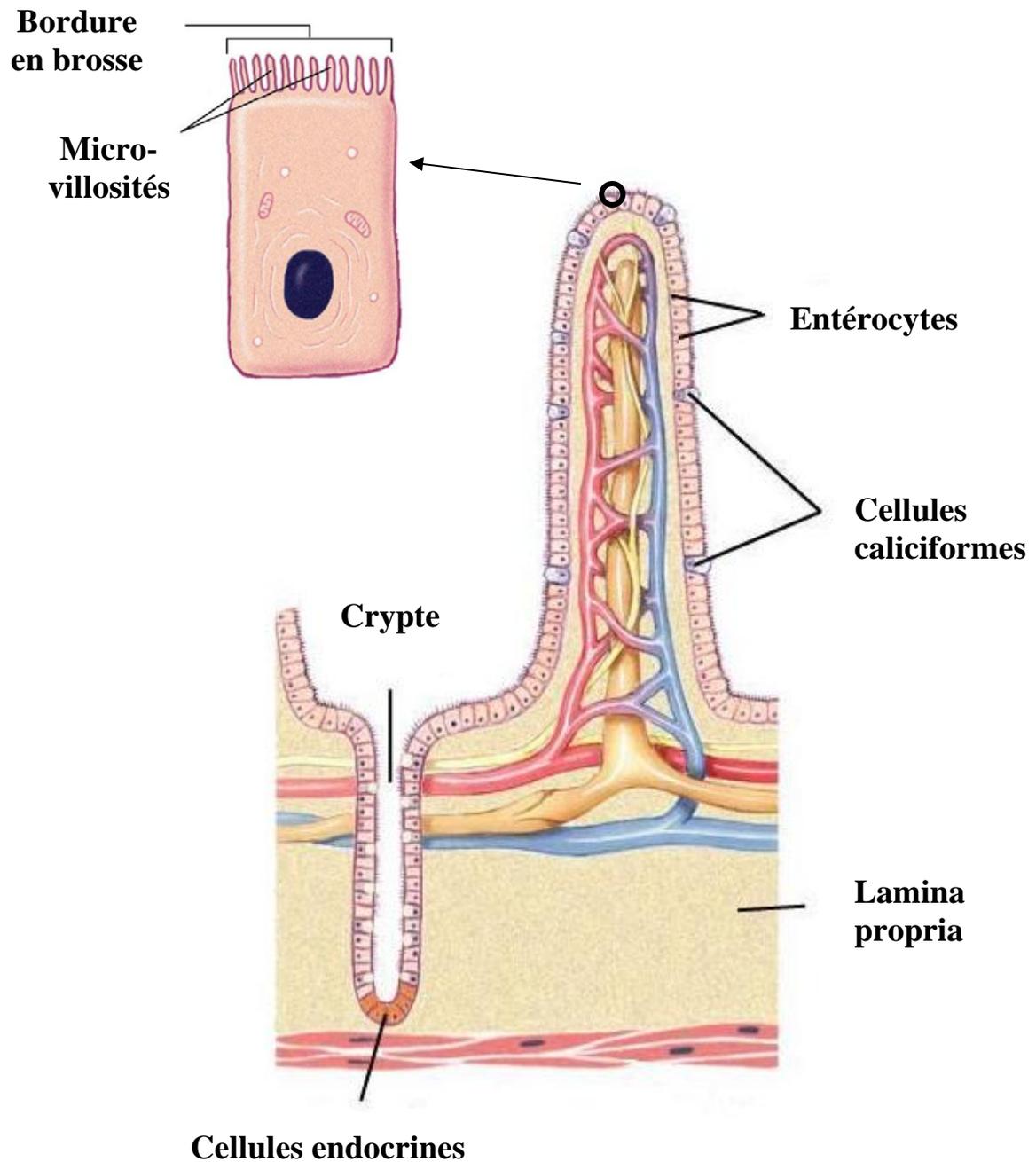


Figure 3 : Surface intestinale et détail d'une cellule absorbante [49]

L'épithélium se défend grâce à trois éléments :

- le mucus

Comme toutes les muqueuses du corps, la surface de l'épithélium gastro-intestinal est recouverte d'une couche visco-élastique de mucus ayant un rôle de protection, lubrification et transport entre l'espace luminal et l'épithélium.

Ce gel est formé de mucines : ce sont des structures peptidiques alternant des domaines non glycosylés et glycosylés (70 à 80%) et comprenant souvent des résidus acide sialique ou sulfates. Les 4 oligosaccharides rencontrés sont la N-acétylglucosamine, la N-acétylgalactosamine, le fucose et le galactose. Ils sont associés de différentes façons et créent des structures très variées qui sont des sites potentiels d'adhésion pour les bactéries [27].

Les mucines ont une rotation rapide et sont sécrétées par exocytose à la surface apicale des cellules caliciformes de l'épithélium selon deux modes [50] :

- une sécrétion continue
- une libération massive et accélérée en réponse à des stimulations physico-chimiques par différentes molécules : hormones, neuropeptides, médiateurs inflammatoires (des lipides : prostaglandines PG et des cytokines : interleukines IL, interféron IFN, Tumor Necrosis Factor TNF)...

L'épaisseur et le caractère hydrophobe du mucus varient le long du tube digestif [50] :

- au niveau du côlon, la couche de mucus est continue et son épaisseur augmente progressivement jusqu'au rectum alors que l'intestin grêle est recouvert d'une couche fine et discontinue (notamment au niveau des plaques de Peyer) pour faciliter le transport des antigènes.
- une couche supérieure de phospholipides confère des propriétés hydrophobes à la surface du mucus pour empêcher le contact de la muqueuse avec des toxines bactériennes hydrosolubles : elle reste fine au niveau de l'intestin grêle où a lieu le phénomène d'absorption, mais s'épaissit du côlon proximal au côlon distal.

Les types de mucines (neutres ou acides parmi lesquelles on distingue les sialo- et les sulfomucines) et la distribution des cellules caliciformes varient le long du tube digestif et aussi durant le développement postnatal.

A la surface des cellules épithéliales, on retrouve les mêmes types de molécules glycoconjuguées avec en plus le mannose comme oligosaccharide de base. Elles servent de nutriments à la microflore intestinale et de récepteurs pour les adhésines ou toxines de bactéries pathogènes : ces molécules glycoprotéiques et glycolipidiques forment le glycocalyx.

Dans des conditions normales, les bactéries adhèrent aux mucines (solubles ou recouvrant les cellules) à l'entrée des villosités intestinales mais jamais au niveau des cryptes.

Lorsque la fine couche de mucus ne joue plus son rôle de barrière physique, la fixation des pathogènes est alors possible directement sur les cellules épithéliales [35].

- Deuxième moyen de défense : une perméabilité cellulaire contrôlée

Au sommet des villosités a lieu l'absorption « active » et à leur base, l'absorption passive des grosses molécules telles que les anticorps ou grosses protéines antigéniques. Le transfert de grosses molécules peut se faire via ou entre les entérocytes. En effet, l'épithélium constitue une barrière de cellules parsemée de jonctions étanches ou « tight junctions ». Ce sont des structures macromoléculaires qui relient les cellules épithéliales entre elles. Elles contrôlent le passage des solutés entre la lumière et la muqueuse intestinale sans modifier l'effet barrière.

La perméabilité intestinale est altérée dans certaines pathologies : syndrome de l'intestin irritable, eczéma atopique, allergies alimentaire, cirrhose hépatique...

- Et enfin, la synthèse de substances actives

Les **peptides « trefoil »** sont des peptides résistants aux protéases sécrétés par les cellules caliciformes ; ils participent aux propriétés viscoélastiques de la couche de mucus.

Ils peuvent protéger la muqueuse des toxines bactériennes, des produits chimiques, des médicaments et participent au rétablissement de la continuité de l'épithélium après une lésion.

Les cellules de Paneth sécrètent un autre type de substances assurant la défense de la muqueuse : ce sont les **défensines**, des peptides aux propriétés anti-microbiennes [27]. A la différence des entérocytes et des cellules caliciformes, les cellules de Paneth ne migrent pas vers le sommet des villosités mais se regroupent au fond des cryptes intestinales ; elles sont nombreuses au niveau de l'intestin grêle. Elles synthétisent et stockent au niveau apical des substances capables d'agir de façon synergique contre différents micro-organismes. La sécrétion des défensines est stimulée par les bactéries Gram + et Gram - ou des produits bactériens (lipopolysaccharide par exemple). La cholécystokinine, des agonistes cholinergiques ou des cytokines (comme l'IFN α , le TNF α) peuvent aussi provoquer la

libération des substances. Même très diluées, ces substances sont actives donc elles pourraient assurer la protection des cellules de la crypte et de celles plus matures ayant migré vers les villosités.

B. Relations avec la flore

Le mucus empêche un accès direct des bactéries aux cellules épithéliales, mais il offre de nombreux avantages écologiques aux bactéries intestinales commensales :

- Elles possèdent l'équipement enzymatique pour dégrader les mucines et accéder à une source directe de glucides, peptides, vitamines, minéraux.
- Il permet aux bactéries de se fixer par des épitopes spécifiques, de résister à leur élimination sous l'influence du flux intraluminal et donc de le coloniser.

Les bactéries jouent un rôle dans la régulation du mucus :

1. elles modulent les sites d'adhésion bactériens

La colonisation finale de la flore résidente de l'adulte dépend beaucoup de la colonisation initiale : par deux mécanismes, les premières bactéries à s'implanter peuvent se créer une niche permanente, un environnement favorable à leur croissance et empêcher la croissance d'autres bactéries introduites plus tardivement dans cet écosystème [51] :

- en induisant des glycosylations spécifiques au niveau de l'épithélium intestinal

Les sites d'adhésion sont déterminés génétiquement chez le nourrisson. Cependant, sous l'action des glycosidases bactériennes, les structures peuvent être progressivement modifiées. Si les premières bactéries à s'implanter à la naissance sont dotées d'une activité glycolytique, le répertoire évolue et de nouvelles espèces bactériennes se lient aux mucines lorsque de nouveaux sites apparaissent. Pour cette raison, chaque individu possède sa propre flore intestinale [27].

- en modulant l'expression de gènes des entérocytes de l'hôte

Les bactéries de la flore résidente communiquent avec les cellules de l'hôte. L'équipe de J. Gordon a ainsi montré que *Bacteroides thetaiotaomicron* (une bactérie de la flore résidente) peut agir sur la composition des glycoconjugués intestinaux en modulant l'expression ou l'activité des glycosyltransférases cellulaires. De nombreux points restent à éclaircir : la nature du signal, le mécanisme d'action, le nombre de bactéries nécessaire pour établir ce dialogue et l'influence d'autres bactéries.

2. elles agissent sur la production mucus lui-même

L'activité sécrétrice des cellules caliciformes et la composition du mucus peuvent être influencées par les micro-organismes présents dans l'intestin. Ainsi il a été observé que les cellules caliciformes de rongeurs axéniques étaient moins nombreuses et plus petites que chez d'animaux élevés dans des conditions normales. Chez cette même population, la couche de mucus est jusqu'à deux fois plus fine que chez des animaux conventionnels [50].

Deux hypothèses sont envisagées :

- une modulation directe du micro-organisme par des facteurs bioactifs (ex : toxines)
- une modulation indirecte par activation de cellules immunitaires de l'hôte.

Cependant, les bactéries entéropathogènes peuvent aussi modifier les fonctions de l'épithélium et même exploiter les défenses de l'hôte dans leur propre intérêt.

C. L'effet barrière

Avec l'utilisation des antibiotiques et le développement d'infections à germes opportunistes, on a pris conscience de l'importance de la flore résidente. Les bactéries de cette flore jouent un rôle crucial dans la résistance à la colonisation par des micro-organismes pathogènes : par exemple, *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, certaines espèces pathogènes d'entérobactéries... Des animaux sans germe sont en effet très sensibles aux infections.

En absence de microflore, le transport des antigènes est notamment augmenté.

Seules certaines espèces bactériennes sont impliquées dans cet effet barrière et elles appartiennent toutes à la flore dominante.

On qualifie souvent les lactobacilles et les bifidobactéries de bactéries bénéfiques pour l'organisme mais elles ne sont pas les seules à participer à l'effet barrière. Les bactéries du genre *Eubacterium*, par exemple, interviennent aussi.

Les bactéries commensales agissent selon trois axes [52] :

1. empêcher le développement des pathogènes en :
 - a. épuisant les substrats ou entrant en compétition pour les substrats : les bactéries de la flore consomment un aliment présent en quantité limitée dans l'intestin et qui est nécessaire à la croissance d'un pathogène. Une relation symbiotique entre les bactéries et l'hôte évite une surproduction en nutriments qui favoriserait les pathogènes.
 - b. générant un environnement physiologique restrictif : par la production d'acides gras volatils qui inhibent la croissance cellulaire, la production de sulfure d'hydrogène ou la modification du potentiel d'oxydoréduction.
 - c. sécrétant des bactériocines : substances « antibiotiques » bloquant la croissance ou détruisant les bactéries. Elles sont généralement réservées à des niches localisées et l'hôte peut exercer un contrôle sur la production de ces protéines grâce à des protéases.
2. empêcher leur fixation aux cellules épithéliales en entrant en compétition pour les sites récepteurs : par encombrement stérique ou par blocage spécifique d'un récepteur, certaines bactéries peuvent gêner l'adhérence des pathogènes.
3. neutraliser leur action toxique : inhiber la production ou les effets de toxines bactériennes cytotoxiques ou responsables d'altérations biochimiques.

L'effet barrière ne concerne pas seulement le niveau de population d'une espèce bactérienne mais aussi le contrôle de ses effets toxiques. Sans modifier la concentration du micro-organisme, le taux des toxines peut être diminué.

Chez l'adulte sain, la flore complexe exerce normalement son pouvoir immunostimulant sur l'ensemble des fonctions immunitaires et participe ainsi à l'homéostasie de l'hôte. La stabilité de la flore est plus grande que chez l'enfant, mais nous avons peu de connaissances quant à

l'influence de situations de la vie courante telles que le stress, la prise de médicaments, ou encore les modifications de l'alimentation..., sur son équilibre. Seule la prise d'antibiotiques a fait l'objet d'études montrant un impact important sur l'équilibre de la flore intestinale.

Lorsque des dysfonctionnements apparaissent, il peut y avoir développement de germes potentiellement pathogènes par perte de l'effet barrière, apparition de diarrhées et la flore endogène est aussi suspectée dans la pathogénie des maladies inflammatoires de l'intestin ou des cancers coliques. L'administration d'antibiotiques peut modifier l'équilibre bactérien et permettre la croissance d'espèces telles que *Clostridium difficile*.

La microflore agit ainsi directement contre les pathogènes mais elle exerce aussi un rôle sur le système immunitaire intestinal. Son rôle dans la maturation du système immunitaire intestinal est crucial au cours des premiers mois de la vie car à la naissance, le système immunitaire muqueux du nouveau-né est immature alors que la confrontation antigène/micro-organismes débute aussitôt. Elle permettra de développer une tolérance progressive, locale et périphérique aux antigènes alimentaires.

La flore intestinale stimule différents processus : l'immunité Th1, la sécrétion de TGF (Transforming Growth Factor) γ et la production d'IgA.

L'effet barrière est alors complété par la sécrétion d'IgA et d'IgM qui empêchent la pénétration d'antigènes hostiles et la colonisation par des germes pathogènes.

V. Interactions avec le système immunitaire

La microflore intestinale joue un rôle important dans l'immunité et certains industriels axent sur ces propriétés immunomodulatrices la communication concernant leurs produits probiotiques. Pour mieux comprendre les allégations développées, un court rappel d'immunologie est nécessaire.

A. Généralités sur le système immunitaire

Lorsque des pathogènes pénètrent dans l'organisme, la réponse immunitaire innée se met en place : cette réponse non spécifique implique des macrophages, des neutrophiles, des cellules NK (Natural Killer) et le complément. Des récepteurs présents à la surface des cellules détectent les pathogènes qui seront détruits par phagocytose.

Lorsque cette première ligne de défense n'est pas efficace (insuffisante ou n'ayant pas reconnu le pathogène), une réponse immunitaire adaptative spécifique est mise en œuvre 4 à 7 jours après le début de l'infection selon deux modes (Figure 4) :

- l'immunité à médiation cellulaire par les lymphocytes T
- l'immunité humorale par l'intermédiaire d'anticorps, les immunoglobulines, sécrétés par les lymphocytes B circulants activés en plasmocytes.

Il existe 5 classes d'immunoglobulines : IgG, IgM, IgA, IgD et IgE. Les IgA représentent environ 10% des immunoglobulines, prédominent sur les muqueuses et résistent aux protéases bactériennes.

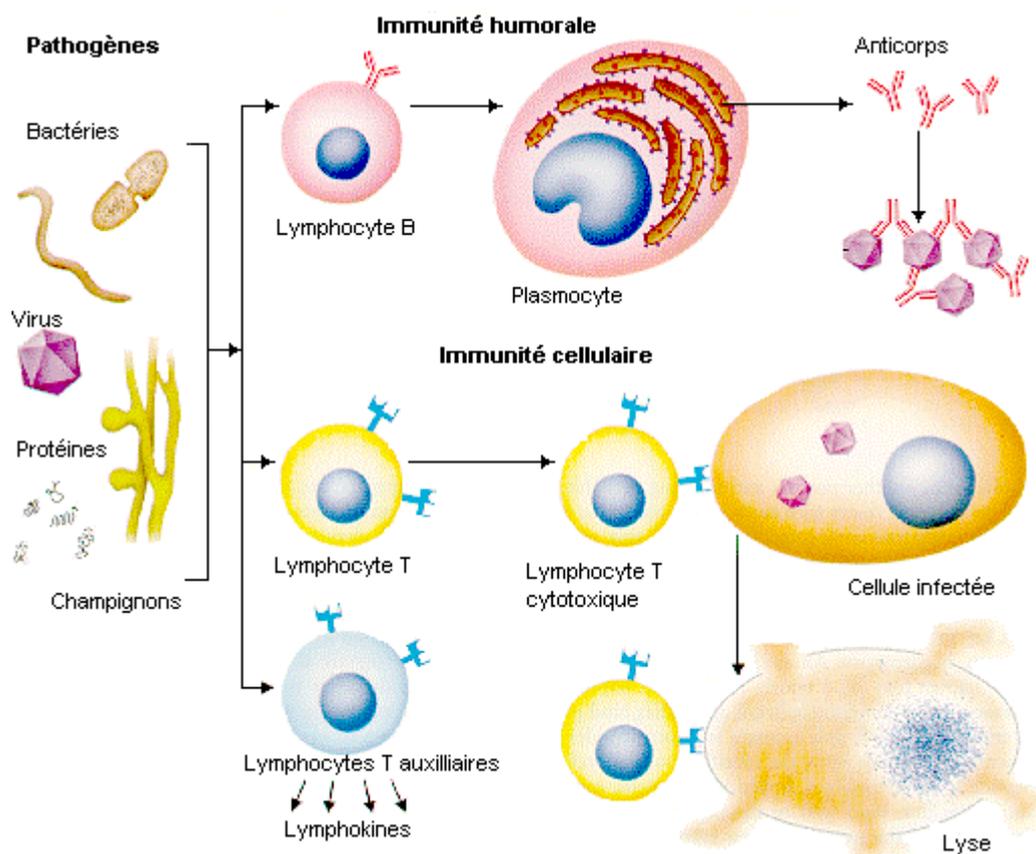


Figure 4 : La réponse immunitaire spécifique [53]

Après contact avec les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), les lymphocytes T auxiliaires CD₄ naïfs se différencient en T-helper. Il existe deux sous-populations Th1 et Th2, qui se caractérisent par les cytokines qu'elles secrètent et la réponse immunitaire induite [51].

La sous-population Th1 :

1. active les lymphocytes T CD₈ cytotoxiques par la sécrétion d'interféron IFN γ , d'interleukines IL-2 et IL-12, de Tumor Necrosis Factor TNF α
2. stimule l'immunité cellulaire
3. stimule la synthèse d'immunoglobulines sériques de type IgG₂ peu efficaces.
4. est impliquée dans la réponse inflammatoire
5. confère une protection contre les pathogènes intra-cellulaires, favorise la phagocytose.

La sous-population Th2 :

1. active les lymphocytes B par la sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 et de l'IL-13
2. favorise la production d'anticorps de type IgA et IgE, d'IgG₁
3. confère une protection contre les parasites par recrutement de polynucléaires basophiles, éosinophiles et de mastocytes.

Les sous-populations Th1 et Th2 s'inhibent réciproquement : le fonctionnement Th1 ou Th2 est donc mutuellement exclusif.

L'orientation vers un profil Th1 ou Th2 dépend de :

- l'IL-12, le TGF β et l'interféron IFN γ pour la population Th1
- l'IL-4 pour la population Th2.

La figure 5 présente les différentes cytokines sécrétées et les interactions entre les lymphocytes Th1 et Th2 [51].

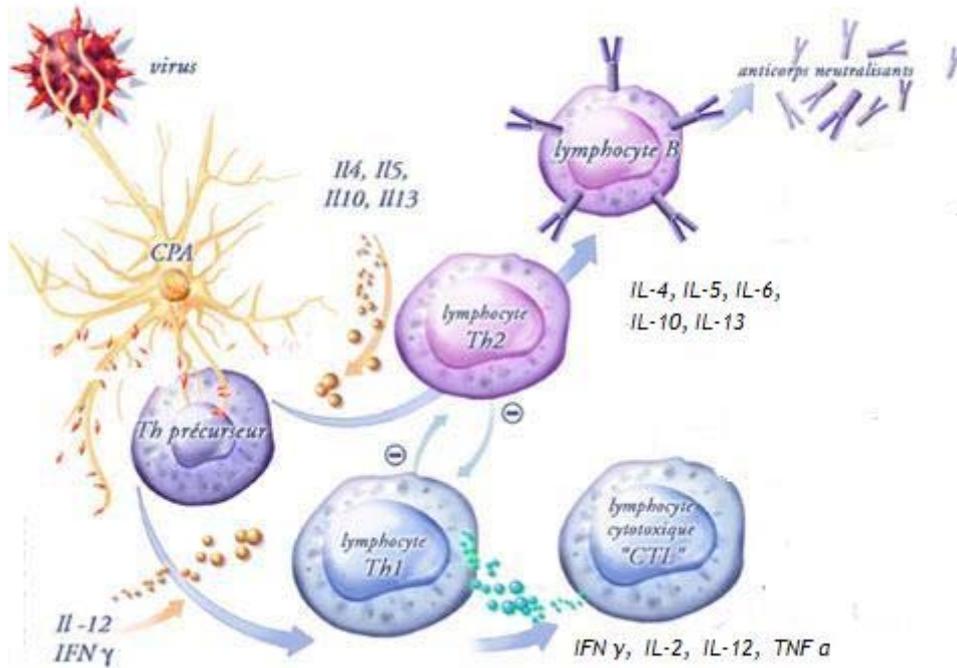


Figure 5 : Interactions et maturation des lymphocytes T helper [51, 54]

Un dysfonctionnement dans l'équilibre Th1/Th2 peut être responsable de pathologies : allergies (profil Th2) ou maladies auto-immunes telles que certaines maladies inflammatoires intestinales (profil Th1).

Une fois les bactéries ou les cellules infectées par le virus éliminées, les lymphocytes B et T activés se transforment en cellule mémoire : l'intérêt de cette réponse adaptative est une protection contre la réinfection par les micro-organismes pathogènes. Cette rapide contre-attaque lors du prochain contact avec le pathogène est utilisée lors de la vaccination.

La flore intestinale joue un rôle important dans la résistance aux infections en interagissant directement avec les bactéries pathogènes mais aussi en influençant le système immunitaire au niveau intestinal [28].

B. Système immunitaire intestinal

Le tube digestif est l'organe lymphoïde le plus important de l'organisme désigné sous le terme de GALT : Gut Associated Lymphoid Tissue (tissu lymphoïde associé à l'intestin). La muqueuse intestinale contient ainsi plus de cellules immunocompétentes (lymphocytes T, lymphocytes B et plasmocytes, macrophages, mastocytes, polynucléaires éosinophiles et basophiles) que tout le reste de l'organisme et plus de 70% des cellules sécrétant des immunoglobulines.

Le système immunitaire intestinal comprend :

- le D-MALT : Diffuse Mucosa-Associated-Lymphoid Tissue. Ce sont des cellules disséminées sous l'épithélium intestinal (dans le tissu conjonctif sous-jacent : la *lamina propria*) ou entre les cellules épithéliales. Il s'agit principalement de lymphocytes T CD₈ et de plasmocytes sécrétant des IgA [34].
- le O-MALT : Organized Mucosa-Associated-Lymphoid Tissue. Ce sont des cellules regroupées en grand nombre dans des structures plus organisées : les follicules lymphoïdes. Ces follicules peuvent être isolés ou regroupés en « plaques de Peyer » qui comprennent des lymphocytes B en leur centre et des lymphocytes T – majoritairement de phénotype CD₄ - à leur périphérie. Les plaques de Peyer se situent au niveau de l'intestin grêle et principalement dans la fraction terminale de l'iléon.

De nombreux antigènes dérivés de micro-organismes ou d'aliments sont détruits par l'acidité gastrique ou éliminés par les mouvements péristaltiques et la flore intestinale. Un faible pourcentage est capturé pour être présenté aux cellules immunocompétentes situées sous la muqueuse ; différentes voies existent :

1. par traversée de la couche épithéliale normale recouvrant la *lamina propria*,
2. par passage entre les entérocytes
3. par l'intermédiaire des cellules M (microfolds) situées au-dessus des plaques de Peyer entre les cellules épithéliales.

Les cellules M siègent principalement au niveau de l'intestin grêle, mais sont aussi présentes dans le côlon et le rectum. Elles permettent une entrée sélective de stimulants antigéniques, viraux ou bactériens, de macromolécules et leur présentation aux nombreuses cellules lymphoïdes qui sont présentes juste sous ces cellules.

Les deux premières voies ne concernent que des antigènes de petite taille chez des individus en bonne santé.

Les lymphocytes B et T activés par ces antigènes subissent une maturation ; ils migrent via le système lymphatique vers la circulation sanguine et jusqu'à la région à défendre.

- Les lymphocytes B se transforment en plasmocytes responsables d'une importante sécrétion d'immunoglobulines IgA polymériques qui diminuent l'intensité et la durée de l'infection.
- Les lymphocytes T sécrètent des cytokines et permettent le recrutement de cellules immunes.

Certains micro-organismes pathogènes profitent du système de transport des antigènes par les cellules M pour traverser l'épithélium intestinal : c'est la translocation. Pauvres en mucus et glycocalix, ces cellules sont aussi dépourvues de microvillosités et donc plus perméables aux micro-organismes. Le contact avec ces cellules est facilité et *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* détournent ainsi à leur profit la capacité d'endocytose des cellules M [52].

Le développement des cellules M, des plaques de Peyer ou des plasmocytes semble nécessiter un contact avec la microflore intestinale. Des animaux élevés dans un environnement sans germe ont un système immunitaire intestinal sous-développé : densités plus faibles de lymphocytes, follicules lymphoïdes plus petits et concentrations en immunoglobulines sanguines plus faibles. Après une exposition intestinale à des germes, ces caractéristiques se modifient rapidement [52].

La figure 6 schématise le tissu lymphoïde intestinal disséminé et organisé avec une plaque de Peyer [55].

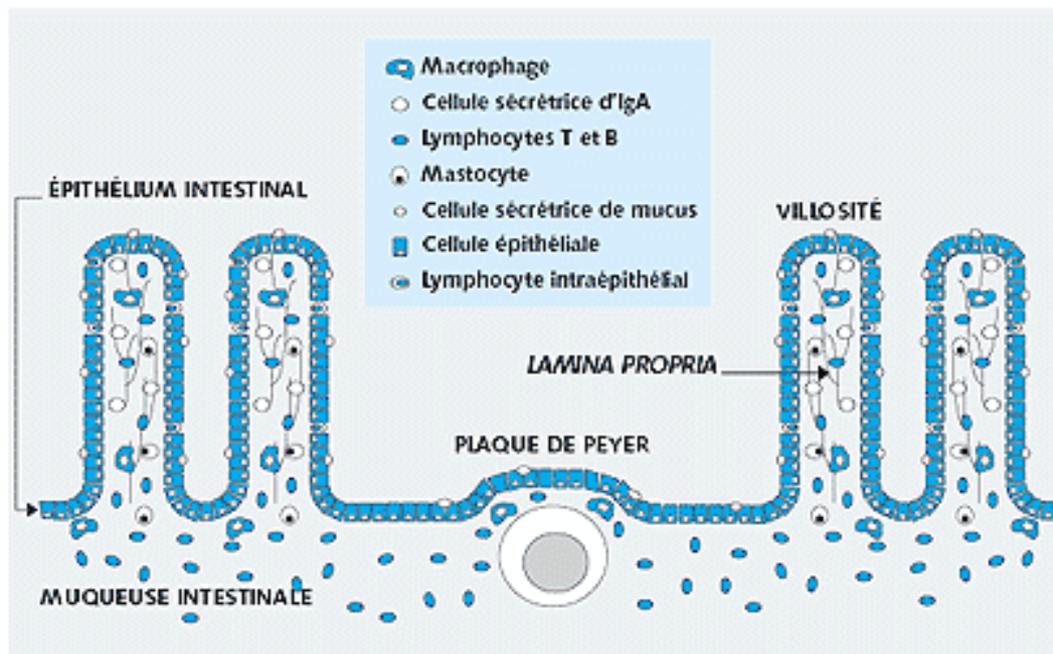


Figure 6 : Système immunitaire intestinal [55]

Le système immunitaire intestinal (SII) est spécialisé dans deux fonctions opposées ayant pour but de maintenir l'intégrité de l'épithélium intestinal et limiter sa perméabilité :

1. empêcher le développement de réactions immunitaires envers les antigènes issus de protéines étrangères présentes dans l'intestin (comme les protéines alimentaires et celles des bactéries intestinales commensales) : c'est la tolérance orale.
2. développer des réactions de défense envers les germes entéropathogènes, en particulier par la sécrétion d'anticorps adaptés au milieu intestinal, les immunoglobulines IgA sécrétoires (IgAs). Leur rôle protecteur est dû à leur capacité à bloquer l'adhésion, inhiber la multiplication virale et neutraliser les toxines bactériennes [56].

Alors que ces micro-organismes présentent souvent les mêmes éléments structuraux, la flore résidente ne provoque aucune réponse ou une réponse inflammatoire très légère.

Il existe deux types de réponses immunes [51] :

Réponse de type inducteur : elle se caractérise par la synthèse et la sécrétion d'immunoglobulines de type A sécrétoires IgAs. Les IgAs sont des dimères d'IgA reliés par une composante protéique - pièce sécrétrice + pièce J - et correspondent à la réponse humorale adaptée aux muqueuses. Elle assure la protection de la muqueuse contre les micro-organismes entéropathogènes en bloquant l'adhésion, la translocation vers le compartiment

systémique, la multiplication virale, en neutralisant les entérotoxines ou encore en bloquant le passage de macromolécules par la formation d'immun-complexes.

Réponse de type supprimeur : les réponses humorales et cellulaires spécifiques d'une protéine alimentaire et des bactéries résidentes sont supprimées. Ce phénomène, appelé « tolérance orale », empêche le développement d'hypersensibilités alimentaires dont l'allergie et les réactions inflammatoires du tube digestif envers les bactéries intestinales, comme dans la maladie de Crohn.

Elle serait due :

- soit à une inhibition de la réactivité des lymphocytes, après sécrétion de cytokines immunosuppressives : l'IL-4, IL-10 et le TGF β par des lymphocytes T régulateurs Tr1 et Th3
- soit à une présentation des antigènes par les CPA sans activation des lymphocytes T.

La microflore intestinale semble jouer un rôle crucial dans le développement de la tolérance orale : des animaux sans germe ou axéniques présentent en effet une tolérance orale déficiente.

Le fonctionnement optimal du système immunitaire intestinal se situe entre infections et allergies. S'il est insuffisant, il ne s'opposera pas à la pénétration des micro-organismes et de leurs toxines mais s'il est excessif, il sera responsable de réactions d'hypersensibilité. Il induira alors des réactions allergiques (allergies digestives), des intolérances digestives (maladie cœliaque) ou un emballement du système immunitaire : maladie de Crohn, entérocolites auto-immunes, colites collagène et microscopiques, entérite à éosinophiles.

Il semble que l'équilibre entre les sous-populations Th1 et Th2 est particulièrement important au niveau de l'immunité muqueuse.

Au cours de la petite enfance, la flore intestinale est la source majeure de stimuli microbiens ; les bactéries de la flore commensale ont une influence considérable sur le développement et la modulation des fonctions du système immunitaire intestinal de l'enfant car son système immunitaire intestinal est immature à la naissance et son tube digestif stérile. La flore sert alors de stimulus primaire pour les deux types de réponse immune : innée et adaptative.

Les études réalisées avec des animaux axéniques, ont montré le rôle décisif de la colonisation bactérienne du tube digestif sur le développement et la modulation des fonctions du SII. Ces

animaux axéniques sont aussi des modèles animaux expérimentaux très intéressants, car on peut coloniser leur tube digestif avec des flores fécales humaines, obtenant ainsi des souris "à flore humaine" appelées "souris gnotoxéniques". Les souris axéniques permettent aussi, en colonisant le tube digestif avec cette fois une seule bactérie isolée de la flore intestinale étudiée, d'analyser *in vivo* le rôle particulier joué par cette bactérie sur un paramètre immunitaire précis. Grâce à ces modèles, il a été montré le rôle primordial que joue l'installation de la flore intestinale du jeune enfant sur le développement du SII, et l'intérêt particulier de la présence de certaines bactéries pour la stimulation des fonctions des macrophages (phagocytose, synthèse de cytokines), la modulation des fonctions du SII, la synthèse d'IgA et la tolérance orale.

L'équipe de M-C Moreau a étudié chez des souris gnotoxéniques l'effet immunomodulateur de deux flores différentes : celle d'un enfant nourri au sein et celle d'un enfant nourri au lait de vache adapté [56]. Ces souris sont infectées par un rotavirus et la réponse IgAs est étudiée. Les résultats, contenus dans le tableau 8, montrent que le nombre de cellules sécrétrices d'IgAs anti-rotavirus présent dans la muqueuse intestinale est plus important chez les souris hébergeant la flore du bébé nourri au sein que chez celles hébergeant la flore du bébé nourri au lait de vache adapté. La flore de l'enfant nourri au sein a un effet stimulant sur la synthèse d'IgAs.

Groupes de souris	Genres bactériens présents	Nombre de cellules sécrétrices d'IgAs anti-rotavirus/10 ⁶ cellules
Souris hébergeant une flore de bébé nourri au sein	<i>Bifidobacterium</i> <i>Streptococcus</i> <i>Escherichia coli</i>	156 ± 40 **
Souris hébergeant une flore de bébé nourri au lait de vache adapté	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacteroides</i>	29 ± 9

Expression des résultats : moyenne des nombres trouvés chez dix souris ± écart-type à la moyenne ; ** différence significative à 1%

Tableau 8 : Nombre de cellules sécrétrices d'IgA anti-rotavirus présent dans la muqueuse de l'intestin de souris hébergeant des flores intestinales différentes [56]

Ils se sont ensuite intéressés spécifiquement à *Bifidobacterium* et *E. coli* en comparant l'effet immunomodulateur de ces bactéries, seules ou en association, par rapport à une souris axénique (Tableau 9).

Flore intestinale des groupes de souris	Nombre de cellules sécrétrices d'IgAs anti-rotavirus/10⁶ cellules
Axénique (sans germes)	447 ± 198
<i>Bifidobacterium</i>	5486 ± 2670 **
<i>Escherichia coli</i>	48 ± 11 **
<i>Bifidobacterium</i> + <i>Escherichia coli</i>	500 ± 250 NS

Expression des résultats : moyenne des nombres trouvés chez dix souris ± écart-type à la moyenne. Comparaison avec le groupe axénique : ** différence significative à 1%, NS non significativement différent.

Tableau 9 : Nombre de cellules sécrétrices d'IgA anti-rotavirus présent dans la muqueuse de l'intestin de souris hébergeant des flores intestinales différentes [54]

La présence de *Bifidobacterium* a un effet adjuvant sur la quantité d'IgAs anti-rotavirus fécale et multiplie environ par 10 le nombre de cellules sécrétrices présentes dans la muqueuse, par rapport à la souris axénique. Inversement, *E. coli* a plutôt un effet inhibiteur sur le nombre de cellules sécrétrices qui est diminué d'un facteur 10. La présence de *Bifidobacterium* et d'*E. coli* dans le tube digestif modère l'effet inhibiteur exercé par *E. coli*.

Ces résultats montrent le rôle important que pourraient jouer les bifidobactéries chez l'enfant et l'éventuel effet de leur présence dans les préparations lactées infantiles mais les mécanismes d'action ne sont pas encore élucidés.

Les fonctions du SII jouent ainsi un rôle très important sur l'homéostasie de l'hôte. Il existe un trafic cellulaire important entre le SII, le compartiment systémique et les autres muqueuses, dont la muqueuse vaginale. Un événement se situant dans la sphère intestinale, comme une immunomodulation bactérienne, peut avoir ainsi des conséquences au niveau systémique et sur d'autres muqueuses. L'ensemble de ces interactions passe par un "langage immunologique" exprimé par des molécules protéiques appelées "cytokines", synthétisées principalement par les différentes cellules du système immunitaire en réponse à des stimuli.

Les trois éléments du système de défense de l'intestin – flore, muqueuse et système immunitaire – peuvent subir des dysfonctionnements. En cas de sur-développement d'une bactérie dans l'intestin grêle, d'une perméabilité accrue de la muqueuse intestinale ou de déficiences du système immunitaire de l'hôte, le passage à travers la muqueuse d'une bactérie vivante du tube digestif jusqu'au sang (via les ganglions mésentériques, le foie et la rate) est possible. Ce phénomène est appelé translocation.

Après avoir traversé la barrière épithéliale, la bactérie peut alors migrer via la lymphe en dehors de l'intestin et se disséminer dans tout l'organisme. Les bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, des entérobactéries et des entérocoques sont capables de subir une translocation [34]. Ce phénomène est aussi directement lié au pouvoir d'invasion de certaines bactéries pathogènes.

Compte tenu des interactions de la flore avec le système immunitaire intestinal, la nécessité d'un équilibre de la flore intestinale pour la prévention de pathologies infectieuses, auto-immunitaires, cancéreuses, allergiques... (et ce, dès le plus jeune âge) devient un sujet d'étude de plus en plus fréquent.

L'importance de la microflore dans les fonctions biologiques de l'intestin est reconnue depuis quelques dizaines d'années. Les microbiologistes et les nutritionnistes ont cherché à mieux connaître cet écosystème pour le protéger et le renforcer.

Parmi les espèces dominantes de la microflore intestinale, les lactobacilles et les bifidobactéries ont attiré l'attention car ils sont connus pour leurs effets positifs chez l'homme. Actuellement deux approches sont utilisées pour moduler le nombre de ces bactéries dans le côlon et essayer d'influencer le développement de l'immunité :

→ L'approche prébiotique repose sur la consommation de produits alimentaires qui favorisent la multiplication de ces bactéries dans l'intestin, il s'agit généralement d'oligosaccharides.

→ L'approche probiotique consiste à augmenter le nombre de ces micro-organismes grâce à un apport dans l'alimentation et la consommation de laits fermentés. Les produits agro-alimentaires contenant des probiotiques seront étudiés dans la troisième partie.

3^{ème} PARTIE : PROBIOTIQUES ET PREVENTION NUTRITIONNELLE

Nous avons vu dans la deuxième partie que les micro-organismes présents dans l'intestin peuvent être divisés en deux catégories selon qu'ils exercent sur l'hôte des effets pathogènes ou bénéfiques à sa santé. Ceux qui ont des effets bénéfiques peuvent avoir deux origines :

- appartenir à la flore intestinale résidente de l'hôte
- lui être administrés afin d'améliorer son état de santé.

Dans ce deuxième cas, ces micro-organismes sont appelés probiotiques ; ils font l'objet de nombreuses études ces dernières années aussi bien dans le domaine pharmaceutique et, ce qui nous intéresse avant tout, dans le domaine agro-alimentaire. En effet, les aliments fonctionnels, qui ont des effets bénéfiques sur le consommateur au-delà de leur valeur nutritive intrinsèque, sont en pleine expansion et représentent un enjeu de taille pour l'industrie agro-alimentaire.

Les aliments contenant des probiotiques constituent une des catégories majeures des aliments fonctionnels : actuellement, une large gamme se développe avec des produits variés et s'adressant à tous les âges. Le marché potentiel pour ces aliments conduit les industriels à mettre en avant leur rôle dans le maintien du bien-être et la prévention d'infections ou de troubles gastro-intestinaux. Parallèlement à la croissance de ces produits se pose alors le problème de la justification de ces allégations.

I. Les probiotiques

A. Définition

Le concept des probiotiques a été introduit par Elie Metchnikoff (1845-1916), savant ukrainien naturalisé français ayant travaillé à l'Institut Pasteur et Prix Nobel 1908. Il a été le

premier à observer l'effet positif joué par certaines bactéries sur l'homme : après avoir constaté la longévité des montagnards du Caucase et des Balkans, il a affirmé qu'elle était liée à leur consommation de laits fermentés qui avait des effets bénéfiques sur leur santé.

A la même époque (1906), le pédiatre français Tissier observe le faible nombre de bifidobactéries dans les selles d'enfants diarrhéiques par rapport aux selles d'enfants en bonne santé. Il suggère alors d'administrer ces bactéries aux patients diarrhéiques pour les aider à restaurer une flore intestinale saine [57].

Les découvertes de Metchnikoff et Tissier sont séduisantes, une exploitation commerciale de produits contenant des bactéries commence alors : Metchnikoff est à l'origine du développement au début du XX^{ème} siècle du yaourt en Europe Occidentale. Mais les résultats suivants ne sont pas toujours positifs ou anecdotiques. Considéré comme non prouvé scientifiquement, le concept est délaissé et l'intérêt qu'il suscite durant les décennies suivantes est faible.

Le terme « probiotique » apparaît en 1965 ; il est dérivé du grec et veut dire « pour la vie ». Il a été utilisé la première fois par Lilly et Stillwell pour décrire des substances secrétées par un micro-organisme qui stimulent la croissance d'un autre, par opposition au terme antibiotique [16].

En 1974, Parker fut le premier à utiliser le terme dans son sens actuel : « des organismes ou substances qui contribuent à l'équilibre de la flore digestive ». En 1989, Fuller [58] inclut la notion de viabilité des probiotiques et celle d'effets bénéfiques sur l'hôte : « un organisme vivant qui a des effets positifs sur l'hôte en améliorant l'équilibre de la microflore intestinale ».

Même si des effets physiologiques bénéfiques ont été attribués à des micro-organismes tués par la chaleur (pasteurisation) ou par irradiation, ceux-ci ne constituent en aucun cas des probiotiques. Cependant, des effets peuvent être observés car la lyse bactérienne peut libérer des composés biologiquement actifs : métabolites, enzymes ou constituants de la paroi. La question des micro-organismes vivants au moment de leur ingestion, qui ont un effet physiologique bénéfique démontré, mais qui ne survivent pas au cours du transit digestif se pose aussi ; c'est le cas des yaourts par exemple. Ainsi lors de la conférence de la FAO et de l'OMS de 2001 [57], seuls les micro-organismes survivant au cours du transit digestif et ayant la capacité d'y proliférer ont été considérés comme des probiotiques alors que le groupe de travail « Alimentation infantile et modification de la flore intestinale » de l'AFSSA [31] n'a

pas retenu ces deux exigences et a considéré que tous les micro-organismes vivants au moment de leur ingestion et exerçant un effet bénéfique sur la santé du nourrisson et de l'enfant en bas-âge étaient des probiotiques.

En 1996, Schaafsma [59] élargit ensuite les effets des probiotiques en ne les limitant plus à une action sur la microflore : « les probiotiques administrés par voie orale sont des micro-organismes vivants qui ingérés en une certaine quantité, exercent des effets sur la santé au-delà de leur valeur nutritionnelle intrinsèque ».

En 2001, Schrezenmeir et De Vrese proposent de compléter la définition [60]: « une préparation ou un produit contenant des micro-organismes vivants, définis et en quantités suffisantes, qui modifie la microflore d'un compartiment de l'hôte (en s'y implantant ou en le colonisant) et qui par-là exerce des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte ».

Les particularités de cette définition sont :

- le besoin d'inclure des produits en plus des micro-organismes
- la nécessité d'avoir un nombre suffisant de micro-organismes.

Cette définition ne préjuge en rien du site d'action et du mode d'administration. Ainsi des sites d'action tels que la peau, la cavité buccale, l'intestin ou le vagin peuvent être envisagés [61]. Dans le cas de probiotiques ingérés la notion de survie dans le tube gastro-intestinal prend toute son importance.

Le document situé en annexe 3 est issu de la lettre d'information « Danone Nutritopics » n°29 de mars 2004 et dresse un historique de la définition du mot probiotique.

Les probiotiques sont des bactéries ou de levures, présentes ou non dans la microflore intestinale résidente, ingérés sous forme de médicaments, de compléments alimentaires ou d'aliments fonctionnels tels que, par exemple, des produits laitiers fermentés (laits fermentés, yaourts, certains fromages), des jus de fruits ou des préparations pour nourrissons.

Certains produits laitiers fermentés puis pasteurisés ou stérilisés ne peuvent être appelés probiotiques car les micro-organismes ont été tués.

Dans son rapport de 2005 sur les probiotiques [62], l'AFSSA a posé la question « Quel est l'intérêt des produits contenant des micro-organismes vivants par rapport aux produits contenant des micro-organismes tués ? ». La conclusion des experts est la suivante :

- Peu de travaux ont comparé de manière rigoureuse les effets de bactéries vivantes par rapport à ceux des bactéries tuées. Cette rigueur impose que la seule différence entre le groupe testé et le groupe contrôle soit le caractère vivant de la bactérie.
- Certains effets de préparations bactériennes peuvent être dus à certains de leurs métabolites et/ou à leur ADN. Ils peuvent aussi être observés avec des préparations non vivantes. Cependant, d'autres effets ne sont observés qu'avec des micro-organismes vivants [...].
- La survie dans le tube digestif de souches ingérées n'implique pas forcément l'existence d'effets bénéfiques. La non-survie n'implique pas nécessairement l'absence d'effets bénéfiques.

Un probiotique peut aussi être associé dans un même produit à un (ou des) prébiotique(s) : il s'agit alors d'un synbiotique [60]. L'encouragement prébiotique spécifique de la croissance d'un probiotique spécifique aurait pour résultat un renforcement des propriétés bénéfiques pour la santé.

Etant donné que les probiotiques doivent être fréquemment administrés pour obtenir un effet maximal, l'utilisation simultanée de probiotiques et de prébiotiques (par exemple, des bifidobactéries associées à des FOS) offrirait des avantages par rapport à la seule administration de probiotiques. Lorsque le prébiotique prétend améliorer l'activité et/ou la survie du probiotique, une démonstration de cet effet est nécessaire.

B. Micro-organismes probiotiques

Il n'existe pas au niveau européen de définition légale, de règlement, ni de liste positive (seuls les éléments de la liste peuvent entrer dans la composition d'un produit) pour réguler l'utilisation des probiotiques dans l'alimentation humaine [63]. En pratique, toutes les souches appartenant à une espèce traditionnellement utilisée peuvent être ajoutée à un produit.

En France, une réglementation existe pour les yaourts, qui ne peuvent contenir que deux bactéries : *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* avec des concentrations supérieures ou égales à 10^7 ufc/g de produit. En revanche, aucune exigence n'est requise pour l'identification des bactéries présentes dans les laits fermentés et parfois seule la mention « ferments lactiques » apparaît.

Les probiotiques utilisés se répartissent en deux groupes qui se différencient par des mécanismes d'action, des métabolismes et des sensibilités aux antibiotiques différents [64].

1. Les bactéries lactiques constituent le plus grand groupe.

Elles sont capables de digérer le lactose et de le convertir en acide lactique : il constitue leur unique ou principal produit du métabolisme glucidique et diminue le pH environnemental. Elles incluent les genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*.

La plupart des bactéries lactiques participent à l'élaboration de produits alimentaires fermentés pour lesquels elles jouent plusieurs rôles relatifs aux caractéristiques organoleptiques, nutritionnelles et sanitaires de l'aliment [20].

Les *Lactobacilli* sont des bactéries anaérobies facultatives Gram positif, surtout d'origine humaine, dont les 80 espèces se différencient par leurs processus de fermentation, leur production en peroxyde d'hydrogène et en bactériocines. Elles sont capables de se développer à un pH=4, de coloniser l'intestin et jouent un rôle dans la production de vitamine(s) et la digestion des aliments. Ils sont disponibles vivants dans certains aliments, vivants ou inactivés par la chaleur dans des préparations pharmaceutiques.

Les *Bifidobacteria* sont des bactéries anaérobies strictes Gram positif principalement d'origine humaine. Elles participent à la déconjugaison des acides biliaires, au catabolisme des glucides et à la synthèse des vitamines. Elles sont souvent présentes dans des aliments.

Enterococcus faecium et *Enterococcus faecalis* ont de bonnes caractéristiques microbiologiques (temps de régénération court, producteur de bactériocines) mais elles sont capables de provoquer des infections graves, en général chez des individus immunodéprimés.

La prévalence du genre *Enterococcus* en tant que bactérie responsable d'infections nosocomiales a beaucoup augmenté et il occupe la deuxième place après *E. coli* [25]. *E. faecium* et *E. faecalis* sont devenus résistants à de nombreux traitements et, étant donné que chez *E. faecium*, la résistance à la vancomycine* est portée par un plasmide susceptible d'être transféré d'une bactérie à une autre, on craint une transmission *in vivo* d'un caractère de résistance aux antibiotiques.

2. Les bactéries non lactiques et levures

Elles comprennent le genre bactérien *Bacillus* et la levure *Saccharomyces* mais n'interviennent pas dans la composition d'aliments fonctionnels.

Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont des bacilles aérobies Gram positif. Ils ont été beaucoup utilisés sous forme de suspension et de manière empirique dans la prévention et le traitement de la diarrhée. Devant l'absence d'essais contrôlés de leur efficacité, ils sont aujourd'hui délaissés pour de nouveaux probiotiques.

La levure *Saccharomyces boulardii* est disponible sous forme lyophilisée. Elle constitue notamment le principe actif d'un médicament commercialisé en France sous le nom d'Ultralevure® et indiqué dans le traitement symptomatique d'appoint de la diarrhée. Son avantage est de résister aux agents antibactériens : elle est utilisée comme flore de substitution en prévention et traitement de diarrhées associées à la prise d'antibiotiques. Dans la fiche qui est consacrée à ce médicament dans le dictionnaire Vidal® [65], on peut lire « l'efficacité clinique de ce médicament dans le traitement des diarrhées n'a pas été documentée par des essais contrôlés » mais le produit a bel et bien une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché).

La nomenclature des probiotiques doit se conformer aux noms courants, scientifiquement reconnus. L'hybridation ADN-ADN est la méthode de référence pour spécifier l'appartenance d'une souche à une espèce. La caractérisation de la souche doit ensuite être réalisée avec une

* cf. définitions (annexe 1)

méthode reconnue telle que l'électrophorèse en champ pulsé [31]. Enfin, toutes les souches devraient être déposées dans une collection internationale reconnue.

Les espèces probiotiques les plus couramment utilisés et étudiés appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Saccharomyces* : *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum* et *S. cerevisiae*, *S. boulardii* [27].

Des souches non pathogènes d'*Escherichia*, *Propionibacterium* sont aussi utilisées.

Le tableau 10 présente, de façon non exhaustive, les micro-organismes utilisés comme probiotiques [44, 64, 66].

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres bactéries lactiques	Bactéries non lactiques et levures
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>faecium</i>	<i>B. coagulans</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. breve</i>		
<i>L. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>L. cremoris</i>	
<i>L. delbrueckii</i> subsp.	<i>B. longum</i>	<i>L. diacetylactis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>bulgaricus</i>	<i>B.</i>		<i>S. cerevisiae</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>thermophilum</i>	<i>Leuconostoc</i> spp.	
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. helveticus</i>		<i>Pediococcus</i>	
<i>L. johnsonii</i>		<i>acidilactici</i>	
<i>L. kefir</i>			
<i>L. lactis</i>		<i>Streptococcus lactis</i>	
<i>L. paracasei</i>		<i>S. thermophilus</i>	
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>		<i>S. diaacetylactis</i>	
<i>L. rhamnosus</i>		<i>S. intermedius</i>	
<i>L. salivarius</i>			

Tableau 10 : Micro-organismes utilisés comme probiotiques chez l'homme, classés par ordre alphabétique dans chaque colonne [42, 63, 65]

C. Choix d'un probiotique

Compte tenu de la définition retenue pour le terme probiotique : « un micro-organisme vivant qui exerce des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte », le point primordial lors du choix d'une souche probiotique sera de s'assurer de sa capacité, premièrement, à rester vivant au niveau du site d'action attendu et, deuxièmement, à affecter de manière bénéfique l'organisme de l'hôte. Néanmoins de nombreux autres critères existent.

Les différents critères de sélection des micro-organismes probiotiques sont [2, 64, 67] :

1. une origine humaine
2. une stabilité génétique
3. un nombre élevé de cellules viables lors du stockage et de l'utilisation
4. une résistance à l'acidité et à la bile (lors d'une administration par voie orale)
5. une résistance aux antibiotiques sans transmission de cette résistance
6. une adhérence aux cellules épithéliales intestinales
7. une colonisation du tube digestif, même transitoire tout en participant à une flore équilibrée
8. une activité métabolique intacte au niveau de l'intestin
9. un antagonisme avec les germes pathogènes en empêchant ou réduisant leur adhérence
10. une production d'agents antimicrobiens : acides, peroxyde d'hydrogène, bactériocines...
11. une capacité d'immunomodulation
12. des effets bénéfiques démontrés chez l'homme
13. une innocuité pour l'homme : sécurité d'emploi « GRAS » (Generally Recognised As Safe), non pathogène, non invasif, non carcinogène, non toxique
14. une facilité de production et d'administration
15. la préservation des caractéristiques biochimiques et des caractères organoleptiques du produit alimentaire dans lequel il est incorporé.

Pour choisir le probiotique, il faudra aussi considérer l'objectif et le site d'action désirés [2].

➤ L'objectif visé par l'emploi du produit alimentaire

Un traitement par des probiotiques, à visée curative ou préventive, consiste à introduire intentionnellement des souches de bactéries bénéfiques pour écarter des bactéries néfastes à l'hôte.

Si l'objectif du probiotique est de maintenir l'équilibre de la flore intestinale, on aura tout intérêt à choisir un genre ou une espèce bactérienne proche de la flore résidente normale. Ainsi dans les produits alimentaires fermentés, les genres les plus utilisés appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Bifidobacterium*. Ils ont l'avantage de ne pas représenter de risque toxique ou infectieux et sont facilement inclus dans des produits laitiers.

➤ le site d'action attendu

S'agissant d'aliments, la cible visée correspond à la recherche d'effets dont le point de départ est l'intestin. L'utilisation de probiotiques présents dans des yaourts ou dissous dans du lait nécessite un stockage au frais et limite leur durée de conservation. Ces limites peuvent être dépassées par l'utilisation de formes desséchées ou lyophilisées.

Une bactérie résidente a un effet sur l'hôte dès lors que son taux dépasse 10^7 - 10^8 ufc/g de contenu intraluminal : la dose d'administration recommandée pour les probiotiques est généralement de 10^9 à 10^{11} micro-organismes [64]. Pour des doses ingérées faibles, la fréquence d'administration pourrait, suivant les effets immunomodulateurs considérés, avoir un effet additif conduisant à une stimulation, mais il y a peu d'études sur ce sujet.

Pour les probiotiques utilisés comme principe actif de médicaments, d'autres voies d'administration peuvent être envisagées :

- Une administration rectale présenterait l'intérêt d'avoir un plus grand choix de micro-organismes car ils n'ont pas besoin de résister à un pH gastrique mais peu d'études ont été effectuées.
- L'administration vaginale serait un bon moyen d'obtenir une recolonisation par des *Lactobacilli* : elle a été suggérée dans le traitement des candidoses génitales et infections urinaires récidivantes [61].

Le développement d'un aliment fonctionnel contenant des probiotiques passe par une étude de ces probiotiques en trois points :

- étudier la survie, l'adhésion et la colonisation
- identifier les éléments actifs et les mécanismes d'action
- démontrer les effets.

D. Survie, adhésion des probiotiques et colonisation du tube digestif

Pour espérer être efficaces au niveau de l'intestin grêle ou du côlon, les probiotiques ingérés doivent être vivants dans le tube digestif et donc survivre durant le transit. Néanmoins, cela ne signifie pas qu'ils doivent s'implanter *in vivo*.

Pour élucider les questions autour de la survie des probiotiques, de la colonisation de l'intestin et pouvoir juger les effets des probiotiques sur la composition de la flore, il est important de pouvoir déterminer les changements de populations quantitativement et qualitativement au niveau de l'espèce et de la souche ; d'où l'importance de l'analyse moléculaire [44].

Une des principales difficultés lors de l'utilisation de micro-organismes vivants est de les détecter et de les quantifier dans l'intestin ou les selles tout en les différenciant des autres bactéries résidentes appartenant aux mêmes genres ou espèces bactériens. Les méthodes moléculaires permettraient de pouvoir différencier les probiotiques des souches endogènes de la même espèce déjà présentes chez l'hôte si l'ARN ribosomal 16S contient des signatures spécifiques à la souche. Mais un problème peut encore se poser : la spécificité de ces séquences d'ARNr, car le nombre de souches peut être supérieur au nombre de variants d'ARNr 16S. Ainsi la meilleure approche paraît être de s'assurer que le variant d'ARNr de la souche n'est pas présent initialement. Une autre approche pourrait être d'utiliser des probiotiques génétiquement modifiés (par exemple produisant une protéine fluorescente).

On distingue trois étapes dans la vie d'une bactérie probiotique lors de son transit dans le système digestif :

1. la survie
2. l'implantation dans l'intestin
3. la colonisation.

1. Survie dans le tube digestif

La survie lors du transit gastro-intestinal varie considérablement d'une souche à l'autre mais aussi de la dose ingérée, de facteurs liés à l'hôte et de l'aliment vecteur [62]. Certaines souches appartenant aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (par exemple *L. plantarum* ou *L. acidophilus*) traversent l'intestin grêle et parfois le côlon à des hauts niveaux de population alors que d'autres seront tuées dès l'estomac.

Au niveau de l'estomac, la viabilité des probiotiques dépendra de la souche, du pH et de la durée d'exposition à l'acidité gastrique. Les espèces les plus résistantes à l'acidité gastrique sont *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus acidophilus*.

Ensuite au niveau de l'intestin grêle, l'obstacle le plus important à la survie sera la sécrétion des sels biliaires. La survie dépendra alors de leur concentration, de la durée d'exposition et du niveau d'activité des enzymes hydrolysant les sels biliaires.

Le taux de survie, estimé entre 10 et 30% selon les espèces, est un critère important pour le choix du probiotique et de la dose à administrer pour observer un effet.

Une équipe danoise a testé 47 souches de lactobacilles [68]. Seules 5 souches ont résisté *in vitro* à un pH=2.5 et ont adhéré aux cellules Caco2* (il s'agit de cellules coliques humaines immortelles cultivées *in vitro*) : *L. rhamnosus* 19070-2, *L. reuteri* DSM 12246, *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103), *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CHCC 2329, *L. casei* subsp. *alactus* CHCC 3137 (*L. bulgaricus* n'était pas testé). Chez l'homme, ces 5 souches parcourent vivantes l'intestin et sont plus ou moins rapidement éliminées après l'arrêt de la consommation. Durant les 18 jours de consommation d'une dose bi-quotidienne de 10^{10} ufc d'une des 5 souches, les lactobacilles sont récupérés vivants dans les fèces de 10 des 12 volontaires. Pendant la première semaine qui suit l'arrêt de la consommation, moins de 50% des échantillons de fèces comportent 10^5 à 10^8 ufc de lactobacilles et dès la deuxième semaine d'arrêt de consommation, les lactobacilles ne sont plus détectés dans aucun échantillon de fèces.

L'ingestion de 10^{10} ufc de *Lactobacillus casei* DN-114 001 permet de retrouver une population de 10^6 à 10^7 UFC/g dans le tractus intestinal : de telles concentrations permettent de garantir une action métabolique de *Lactobacillus casei* DN-114 001 au niveau de l'intestin

* cf. définitions

grêle et du côlon [69]. En revanche, les populations de *Lactobacillus casei* DN-114 001 ne sont plus retrouvées quelques jours après l'arrêt de la consommation du produit : *Lactobacillus casei* DN-114 001 est une bactérie de transit qui ne colonise pas le tractus digestif.

Les scientifiques n'ont pas encore validé la résistance *in vivo* des nombreux probiotiques utilisés, ni l'étape suivante : leur adhésion aux cellules épithéliales. Après avoir survécu lors du transit gastro-intestinal, le probiotique entre en compétition avec la flore résidente pour ses nutriments et les sites de colonisation.

2. Adhésion aux cellules intestinales

Beaucoup de bactéries résidentes vivent associées aux cellules épithéliales digestives ou au mucus intestinal et certains probiotiques posséderaient cette propriété.

La capacité d'adhésion des probiotiques constitue actuellement un critère de sélection des souches car la fixation à la muqueuse représente un avantage écologique majeur au niveau de l'écosystème : les bactéries résistent mieux aux mouvements péristaltiques intestinaux, leur persistance peut être favorisée par le mucus qui est source de nutriments. En prolongeant leur temps de présence dans le tube digestif, la durée pendant laquelle les probiotiques peuvent influencer la microflore de l'hôte et son système immunitaire est augmentée. Enfin, on peut penser que les bactéries seront d'autant plus efficaces qu'elles seront proches de la muqueuse : les relations avec l'épithélium entérocytaire et le système immunitaire local sont alors facilitées. Mais pour espérer s'implanter dans l'intestin de l'hôte, les bactéries doivent résister aux mécanismes locaux de régulation de la flore et notamment à la flore autochtone.

Cette idée selon laquelle l'effet probiotique maximal est atteint si le micro-organisme adhère aux cellules intestinales est développée mais il n'y a pas de preuve *in vivo* de cette adhésion. Au contraire, les probiotiques semblent arriver jusqu'au fèces sans avoir adhéré ou s'être multipliés [70].

Pour prouver la capacité d'adhérer d'une bactérie, il faut soit réaliser des études avec biopsies lors de coloscopies ou étudier *in vitro* des lignées de cellules épithéliales telles que Caco-2 et

HT-29*. Cette deuxième méthode est plus simple et moins onéreuse mais le problème de la concordance entre résultats *in vitro* et la réalité *in vivo* subsiste [25].

Peu de souches de *Lactobacillus* utilisées dans le commerce adhèrent aux cellules Caco-2 ou HT-29 et chez l'homme. *L. bulgaricus* et *L. acidophilus* n'adhèrent pas *in vitro* ou *in vivo*. Parmi les souches étudiées lors d'évaluation chez l'homme, la capacité d'adhésion aux entérocytes a été montrée pour *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* 271, *L. plantarum* 299 et 299v, *L. acidophilus* LA-1 [25].

L'adhérence (capacité à adhérer aux cellules) de souches de *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus* GG, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei* et *L. salivarius* à du mucus intestinal a été étudiée chez quatre populations : nouveau-nés, nourrissons de 2 et 6 mois et adultes [71]. Les résultats figurent dans le tableau 11.

	Nouveau-nés	Nourrissons		Adultes
		2 mois	6 mois	
<i>B. lactis</i> Bb-12	26.3	23.2	26.9	29.8
<i>L. crispatus</i> Mu5	1.8	1.5	1.7	2.1
<i>L. crispatus</i> M247	6.2	6.7	7.2	10.4
LGG	45.3	45.7	44.1	46.0
<i>L. johnsonii</i> LJ-1	9.6	9.4	11.8	14.4
<i>L. paracasei</i> F19	6.6	6.0	6.2	9.7
<i>L. salivarius</i> LM2-118	4.6	2.5	3.7	7.7

Tableau 11 : Pourcentage d'adhésion de 7 souches bactériennes à du mucus humain [70]

En observant les résultats, on peut faire deux remarques :

1. l'adhésion dépend de l'âge et de la souche
2. LGG et *B. lactis* adhèrent de façon plus importante au mucus que les autres souches.

* cf. définitions

Les différences concernant l'âge sont faibles mais reproductibles : toutes les souches adhèrent en plus grand nombre au mucus de l'adulte qu'à celui des nourrissons (l'immaturation de l'intestin chez les nourrissons pourrait être à l'origine d'un nombre plus faible de sites d'adhésion). L'importance des différences varie selon les souches : pour certaines, il sera important de cibler selon leur âge les patients auxquels les probiotiques seront administrés.

L'adhésion bactérienne est basée initialement sur des interactions physiques non spécifiques qui permettent ensuite des interactions spécifiques entre les adhésines bactériennes et des récepteurs complémentaires. Étant donné que le mucus intestinal est dégradé en permanence, si une bactérie adhère au mucus sans atteindre la surface de l'épithélium, elle sera malgré tout rapidement éliminée de la surface de la muqueuse avec les débris de mucines.

L'adhésion aux cellules intestinales est la première étape de la colonisation, même transitoire, par un probiotique mais elle n'y conduit pas forcément.

3. Colonisation de l'intestin par les probiotiques

La question de la colonisation de l'intestin par les probiotiques a longtemps été controversée : il est maintenant démontré que les probiotiques ne s'implantent pas ; ils sont éliminés avec les selles, parfois sans avoir adhéré ou s'être multipliés.

La colonisation durable de l'écosystème intestinal par un micro-organisme - qui correspond au maintien et au développement local de celui-ci sans qu'il soit nécessaire de le réintroduire régulièrement - est considérée comme impossible car la flore intestinale résidente est beaucoup plus abondante et sature les sites possibles d'adhésion.

Les probiotiques ne réussissent pas à persister durablement dans le tube digestif (l'établissement durable de probiotiques chez le prématuré est à l'étude), ils transitent dans le tube digestif sans le coloniser : leur persistance est plus ou moins longue, de 2 à 20 jours, et il est admis que l'effet probiotique aura d'autant plus de chance d'exister que la bactérie vivante persistera longtemps. Une consommation régulière des probiotiques semble donc indispensable pour obtenir un effet bénéfique persistant.

Gopal *et al.* ont comparé l'impact sur la flore intestinale de la consommation de *Bifidobacterium lactis* et de galacto-oligosaccharide, un composé connu pour stimuler la croissance des bifidobactéries [72]. Les volontaires ont consommé chaque jour pendant 4 semaines 250 ml soit d'un placebo, soit d'un lait supplémenté en *B. lactis* HN019 (3×10^{10} ufc/jour), soit d'un lait supplémenté en galacto-oligosaccharide (2.4 g/jour). Des analyses bactériologiques hebdomadaires ont été réalisées sur leurs selles 2 semaines avant le début du test puis pendant 8 semaines. Aucune modification dans la composition de la flore intestinale n'a été observée chez les sujets témoins consommant le lait seul. Des modifications identiques sont par contre observées chez les sujets recevant les laits supplémentés : une augmentation du nombre total de bifidobactéries et de lactobacilles dans les selles. Mais à l'arrêt de la consommation, le nombre de bifidobactéries et de lactobacilles redevient identique à celui observé avant le début du test.

Ainsi lors de l'administration d'une souche de *Bifidobacterium*, la concentration fécale est en adéquation avec les taux de survie dans le tube digestif mais lorsque l'administration est stoppée, la souche probiotique n'est plus retrouvée dans les fèces : pour obtenir un effet, les probiotiques doivent être ingérés en continu.

Mais récemment certaines études ont démontré que des souches de *L. plantarum* et *L. rhamnosus* pouvaient coloniser de manière prolongée la muqueuse jéjunale et/ou rectale de quelques individus [62]. Jusqu'à 11 jours après l'arrêt de l'administration de *L. plantarum* souche 299 et 299v, ces bactéries étaient retrouvées au niveau de la muqueuse jéjunale ou rectale de 11 individus sur 13 [21].

Même s'il a été conclu que les probiotiques peuvent survivre au passage à travers le tube digestif, le concept adhésion/colonisation doit encore être supporté par plus de preuves obtenues *in vivo*. Ce constat ne remet néanmoins pas en question les résultats obtenus lors de l'administration de probiotiques. L'identification des constituants actifs des micro-organismes est difficile et plutôt que de déterminer la nature exacte au plan biochimique et moléculaire, ce sont surtout les effets des probiotiques qui sont étudiés.

E. Effets biologiques

Dans le cadre des aliments fonctionnels, la communication par le biais d'allégations sur les produits contenant des probiotiques ne peut mentionner de propriétés préventives ou curatives à l'égard de maladies. Au mieux, les allégations relatives à la santé peuvent faire référence à des modifications biologiques ; les deux principales allégations figurant sur les aliments fonctionnels contenant des probiotiques sont relatives à l'équilibre de la flore intestinale et au renforcement des défenses naturelles de l'organisme.

Ce sont les bactéries appartenant aux lactobacilles et aux bifidobactéries qui font l'objet de la majorité des études concernant les probiotiques. Leurs effets y sont nombreux et variés mais les mécanismes souvent encore mal connus : les bifidobactéries exercent leur rôle bénéfique en améliorant la composition de la flore fécale, en protégeant l'organisme d'infections intestinales, en diminuant le pH intestinal, en diminuant la flore pathogène et putréfactive, en produisant des vitamines, en activant les fonctions intestinales, en améliorant la digestion et l'absorption des nutriments et en stimulant la réponse immunitaire... [73]

Pour apprécier les effets au niveau intestinal des aliments fonctionnels contenant des probiotiques, nous avons vu dans la première partie que différentes fonctions ont été choisies comme la formation des selles, la composition de la flore du côlon, le contrôle des fonctions immunitaires et le contrôle des produits de fermentation.

Plusieurs marqueurs ont été retenus tels que la consistance, le poids et la fréquence des selles, le temps de transit, la composition de la flore colique, son activité, et la production d'immunoglobuline A, de cytokines et d'AGCC (Acides Gras à Chaîne Courte).

Parmi tous les effets potentiellement attribués aux probiotiques, seuls quelques-uns ont réunis suffisamment de preuves pour être généralement acceptés. Nous allons voir les conditions nécessaires à l'évaluation de l'efficacité d'un probiotique.

1. Evaluation de l'efficacité des probiotiques

Différents types d'expérimentations sont possibles pour étudier les effets des probiotiques :

- des tests *in vitro* (modèles cellulaires, par exemple lignées Caco-2 et HT-29)
- des études *in vivo* :
 - chez l'animal (chez le rat et la souris)
 - chez l'homme.

Devant la complexité de la flore intestinale de l'homme, ses interactions avec l'organisme et son système immunitaire, les seuls modèles simplifiés tels que des lignées cellulaires ou des animaux apparaissent insuffisants.

Les études réalisées sur des animaux axéniques, chez lesquels une ou plusieurs bactéries sont introduites, posent problèmes en terme de représentativité de l'écosystème naturel :

1. une souche colonisera dans des proportions plus importantes un animal gnotobiotique qu'un animal à flore conventionnelle.
2. des différences physiologiques existent entre les animaux sans germe et conventionnels, notamment au niveau du péristaltisme intestinal.
3. dans un environnement conventionnel, la régulation de l'expression des gènes de l'hôte peut être contre balancé par d'autres espèces.

C'est pourquoi l'idée d'adopter une approche soustractive (animaux à flore conventionnelle moins certaines espèces bactériennes) plutôt qu'une approche additive (animal axénique plus des espèces bactériennes) serait intéressante [74].

Néanmoins, les modèles *in vitro* ou animaux restent très utiles pour déterminer la résistance à l'acidité et aux sécrétions biliaires, la production de substances anti-microbiennes, la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales, l'influence de régimes alimentaires sur la flore ou encore l'implication de celle-ci dans certaines pathologies comme par exemple les cancers colorectaux [30].

Les résultats d'expérimentations *in vitro* et *in vivo* chez l'animal constituent des axes de recherche permettant d'avancer des hypothèses sur les propriétés et les mécanismes d'action du produit testé. Ces résultats sont pris en compte dans l'évaluation scientifique mais ne sont

en aucun cas suffisants pour la justification scientifique des allégations se rapportant à l'homme.

La difficulté à établir les propriétés des probiotiques provient des modèles expérimentaux considérés mais aussi :

- de la diversité des micro-organismes : il est très difficile de généraliser quant à une action des probiotiques car chaque bactérie se caractérise par un genre, une espèce et une souche d'où découlent des habitats et activités métaboliques différents. Ainsi les effets d'une bactérie probiotique ne doivent être extrapolés à d'autres bactéries, même appartenant à la même espèce.
- des protocoles utilisés (taille de l'échantillon, durée de l'étude) : les effets sur la santé de l'homme doivent être établis après des études d'intervention chez l'homme ou de grandes études épidémiologiques. Pour être utilisées en tant que preuves réelles permettant de confirmer ou d'infirmer les allégations proposées, les études cliniques doivent être :
 - randomisées
 - conduites en double aveugle
 - réalisées versus placebo
 - menées sur des populations cibles (nourrissons et enfants en bas âge, étudiants, sportifs, personnes âgées...)
 - réalisées sur un nombre suffisant de sujets pour que les résultats puissent être statistiquement significatifs
 - dans des conditions proches des recommandations de consommation proposées par l'industriel.

Enfin, il est préférable que des résultats similaires soient obtenus par plusieurs centres indépendants.

- de l'effet étudié : par exemple, pour l'effet immunomodulateur, le type de réponse immune étudiée est important (intestinale ou systémique, cellulaire ou humorale, innée ou acquise) car les significations sont très différentes.

- des formes variées d'administration du probiotique : hors des quelques formes médicamenteuses, il peut être donné seul ou associé avec d'autres micro-organismes, sous forme d'additif, de complément alimentaire ou encore d'aliment. Pour certains aliments, il peut être difficile de différencier l'effet dû au probiotique de celui dû aux caractéristiques générales du produit : la nature des contrôles utilisés dans les études est alors primordiale. Il ne faut pas extrapoler les propriétés d'un aliment contenant un probiotique à un autre aliment contenant le même probiotique car la modification du « véhicule » peut influencer la fonctionnalité du probiotique. Dans le cas des produits laitiers fermentés par exemple, les métabolites issus de la fermentation pourront, eux aussi, avoir des activités immunomodulatrices.

En conclusion, la littérature concernant les probiotiques est importante mais le nombre d'études cliniques solides c'est-à-dire rigoureuses et non biaisées, est plus restreint.

En 2001, un groupe d'experts a été réuni à l'initiative de la FAO et de l'OMS [57] : 11 scientifiques provenant de 10 pays différents ont étudié les preuves scientifiques disponibles sur les propriétés, la fonctionnalité, les effets bénéfiques, la sécurité d'emploi et les caractéristiques nutritionnelles des aliments contenant des probiotiques. Etant donné qu'il n'existe alors pas de consensus international sur la méthodologie à utiliser pour évaluer l'efficacité et la sécurité d'emploi des probiotiques, le groupe souhaite rédiger des lignes directrices générales. Les recommandations émises dans le rapport publié à l'issue de la consultation sont les suivantes :

1. Les souches probiotiques potentielles doivent être nommées selon le Code International de la Nomenclature et identifiées par des méthodes utilisant des techniques moléculaires validées au niveau international. Les souches doivent être de préférence déposées dans une collection de renommée internationale.
2. Pour obtenir la dénomination « probiotique », le micro-organisme doit exercer des bénéfices sur la santé de l'hôte dans le produit qui sera réellement mis à la disposition du consommateur.
3. Les tests *in vitro* et *in vivo* doivent être perfectionnés afin de mieux prévoir si des micro-organismes probiotiques peuvent exercer une action chez l'homme.

4. Les données attestant de l'efficacité des probiotiques chez l'homme et statistiquement significatives doivent être plus nombreuses.
5. Des bonnes pratiques de fabrication doivent être appliquées (assurance qualité), les conditions de conservation doivent être déterminées ; l'étiquetage doit stipuler des allégations vérifiables et la dose journalière minimum pour observer les effets bénéfiques.
6. Le statut réglementaire des probiotiques en tant qu'ingrédient alimentaire doit être établi au niveau international.
7. Une structure régulatrice doit être créée : son but serait de s'occuper de toutes les questions relatives aux probiotiques (efficacité, sécurité, étiquetage, fraudes et allégations).
8. Les produits contenant des probiotiques et ayant des effets bénéfiques démontrés doivent être autorisés à décrire ces effets.
9. Des systèmes de surveillance, associant traçabilité et vigilance après la mise sur le marché, doivent être mis en place pour recueillir et analyser tout effet indésirable dû à un probiotique contenu dans un aliment. Ils nécessitent la participation des fabricants, des professionnels de santé et des responsables de la santé publique. Ces systèmes peuvent aussi être utilisés pour contrôler les effets bénéfiques à long terme des souches probiotiques.
10. Des efforts doivent être réalisés pour rendre les produits probiotiques plus largement disponibles, surtout pour les œuvres de secours et les populations à haut risque de morbidité et de mortalité.
11. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour déterminer des critères et des méthodologies relatifs aux probiotiques.

Les experts recommandent aussi qu'apparaissent sur l'étiquette :

1. le nom du probiotique, précisé jusqu'au niveau de la souche s'il y a eu sélection d'une souche particulière car les effets sont souche-dépendants.
2. la concentration minimale assurée pour chaque probiotique du produit jusqu'à la date limite de consommation. La viabilité et le maintien de l'activité des probiotiques au cours de la préparation, du traitement et du stockage du produit alimentaire sont primordiaux. Des programmes adéquats d'assurance qualité doivent être mis en place pour vérifier ces deux points jusqu'à la fin de la vie du produit.

2. Effets des probiotiques

Les effets bénéfiques potentiels sur la santé des probiotiques sont très nombreux et appartiennent à des domaines très variés :

1. les troubles gastro-intestinaux : prévention de diarrhées bactériennes et virales, infections à *Helicobacter pylori* et ses complications, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et le syndrome de l'intestin irritable, la constipation
2. l'immunité muqueuse
3. les allergies
4. les maladies cardio-vasculaires : les lactobacilles et leurs métabolites pourraient avoir un effet bénéfique sur le cœur utile dans la prévention et le traitement de syndromes ischémiques ou la diminution du cholestérol sérique [57]
5. les infections uro-génitales : vaginose bactérienne, mycose vaginale, infections urinaires. L'administration orale de *Lactobacillus acidophilus* et de yaourt a été utilisée pour prévenir et traiter les candidoses vaginales sans que des preuves de son efficacité n'aient été publiées. Actuellement les études associent l'administration orale et vaginale de souches de *Lactobacillus* pour restaurer une flore vaginale où les lactobacilles dominant et diminuer le risque d'infections urinaires récidivantes [57].
6. l'absorption des minéraux et leur métabolisme. Après avoir administré un lait fermenté par *Lactobacillus* à des femmes ménopausées, des chercheurs finlandais ont observé versus placebo une augmentation du taux de calcium dans le sang et, le plus important, de sa fixation au niveau de l'os [75]. Ce probiotique aux effets positifs sur le métabolisme calcique et osseux pourrait être utilisé dans la prévention de l'ostéoporose chez les femmes ménopausées.

Il est important de distinguer parmi toutes les propriétés et les effets des probiotiques mentionnés :

- ceux qui peuvent faire l'objet d'allégations pour des aliments fonctionnels d'une part
- ceux qui, bien que montrés, ne peuvent être revendiqués de façon directe par le biais d'allégations.

Les effets les mieux documentés chez l'homme sont [4, 16]:

- une diminution de l'incidence, de la sévérité ou de la durée d'infections gastro-intestinales : diarrhées associées aux antibiotiques (*Clostridium difficile*), aux infections à Rotavirus, consécutives à une chimiothérapie et la diarrhée du voyageur. Ceci n'est pas traité ici car il s'agit alors plutôt du versant médicamenteux des probiotiques.
- une diminution des symptômes de malabsorption du lactose
- une stimulation du système immunitaire (immunité humorale et cellulaire)
- une diminution des manifestations de l'eczéma atopique
- une diminution de la concentration en métabolites toxiques (par exemple : ammonium, amines hétérocycliques) et en enzymes procancérogènes (β -glucuronidase, nitroréductase, azoréductase) dans le côlon.

Les effets probables sont :

- une diminution des infections à *Helicobacter pylori*
- une régulation de la motilité intestinale : soulagement de la constipation et du syndrome de l'intestin irritable
- la prévention de l'ostéoporose par des effets bénéfiques sur le métabolisme minéral (densité de l'os et stabilité)
- la prévention du cancer : chez des animaux traités par des carcinogènes, ils sont capables de diminuer l'incidence des lésions précancéreuses mais il reste encore à le démontrer chez l'homme.
- un effet adjuvant immun
- la prévention de l'athérosclérose : diminution des triglycérides plasmatiques et du cholestérol avec augmentation du ratio HDL/LDL
- la prophylaxie d'infections uro-génitales : candidoses vaginales et infections urinaires
- une valeur nutritionnelle augmentée : meilleure digestibilité, absorption améliorée de minéraux et vitamines
- une croissance favorisée (seulement observé chez les jeunes rats).

Prenons l'exemple d'une des bactéries lactiques les plus étudiées et dont la souche est taxonomiquement bien définie : *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) [25]. Des études ont montrées qu'elle :

1. diminue l'activité des β -glucuronidase, nitroréductase et hydrolases fécales et aurait des effets préventifs sur le cancer
2. diminue la durée de diarrhée à rotavirus
3. est efficace dans la prévention et le traitement des diarrhées chez le prématuré, le nouveau-né, l'enfant et le voyageur
4. est efficace contre les infections intestinales à *Clostridium difficile*
5. est sûre lors de l'administration chez l'homme.

Les mécanismes d'action des probiotiques ne sont pas bien connus mais deux remarques s'imposent :

- Les nombreux effets ne peuvent être expliqués par un unique mécanisme : le mécanisme d'action peut être une complexe combinaison d'événements. Il peut impliquer la production d'enzyme(s) spécifique(s), de métabolites qui agissent directement sur les micro-organismes mais le probiotique peut aussi « pousser » l'organisme de l'hôte à produire lui-même cet action bénéfique.
- Selon les micro-organismes, ces mécanismes peuvent varier même si différents moyens peuvent concourir au même effet bénéfique.

3. Effets sur la flore endogène – équilibre de la flore colique

Il est difficile d'évaluer l'impact des probiotiques sur l'écosystème microbien du tube digestif car il reste d'importantes lacunes à combler dans la connaissance des groupes bactériens qui le constituent. Avec le développement des techniques de biologie moléculaire, les scientifiques se sont rendu compte de deux choses : la proportion de bactéries non cultivables est très importante et la majorité des espèces composant la flore ne sont même pas répertoriées dans les collections actuelles de souches.

Le niveau de population à partir duquel une bactérie non pathogène peut influencer la physiologie de l'hôte dépend de la bactérie et de l'effet. Les points de vue divergent sur l'estimation de ce niveau mais il semble qu'en dessous de 10^8 ufc/g les effets métaboliques soient minimes.

Etant donné que la microflore intestinale d'un individu est remarquablement stable dans le temps : il paraît alors difficile de pouvoir influencer sa composition. Néanmoins lors de l'administration de probiotiques, des changements dans le profil de la flore sont observés : ils sont mineurs mais, dans des situations pathologiques, peuvent suffire à influencer de façon bénéfique l'évolution de la maladie [70].

Au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle, les probiotiques peuvent aisément représenter une flore dominante et créer un effet barrière transitoire car les bactéries résidentes colonisent très peu ces régions (10^4 à 10^5 /g), alors que les probiotiques vont transiter en nombre parfois supérieur à 10^8 . Lors de diarrhées infectieuses (notamment à Rotavirus, *Shigella* spp., *Salmonella* spp. ou *Escherichia coli*) au cours desquelles les micro-organismes détruisent ou lèsent les cellules au niveau de l'intestin grêle, les probiotiques ont un grand intérêt dans cette partie de l'intestin.

La flore de l'intestin grêle, beaucoup moins importante, sera plus facilement influençable par des apports exogènes mais c'est l'action des probiotiques au niveau du côlon qui suscite le plus d'intérêt. Certains auteurs préconisent de privilégier les bifidobactéries au niveau colique car elles y sont l'espèce dominante. Dans cet organe, la modulation de la microflore pourrait être plus facilement obtenue par l'ingestion de probiotiques favorisant la production de métabolites antibactériens.

La physiologie intestinale est le principal élément qui peut être influencé par les probiotiques ; ils peuvent agir sur elle :

1. de façon directe
2. de façon indirecte par modification de l'écosystème ou du système immunitaire local.

Les probiotiques ont, au niveau intestinal, trois propriétés essentielles [73, 76] :

- protéger l'intestin vis-à-vis des micro-organismes pathogènes
 - ✓ inhibition de la croissance des pathogènes par :
 - compétition pour les nutriments
 - production de substances toxiques : H_2S , H_2O_2 , bactériocines (substances qui inhibent les bactéries pathogènes Gram + et Gram -)
 - diminution locale du pH (production d'acétate et de lactate) et du potentiel rédox
 - ✓ compétition pour les sites d'adhésion à la muqueuse

- stimuler l'immunité intestinale et générale

- entretenir de la fonction digestive intestinale :
 - ✓ régénération cellulaire accélérée des cellules de la muqueuse
 - ✓ motilité intestinale améliorée
 - ✓ production d'enzymes digestives et de vitamines du groupe B (la synthèse bactérienne de vitamines n'est prouvée *in vivo* que pour la vitamine K)
 - ✓ détoxification de l'ammoniac et d'amines potentiellement toxiques.

Dans la plupart des cas, l'administration de probiotiques provoque [70] :

- une augmentation de la population de bifidobactéries et lactobacilles
- une diminution des concentrations des bactéries anaérobies Gram négatif, des entérobactéries et des clostridies réductrices de sulfites [21]
- une diminution du pH fécal
- une diminution de l'activité enzymatique fécale d'enzymes associées au développement de cancers coliques (β glucuronidase, azoréductase, nitroréductase) ou la diminution de la production d'acides biliaires secondaires.

La figure 7 montre les différents mécanismes d'action des probiotiques sur la composition et la physiologie de la flore intestinale [76].

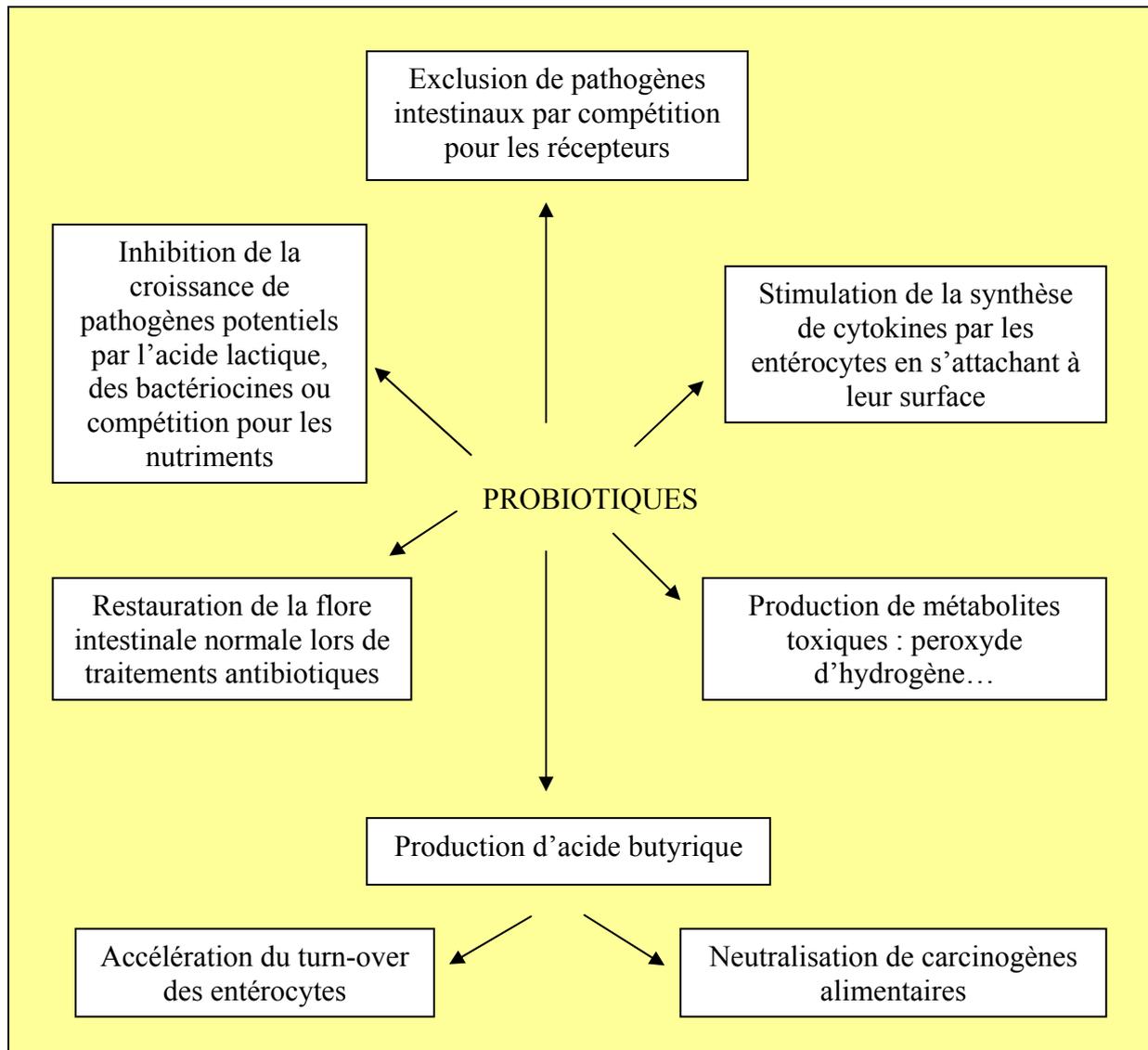


Figure 7 : Mécanismes d'action des probiotiques au niveau intestinal [76]

❖ Exclusion de pathogènes intestinaux par compétition pour les récepteurs

L'effet bénéfique des probiotiques serait dû en partie à leur capacité à interférer avec l'adhésion des micro-organismes sur les cellules intestinales et donc à contrôler le développement de micro-organismes potentiellement pathogènes : au niveau intestinal, *Salmonella thyphimurium*, *Shigella*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* [25]. (Cette propriété serait aussi intéressante aussi au niveau urogénital avec *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides biviuis*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*.)

La compétition entre les probiotiques et les souches pathogènes dépend de leurs spécificités d'habitat car ce dernier diffère selon la souche :

- Certaines souches de *Lactobacillus plantarum* adhèrent à des glycoprotéines contenant du mannose qui ont été auparavant identifiées comme sites d'attache d'entérobactéries telles que *E. coli*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, ou encore *Vibrio cholerae* [25]. *In vitro*, *Lactobacillus plantarum* 299v et *Lactobacillus rhamnosus* GG augmentent l'expression de gènes de régulation des mucines sur des cellules HT-29 : cette propriété pourrait être à l'origine de la capacité des *Lactobacilli* d'empêcher l'adhésion d'*E. coli* entéropathogènes [50].
- Les bifidobactéries produisent en effet une protéine qui empêche l'adhésion d'*Escherichia coli* pathogènes.

Chez l'animal, certains probiotiques (par exemple *Lactobacillus rhamnosus* GG) peuvent aussi diminuer le risque de translocation de bactéries pathogènes.

Une étude souligne le rôle des probiotiques dans la neutralisation des toxines bactériennes plutôt que dans la prévention de la colonisation intestinale par des pathogènes [77]. Elle a été réalisée chez des personnes âgées recevant concomitamment des antibiotiques et des probiotiques : 2×10^{10} ufc de *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium bifidum*. Les paramètres étudiés sont la fréquence des épisodes diarrhéiques, la présence de *Clostridium difficile* (un agent pathogène responsable de troubles intestinaux sévères) et de ses toxines dans les selles. Entre le groupe recevant les probiotiques et le groupe témoin, le nombre de porteurs de *Clostridium difficile* est comparable mais :

1. la toxine bactérienne est décelée chez un nombre inférieur de personne dans le groupe recevant des probiotiques
2. la proportion de sujets développant une diarrhée et chez qui l'on décèle la toxine de *Clostridium difficile* y est significativement moins forte que dans le groupe placebo.

La consommation de ces probiotiques lors du traitement antibiotique préviendrait l'apparition de diarrhées liées à *C. difficile* : les patients paraissent porteurs asymptomatiques.

- ❖ Inhibition de la croissance de pathogènes potentiels par l'acide lactique, des bactériocines ou compétition pour les nutriments

Les bactéries lactiques sont capables de produire un certain nombre de métabolites capables d'inhiber la prolifération d'autres bactéries, voire de bactéries de la même espèce. Parmi ces substances, les bactéries lactiques produisent de l'acide lactique et d'autres acides organiques, du peroxyde d'hydrogène qui a un effet bactéricide sur la plupart des pathogènes, et de l'éthanol. Un nombre croissant de bactériocines est actuellement détecté et isolé. Une équipe de l'INRA a détecté la présence de 3 substances inhibitrices dans le surnageant de culture de *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* V111007 [78]: H₂O₂, une bactériocine-like et un autre facteur inhibant *in vitro* la croissance de *Streptococcus thermophilus*. Les effets inhibiteurs de ce probiotique semblent être suffisamment puissants *in vitro* pour influencer la compétition entre différentes souches *in vivo* et par conséquent moduler l'équilibre écologique de la flore intestinale.

- ❖ Production d'acide butyrique

La production d'acide butyrique par certains probiotiques augmente le turnover des entérocytes et neutralise l'activité de carcinogènes d'origine alimentaire tels que les nitrosamines (produit final de l'activité métabolique de la flore commensale en cas de régime riche en protéines). Cet acide gras a en effet un effet pro-différenciant, anti-prolifératif et anti-angiogénique sur les côlonocytes [30].

Par exemple, *L. plantarum* 299v augmente la concentration en acides gras à chaîne courte (principalement de l'acide acétique et de l'acide propionique) dans les fèces [21].

Cette modification peut être due à :

1. une modification dans la composition de la flore
2. une augmentation de la quantité de mucine et donc de la quantité de substances fermentescibles en AGCC. Cette souche a stimulé *in vitro* la production de mucine épithéliale.

Compte tenu des effets attribués aux probiotiques, le principal champ d'application est la gastro-entérologie. L'utilisation des probiotiques relève dans ce domaine beaucoup du médicament, donc sera plus rapidement abordé.

4. Applications en gastro-entérologie

De nombreuses propriétés ont été attribuées aux probiotiques dans le domaine de la gastro-entérologie mais là encore, la distinction entre l'action préventive des probiotiques via l'alimentation et le rôle curatif de probiotiques contenus dans des spécialités pharmaceutiques ayant une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) ou une ATU (Autorisation Temporaire d'Utilisation) doit être fait.

Au cours du symposium « probiotiques, prébiotiques et santé gastro-intestinale » de Dijon (2002), des tableaux récapitulatifs d'essais randomisés effectués en double aveugle contre un placebo dans les domaines de la gastro-entérologie ont été présentés par P. Marteau [79]. Ils figurent en annexe 4. Seul un nombre restreint de souches probiotiques s'est montré efficace lors d'essais cliniques randomisés versus placebo.

Un haut niveau de preuve a été atteint par certaines souches probiotiques dans les domaines [79]:

1. de l'intolérance au lactose
2. du raccourcissement ou la prévention de gastro-entérites aiguës
3. de la diarrhée associée aux antibiotiques
4. de la prévention de la rechute de maladies inflammatoires de l'intestin (pochite réfractaire, rectocolite hémorragique, maladie de Crohn).

Les deux derniers items relèvent de la thérapeutique et ne seront donc pas abordés.

❖ Digestion du lactose et autres effets enzymatiques directs

Le consensus est général pour cette propriété des probiotiques. De nombreux travaux ont montré la meilleure digestibilité du lactose du yaourt comparé à celle du lactose du lait ou de

yaourt pasteurisé. Les bactéries lactiques augmentent la digestion intestinale du lactose et éliminent ainsi les symptômes d'intolérance chez les patients souffrant de malabsorption primaire du lactose ou secondaire à une résection intestinale. Les produits laitiers fermentés par des bactéries lactiques constituent une alternative au lait intéressante chez ces personnes et doivent leur être conseillés pour assurer un apport calcique suffisant.

Cet effet est dû à deux mécanismes :

- un ralentissement de la vidange gastrique et un temps de transit intestinal du yaourt supérieur à celui du lait
- la digestion du lactose dans la lumière intestinale par la β galactosidase (lactase) d'origine bactérienne. La paroi et la membrane de ces bactéries sont facilement lysées par les acides biliaires et libère l'enzyme. Même si des effets sont observés avec des bactéries tuées par pasteurisation, la digestibilité observée du lactose est réduite, d'où l'importance que la souche soit vivante [80].

Le remplacement du lait par du yaourt :

- diminue la diarrhée et les symptômes d'intolérance chez les sujets intolérants au lactose, les enfants avec diarrhée et les sujets présentant un syndrome de l'intestin irritable
- permet ainsi un apport journalier suffisant en calcium chez les patients atteints de malabsorption. Cela concerne de 5 à 15% de la population européenne et nord-américaine mais de 50 à 100% des populations asiatique, africaine et sud-américaine.

Cependant certaines espèces de *Lactobacilli* ne fermentent pas le lactose : par exemple, LGG fermente le fructose essentiellement.

Il existe des préparations pour nourrissons ou de suite qui contiennent des probiotiques afin d'améliorer la digestibilité du lait. Par exemple, « le lait Gallia Digest Premium® 1^{er} âge est formulé pour répondre au développement progressif des fonctions digestives du nourrisson » et le 2^{ème} âge de la même gamme « permet de faciliter naturellement la digestion des tout-petits ».

Cependant, dans son rapport « Alimentation infantile et modification de la flore intestinale » de juin 2003, l'AFSSA conclut que, chez un nourrisson ne présentant pas d'intolérance au lactose, l'intérêt d'ajouter des probiotiques pour améliorer l'hydrolyse du lactose n'est pas démontré [31].

Selon le même principe :

- la levure *Saccharomyces cerevisiae* - contenant de la saccharase – pourrait être intéressante chez les enfants déficients en cette enzyme [81]. La digestion d'un autre disaccharide : le saccharose serait améliorée. Néanmoins son intérêt thérapeutique n'a pas encore été établi.
- Des travaux ont été menés sur une souche de *Lactococcus lactis* génétiquement modifiée pour produire une lipase. Elle pourrait avoir des effets bénéfiques sur la digestion des graisses en cas d'insuffisance pancréatique exocrine.

❖ Gastro-entérites

La diminution de la fréquence et de la durée des épisodes diarrhéiques est un des bienfaits qui pourraient être annoncés par les fabricants sur leurs aliments fonctionnels contenant des probiotiques, notamment des préparations pour nourrissons et préparations de suite. Cette propriété sera détaillée dans la partie consacrée aux intérêts nutritionnels des probiotiques.

La recherche explore aussi d'autres domaines tels que la prévention du cancer colique et le traitement des troubles fonctionnels intestinaux [79].

❖ Probiotiques et cancers coliques

Il s'agit d'un domaine beaucoup plus spéculatif qui ne peut être mis en avant par le biais d'allégations par les industriels car, si la prévention des cancers coliques est une piste possible d'emploi des probiotiques présents dans les aliments fonctionnels, c'est aussi l'effet le plus controversé des probiotiques. Il n'existe aucune preuve de l'effet protecteur ou préventif des probiotiques chez l'homme mais de nombreuses observations chez l'animal suggèrent un effet bénéfique potentiel dans les cancers du côlon. Des conseils de consommation de probiotiques dans le but de prévenir les cancers coliques ne pourront intervenir que lorsque le niveau de preuves sera suffisant et dans le cadre de conseils nutritionnels de prévention plus généraux.

Le cancer colorectal est l'un des premiers en terme de morbidité et de mortalité dans les pays occidentaux. Il affecte un Français sur 25. Son caractère héréditaire possible est bien établi.

Cependant des facteurs environnementaux tels que l'alimentation jouent un rôle majeur dans le développement des formes sporadiques. Un régime alimentaire riche en lipides et une consommation importante de viande rouge sont associés à un risque élevé de cancer colique par exemple. En effet, un régime riche en graisse et en viande mais pauvre en légumes augmente l'excrétion fécale de composés nitrosés génotoxiques promoteurs de cancers coliques. Lors de la cuisson de la viande, des amines hétérocycliques aromatiques carcinogènes se forment. Au contraire, une consommation importante de fruits et légumes, de céréales complètes, de poisson et de calcium est associé à un risque plus faible.

Certains composés dits promoteurs ne sont pas génotoxiques mais vont favoriser la croissance de tumeurs en augmentant la prolifération cellulaire par cytotoxicité ou irritation de la muqueuse. C'est le cas des acides biliaires secondaires présents en quantité importante lors d'un régime riche en graisses.

Ces facteurs génétiques et alimentaires interviennent en partie dans les réactions prenant place dans le côlon. Les effets de l'alimentation seraient dus à des changements de l'activité métabolique et de la composition de la microflore colique.

Le rôle des probiotiques dans la prévention des cancers ne serait pas dû qu'au rôle qu'ils jouent dans l'exclusion d'espèces pathogènes mais aussi à leur présence intrinsèque car l'action anticancéreuse associerait différents mécanismes :

- la liaison et la dégradation de carcinogènes ou mutagènes
- des modifications quantitatives et/ou qualitatives de la flore intestinale
- des modifications des activités métaboliques de la flore
- des modifications physico-chimiques dans le côlon
- la stimulation des réponses immunitaires.

L'administration orale de bactéries lactiques chez des rats - *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *L. confusus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve* et *B. longum* - diminue significativement les dommages causés par des carcinogènes d'origine chimique à l'ADN au niveau du mucus stomacal et gastrique [82]. Ces effets anti-génotoxiques ne sont retrouvées qu'avec des souches vivantes et donc métaboliquement actives.

Les probiotiques ont montré leur effet préventif des cancers coliques chez l'animal mais leur rôle dans la réduction du risque de cancer du côlon chez l'homme n'est pas établi [83]. Cependant, des probiotiques appartenant aux lactobacilles et aux bifidobactéries (*L.*

acidophilus, *B. bifidum*, *L. delbrueckii*, *S. thermophilus*) ont montré chez l'homme une diminution de l'activité fécale d'enzymes microbiennes produisant des composés génotoxiques initiateurs de tumeurs : la β -glucuronidase, la β -glucosidase, la nitroréductase et l'uréase [84].

Dans une étude chez l'homme, un risque élevé de cancer du côlon était associé à la présence de *Bacteroides vulgatus* et *B. stercoris*. Un faible risque était associé à la présence de *Lactobacillus acidophilus* et *Eubacterium aerofaciens*. Certains micro-organismes intestinaux vont en effet augmenter les dommages causés à l'ADN par ces molécules alors que d'autres bactéries peuvent diminuer leur toxicité en les dégradant ou en s'y liant : les bactéries des genres *Bacteroides* et *Clostridium* augmentent l'incidence et la croissance des tumeurs coliques induites chez l'animal alors que les genres *Bacillus* et *Bifidobacterium* préviennent la tumorigénèse [85].

Des études *in vitro* montrent la capacité de bactéries lactiques - certains *Lactobacilli*, *Bifidobacteria*, *S. thermophilus*, *L. lactis* et *E. faecalis* - à se lier à des composés mutagènes formés durant la cuisson de composés riches en protéines. Ces liaisons dépendent plus des substances chimiques que des souches bactériennes et les bactéries tuées ont le même effet que les vivantes dans ce cas-là.

Mais cette constatation ne peut être extrapolée car on ne connaît pas la réversibilité de cette liaison *in vivo*.

Enfin, l'acide butyrique produit lors du métabolisme bactérien a une action trophique sur la muqueuse colique mais il est aussi un facteur de différenciation cellulaire : il favoriserait les réparations, stabiliserait les mitoses et constituerait un agent inducteur d'apoptose.

❖ Probiotiques et troubles fonctionnels intestinaux

Le syndrome de l'intestin irritable ou colopathie fonctionnelle est une réaction motrice et/ou sensitive anormale au contenu colique et correspond à une association variable de troubles digestifs dépourvus de cause organique : douleurs abdominales, ballonnements, troubles du transit (constipation chronique). Il est plus fréquemment rencontré chez la femme.

Aucune recommandation clinique n'est possible car certaines études ont suggéré une efficacité partielle, par exemple dans la constipation, alors que d'autres travaux étaient négatifs.

En tant qu'aliments fonctionnels, les probiotiques peuvent donc avoir des applications en gastro-entérologie dans l'amélioration de l'intolérance au lactose, la prévention des diarrhées, les troubles fonctionnels intestinaux, ou la prévention des cancers colorectaux.

5. Stimulation de l'immunité

La difficulté à démontrer cette autre propriété des probiotiques est due au fait que certaines études montrent des améliorations de l'activité de certaines populations de cellules immunitaires par des tests *in vitro* sans déterminer si les modifications observées sont responsables d'un réel bénéfice au niveau clinique, en réduisant par exemple l'incidence et/ou de la sévérité des maladies.

Il est aussi délicat de tirer une conclusion générale des études réalisées car elles concernent des souches et des systèmes de tests très variés.

Le métabolisme bactérien conduit à des produits de fermentation pouvant avoir des effets directs sur l'immunité ou indirects via des modifications de la flore intestinale. Suivant la forme sous laquelle les probiotiques seront donnés, seuls ou associés aux produits de fermentation, les effets peuvent être différents. Il est ainsi très difficile de savoir, en nutrition, si un effet probiotique est seulement dû à la bactérie, à un effet synergique entre plusieurs probiotiques, ou à la bactérie et/ou ses produits de fermentation. Suivant la finalité du probiotique (médicament ou aliment), le mieux est de tester le produit tel qu'il sera commercialisé. L'importance des métabolites dans les effets immunomodulateurs pose aussi la question des bactéries vivantes ou mortes. Les bactéries mortes ne sont pas considérées comme probiotiques, mais il est impossible d'affirmer qu'elles ne peuvent pas avoir d'effets immunomodulateurs. On sait qu'il existe des composants immunomodulateurs dans la paroi des bactéries à Gram négatif (lipopolysaccharide ou LPS) et à Gram positif (peptidoglycane) qui ont des propriétés connues. Par ailleurs, des protéines ou peptides issus de processus

fermentaires, peuvent avoir des effets immunomodulateurs [86]. Dans ce cas encore, il est important de bien définir le paramètre immunitaire étudié. A l'heure actuelle, on peut honnêtement penser que des bactéries mortes, ou des produits de fermentation puissent être actifs sur certaines fonctions alors que, inversement, la bactérie vivante et physiologiquement active sera absolument nécessaire pour stimuler d'autres fonctions immunes. La compréhension à la fois de la physiologie bactérienne des probiotiques et des mécanismes immunomodulateurs impliqués est indispensable pour répondre à ces questions.

L'ingestion de différentes espèces d'un même genre bactérien n'a pas le même effet immunomodulateur. Cette différence pourrait s'expliquer par l'induction d'un profil de cytokines variable suivant l'espèce bactérienne avec, pour conséquence, une modulation différente des réponses immunes mesurées au niveau intestinal et systémique. Ces différences peuvent être associées aux souches elles-mêmes (parois, enzymes et métabolites bactériens...) ou à l'état de la flore intestinale résidente qui aura, ou non, déjà exprimé un effet immunomodulateur. Chez des souris gnotoxéniques ne différant que par l'espèce de *Bifidobacterium* colonisant le tube digestif, l'effet modulateur sur la réponse IgA anti-rotavirus n'est pas le même suivant les espèces, et l'équilibre bactérien présent dans le tube digestif va jouer un grand rôle dans l'expression d'un effet "probiotique". La variabilité interindividuelle de la stimulation immunitaire lors de la consommation d'un aliment fonctionnel peut être grande.

Il est important de déterminer les populations qui peuvent tirer un bénéfice de ces activités sur l'immunité de l'hôte : toute la population, les seules personnes en bonne santé ou uniquement celles qui sont malades ?

Deux populations apparaissent particulièrement intéressantes :

- les nouveaux-nés et les jeunes enfants, chez qui :

- Le nombre de cellules sécrétrices d'IgAs n'atteint le niveau d'un adulte que vers l'âge de deux ans.
- Les lymphocytes intra-épithéliaux sont peu nombreux.
- La tolérance orale ne s'établit qu'à partir d'un an.

- les personnes âgées de plus de 65 ans

Un déclin de l'immunité est observé lors du vieillissement mais celui-ci n'est pas significatif de 70 à 85 ans et ne le serait qu'à partir de 85 ans. Cependant, chez une personne âgée malnutrie ou dénutrie, le déficit immunitaire peut être important.

On observe chez la personne âgée une augmentation de la perméabilité intestinale, une diminution de la concentration en IgAs (par diminution du nombre de plasmocytes, de leur sécrétion d'IgAs ou de leur transfert à la surface de la muqueuse), une modification de l'activité des lymphocytes T.

La stimulation des réponses immunitaires humorales spécifiques et non spécifiques sont bien documentées pour, par exemple, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* et *Lactobacillus rhamnosus* GG [87].

In vitro, certaines souches probiotiques induisent la libération de cytokines pro-inflammatoires, de TNF α ou d'IL-6, caractéristiques de la réponse immunitaire non spécifique ; La phagocytose est aussi stimulée chez l'homme par les souches *L. acidophilus* La1 et LGG [87].

Les probiotiques administrés par voie orale peuvent augmenter la réponse IgA spécifiques chez des enfants infectés par un Rotavirus [88]. La co-administration de *L. casei* au vaccin oral contre le rotavirus permet une réponse augmentée des cellules sécrétant des IgM spécifiques de ce virus.

La figure 8 montre les mécanismes présumés mis en jeu dans l'immunomodulation par les probiotiques [76].

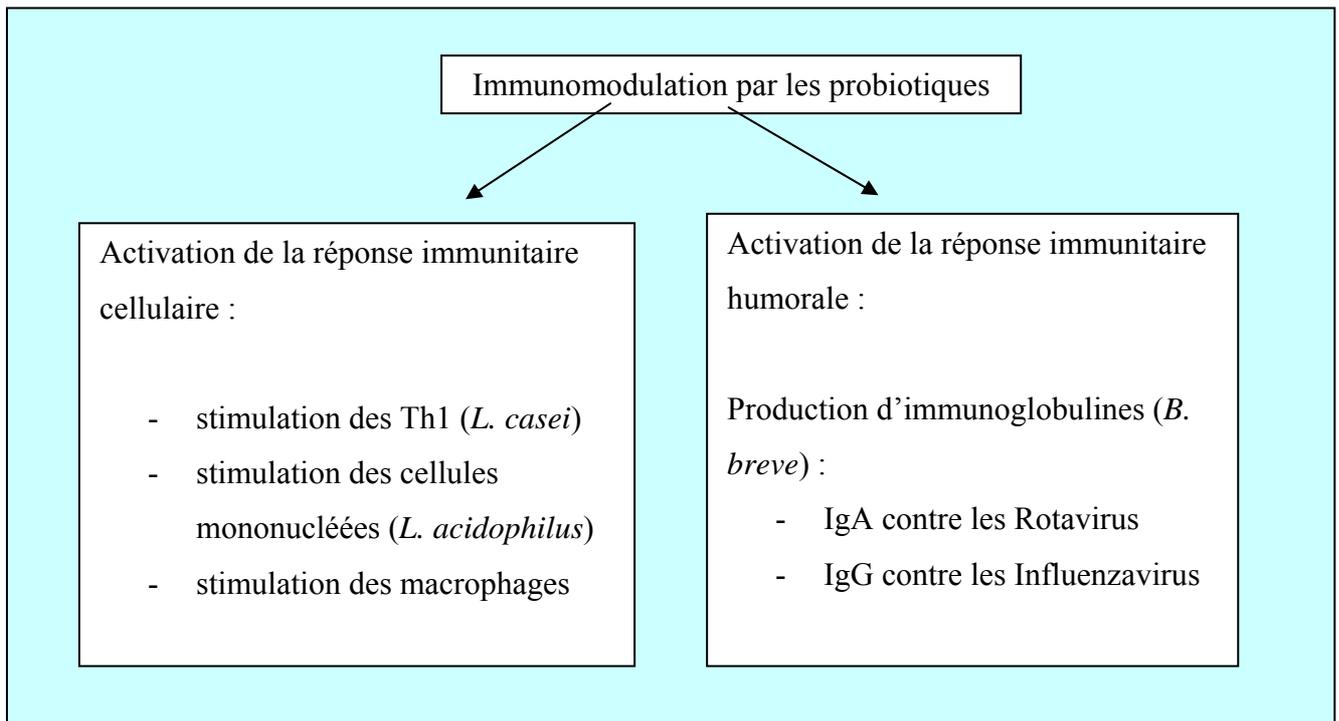


Figure 8 : Mécanismes immunomodulateurs présumés de différentes souches probiotiques [76]

Plus spécifiquement, le rôle des lactobacilles commence à être bien connu. De nombreuses études *in vitro*, synthétisées par O. Vaarala [89], indiquent qu'ils interviennent sur de nombreux acteurs du système immunitaire :

- les macrophages, les cellules dendritiques et les cytokines de l'immunité non spécifique sont orientés vers des réponses de type Th1, anti-allergiques
- les phagocytes sont stimulés
- les sécrétions d'anticorps, par exemple après une vaccination orale, sont augmentées par les lactobacilles
- les réponses lymphocytaires T sont modulées dans un sens d'atténuation des réponses Th2.

Au total, la flore digestive et notamment les lactobacilles sont de puissants et nécessaires immunorégulateurs. Bien qu'il reste encore un certain nombre d'inconnues, toutes ces études fournissent une explication rationnelle à l'effet clinique démontré des lactobacilles.

Cependant, les nombreuses propriétés des probiotiques n'ont pas toutes le même intérêt selon le point de vue thérapeutique et l'utilisation de ces micro-organismes en tant que médicament ou le point de vue de la nutrition et les bénéfices dans le cadre d'une consommation alimentaire : concernant l'immunité, il convient de bien différencier les groupes pouvant tirer un bénéfice de cet effet du reste de la population chez laquelle des tentatives de « sur » stimulation n'aurait aucun intérêt.

II. Probiotiques et prévention nutritionnelle

L'essor récent du concept d'aliments fonctionnels et une meilleure connaissance des relations mutuelles entre la flore intestinale et l'hôte qui l'héberge ont fortement relancé l'intérêt porté aux probiotiques. Les produits apparus sur le marché de l'agro-alimentaire depuis une dizaine d'années revendiquent des effets bénéfiques sur :

- l'équilibre ou le bon fonctionnement de la flore intestinale
- le renforcement de la barrière intestinale
- la régulation du système immunitaire intestinal.

Par exemple, Bio[®] « contribue à l'équilibre de notre flore intestinale »,

Yoplait Renforce[®] « aide notre corps et notre flore intestinale » et « renforce la barrière intestinale »

Actimel[®] « agit sur les trois niveaux de défenses de l'intestin » [*la flore, la paroi et le système immunitaire*] et « participe à renforcer les défenses naturelles de l'organisme ».

Beaucoup de produits contenant des probiotiques sont utilisés par des consommateurs qui se considèrent en bonne santé et supposent que ces produits peuvent les aider à préserver leur santé, leur bien-être et potentiellement réduire le risque à long terme de maladies intestinales, rénales, respiratoires ou cardiaques. Des études multi-centriques - randomisées notamment sur la base de l'âge, du sexe, de l'ethnie, des apports alimentaires, de l'éducation, du statut socio-économique – sont souhaitables pour déterminer si la prise régulière de probiotiques a un intérêt chez des hommes, femmes et enfants en bonne santé. La consommation de

probiotiques par des sujets *a priori* sains ne peut remplacer un style de vie sain associé à une alimentation équilibrée et une activité physique régulière.

Les experts de l'AFSSA sont de plus en plus sollicités pour évaluer la véracité d'allégations relatives aux aliments contenant des probiotiques. En novembre 2003, des lignes directrices pour l'évaluation de préparations pour nourrissons et de suite contenant des probiotiques et/ou des prébiotiques ont été publiées [31] et en février 2005, un deuxième rapport avait pour but d'évaluer les effets des probiotiques et des prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'adulte [62].

Il existe 3 grandes populations cibles des aliments fonctionnels contenant des probiotiques :

- le nourrisson et le jeune enfant

Les préparations lactées et préparations de suite contenant des ingrédients à visée probiotiques veulent atteindre un objectif : se rapprocher le plus possible des propriétés fonctionnelles du lait maternel et favoriser un profil bactérien proche de celui des nourrissons allaités au sein.

- l'homme adulte sain

Des modifications répétées de l'équilibre bactérien intestinal peuvent conduire, à court ou long terme, à une rupture de l'homéostasie avec déséquilibre immunitaire et apparitions de pathologies infectieuses, inflammatoires ou allergiques. La prise régulière de probiotiques, en empêchant la rupture de cet équilibre, participerait au maintien du "bien-être".

- Personnes âgées

Compte tenu du rôle des bifidobactéries sur l'organisme et de leur diminution chez les personnes âgées, ce groupe peut être une cible intéressante pour les probiotiques mais très peu d'études existent quant à l'effet des probiotiques dans cette tranche d'âge.

Les mentions figurant sur l'étiquetage des produits contenant des probiotiques ou la communication qui est faite autour de leur commercialisation retiennent toute l'attention.

Le tableau 12 présente de façon non exhaustive quelques produits contenant des probiotiques et les allégations mentionnées sur leurs emballages.

Aliment fonctionnel	Allégation(s)
<p>Actimel[®] de Danone[®] Lait fermenté au <i>L. casei</i> defensis</p> 	<p>Actimel[®] participe à renforcer les défenses naturelles de l'organisme dans le cadre d'une consommation quotidienne. Actimel[®] agit sur les trois niveaux de défense de l'intestin.</p>
<p>Yoplait Renforce[®] de Yoplait[®] Lait fermenté au Bifidus lactis</p> 	<p>Le Bifidus lactis renforce la flore intestinale En complément d'une hygiène de vie saine, le Bifidus lactis de Yoplait Renforce[®], par son action dans l'intestin, renforce la barrière intestinale.</p>
<p>Bio[®] de Danone[®] Lait fermenté au Bifidus actif essensis</p> 	<p>Un ferment naturel [...] qui, consommé quotidiennement, contribue à l'équilibre de notre flore intestinale et aide à réguler le transit dès 15 jours.</p>
<p>B'A[®]</p> 	<p>Une gamme de produits au bifidus actif qui participe à une bonne assimilation des nutriments par votre flore intestinale et qui, jour après jour, revitalise votre organisme.</p>
<p>Déli up[®] de Délisse[®] (magasins Leclerc[®]) Lait fermenté au <i>L. casei</i> actif</p> 	<p>Un ferment lactique spécifique, le <i>L. casei</i>, qui participe à l'équilibre de la flore intestinale.</p>

<p>Lactus à boire de Carrefour®</p> 	<p>Des ferments lactiques « probiotiques », les <i>Lactobacillus casei</i>, qui permettent de rééquilibrer une flore intestinale perturbée par les désagréments de la vie agitée que nous menons. C'est par leur action positive sur certaines bactéries au niveau de l'intestin qu'ils agissent de façon bénéfique sur notre organisme.</p>
---	---

Tableau 12 : Exemples d'aliments fonctionnels contenant des probiotiques et leurs allégations

Les étiquettes mentionnent des allégations santé et, souvent aussi, de longues années de recherche : par exemple « 15 ans d'études cliniques » sur la bouteille Yoplait Renforce® ou « scientifiquement prouvé » pour Actimel® et son ferment *L.Casei* Defensis qui est présenté comme ayant fait l'objet de « plus de 10 ans de recherche » par le groupe Danone®.

Nous avons vu dans le paragraphe sur les effets que de nombreux critères sont nécessaires pour qu'une étude soit considérée comme consistante du point de vue justificatif des propriétés et bénéfices apportés. Les premières recherches sur les souches probiotiques utilisées dans les produits ont certes débutées il y a longtemps mais les expérimentations réalisées sur le produit fini réellement consommé par l'acheteur sont souvent moins anciennes.

L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) est régulièrement saisie par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes pour évaluer la sécurité d'emploi de produits contenant des probiotiques ou évaluer le fondement scientifique des allégations relatives à ces produits. Le Comité d'experts spécialisé « Nutrition humaine » est consulté. Souvent les résultats des études présentées ne permettent pas de justifier tous les effets allégués chez l'homme.

Le principal argument santé affiché par les aliments fonctionnels contenant des probiotiques est de contribuer à renforcer les défenses naturelles de l'organisme. Ils permettraient de réhabiliter la flore intestinale et de retrouver vitalité.

A. « Aidons nos défenses naturelles »

Certains aliments fonctionnels contenant des probiotiques revendiquent une action sur le système immunitaire et les défenses naturelles de l'intestin. Les allégations figurant sur ces produits sont alors des allégations relatives à la santé telles que « participe à renforcer les défenses naturelles de l'organisme » (Actimel® ou Gallia Calisma®).

Certes, des effets des probiotiques sur des facteurs du système immunitaire ont été démontrés mais une question subsiste : augmentent-ils vraiment la résistance de l'hôte en réduisant, par exemple, le nombre de pathologies hivernales ou en luttant contre la baisse des défenses lorsque l'organisme est soumis à un stress ?

❖ Stimulation de l'immunité chez les seniors

Une étude réalisée en 2003 a cherché à évaluer l'impact de la consommation du lait fermenté Actimel® sur les infections hivernales d'origine virale chez le sujet âgé [90].

Commercialisé par Danone®, il s'agit du produit obtenu par fermentation du lait par les deux souches bactériennes utilisées dans la fabrication des yaourts : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*, auxquelles est ajoutée une autre souche bactérienne originale : *Lactobacillus casei* DN-114 001. Ces trois souches utilisées ont toutes le statut de GRAS (Generally Recognised As Safe).

Les 360 volontaires âgés de 60 à 70 ans ont été répartis en 2 groupes : certains ont consommé quotidiennement 300 ml d'Actimel® pendant 3 semaines, les autres n'ont reçu aucun produit. Chez les sujets consommant le lait fermenté, la durée des pathologies hivernales (syndrome grippal ou gastro-intestinal, broncho-pneumopathie bactérienne, infections ORL) est significativement réduite - d'environ 20% - par rapport au groupe témoin mais l'incidence des infections n'a pas été modifiée.

Une étude à plus grande échelle permettrait d'étayer les résultats obtenus.

Il convient de noter que [69] :

- l'essai a été réalisé avec des quantités de lait fermenté très importante : 300 ml correspondent à 3 doses d'Actimel® telles qu'elles sont présentées dans le commerce.

- pendant l'étude, 82 % des sujets étaient vaccinés contre la grippe et l'effet significatif du produit sur la durée des pathologies disparaît lorsque l'on considère les sous-populations vaccinées et non vaccinées.

❖ Baisse des défenses immunitaires dues à un stress

Les situations de stress sont souvent accompagnées d'une diminution des défenses immunitaires et donc d'une susceptibilité accrue aux infections. Des chercheurs ont étudié l'influence de la prise d'Actimel® sur différents paramètres immunitaires chez des étudiants lors des examens [91].

Pendant 6 semaines (3 avant les examens et pendant), les étudiants ont consommé chaque jour 200 ml de lait écrémé (groupe témoin) ou 200 ml d'Actimel® contenant 2×10^9 ufc de *Lactobacillus bulgaricus*, 2×10^{10} ufc de *Streptococcus thermophilus* et 2×10^{10} ufc de *Lactobacillus casei* DN-114 001.

Les marqueurs de stress (anxiété et taux de cortisol) étaient équivalents dans les deux groupes mais une modulation de la réponse immunitaire a été observée dans le groupe consommant Actimel®.

Marqueurs de l'immunité utilisés	Groupe Actimel®	Groupe témoin
Lymphocytes	↗	↘
Cellules CD56 (cellules T cytotoxiques et Natural Killers)	↘	=

Tableau 13 : Evolution du nombre de lymphocytes et de cellules CD56 après 6 semaines de prise d'Actimel® ou d'un placebo en période de stress [91]

La consommation de ce lait fermenté permettrait de prévenir les altérations induites par le stress sur certains marqueurs de l'immunité mais ce sont les conséquences cliniques, en terme d'infections et de résistance, plus que des paramètres qui devraient être étudiés.

Concernant Actimel®, l'aliment fonctionnel contenant des probiotiques sûrement le plus connu en France, l'AFSSA a conclu que [69]:

L'ensemble des résultats d'études *in vitro* et *in vivo* présentés permet de montrer que la souche *Lactobacillus casei* DN-114 001 a des effets sur la flore intestinale, les cellules épithéliales et sur quelques paramètres du système immunitaire muqueux et intestinal mais les résultats des études disponibles ne permettent pas de démontrer tous les effets allégués du produit chez l'homme. En effet, malgré un faisceau d'arguments apporté par les résultats parcellaires des études cliniques réalisées chez l'adulte et les personnes âgées et par les résultats relatifs à l'effet du produit sur la sévérité et l'incidence des diarrhées des nourrissons et enfants en bas âge, l'absence de concordance des conclusions de ces dernières études ne permet pas d'assurer que ces effets peuvent être aujourd'hui considérés comme vérifiés.

Même lorsque des études sont réalisées chez l'homme, il est très important de noter le fait que la quantité recommandée (100 mL/j) et les doses proposées dans les études cliniques (chez l'homme adulte ou l'enfant) ne sont pas comparables : la quantité consommée est 2 à 5 fois supérieure dans les études.

En conclusion l'AFSSA a considéré que les 9 allégations « aide votre barrière intestinale à se renforcer », « aide à la régulation du système immunitaire », « contribue au bon fonctionnement du système immunitaire », « aide à renforcer le système immunitaire intestinal », « aide le corps à bien se défendre », « contribue à rendre le corps plus résistant », « aide à protéger votre corps », « aide votre intestin à repousser certaines bactéries indésirables », « aide votre corps à lutter contre certaines agressions du quotidien » ne sont en l'état pas acceptables car elles sont soit non justifiées scientifiquement, soit imprécises (par exemple, les termes « certaines » et « agressions du quotidien » peuvent être un obstacle à la bonne compréhension de ces messages). L'allégation « participe à renforcer les défenses naturelles de l'organisme » est justifiée et préférée à « aide à renforcer les défenses naturelles ».

L'AFSSA a aussi émis quelques recommandations:

1. Il conviendrait de mentionner sur l'étiquetage que « l'effet bénéfique attendu n'est scientifiquement prouvé que pendant la prise du produit et cesse très vite dès son arrêt ».
2. Sur certains documents de présentation du produit, la mention « convient à partir de 3 ans » apparaît alors que les études cliniques effectuées sur les jeunes enfants concernent des enfants de moins de 3 ans. Si l'industriel souhaite positionner son produit avant cet âge, des études complémentaires seront nécessaires.

3. Il serait judicieux de définir, pour chaque catégorie de population, les doses optimales permettant d'observer les effets annoncés par l'allégation.

Devant le succès d'Actimel[®], d'autres industriels ont mis sur le marché des laits fermentés contenant la même espèce bactérienne qu'Actimel[®] et mettent en avant la présence de *L. casei* dans leurs produits. Le consommateur peut espérer obtenir les effets vantés par Actimel[®] mais étant donné le caractère souche-dépendant des effets probiotiques, rien n'est sûr.

En 2004, une entreprise agro-alimentaire concurrente : Yoplait[®] a mis sur le marché sous le nom de « Yoplait Renforce[®] » un lait fermenté sucré contenant les ferments lactiques du yaourt (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) associés à un probiotique *Bifidobacterium lactis* souche Bb12. La concentration moyenne de la souche *B. lactis* Bb12 est de 5×10^7 ufc/g de produit fini à la fin de la durée de vie du produit. C'est un produit destiné aux enfants de plus de 3 ans et aux adultes. Il ne se présente pas en dose individuelle mais sous la forme d'une bouteille de 730 mL (770g) car sa particularité est de recommander des volumes d'emploi différents selon le consommateur. Les quantités de consommation proposées sur l'étiquetage sont les suivantes :

- 100 mL pour l'adulte
- 150 mL pour l'enfant
- 200 mL pour la femme enceinte et l'adolescent.

Remarque : le produit préconise des quantités journalières en millilitres mais gradue sa bouteille en grammes !

L'allégation revendiquée est « aide à renforcer les défenses naturelles ». Sur la bouteille apparaît « le *B. lactis* renforce la flore intestinale » et au dos apparaît la mention « 15 ans d'études cliniques ».

La DGCCRF a demandé à l'AFSSA d'évaluer le fondement scientifique des allégations relatives à ce lait fermenté, notamment au regard des quantités recommandées sur l'étiquetage [92]. Lors de la réunion du Comité d'experts spécialisé « Nutrition humaine », aucune étude clinique n'avait été réalisée avec le produit. Certes de nombreuses études en présence de la souche *B. lactis* Bb12 ont été réalisées mais soit :

1. avec des matrices alimentaires différentes (lait infantile, capsules)
2. dans des populations non ciblées par le produit (populations d'âge inférieur à 3 ans)

3. avec les ferments du produit non associés (*B. lactis* Bb12 seule ou en association avec l'un ou l'autre des ferments du yaourt) ou en association avec d'autres ferments non présents dans le produit (autres probiotiques).

Dans son avis rendu le 16 décembre 2004, « l'AFSSA estime que le fondement scientifique des allégations n'est pas justifié en l'absence d'études réalisées avec le produit sur la population cible et qu'aucune justification n'est fournie sur les différentes doses recommandées pour la population cible ».

Le fabricant n'a pour l'instant pas modifié son étiquette et en août 2005, les « quantités indicatives de Yoplait Renforce[®] adaptées aux besoins nutritionnels de chacun » figurent encore sur le produit. On peut aussi lire sur l'étiquette : « parce que nous avons tous les mêmes besoins mais en quantités différentes, avec Yoplait Renforce[®], chacun peut se servir dans un verre la quantité qui lui convient ». La mise sur le marché de ce produit symbolise très bien la problématique des aliments fonctionnels contenant des probiotiques.

B. Probiotiques et alimentation infantile

Dès 1952, Robinson et Thompson ont étudié l'effet d'une supplémentation par *Lactobacillus acidophilus* de l'alimentation de nouveaux-nés nourris au lait maternisé. Actuellement, l'inclusion de probiotiques dans l'alimentation du nourrisson et du jeune enfant suscite un grand intérêt. Les principaux agents probiotiques utilisés en alimentation infantile appartiennent aux genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et sont inclus dans des préparations pour nourrissons ou des préparations de suite.

Le tableau 14 donne quelques exemples de ces produits.

Produit	Allégation
<p>Lait Gallia Calisma® 1^{er} âge</p> 	<p>Un lait infantile élaboré à partir de 2 ferments lactiques naturels rigoureusement sélectionnés par la recherche Gallia® pour leur action sur l'équilibre de la flore intestinale du bébé.</p>
<p>Lait Gallia Calisma® 2^{ème} âge</p> 	<p>Favorise l'équilibre de la flore intestinale du bébé et participe ainsi à renforcer les défenses naturelles de son organisme.</p>
<p>Lait Gallia Digest Premium® 1^{er} âge</p> 	<p>Formulé pour répondre au développement progressif des fonctions digestives du nourrisson.</p>
<p>Lait Gallia Digest Premium® 2^{ème} âge</p>	<p>Permet de faciliter naturellement la digestion des tout-petits.</p>
<p>Lait Guigoz Transit® 2^{ème} âge au bifidus actif</p>	<p>Lait de suite acidifié à partir de ferments lactiques et contenant du bifidus qui participe au bon fonctionnement du système digestif du bébé.</p>

Tableau 14 : Exemples d'aliments contenant des probiotiques destinés au nourrisson

Se rapprocher le plus possible du lait maternel et favoriser un profil bactérien proche de celui des nourrissons allaités au sein est l'objectif n°1 de ces produits pour :

- apporter des solutions simples au traitement et/ou à la prévention des infections gastro-intestinales, fréquentes lors de la petite enfance
- prévenir l'apparition d'allergies.

Enfin, une population cible un peu à part fait l'objet d'études : les prématurés.

1. Prévention de la diarrhée et réduction de la sévérité des épisodes diarrhéiques

Un des premiers domaines de recherche sur les probiotiques en pédiatrie a été le traitement et la prévention des diarrhées.

Etant donné que chez les sujets nourris au sein, les bifidobactéries et les lactobacilles prédominent et que ces enfants sont moins sensibles aux infections gastro-intestinales que ceux recevant un lait infantile, une hypothèse a été formulée : la présence massive de bifidobactéries et de lactobacilles dans la flore intestinale du jeune enfant lui offre une meilleure protection contre ce type d'infections.

Ainsi, l'enrichissement de préparations pour nourrissons ou de préparations de suite avec des ingrédients à visée probiotique a pour but de se rapprocher de l'allaitement maternel et conférer aux nourrissons une protection contre les infections intestinales. Cette utilisation dans la prévention et la réduction de la sévérité des épisodes diarrhéiques se situe à la limite du médicament.

Les gastro-entérites qu'elles soient d'origine virale, bactérienne ou parasitaire, sont la cause principale de diarrhée aiguë et chez l'enfant, l'infection à rotavirus est l'étiologie la plus commune. Lors de cette infection, la muqueuse intestinale est en partie détruite, la composition de la flore modifiée et sa fonction protectrice alors réduite.

La capacité des souches à inhiber l'adhésion de divers pathogènes aux cellules intestinales épithéliales est un critère pour la prévention de la diarrhée afin de limiter l'invasion des cellules épithéliales son action a été renforcée par des agents antimicrobiens sécrétés par cette souche [93].

R. Young rapporte les études pédiatriques réalisées en double aveugle versus placebo ayant démontré l'efficacité des probiotiques [94] dans la diarrhée (Tableau 15).

Indications	Souches probiotiques
Traitement de la diarrhée aiguë	<i>Lactobacillus GG</i>
	<i>Lactobacillus reuteri</i>
	<i>Lactobacillus acidophilus Lb</i>
	<i>Saccharomyces boulardii</i>
	<i>Streptococcus thermophilus, L. acidophilus, L. bulgaricus</i>
Prévention de la diarrhée aiguë	<i>Lactobacillus GG</i>

Tableau 15 : Souches probiotiques dont des études pédiatriques réalisées en double aveugle, versus placebo ont démontré une efficacité [92]

Le traitement actuel de la diarrhée aiguë est basé sur l'administration de solutés de réhydratation mais ils n'ont aucune action sur la durée de la diarrhée. Des essais randomisés réalisés en double aveugle ont démontré que plusieurs probiotiques raccourcissent significativement la durée de la diarrhée au cours de gastro-entérites (notamment à rotavirus). Le tableau 16, issu d'un article de P. Marteau, récapitule des études ayant rapporté un effet statistiquement significatif des probiotiques sur la durée de gastro-entérites aiguës [79].

Situation clinique	Probiotique	Référence
Diarrhée à rotavirus	<i>L. rhamnosus GG</i>	Pediatrics, 1991, 88, 90-7
		Pediatrics Res, 1992, 32, 141-4
		J Ped Gastroenterol Nutr, 1995, 20, 333-8
		J Ped Gastroenterol Nutr, 1997, 25, 516-9
	<i>L. casei</i> Shirota	Jpn J Pediatr, 1994, 47, 2755-62
	<i>L. acidophilus</i> tuées par la chaleur	J Ped Gastroenterol Nutr, 2000, 30, 68-72
Gastroentérites	<i>L. rhamnosus GG</i>	Pediatr Infect Dis, 1995, 14, 107-11
		J Trop Ped, 1996, 42, 162-5
		J Ped Gastroenterol Nutr, 2000, 30, 214-6

	<i>E. faecium</i> SF68	Curr Ther Res, 1980, 28, 927-36
		Chemotherapy, 1981, 27, 466-70
		Scand J Gastroenterol, 1996, 31, 887-91
	<i>S. boulardii</i>	Ann Pediatr, 1985, 32, 1-3
	<i>L. reuteri</i>	J ped Gastroenterol Nutr, 1997, 24, 399-404
		Pediatr Infect Dis, 1997, 16, 1103-7
	Yaourt	J Ped Gastroenterol Nutr, 2001, 33, 307-13
	<i>L. reuteri</i> DSM12246 +	Pediatr Infect Dis J, 2002, 21, 417-9
	<i>L. rhamnosus</i> 19070-2	Pediatr Infect Dis J, 2002, 21, 411-6

Tableau 16 : Etudes randomisées contrôlées ayant rapporté un effet statistiquement significatif de probiotiques pour raccourcir la durée de gastro-entérites aiguës [78]

Les probiotiques sont surtout efficaces dans les diarrhées dues à une infection à rotavirus. Ils permettraient [87] :

- une stabilisation de la flore endogène
- une réduction de la période de dissémination du rotavirus
- un rétablissement de la perméabilité intestinale altérée lors d'une infection à rotavirus
- une stimulation du système immunitaire intestinal à l'origine d'une augmentation significative des cellules sécrétant des IgA anti-rotavirus (elles peuvent aussi avoir un effet préventif sur les diarrhées).

Une autre méta-analyse a été réalisée par l'équipe de Van Niel : celle-ci a uniquement considéré les probiotiques appartenant aux genre *Lactobacillus* chez les enfants atteints de diarrhées [95]. Neuf études correspondant à un niveau de preuve élevé (contrôlées, randomisées, réalisées versus placebo et en aveugle) ont été analysées. La réduction moyenne de la durée de la diarrhée est de 0.7 jours et la fréquence des selles au deuxième jour de traitement est réduite de 1.6 selles chez les enfants recevant *Lactobacillus* par rapport à ceux recevant le placebo. Elle conclue à une efficacité et une sécurité d'emploi de *Lactobacillus* dans le traitement de la diarrhée et souligne le faible coût des probiotiques en comparaison à des soins plus longs.

D'autres études randomisées et contrôlées ont recherché l'existence d'un effet préventif des probiotiques contre les diarrhées infectieuses chez des nourrissons en crèche ou hospitalisés

pour un autre motif : des résultats positifs ont été obtenus avec *Bifidobacterium bifidum* associé à *S. thermophilus*, *Lactobacillus* GG et *L. casei* DN 114 001. Le tableau 17 donne les résultats de ces études [79].

Probiotique	Effet	Référence
<i>B. bifidum</i> + <i>S. thermophilus</i>	7 vs 31% de diarrhées nosocomiales	Lancet, 1994, 344, 1046-9
<i>L. rhamnosus</i> GG	6.7 vs 33% de diarrhées nosocomiales	J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1997, 25, 516-9
<i>L. rhamnosus</i> GG	5.2 vs 6.02 épisodes de diarrhées/12 mois	J Pediatr, 1999, 134, 15-20
<i>L. casei</i> DN-114 001	23.4 vs 26.4% de diarrhées sur 6 mois : NON significatif	Int J Clin Pract, 1999, 53, 179-84
<i>L. casei</i> DN-114 001	15.9 vs 22% de diarrhées sur 6 mois	Int J Clin Pract, 2000, 54, 568-71

Tableau 17 : Etudes randomisées contrôlées de probiotiques pour prévenir des gastro-entérites aiguës chez des nourrissons ou enfants [79]

Dans le premier essai cité, *B. bifidum* et *S. thermophilus* ont été administrées pendant 17 mois à des enfants hospitalisés en services de long séjour [96]. 31% des patients du groupe contrôle et seulement 7% dans le groupe supplémenté ont développé une diarrhée aiguë. De plus, 39% des sujets contrôles et seulement 10% des sujets supplémentés ont présenté des rotavirus dans leurs selles. C'est la première fois qu'un effet préventif lors d'une épidémie diarrhéique était montré.

Deux études ont été menées sur *L. casei* souche DN-114 001 : la première n'a pas révélé de différence significative pour l'incidence des gastro-entérites mais leur sévérité était diminuée dans le groupe d'enfants recevant le probiotique. La deuxième étude a montré une réduction significative de la fréquence des diarrhées.

Ces résultats ont été confirmés en 2004 par une étude française [97].

Cette étude concernait 90 enfants de moins de 8 mois. Ils ont reçu pendant 4 mois soit un lait infantile standard, soit un lait acidifié (par fermentation de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* avant lyophilisation) et additionné de *Bifidobacterium lactis* Bb12 (1×10^6 ufg/g de poudre soit 1.5×10^5 ufc/ml de lait reconstitué). Les enfants ayant reçu le lait

contenant le probiotique ont moins souffert de diarrhées que les enfants témoins (28.3% vs 38.7%) et les épisodes de diarrhées étaient plus courts (1.15 ± 2.5 jours vs 2.3 ± 4.5 jours). Les chercheurs ont estimé que la consommation du lait infantile contenant le probiotique diminuait le risque d'apparition de diarrhée d'un facteur 1,9.

Les laboratoires Gallia[®] ont alors mis au point le lait Calisma[®] qui est fermenté par *Bifidobacterium breve* C50 et *Streptococcus thermophilus* 065 (inactivées après la fermentation). Ce lait a été administré en double aveugle versus placebo (un lait infantile standard à la composition nutritionnelle identique) à des nourrissons en bonne santé pendant 3 mois. La fréquence, la durée et la sévérité des épisodes diarrhéiques ont ensuite été étudiées. Parmi ces marqueurs, seule la sévérité de la diarrhée était significativement diminuée chez les enfants consommant le lait Calisma[®] : moins de cas de déshydratation, de consultations médicales, de prescription de solutés de réhydratation ou de changement de lait [98]. Etant donné le problème récurrent que sont les diarrhées chez le nourrisson, la consommation de ce lait fermenté peut être bénéfique, mais il faut bien noter que les bactéries ont été ici inactivées.

Les preuves les plus fortes d'un effet bénéfique de probiotiques sur la prévention et le traitement de la diarrhée aiguë (surtout due au rotavirus chez l'enfant) ont été établies pour les souches *Lactobacillus rhamnosus* GG et *Bifidobacterium lactis* Bb-12 [57].

Deux cas sont particulièrement adaptés à l'utilisation préventive des probiotiques :

- les enfants fréquemment hospitalisés [99]
- les pays en développement où les conséquences de la diarrhée peuvent être graves [95] : peu coûteux, les probiotiques auraient un énorme potentiel dans la prévention et le traitement de diarrhées dans des régions socialement défavorisées où surviennent plus facilement des endémies voire épidémies infectieuses.

La consommation de probiotiques par des nourrissons et des enfants en bas âge est donc surtout intéressante pour diminuer la sévérité et la durée des épisodes diarrhéiques et alors éviter le risque de complications dues à une déshydratation.

2. Probiotiques et atopie

Le second axe de recherche en pédiatrie est la stimulation du système immunitaire et la prévention des manifestations atopiques : l'atopie est une tendance individuelle ou familiale à développer des immunoglobulines IgE spécifiques lors de l'exposition à des allergènes environnementaux. Elle se présente sous diverses formes : eczéma, rhinite, asthme...

La prévalence de cette maladie chronique a beaucoup augmenté dans les pays développés ces 40 dernières années et on constate que plus les pays sont développés et plus la fréquence de l'atopie est importante.

La théorie hygiéniste de l'atopie s'est développée : la baisse de l'exposition aux micro-organismes lors de la petite enfance pourrait être responsable d'un retard de maturation du système immunitaire intestinal, lui-même suspecté dans l'augmentation des allergies. Dès la naissance, les nouveau-nés vivent dans un milieu « aseptisé » : hygiène plus importante lors des accouchements, séjours en soins intensifs plus nombreux. Ensuite, interviennent les vaccinations, la répétition des traitements antibiotiques, une hygiène accrue, une famille réduite. Aussi, une exposition à des niveaux élevés d'antigènes pendant les tous premiers mois de la vie pourrait prédisposer les individus à une sensibilité allergique.

Des études épidémiologiques et cliniques suggèrent que les probiotiques jouent un rôle dans la prévention primaire des manifestations atopiques.

Actuellement les allégations des préparations pour nourrisson ou de suite ne revendiquent qu'une action sur la flore intestinale ou le renforcement des défenses immunitaires du bébé (par exemple Gallia Calisma[®]) sans mentionner un rôle préventif probable dans l'apparition de manifestations atopiques : ceci est dû aux limites réglementaires imposées aux allégations des aliments fonctionnels.

La flore intestinale a une composition différente chez des enfants atopiques et des enfants sains [31]. Chez les enfants ayant développé des manifestations allergiques, il existe au niveau du côlon un déséquilibre entre les bactéries bénéfiques et celles potentiellement nuisibles : l'intestin était moins souvent colonisé par des entérocoques au premier mois et par des bifidobactéries durant la première année. De plus, le genre *Clostridium* est plus largement présent à 3 mois.

La proportion de clostridies étant plus élevée et celle des bifidobactéries tendant à être plus basse, il en résulte une diminution significative du rapport bifidobactéries/clostridies chez les enfants atopiques en comparaison aux non-atopiques.

Dans une autre étude, les enfants atopiques avaient une flore totale à un plus faible niveau et étaient colonisés moins fréquemment par des espèces Gram positif dont le genre *Bifidobacterium*. En revanche, le niveau de *Bacteroides* était supérieur. Après le sevrage, une diminution des *Bacteroides* et *Bifidobacterium* a été observée chez les atopiques ainsi qu'une diminution totale de la flore chez les enfants sains [100]. A l'âge de deux ans, la flore des enfants allergiques est moins riche en lactobacilles et bactéries anaérobies mais enrichie en bactéries aérobies tels que les coliformes et *Staphylococcus aureus* [51].

Donc, chez les enfants atopiques, les clostridies et les bactéries du genre *Bacteroides* semblent être plus nombreuses. Or certaines souches d'*E. coli*, *Bacteroides* ou clostridies [101] peuvent entraîner une réponse inflammatoire ou sécréter des toxines : la muqueuse intestinale remplit moins bien son rôle de barrière du fait d'une augmentation de la perméabilité intestinale [102], le transport des antigènes à travers la barrière épithéliale de l'intestin est augmenté et donc aussi l'exposition à des allergènes potentiels.

La composante héréditaire dans le développement des maladies atopiques est importante mais n'explique pas la récente augmentation de ces pathologies dans les pays occidentaux. Parmi les mesures préventives déjà étudiées, seul l'allaitement au sein est actuellement recommandé pour son effet bénéfique. L'utilisation des probiotiques pourrait être un autre moyen de prévention des maladies atopiques. Ceci est basé sur l'hypothèse épidémiologique que le profil bactérien de la flore intestinale est déterminant dans le développement des allergies, en particulier de l'atopie.

Une équipe finlandaise de l'université de Turku a cherché à démontrer le bénéfice de l'ingestion de probiotiques pour prévenir ou traiter l'eczéma atopique. Kirjavainen *et al.* ont étudié la flore de nourrissons atopiques avant et après le sevrage [101]. Les enfants recevaient un lait infantile avec des protéines de lait hydrolysées et un placebo ou une supplémentation en *Bifidobacterium lactis* Bb-12 (8×10^{10} ufc/kg/jour). Dans le groupe placebo, le genre

Bacteroides augmente et *E. coli* chez 4 des 6 enfants. Dans le groupe *B. lactis* Bb-12, le nombre de *Bacteroides* diminue chez 4 des 7 enfants et celui des *E. coli* chez tous.

Les chercheurs ont observé que la concentration sérique d'IgE était corrélée au nombre d'*E. coli* et de *Bacteroides* chez des enfants atopiques, intolérants à une préparation aux protéines lactées hydrolysées, et que la supplémentation de l'aliment avec *Bifidobacterium lactis* Bb-12 diminuait le nombre d'*E. coli* et ralentissait le développement des *Bacteroides* lors de la diversification alimentaire : l'effet bénéfique des bifidobactéries dans l'eczéma atopique et les bienfaits de l'allaitement maternel chez des enfants à haut risque serait lié au fait que ces bactéries empêchent l'augmentation des *Bacteroides* et d'*E. coli*. Il reste à confirmer le lien entre la présence de ces bactéries et une prédisposition à l'atopie ; les auteurs relèvent en effet le fait que certaines études montrent que l'administration d'une souche non pathogène d'*E. coli* diminue le risque de développer des allergies.

Certaines données suggèrent que si la composition de la flore est anormale, par exemple un nombre inadéquat de bifidobactéries, le système immunitaire peut être privé de signaux régulateurs des lymphocytes Th2 et des réponses allergiques.

Le bon fonctionnement de la réponse immune est très important chez le nouveau né qui est physiologiquement "immunodéprimé" et beaucoup plus sujet aux infections entérales et à l'allergie alimentaire que l'adulte.

Son système immature implique [51] :

- une perméabilité accrue aux macromolécules et allergènes potentiels
- une absence de tolérance orale
- une faible production d'immunoglobulines IgA
- un profil cytokinique immature plutôt orienté en faveur des Th2 car pour éviter un rejet du fœtus pendant la grossesse, la population Th2 prédomine chez la mère et le fœtus : le nouveau-né est donc orienté vers une réponse allergique.

Chez les nourrissons non atopiques, une diminution des cytokines de type Th2 est progressivement observée alors que chez les allergiques, c'est l'inverse et ils sont déficitaires en IFN γ .

Administrer des micro-organismes exogènes pour moduler la flore endogène et réorienter l'immunité intestinale vers un profil Th1 est une idée séduisante et à la base du développement des probiotiques dans les préparations pour nourrissons ou préparations de suite.

La flore intestinale peut lutter contre les allergies en modulant la réponse Th1/ Th2 :

- en induisant une réponse de type Th1 anti-inflammatoire grâce à la production d'IL-12 et d'IFN γ
- en stimulant la synthèse de cytokines anti-inflammatoires comme le TGF β et l'IL-10 qui suppriment l'inflammation allergique induite par les Th2 et favorise la tolérance orale
- en favorisant une réponse immunitaire de type IgA.

In vitro, *Lactobacillus rhamnosus* GG induit la sécrétion par les cellules mononucléées à la fois de cytokines à effet pro-inflammatoire : IL-6, IL-12, IFN γ , TNF α et des cytokines à effet anti-inflammatoire comme l'IL-10. L'interleukine 10 est une cytokine intéressante dans l'atopie parce qu'elle exerce un effet immunosuppresseur complexe, qui passe notamment par une diminution de la production d'IgE.

Une équipe finlandaise a cherché à déterminer si *Lactobacillus rhamnosus* GG pouvait générer la synthèse de cytokines immunosuppressives chez des enfants atopiques [103].

Le but de cette étude était de déterminer si une supplémentation en probiotiques agissait sur un certain nombre de paramètres immunologiques, dont l'IL-10. Neuf enfants, âgés de 7 à 42 mois présentant une dermatite atopique et une allergie au lait de vache, ont reçu chaque jour pendant 4 semaines 2×10^{10} ufc de *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) par voie orale. Bien qu'il s'agisse d'un petit nombre d'enfants et que les résultats soient assez dispersés, une augmentation transitoire de l'IL-10 dans le sérum des enfants traités a été observée, cette augmentation était relativement tardive mais précédée d'une augmentation de la production d'IL-10 par les cellules mononucléées en culture. Cette étude *in vivo* confirme que les lactobacilles induisent des modifications immunologiques dans un sens anti-inflammatoire, et anti-allergique.

L'équipe de Pohjavuori a aussi étudié l'influence de l'administration de *Lactobacillus* GG chez des enfants souffrant d'allergie au lait de vache [104]. La bactérie a été responsable

d'une augmentation de la production d'IFN γ . Cette orientation vers un profil Th1 pourrait être bénéfique à la maturation du système immunitaire chez des nourrissons allergiques.

Une équipe tchèque s'est intéressée à la stimulation de la production d'IgA sécrétoires par les probiotiques et a analysé les conséquences de l'administration de *E. coli* O83 à des nouveau-nés en mesurant la production d'immunoglobulines dans la salive et en évaluant la fréquence d'apparition d'allergies à l'âge de 10 et 20 ans. *E. coli* a été choisie car c'est une des premières souches colonisant le système gastro-intestinal du nouveau-né.

Dans la première étude [105], 40 enfants âgés de 5 jours et suivis jusqu'à l'âge de 6 mois ont été répartis suivant leur mode d'alimentation (au sein ou lait infantile). Dans chaque groupe, la moitié a reçu une suspension d'*E. coli* O83 par voie orale pendant 4 semaines. Cette colonisation a été initiée à différents âges. Les taux d'IgA et d'IgM ont été mesurés pendant 25 semaines.

De manière générale, les taux d'IgA et d'IgM sont plus élevés chez les enfants nourris au sein par rapport à ceux nourris au lait infantile, les IgM apparaissent avant les IgA et les niveaux de ces deux immunoglobulines diminuent dès le sevrage.

Chez les enfants nourris au sein, la colonisation par *E. coli* (effectuée à la 3^{ème} semaine) a stimulé la production d'IgA en comparaison aux témoins n'ayant pas reçu *E. coli*. Mais à la 13^{ème} semaine, le taux d'IgA est plus bas chez ces enfants que chez les témoins.

Chez les enfants nourris au lait infantile, la colonisation par *E. coli* induit une augmentation des IgA mais aucune modification des taux d'IgM n'a été constatée. La plus forte stimulation de la sécrétion d'IgA est observée chez les enfants colonisés par *E. coli* entre la 9^{ème} et la 11^{ème} semaine en comparaison avec ceux colonisés entre la 5^{ème} et la 9^{ème} semaine.

Dans la seconde étude [106], l'équipe a évalué l'incidence des allergies et des infections à répétition chez des sujets ayant été colonisés à la naissance par la même souche d'*E. coli*. Deux groupes ont été constitués ; les enfants nés à terme et les enfants prématurés. La moitié des enfants de chaque groupe a reçu une suspension orale d'*E. coli*. 20 ans après la naissance pour les enfants nés à terme et 10 ans après pour les prématurés, des questionnaires ont été envoyés aux familles : les symptômes allergiques recensés concernent la rhinite, la conjonctivite, la bronchite, l'asthme et l'eczéma.

Le tableau 18 présente les résultats des questionnaires.

Groupes d'enfants		Nombre d'individus	Allergie	Infections à répétition
Nés à terme Résultats à 20 ans	Colonisés	150	16%	59%
	Témoins	144	32%	60%
Prématurés Résultats à 10 ans	Colonisés	77	12%	23%
	Témoins	55	33%	58%

Tableau 18 : Conséquences de la colonisation à la naissance par *E. coli* sur la fréquence d'apparition d'allergies et d'infections à répétition [104]

Dans les deux groupes, l'occurrence des allergies est plus faible chez les enfants colonisés par *E. coli* par rapport aux enfants témoins.

Chez les enfants prématurés, l'occurrence des infections à répétition est plus faible pour le groupe ayant été colonisé comparativement au groupe témoin mais chez les enfants nés à terme, la colonisation précoce par *E. coli* n'a pas eu d'influence sur les infections à répétition.

Les résultats de ces deux études semblent indiquer que la colonisation précoce de nouveaux-nés durant les premiers mois de la vie par *E. coli* O83 stimule le système immunitaire au niveau des muqueuses et la production d'immunoglobulines sécrétoires et diminue l'incidence des allergies chez ces enfants à l'âge de 10 et 20 ans. Mais le nombre d'individus est relativement faible et ne permet pas d'avancer une conclusion définitive.

Actuellement la prévention de l'atopie chez l'enfant est aussi étudiée lors de l'administration de probiotiques dès la grossesse.

Les premiers travaux convaincants ayant examiné les effets de la consommation de probiotiques pré- et postnatale sur la prévention des maladies atopiques ont été publiés dans le *Lancet* en 2001 : Kalliomäki *et al.* ont montré l'efficacité de *Lactobacillus* GG dans la prévention de l'eczéma durant les deux premières années de vie chez des enfants à haut risque [107].

Les études citées, randomisées et conduites en double aveugle versus placebo, concernent des familles atopiques où la mère, le père ou un enfant plus âgé de la fratrie souffrait ou avait des antécédents d'eczéma, rhinite ou conjonctivite allergique, asthme.

Lactobacillus rhamnosus souche GG (ATCC 53103) (2×10^{10} ufc) ou un placebo ont été administrés à 132 couples mère-enfant durant la période périnatale :

- à la mère de 14 à 28 jours avant la naissance
- puis pendant six mois après la naissance, à la mère ou à l'enfant selon le type d'allaitement (avec le même taux de *Lactobacillus* dans les fèces quelque soit le mode d'administration).

L'eczéma chronique, qui est le signe principal de l'atopie dans les premières années de vie, a été observé chez 35% des nourrissons à l'âge de deux ans, 1 nourrisson présentait une rhinite allergique, six de l'asthme.

La réactivité au prick test était plus fréquente et la concentration totale en IgE supérieure chez les enfants atopiques à 12 et 24 mois. Mais l'augmentation des IgE spécifiques était aussi fréquente chez les atopiques et les non atopiques. La même tendance était observée dans le groupe placebo ou le groupe probiotique.

L'administration de probiotique diminuait de moitié l'incidence de l'eczéma chronique à l'âge de 2 ans: la fréquence de l'eczéma dans le groupe recevant des probiotiques était de 23% (15/64) contre 46% (31/68) dans le groupe placebo. L'effet préventif ne dépend pas du mode d'administration du probiotique: dans le groupe *Lactobacillus*, 25% des nourrissons consommant directement le probiotique présentaient de l'eczéma contre 21% des nourrissons lorsque la mère allaitante recevait le probiotique.

Cet effet préventif des probiotiques dans l'atopie serait dû à :

- une diminution de la perméabilité intestinale exagérée retrouvée chez les enfants avec de l'eczéma ou des allergies alimentaire
- une stimulation de la réponse IgA spécifique au niveau intestinal, souvent déficitaire chez l'enfant allergique alimentaire
- un effet barrière renforcée de la muqueuse intestinale
- une microflore intestinale rééquilibrée (des modifications sont observées dans la flore d'atopiques).

Après arrêt du complément alimentaire, les chercheurs ont voulu étudier la persistance de l'effet préventif sur l'eczéma chez ces mêmes enfants [108] : 107 sur les 132 participèrent aux examens réalisés à l'âge de 2 et 4 ans.

Le tableau 19 présente, pour chaque groupe, le nombre d'enfants présentant des manifestations atopiques lors de l'examen réalisé à l'issue de 4 années [108]. La réactivité au prick test était la même dans les deux groupes.

Pathologies à l'âge de 4 ans	Groupe <i>Lactobacillus</i> n=53	Groupe placebo n=54
Eczéma	14	25
Rhinite allergique	10	5
Asthme	3	1

Tableau 19 : Manifestations atopiques observées à l'âge de 4 ans [106]

L'effet préventif de l'administration de *Lactobacillus* GG sur l'eczéma atopique chez les enfants à haut risque est donc prolongé jusqu'à l'âge de 4 ans mais aucune conclusion concernant les maladies respiratoires allergiques ne peut être faite car elles se manifestent typiquement plus tardivement. La concentration en oxyde nitrique exhalé a été mesurée et les concentrations sont supérieures dans le groupe placebo alors que le nombre de cas d'asthme et de rhinite n'était pas significativement différent entre les deux groupes.

62 femmes enceintes de l'étude finlandaise précédemment citée avaient été supplémentées en *Lactobacillus rhamnosus* souche GG durant les 4 semaines précédant la naissance puis lors de l'allaitement exclusif jusqu'à l'âge de 3 mois [109].

Partant du constat que *Lactobacillus* GG est capable d'augmenter la production de TGF β [110], le pouvoir immunoprotecteur du lait maternel a été étudié lors de l'administration de probiotiques chez la femme enceinte et allaitante.

Le TGF β est un facteur clé dans l'immunorégulation car il favorise la synthèse d'IgA et la tolérance orale. En période post-natale, sa production endogène est faible chez le nourrisson et le lait maternel constitue donc une source importante. Sa concentration dans le lait est corrélée avec la capacité du nourrisson à synthétiser des IgA spécifiques contre les antigènes alimentaires lors de l'alimentation exclusive au sein.

En analysant leurs données, les chercheurs ont étudié l'effet préventif de l'administration de probiotiques couplée à un allaitement maternel exclusif.

61% des nourrissons présentaient de l'eczéma pendant les deux premières années et chez 32%, il était chronique. Le risque de développer un eczéma chronique durant les deux premières années de vie était significativement réduit chez les nourrissons dont la mère avait

reçu le probiotique (15%) par rapport à ceux dont la mère prenait un placebo (47%). La même tendance était observée si les mères étaient atopiques ou non.

Les concentrations en IgE totales dans le sang de cordon et de TGF β_2 dans le lait ont été mesurées lors de l'étude.

La concentration en TGF β_2 dans le lait de mères recevant le probiotique était supérieure à celle du lait de mères recevant le placebo et cette augmentation était plus importante chez les enfants ayant des taux d'IgE dans le cordon élevés. Cependant aucune corrélation directe n'a été observée entre le taux de TGF β_2 ou le taux élevé d'IgE dans le sang de cordon et le développement ultérieur de l'atopie.

L'équipe danoise de Rosenfeldt a voulu évaluer l'effet sur la dermatite atopique de l'enfant de deux autres souches de *Lactobacilli* : *L. rhamnosus* 19070-2 et *L. reuteri* DSM 122460 [111]. Cette même équipe a démontré que l'administration de ces 2 souches permettait de réduire la perméabilité intestinale. Cette activité est intéressante chez les enfants atteints de dermatite atopique car leur muqueuse intestinale remplit moins bien son rôle de barrière du fait d'une augmentation de la perméabilité paracellulaire [102].

58 enfants âgés de 1 à 13 ans, présentant un eczéma modéré à sévère, ont été réparti en deux groupes : l'un consomme les deux probiotiques en quantité égale (2×10^{10} ufc/jour de chaque) pendant 6 semaines puis après 6 semaines d'arrêt, un placebo pendant 6 semaines ; le second groupe consomme le placebo avant les probiotiques. La sévérité de l'eczéma était évaluée par le score SCORAD (scoring atopic dermatitis) qui combine une estimation de l'étendue et de la sévérité des lésions eczémateuses à une évaluation subjective de la démangeaison. Une amélioration de l'eczéma était ressentie chez 56% des patients durant la prise de probiotiques et chez 15% lors de la prise du placebo. L'étendue de l'eczéma a aussi diminué mais l'index SCORAD total ne changeait pourtant pas de façon significative. L'efficacité de la prise de probiotiques a été plus importante chez les enfants souffrant aussi d'allergies (prick test cutané positif et niveau d'IgE augmenté).

On peut aussi souligner le fait que, dans cette étude, aucun changement significatif sur la production de cytokines (IL-2, IL-4, IL-10 ou IFN γ) n'a été constaté.

En conclusion, l'effet reste discret, une comparaison de groupes d'âges similaires aurait été plus appropriée et aucun élément sur la persistance des effets après l'arrêt des prises n'est donné.

Ainsi, la consommation de probiotiques, spécialement des souches appartenant au genre *Lactobacillus*, semble être efficace pour diminuer l'incidence et l'amplitude des manifestations de la dermatite atopique chez les enfants mais les mécanismes précis n'ont pas été élucidés ; ils seraient basés sur la capacité des lactobacilles à :

- diminuer la perméabilité intestinale
- stimuler la sécrétion d'IgAs spécifiques
- promouvoir l'effet de barrière de la muqueuse intestinale en restaurant une flore normale
- stimuler la production de TGF β , d'IL-10 et de cytokines qui stimulent la production d'IgE.

Selon les auteurs finlandais Kirjavainen et Isolauri, la colonisation précoce de l'intestin est cruciale pour la maturation du système immunitaire naïf car l'administration de probiotiques pourrait fournir un stimulus adéquat pour favoriser une maturation homogène, optimale et prévenir les maladies atopiques.

Toutes ces études sur la prévention de l'atopie par l'administration de probiotiques sont intéressantes dans le contexte actuel d'une augmentation de la prévalence des manifestations allergiques. Actuellement, seul un complément alimentaire existe sur le marché français ; il est vendu en pharmacie et communique sur sa capacité à « renforcer les défenses de l'organisme notamment en cas de terrain atopique » : il s'agit de Ditopy[®] des laboratoires Ducray[®]. Cette association de 2 probiotiques - *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus acidophilus* - se présente sous forme de sachets à conserver de préférence au frais puis à diluer dans de l'eau froide ou directement dans le biberon (après qu'il ait été chauffé). Pour améliorer le terrain atopique, il est recommandé de prendre 1 sachet par jour pendant 6 mois. Chez un enfant à risque, la consommation peut se faire durant les 6 premiers mois.

L'incorporation de probiotiques dans des aliments destinés à des nourrissons ou des enfants en bas âge dans le but de prévenir l'apparition de manifestations atopiques est séduisante. Comme pour chaque aliment fonctionnel, il est important de déterminer :

- quelle sera la population visée par le marketing et à qui ces produits apporteront-ils un réel bénéfice : les seuls enfants à haut risque, issus de familles atopiques ou l'ensemble des enfants en bas âge
- de connaître précisément les souches bactériennes les plus performantes dans ce domaine.

3. Probiotiques et prématurés

Chez des nouveau-nés prématurés hospitalisés en soins intensifs, le processus de colonisation bactérienne de l'intestin est différent des nourrissons nés à terme et en bonne santé : elle est retardée et ne se fait que par un nombre limité de bactéries qui auront tendance à être virulentes.

L'administration d'antibiotiques, les procédures de contrôle des infections telles que le lavage des mains, l'alimentation stérile et une exposition réduite à la flore maternelle contribuent à limiter l'exposition aux micro-organismes commensaux normaux et donc la colonisation intestinale par ces derniers.

L'intestin devient alors un réservoir de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques et de champignons qui peuvent être responsables d'infections systémiques chez le prématuré qui les héberge et chez d'autres patients de l'unité de soin. Une proportion importante de prématurés souffre de ces infections qui augmentent le risque de maladie pulmonaire chronique ou d'atteintes cérébrales. De plus, cette colonisation aberrante pourrait contribuer au développement de l'entéocolite nécrosante du nouveau-né* [112].

On retrouve dans la flore fécale des enfants prématurés hospitalisés des *Staphylococci*, des *Enterococci*, des entérobactéries parmi lesquelles *Klebsiella* ssp. Les anaérobies les plus rencontrés appartiennent au genre *Clostridium*. Des levures peuvent aussi être présentes en proportion importante.

La diversité est un élément important pour la stabilité de l'écosystème or chez le prématuré en soins intensifs, moins de vingt souches bactériennes sont dénombrées.

La prédominance de bifidobactéries dans l'intestin du nourrisson né à terme et en bonne santé est considérée comme bénéfique : l'administration de probiotiques chez les prématurés aurait pour but de favoriser la mise en place plus rapide d'une flore intestinale comparable afin de diminuer le risque d'infections.

Les effets bénéfiques potentiels de l'administration de probiotiques aux prématurés sont [112, 113] :

* cf. définitions (annexe 1)

1. un effet « barrière » de la muqueuse intestinale plus efficace vis-à-vis des bactéries et des produits bactériens
2. une stimulation des réponses immunitaires
3. une diminution de l'incidence des entérocolites nécrosantes avérées ou suspectées
4. une nutrition entérale améliorée donc une diminution de la nutrition par voie parentérale qui est un risque majeur d'infection bactérienne

La faible motilité intestinale et le manque de tolérance à la nutrition entérale des bébés de très faible poids (moins de 1 kg à la naissance) contraint souvent à adopter une alimentation parentérale presque exclusive. Toute stratégie qui permettrait d'avancer la phase de la nutrition entérale totale serait un avantage : l'utilisation de probiotiques pour promouvoir la tolérance alimentaire et réintroduire ainsi plus précocement des quantités croissantes de lait est donc à l'étude.

5. des modifications dans le processus de colonisation intestinale avec une diminution de la flore pathogène tels que les entérocoques et une augmentation de bactéries favorables telles que *Streptococcus salivarius*

Chez des enfants où la flore intestinale n'est pas encore établie, il est possible que les probiotiques soient les premiers colonisateurs et se maintiennent sur le long terme, même peut être toute la vie. La modification de la flore chez des bébés en bonne santé peut être discutée, l'utilisation des probiotiques chez des nourrissons prématurés de très faibles poids pour prévenir des maladies graves telles que l'entérocolite nécrosante ou des infections dues à leur hospitalisation en soins intensifs mérite d'être largement étudiée.

Améliorer la nutrition, diminuer l'incidence des sepsis et l'usage des antibiotiques, prévenir les entérocolites nécrosantes seraient les objectifs à court terme du choix d'un lait enrichi en probiotiques chez les prématurés. Les études réalisées jusqu'ici ont surtout concerné la colonisation potentielle de l'intestin par les probiotiques ; elles se tournent aujourd'hui vers le gain de poids, la tolérance alimentaire et les entérocolites nécrosantes.

La colonisation de l'intestin par les probiotiques est considérée comme impossible chez l'adulte qui possède une flore résidente installée. Chez les prématurés, cette hypothèse est étudiée : Kitajima a montré que l'implantation précoce de *Bifidobacterium breve* est possible par supplémentation précoce à des prématurés de très petit poids de naissance et cette colonisation améliore la croissance pondérale des premières semaines [114].

Bifidobacterium breve YIT4010 (BBG) a été administrée à raison de $0.5 \cdot 10^9$ ufc par jour pendant 28 jours à des enfants prématurés.

La souche BBG a été choisie car elle appartient à l'espèce de *Bifidobacterium* la plus communément retrouvée chez les enfants nourris au sein et la mieux connue. Son identification dans les selles a été réalisée en utilisant un anticorps spécifique qui réagissait avec seulement deux autres souches de *B. breve* mais avec aucune des espèces bactériennes suivantes : *B. adolescentis*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. animalis*, *Lactobacillus paracasei*, *L. acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *L. plantalum*, *Streptococcus thermophilus*, *S. salivarius*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides melaninogenicus* ou *E. coli*.

Les données ont été collectées chez 90 enfants de très faible poids de naissance : chaque jour pendant 28 jours puis une fois par semaine jusqu'à l'âge de 9 semaines ; 70 ont été suivis jusqu'à l'âge de 3 ans pour observer leur croissance.

Chez 10 enfants prématurés, le processus de colonisation de l'intestin durant les 8 premières semaines de vie a été étudié : aucune autre souche de *B. breve* que BBG n'a été isolée. Le groupe recevant BBG a été colonisé par cette bactérie avant les 2 premières semaines de vie alors que dans le groupe contrôle, la colonisation a lieu en plus de 4 semaines. Jusqu'à 3 semaines, le nombre de bifidobactéries est supérieur à celui des entérobactéries. Les entérobactéries ont une croissance plus rapide chez les enfants recevant BBG mais une fois que les enfants du groupe contrôle ont été colonisés par des entérobactéries, elles sont plus nombreuses chez eux.

Dans le groupe BBG, la croissance du genre *Enterococcus* était supprimée pendant les 4 premières semaines ; celle des espèces de *Lactobacillus* augmente rapidement à partir de la septième semaine. Les genres *Clostridium* et *Bacteroides* n'ont pas été isolés.

Aucune différence concernant les genres bactériens *Staphylococcus*, *Pseudomonas* n'a été observée.

Chez les 90 enfants, les taux de colonisation par *B. breve* était de seulement 12% à 2 semaines et 44% à 6 semaines dans le groupe contrôle et de 73% et de 91% chez les enfants recevant la bactérie (avec une colonisation plus lente chez les enfants dont la durée de gestation était inférieure à 26 semaines).

Ensuite, les taux de colonisation cumulés étaient, respectivement pour 23-25 semaines, 26-28 semaines et 29-33 semaines :

- 80% , 87% et 100% pour le groupe BBG
- 0% , 50% et 45% pour le groupe contrôle.

Les chercheurs concluent que *B. breve* peut coloniser efficacement l'intestin immature.

La bactérie est aussi associée à :

- un gain de poids supérieur entre la quatrième et la huitième semaine chez les enfants de très faible poids de naissance colonisés par *B. breve*. Cela semble persister jusqu'à 18 mois mais les résultats n'étaient pas significatifs.
- de moindres signes abdominaux. Cela est probablement dû à une stabilisation de leur flore intestinale et une alimentation accélérée.

L'administration précoce de *B. breve* améliore significativement le gain de poids et diminue le volume d'air dans l'estomac.

L'équipe d'Agarwal a posé la question de l'impact de *Lactobacillus* GG sur la mise en place de la flore intestinale chez le nouveau-né prématuré [113]. Cette étude randomisée a concerné 39 enfants de poids inférieur à 1.5 kg (groupe 1) et 32 de poids compris entre 1.5 et 2 kg (groupe 2). Le probiotique lyophilisé était administré dans le lait à raison de 2×10^9 ufc/jour pendant 21 jours pour les enfants de poids inférieur à 1.5 kg et pendant 8 jours pour les autres. Le traitement a débuté dans les trois premiers jours suivant la naissance et les selles ont été analysées à J0, J7, J8, J14, J21.

Initialement, les enfants du groupe 1 présentaient une moindre diversité de leur flore intestinale et une moindre densité bactérienne que ceux du groupe 2.

La colonisation par *Lactobacillus* GG est faible à J7 et J21 (21% des enfants de petit poids et 47% pour ceux de poids supérieur).

Le nombre d'espèces bactériennes a augmenté chez les enfants du groupe 1 ayant reçu le probiotique par rapport à ceux de même groupe ne l'ayant pas reçu. Le nombre de bactéries

Gram + a significativement augmenté entre J0 et J21. En revanche, pour les enfants du groupe 2, aucune modification quantitative ou qualitative de la flore n'a été constatée.

Les auteurs tirent alors trois conclusions :

- la réponse au probiotique dépend de l'âge gestatoire et post-natal
- *Lactobacillus* GG est capable de modifier le profil de colonisation intestinale chez les nouveaux-nés de faible poids
- il n'est pas nécessaire que LGG colonise efficacement le système intestinal pour exercer un impact sur la flore autochtone du prématuré.

Si de faibles modifications lors du processus de colonisation de l'intestin sont observées avec l'administration de probiotiques chez les prématurés, il faut maintenant s'assurer qu'ils sont à l'origine d'effets cliniques bénéfiques.

Une flore uniquement composée de bifidobactéries et donc ne comportant pas d'entérobactéries peut être dangereuse car elle serait incapable de synthétiser de la vitamine K [114].

Des facteurs de risque de l'entérocolite nécrosante du nourrisson sont la prématurité et la nutrition entérale. L'incidence et la sévérité sont inversement proportionnelles au poids de naissance. Le rôle des bactéries est suspecté : les épisodes pourraient être dus à une croissance importante d'une souche unique d'une bactérie intestinale (*Klebsiella*, *enterobacter*, *E. coli* par exemple) [114] qui entraînerait des modifications dans les activités métaboliques de la flore (fermentation des glucides et production d'hydrogène).

L'intérêt des probiotiques dans cette maladie se développe avec les études réalisées dans les maladies inflammatoires de l'intestin. Ce sont la capacité d'exclusion des pathogènes, la stimulation immunitaire et l'amélioration de la nutrition entérale par les probiotiques qui seraient mises en œuvre.

L'utilisation de souches génétiquement modifiées de probiotiques sécrétant des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 serait aussi très intéressante.

Il n'y a pas eu chez l'homme d'études randomisées de taille suffisante et versus placebo pour conclure sur l'impact des probiotiques dans l'entérocolite nécrosante. Chez l'animal,

l'administration de *Bifidobacterium infantis* a un effet préventif sur l'entérocolite nécrosante du jeune rat [113].

L'administration à des prématurés de préparations contenant des probiotiques est une perspective très intéressante car chez ces nouveaux-nés la flore intestinale est souvent perturbée. Jusqu'ici l'adjonction de probiotique à des formules existantes était nécessaire mais, compte tenu des résultats des études, des produits spécifiques devraient être mis au point et commercialisés dans les années à venir.

C. Assurance qualité et sécurité d'utilisation

Le développement d'aliments fonctionnels contenant des probiotiques est un cas particulier parmi les autres aliments fonctionnels (aliments enrichis en oméga 3, en phytostérols...) car ils contiennent des micro-organismes vivants. Deux aspects sont alors essentiels :

- connaître précisément le micro-organisme présent dans le produit et en quelle quantité
- s'assurer que sa consommation ne représente pas un danger pour la santé de l'homme.

1. Identification de la souche et énumération

Pour le consommateur, il est difficile de connaître le nom exact du probiotique contenu dans le produit qu'il achète. Or deux produits *a priori* semblables car contenant tous les deux la même espèce bactérienne peuvent avoir des effets différents si la souche utilisée n'est pas la même.

Le tableau 20 donne quelques exemples des indications fournies à l'acheteur. On constate que les informations concernant la souche bactérienne sont souvent vagues ou inexistantes.

Dénomination du produit	Composition figurant sur l'emballage	Souche utilisée
Actimel [®] au <i>L. casei</i> defensivus	Ferments lactiques du yoghourt et <i>L. casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001
Gallia Calisma [®]	Ferments lactiques - bifidobactéries	<i>Bifidobacterium breve</i> C50 et <i>Streptococcus thermophilus</i> 065
Bio [®] au bifidus actif	Ferments lactiques dont <i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i> DN- 173 010

Tableau 20 : Probiotiques utilisés dans certains aliments et indications sur l'emballage

Pourtant, il est recommandé que figurent sur l'étiquette le nom du probiotique, précisé jusqu'au niveau de la souche s'il y a eu sélection d'une souche particulière et la concentration minimale assurée pour chaque probiotique du produit jusqu'à la date limite de consommation.

Certains produits se démarquent : par exemple, les laits fermentés à boire au *L. casei* Form'U[®] (magasins U[®]) ou LK[®] (magasins Auchan[®]) pour lesquels la composition indique « *Bifidobacterium lactis* BB12[®], *Lactobacillus acidophilus* LA5[®], *Lactobacillus casei* ». Aucune souche de *L. casei* n'est pas précisée, peut être est ce parce qu'il n'y a pas eu de sélection de souche pour cette espèce bactérienne. Une autre particularité de ces produits peut être soulignée : l'emballage ne mentionne aucune allégation relative à la santé. Néanmoins, le consommateur est amené à penser que ces produits de marques de distributeurs correspondent exactement au produit commercialisé par Danone[®] sous le nom d'Actimel[®] alors qu'en fait, les souches utilisées et les effets sont peut-être différents.

Des études ont montré que l'identité et le nombre des espèces retrouvées ne correspondaient pas toujours aux étiquettes des produits.

Une équipe française a, par exemple, comparé les types et le niveau de population de souches de lactobacilles présentes dans divers produits alimentaires avec les indications figurant sur ces produits [63]. Il n'existe pas de règles pour l'énumération et le typage des probiotiques contenus dans l'alimentation humaine alors les chercheurs ont appliqué à des aliments fonctionnels les méthodes de contrôle des micro-organismes en tant qu'additifs alimentaires chez l'animal, développées dans le cadre d'un projet de l'Union Européenne.

Parmi les 10 produits étudiés (laits fermentés, fromage, complément alimentaire... commercialisés en Europe), tous spécifiaient le genre et l'espèce bactériens mais seulement 7 donnaient la quantité pour une (des) souches données.

- Pour 5 produits, les quantités ne correspondaient pas aux valeurs indiquées.
- Pour 3 produits, c'est au niveau des espèces de *Lactobacillus* qu'il y avait discordance entre les résultats et l'emballage.
- Dans 4 cas, les souches spécifiées sur l'étiquette n'ont pas été détectées.

Compte tenu du caractère souche-dépendant des caractéristiques des probiotiques (fonctionnalité, sécurité d'emploi), cette étude montre l'utilité des méthodes officielles pour contrôler le contenu des produits contenant des probiotiques non seulement au niveau de l'espèce mais aussi de la souche, ceci afin d'assurer une qualité au produit et protéger le consommateur. Une erreur de dénomination au niveau de l'espèce pourrait être seulement un problème de taxonomie sans conséquence pour le consommateur mais le nom correct des micro-organismes joue un rôle dans le droit de commercialiser le produit et les allégations autorisées.

Enfin, 4 laits fermentés commercialisés sous 3 marques différentes (dont Actimel[®]), contenaient la même souche bactérienne (*Lactobacillus casei* souche Shirota) qui était désignée différemment sur chaque étiquette. Il est important que les souches commercialisées ne portent qu'une seule dénomination afin que le consommateur puisse plus facilement se retrouver parmi les produits probiotiques.

La traçabilité de la souche bactérienne utilisée dans un produit probiotique est un aspect fondamental pour le bien-être et la santé du consommateur. Elle est surtout nécessaire avec les espèces bactériennes qui ne sont pas reconnues comme « GRAS » et qui peuvent représenter un risque pour la santé. Dans le cas de *E. faecium*, seules quelques souches clairement définies sont autorisées à la vente car leur caractère non toxique, non pathogène a été montré *in vitro* et *in vivo*. Le phénomène de résistance aux antibiotiques est aussi souche-dépendant, d'où l'importance de bien définir les souches bactériennes employées et de s'assurer que le produit contient bien la souche prétendue et uniquement celle-ci.

2. Sécurité d'emploi

Durant les vingt dernières années, des probiotiques ont été introduits dans de nombreux aliments, en particulier les produits laitiers. Pour chaque probiotique, il est indispensable d'identifier les effets bénéfiques potentiels sur l'organisme mais il est tout aussi important de s'assurer que sa consommation n'a pas d'effets « secondaires ».

Il conviendra de s'assurer :

- que les probiotiques ne sont pas toxiques, même à des doses nettement plus élevées que les doses usuelles
- que les produits de leur métabolisme ne soient pas toxiques
- que leurs enzymes n'exercent pas d'effet indésirable (comme la déconjugaison excessive des acides biliaires)
- qu'ils n'aient pas de répercussions négatives sur l'immunomodulation
- qu'ils ne contiennent pas de plasmides de résistance à des antibiotiques
- qu'ils ne dégradent pas le mucus et l'épithélium de l'intestin
- qu'ils ne soient pas susceptibles d'envahir l'organisme et d'y causer des infections.

Comme avec toute bactérie, il peut exister un phénomène de résistance aux antibiotiques parmi les bactéries lactiques. Cette résistance peut être due à des gènes situés sur des chromosomes, des transposons* ou des plasmides*. Les situations au cours desquelles ces éléments génétiques peuvent être mobilisés ne sont pas bien connues et on ne sait pas si cela constitue un réel problème clinique [57]. Lors de la sélection de souches probiotiques destinées à un aliment fonctionnel, il est recommandé que la bactérie ne soit pas porteuse de gènes de résistance transmissibles codant pour la résistance à des médicaments utilisés en clinique.

Des travaux doivent être effectués pour mieux connaître :

1. le phénomène de résistance aux antibiotiques chez les lactobacilles et les bifidobactéries notamment

* cf. définitions

2. le potentiel de transmission d'éléments génétiques à d'autres micro-organismes d'origine intestinale et/ou alimentaire.

Le tableau 21 liste les différents points à étudier lors de la validation de la sécurité d'emploi d'une souche probiotique [115].

Propriétés étudiées	Eléments à valider
Propriétés intrinsèques des souches	Facteurs d'adhésion Résistance aux antibiotiques Existence de plasmides et transfert potentiel Profil enzymatique négatif
Métabolites produits	Concentrations Sûreté Autres effets
Toxicité	Toxicité aiguë et subaiguë après ingestion de grandes quantités de la bactérie testée
Effets sur la muqueuse	Adhésion Invasion potentielle Dégradation du mucus intestinal Pouvoir infectieux chez des animaux immuno-compromis
Relation dose-effet	Etudes dose-effet par administration orale chez des volontaires
Validation clinique	Effets secondaires potentiels Evaluation minutieuse chez des volontaires sains et atteints de certaines maladies spécifiques
Etudes épidémiologiques	Surveillance de grandes populations après l'introduction de nouvelles souches et nouveaux produits

Tableau 21 : Etudes à réaliser pour valider la sécurité de souches probiotiques [113]

Le caractère pathogène des bactéries lactiques est extrêmement réduit puisque généralement, aucun caractère pathogène ou phénomène de virulence n'a été observé pour les genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Lactococcus* et seules certaines espèces des genres *Streptococcus* et *Enterococcus* peuvent être impliquées dans des infections humaines : elles sont reconnues comme pathogènes opportunistes responsables de bactériémie, endocardites, infections urinaires et peuvent être porteuses de gènes de résistance à la vancomycine. Cependant, beaucoup de souches *Lactobacilli*, résistantes intrinsèquement à la vancomycine, ont une histoire en tant que probiotiques ancienne et sûre sans aucun élément d'un éventuel transfert de leur résistance à d'autres bactéries.

Les lactobacilles sont utilisés depuis longtemps comme probiotiques et aucun risque pour l'homme n'a été établi. Ceci constitue la meilleure preuve de leur sécurité d'emploi [57]. Une étude finlandaise réalisée par l'équipe de Salminen a montré que l'incidence des bactériémies dues aux lactobacilles n'était pas augmentée par l'utilisation accrue de ces bactéries en tant que probiotiques [31]. Quelques souches de lactobacilles ont cependant été associées à des effets indésirables : des cas isolés de bactériémies.

En revanche, certaines bactéries lactiques, appartenant par exemple au genre *Enterococcus*, possèdent un caractère de virulence. De plus, des souches d'entérocoques peuvent présenter ou acquérir un caractère de résistance à la vancomycine et le transmettre à d'autres bactéries. Certaines souches d'entérocoques résistants à la vancomycine sont ainsi responsables à l'hôpital d'infections nosocomiales.

Pour ces raisons, il est généralement recommandé de ne pas utiliser cette souche comme probiotique chez l'homme et si un fabricant veut utiliser une souche d'*Enterococcus*, il devra montrer qu'elle ne peut acquérir ou transmettre la résistance à la vancomycine et qu'elle n'est pas virulente et ne peut induire d'infection [57].

Les bactéries appartenant au genre *Bifidobacterium* sont généralement considérées comme sûres car elles sont largement utilisées dans les produits laitiers fermentés, en particulier *B. lactis*, *B. infantis*, *B. bifidum* et *B. longum*. De plus, ce sont des bactéries appartenant à la flore dominante du côlon et elles sont très rarement impliquées dans des pathologies. Seules *B. denticolens*, *B. dentium*, *B. inopinatum* ont été associées à des effets préjudiciables mais ces bactéries ne sont pas couramment observées dans la flore intestinale et ne sont pas utilisées

dans les aliments [116]. Un cas de méningite a été attribué à *Bifidobacterium breve* qui était résistant aux pénicillines et aux céphalosporines [114].

L'AFSSA a été saisie par la DGCCRF pour évaluer la sécurité d'emploi de *Bifidobacterium lactis* souche Bb12 dans les préparations pour nourrissons, les préparations de suite et les préparations à base de céréales pour nourrissons et enfants en bas âge [117]. Des formules pédiatriques contenant du *B. lactis* Bb12, à la dose de 10^6 ufc/g de poudre, ont été commercialisées depuis plus de 10 ans sans que le suivi mis en place auprès des consommateurs n'ait mis en évidence d'effet indésirable grave. De plus, cette souche présente une sensibilité normale aux antibiotiques et ne contiendrait pas de plasmide codant pour la résistance aux antibiotiques transférable à d'autres souches naturellement présentes dans le tube digestif. Enfin, un groupe d'experts américains a reconnu en 1996 l'innocuité des bifidobactéries (à l'exception de *Bifidobacterium dentium* à l'origine des caries, et sauf en cas de déficit immunitaire congénital ou acquis, de radiothérapie ou de chimiothérapie), des lactobacilles et de *S. thermophilus* dans les formules infantiles, en vue d'obtenir le statut GRAS par la FDA (Food and Drug Administration) et en 2002, la FDA a effectivement accordé ce statut GRAS à *B. lactis* Bb12.

Afin de tester la tolérance et la sécurité des probiotiques, des enfants (âge moyen : 7 mois) ont consommé un lait infantile standard supplémenté par *B. lactis* Bb12 et *S. thermophilus* (respectivement 1×10^6 et 1×10^7 ufc/g de poudre) durant 1 an [118]. Cette consommation a été parfaitement tolérée et elle offre toutes les garanties de sécurité aux doses utilisées.

Lors d'un essai randomisé, contrôlé et réalisé en double aveugle, deux souches de *Bifidobacterium longum* (2C et 46), isolées chez des personnes âgées en bonne santé, ont été administrées pendant 3 semaines à des adultes sains âgés de 19 à 60 ans [116]. 19 sujets ont reçu quotidiennement 2 capsules contenant les probiotiques (10^9 ufc de *B. longum* 2C et 10^9 ufc de *B. longum* 46) et les 20 autres un placebo. Le but de cette étude était de s'assurer de la tolérance et la sûreté de ces deux souches lors de leur administration. Aucun effet secondaire n'a été rapporté et aucun changement dans les paramètres immunitaires n'a été observé. Selon les auteurs, ceci peut être dû à la courte durée de l'essai ou au fait que les sujets étaient en bonne santé et donc possédaient un système immunitaire fonctionnel.

De même, chez le nourrisson et l'enfant en bas-âge en bonne santé, aucune donnée ne montre un risque d'infection par un probiotique.

Cependant, chez les prématurés, des études spécifiques concernant la sécurité d'emploi des probiotiques doivent être réalisées avant que les préparations contenant des probiotiques soient utilisées de manière plus large, car les connaissances actuelles sont encore très insuffisantes dans cette population, d'autant qu'elle est caractérisée par son immaturité immunologique.

En effet, l'utilisation de probiotiques chez des sujets immuno-compromis ou chez des prématurés est plus délicate car ce sont des individus fragilisés et certains *Lactobacilli*, *Streptococci* et *Enterococci* peuvent être des pathogènes opportunistes [94].

Après avoir étudié chez des adultes sains la tolérance d'une bactérie de la flore normale : *Lactobacillus reuteri*, Wolf *et al.* ont réalisé une étude similaire chez des patients porteurs du VIH (virus de l'immunodéficience humaine) [119]. Pendant 3 semaines, les patients ont absorbé quotidiennement 1×10^{10} ufc de *L. reuteri* souche SD2112 ou un placebo. Aucune modification significative des paramètres étudiés (analyses sanguine et urinaire, examen clinique, profil immunitaire, tolérance gastro-intestinale et flore fécale) n'a été observée dans le groupe à cette dose.

Enfin, la sécurité d'utilisation des nouveaux probiotiques non traditionnels devra faire l'objet d'une attention particulière.

Des modifications génétiques des probiotiques sont une voie de développement pour l'industrie dans le but d'améliorer certaines propriétés telles que la production d'acide, d'arômes, d'enzyme et la résistance à la lyse. Le règlement européen de 1997 sur les nouveaux aliments [17] prévoit une procédure particulière afin d'évaluer les risques environnementaux : l'innocuité des aliments ou ingrédients contenant des organismes génétiquement modifiés doit être évaluée au préalable.

Une des thèmes majeurs des activités scientifiques de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) pour 2005 est la mise au point, la promotion et l'application de nouvelles approches et méthodologies scientifiques harmonisées pour l'évaluation des risques présentés par les denrées destinés à l'alimentation humaine et animale [120].

Le développement d'une approche générique pour l'évaluation de la sécurité des micro-organismes introduits volontairement dans la chaîne alimentaire est en cours.

En conclusion, même si les probiotiques administrés en grande quantité ces vingt dernières années n'ont pas été responsables d'effets indésirables significatifs, une grande vigilance est nécessaire avant et après la commercialisation d'aliments fonctionnels contenant des probiotiques.

CONCLUSION

Les aliments santé sont de plus en plus nombreux sur le marché de l'agro-alimentaire et les effets bénéfiques qu'ils exercent sur l'hôte peuvent concerner des organes et fonctions très variés. Parmi eux, l'intestin et la flore intestinale suscitent un grand intérêt mais une des principales difficultés à étudier les effets de tels aliments est due à la complexité de la flore intestinale autant du point de vue de sa composition, de son métabolisme que de ses rôles physiologiques.

Les probiotiques, des micro-organismes vivants qui produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, font l'objet de nombreuses publications scientifiques visant à étudier leurs effets tant au niveau digestif que systémique. Les effets de ces ingrédients fonctionnels ne sont donc pas encore complètement explorés, de même que leurs mécanismes d'action.

L'impact de ces modificateurs de flore sur les fonctions biologiques de l'homme, et plus spécialement de l'enfant, a plusieurs fois été démontré dans le domaine de la stimulation de l'immunité et la prévention des diarrhées ou des manifestations atopiques. Des études concluent que certains aliments santé peuvent avoir des effets modérés sur la santé mais à condition de les consommer très régulièrement et sur une longue durée.

La consommation d'aliments fonctionnels contenant des probiotiques pour prévenir l'apparition des manifestations atopiques chez le jeune enfant apparaît comme un des éléments les plus intéressants. Leur rôle dans la prévention des cancers coliques serait tout aussi attrayant mais reste à démontrer.

Il faut prendre garde à ne pas généraliser les observations faites avec des probiotiques spécifiques car chaque probiotique a une fonctionnalité potentielle particulière qui lui est propre et l'efficacité est à démontrer individuellement. Les études sur l'homme doivent aussi s'attacher à définir des populations cibles (enfants, personnes âgées, adultes en bonne santé) pour que des produits « sur mesure » soient proposés.

En parallèle, l'industriel exploite ces résultats et valorise ses produits par l'intermédiaire d'allégations relative à la santé qui suggèrent qu'un bénéfice sera tiré de la consommation de ces aliments. Ces allégations doivent être justifiées scientifiquement afin de ne pas abuser de la confiance du consommateur.

Les aliments fonctionnels, s'ils peuvent permettre des corrections nutritionnelles dans certains cas, n'en restent pas moins souvent aussi une stratégie commerciale ayant pour objectif de vendre plus cher - au moins 20% - une denrée en la présentant comme bénéfique pour la santé. Les aliments santé sont à consommer avec modération et objectivité : ils ne pourront jamais remplacer un traitement médicamenteux ni pallier une alimentation déséquilibrée.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Définitions

Axénique : se dit d'un animal sans germes, dont le tube digestif est stérile.

Gnotoxénique : se dit d'un animal dont la flore est connue et contrôlée. Les animaux gnotoxéniques sont obtenus à partir d'animaux axéniques dont on colonise le tube digestif avec des flores intestinales simples ou complexes.

Holoxénique : se dit d'un animal à flore naturelle.

Modèle animal	Flore	Inoculum
Axénique	0	0
Gnotoxénique	+	flore connue et contrôlée
Holoxénique	+	incontrôlé
Hétéroxénique	+	flore fécale humaine

Différents modèles d'animaux d'étude de la flore intestinale [34]

Cellules Caco-2 et cellules HT-29 :

Lignées épithéliales d'origine humaine ayant de caractéristiques physiologiques et morphologiques proches de celles des entérocytes. Elles sont immortelles et cultivées *in vitro*.

Colite ulcéreuse ou rectocolite hémorragique : maladie d'origine inconnue, caractérisée anatomiquement par des lésions congestives hémorragiques et hypersécrétantes de la muqueuse rectocolique et cliniquement par un syndrome dysentérique muco-hémorragique évoluant par poussées fébriles répétées : le pronostic est grave, mortel dans 15 à 20% des cas.

Entérocolite nécrosante du nouveau-né ou entérocolite ulcéronécrosante : maladie grave, de fréquence croissante et de cause inconnue, atteignant surtout les prématurés et les débiles. Elle se manifeste dès les premiers jours par une distension abdominale, des vomissements bilieux, une fièvre, des hémorragies digestives. L'examen radiologique montre une pneumatose intestinale. La mortalité varie de 10 à 40%. Dans ¼ des cas, la survenue d'une perforation

impose une résection intestinale : la mortalité atteint alors 30 à 50%. L'origine virale (Coronavirus) a été suspectée. 1980

Maladie de Crohn : inflammation ulcéreuse et sténosante d'un segment de l'intestin grêle siégeant le plus souvent à sa partie terminale et pouvant se combiner avec une colite du même type. Il existe une hyperplasie importante des follicules et des ganglions lymphoïdes. Elle peut débuter d'une manière aiguë ou subaiguë, simulant l'appendicite, et prenant souvent une allure chronique et cachectisante avec diarrhée tenace, subocclusion et suppuration. Sa cause est inconnue.

Plasmide : minuscule élément génétique présent dans certaines bactéries, beaucoup plus petit que le chromosome et indépendant de lui, mais comme lui constitué d'ADN et porteur de gènes ; il est souvent situé dans le cytoplasme et il est capable de donner naissance par réplication à un autre élément identique. Cette réplique peut être transférée à une autre bactérie [conjugaison bactérienne] dont le matériel et le patrimoine génétiques sont transformés. Ce mécanisme de conjugaison joue un rôle important par transfert de plasmides de résistance dans l'apparition de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Transposon (synonyme de provirus) : élément génétique mobile capable de s'intégrer aux gènes de l'ADN des cellules, de se transposer d'un point du génome à un autre et de produire des mutations dans le génome de la cellule

Vancomycine : antibiotique bactéricide inhibant la synthèse de la paroi bactérienne et utilisé dans le traitement d'infections sévères à germes sensibles, notamment à staphylocoques, streptocoques, entérocoques. Son intérêt réside dans le fait qu'il est encore peu affecté (en France mais plus aux Etats-Unis) par la résistance des staphylocoques (résistance exceptionnelle) et des entérocoques.

ANNEXE 2 : Principales bactéries lactiques associées aux produits laitiers fermentés et leurs rôles [20]

Laits fermentés	Yaourt	Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus, Streptococcus thermophilus ¹ Acidification / texture / arômes
	Enrichis en bactéries	Idem yaourt + Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium ou Lactobacillus casei ¹ Rôle nutritionnel
	Kéfir, koumiss	Lactobacillus brevis, Leuconostoc, Lactococcus lactis ² Acidification / texture / arômes
	Lait ribot, buttermilk	Lactococcus, Leuconostoc ¹ Texture / arômes
Beurre et crème		Lactococcus lactis biovar diacetylactis ¹ arôme
Fromages	Frais ou à pâte molle	Lactococcus lactis subsp. cremoris, lactis, diacetylactis ¹ Acidification : formation du caillé
	A pâte persillée	Leuconostoc ² Formation d'ouverture facilitant la croissance de Penicillium
	A pâte pressée	Lactobacillus, Lactococcus ² Arômes au cours de la maturation
	A pâte pressée cuite (gruyère, emmenthal)	S. thermophilus, Lactobacillus helveticus, L. delbrueckii subsp. lactis ¹ Acidification ; production d'acide lactique utilisé par les bactéries propioniques / protéolyse

¹ Ferments ajoutés

² Flore naturelle

ANNEXE 3 : Danone Nutritopics n°29, mars 2004

Petit historique des définitions du mot "PROBIOTIQUE"

- 1954 Première citation des effets favorables (« Probiotika ») des bactéries bénéfiques.
Vergin F. Anti- und Probiotika. *Hippokrates* 1954;25:16-119.
- 1965 **Substance secrétée par un micro-organisme, qui stimule la croissance d'un autre.**
La vie qui nourrit la vie : « pro-biotique ».
Lilly D.M., Stillwell R.H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 1965;147:747-748.
- 1971 **Extraits de tissus qui stimulent la croissance microbienne.**
Sperti G.S. *Probiotics*. Avi Publishing Co, Westpoint, Connecticut, USA. 121 p.
- 1974 **Organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore intestinale.**
Parker R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr.Health* 1974;29:4-8.
- 1992 **Complément alimentaire microbien vivant qui exerce une influence bénéfique sur la croissance de l'animal hôte en améliorant l'équilibre de sa flore microbienne intestinale.**
Füller R. Probiotics: the scientific basis. Chapman and Hall Ltd, London, p.1. 1992.
- 1992 **Mono- ou polyculture de micro-organismes vivants qui, sur l'homme ou l'animal, a une influence bénéfique en améliorant les propriétés de la microflore endogène.**
Havenaar R., Huis in't Veld J.H.J. Probiotics: a general view. In *Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*, vol. 1. Edited by BJB Wood. Elsevier Applied Science Publishers, London, pp. 151-170.
- 1996 **Culture microbienne vivante ou produit laitierensemencé qui exerce un effet positif sur la santé et la nutrition de l'hôte.**
Salminen S. Uniqueness of probiotic strains. *IDF Nutrition Newsletter* 1996;5(145):18-19.
- 1996 **Supplément alimentaire, constitué de micro-organismes vivants, qui exerce un effet positif sur l'hôte (animal ou homme).**
«...ein Lebensmittelsupplement in Form lebender Mikroorganismen, das den Wirtsorganismus (Tier oder Mensch) günstig beeinflusst.»
De Vrese M. Probiotische Milchprodukte. Eine Bewertung. *Deutsche Milchwirtschaft* 1996;47(18):798-801.
- 1996 **Micro-organismes vivants, qui, à partir d'une certaine quantité ingérée, exercent un effet positif sur la santé au-delà d'un simple bénéfice nutritionnel.**
Schaafsma G. Significance of probiotics and prebiotics in human diets. 21e Congrès international sur l'écologie microbienne et les maladies, LABIP consensus, SOMED, 28-30 octobre 1996, Paris : Institut Pasteur, abstract 117, p.38.
Aussi cité dans : State of the art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutrition Newsletter* 1996;5(145):23-24.
- 1997 **Micro-organismes vivants qui exercent un effet positif sur la santé de l'hôte (animal ou humain), via un meilleur équilibre de la flore intestinale.**
«Lebende Mikroorganismen, welche die Gesundheit des Wirts(tieres) günstig beeinflussen, indem sie das Gleichgewicht der Intestinalflora verbessern».
Et de manière plus générale : **Microorganismes vivants qui exercent une influence positive sur la santé de l'hôte (animal ou humain), au-delà des bénéfices nutritionnels des aliments.**
«Lebende Mikroorganismen, die den Wirtsorganismus (Tier oder Mensch) in einer über die Eigenschaft des Lebensmittels als Nährstofflieferant hinausgehenden Weise positiv beeinflussen».
Schrezenmeier J. Gesundheitsrelevante Aspekte von Probiotika - Mythos oder Realität? *Die Molkereizeitung Welt der Milch* 1997;51:956-958.

- 1998 **Micro-organismes vivants qui exercent un effet positif sur la santé de l'hôte en augmentant la flore endogène.**
Schrezenmeier J. Actual knowledge and propection. In *2nd Symposium Danone, Fermented food, fermentation and intestinal flora. Immunity and probiotics*, Bonn, 30 Octobre 30, 1998 : Abstract.
- 1998 **Aliment microbien vivant qui exerce un effet positif sur l'équilibre microbien intestinal.**
Zoppi G. Probiotici, prebiotici, sinbiotici ed eubiotici (Probiotics, prebiotics, synbiotics and eubiotics). *Pediatr. Med. Chir.* 1998;20(1):13-17.
- 1998 **Ingrédient alimentaire microbien vivant bénéfique pour la santé.**
Diplock A.T. *et al. Scientific concepts of functional foods in Europe.* Consensus document (FF/27/DE98). Bruxelles, ILSI Europe, p.50.
Br.J.Nutr. 1999 ;81(4) Suppl.1.
- 2002 **Micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte.**
Définition FAO 2002.
Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002,
http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf

ANNEXE 4 : Tableaux récapitulatifs d'essais randomisés ou contrôlés réalisés dans le domaine des maladies intestinales [79]

Tableau I.

Essais randomisés montrant un effet significatif de probiotiques vs placebo pour prévenir les perturbations intestinales liées à l'antibiothérapie.

Antibiotique	Probiotique	Effet	Référence
Ampicilline	Lactinex®	8,3 % vs 21 %	<i>Am J Hosp Pharm</i> , 1979, 36 , 754-7.
Antituberculeux	<i>E. faecium</i> SF68	5 % vs 18 %	<i>Curr Ther Res</i> , 1982, 31 , 265-71.
Divers	<i>E. faecium</i> SF68	8,7 % vs 27,2 %	<i>J Int Med Res</i> , 1989, 17 , 333-8.
Néomycine	<i>L. acidophilus</i>	20 % vs 42 %	<i>Prog Food Nutr Sci</i> , 1983, 7 , 29-37.
Érythromycine	<i>B. longum</i>	+	<i>Lancet</i> , 1987, ii , 43.
Erythromycine	<i>L. rhamnosus</i> souche GG	+	<i>Ann Med</i> , 1990, 22 , 57-9.
Clindamycine	<i>B. longum</i> + <i>Lactobacillus</i>	+	<i>Microb Ecol Health Dis</i> , 1994, 7 , 17-25.
Divers	<i>Sac. Boulardii</i>	+	<i>Rev Fr Gastroenterol</i> , 1975, 114 , 45-50.
" "	<i>Sac. Boulardii</i>	4,5 % vs 17,5 %	<i>Gaz Med Fr</i> , 1977, 84 , 2072-8.
" "	<i>Sac. Boulardii</i>	9,5 % vs 21,8 %	<i>Gastroenterology</i> , 1989, 96 , 981-8.
β-lactamines	<i>Sac. Boulardii</i>	7,2 % vs 14,6 %	<i>Am J Gastroenterol</i> , 1995, 90 , 439-48.

Effet : les chiffres correspondent aux pourcentages de sujets avec diarrhée associée aux antibiotiques dans le groupe probiotique et le groupe placebo, respectivement.

+ : les auteurs ont rapporté un effet positif du probiotique sans fournir le pourcentage de sujets présentant une diarrhée dans les deux groupes.

Tableau II.

Études randomisées contrôlées ayant rapporté un effet statistiquement significatif de probiotiques pour raccourcir la durée de gastro-entérites aiguës

Situation clinique	Probiotique	Référence
Diarrhée à rotavirus	<i>L. rhamnosus</i> souche GG	<i>Pediatrics</i> , 1991, 88 , 90-7.
" "	" "	<i>Pediatr Res</i> , 1992, 32 , 141-4.
" "	" "	<i>J Ped Gastroenterol Nutr</i> , 1995, 20 , 333-8.
" "	" "	<i>J Ped Gastroenterol Nutr</i> , 1997, 25 , 516-9.
" "	<i>L. casei</i> souche Shirota	<i>Jpn J Pediatr</i> , 1994, 47 , 2755-62.
" "	<i>L. acidophilus</i> tués par la chaleur	<i>J Ped Gastroenterol Nutr</i> , 2000, 30 , 68-72.
Gastroentérites	<i>L. rhamnosus</i> souche GG	<i>Pediatr Infect Dis</i> , 1995, 14 , 107-11.
" "	" "	<i>J Trop Ped</i> , 1996, 42 , 162-5.
" "	" "	<i>J Ped Gastroenterol Nutr</i> , 2000, 30 , 214-6.
" "	<i>E. faecium</i> SF68	<i>Curr Ther Res</i> , 1980, 28 , 927-36.
" "	<i>E. faecium</i> SF68	<i>Chemotherapy</i> , 1981, 27 , 466-70.
" "	<i>E. faecium</i> SF68	<i>Scand J Gastroenterol</i> , 1996, 31 , 887-91.
" "	<i>Sac. boulardii</i>	<i>Ann Pediatr</i> , 1985, 32 , 1-3.
" "	<i>L. reuteri</i>	<i>J Pediatr Gastroenterol Nutr</i> , 1997, 24 , 399-404.
" "	<i>L. reuteri</i>	<i>Pediatr Infect Dis J</i> , 1997, 16 , 1103-7.
" "	Yaourt	<i>J Ped Gastroenterol Nutr</i> , 2001, 33 , 307-13.
" "	<i>L. reuteri</i> DSM12246 + <i>L. rhamnosus</i> 19070-2	<i>Pediatr Infect Dis J</i> , 2002, 21 , 417-9.
" "	<i>L. reuteri</i> DSM12246 + <i>L. rhamnosus</i> 19070-2	<i>Pediatr Infect Dis J</i> , 2002, 21 , 411-6.

Tableau III.

Études randomisées contrôlées de probiotiques pour prévenir des gastro-entérites aiguës chez des nourrissons ou enfants.

Probiotique	Effet	Référence
<i>Bifidobacterium. bifidum</i> + <i>S. thermophilus</i>	7 vs 31 % de diarrhées nosocomiales*	<i>Lancet</i> , 1994, 344 , 1046-9.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> souche GG	6,7 vs 33 % de diarrhées nosocomiales*	<i>J Pediatr Gastroenterol Nutr</i> , 1997, 25 , 516-9.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> souche GG	5,2 vs 6,02 épisodes de diarrhée/ 12 mois*	<i>J Pediatr</i> , 1999, 134 , 15-20.
<i>Lactobacillus casei</i> souche DN-114 001	23,4 vs 26,4 % de diarrhées sur 6 mois (NS)	<i>Int J Clin Pract</i> , 1999, 53 , 179-84.
<i>Lactobacillus casei</i> souche DN-114 001	15,9 vs 22 % de diarrhées sur 6 mois*	<i>Int J Clin Pract</i> , 2000, 54 , 568-71.

*p < 0,05. NS : non significatif.

Tableau IV.
Études randomisées contrôlées de l'effet de probiotiques pour prévenir la diarrhée du voyageur.

Probiotique	Efficacité	Référence
Lactinex®	Non	<i>Gastroenterology</i> , 1978, 74 , 829-30.
<i>L. fermentum</i> souche KLD	Non	<i>N Eng J Med</i> , 1995, 333 , 1360-1.
Lactobacilles	43 % vs 71 %	<i>J Travel Med</i> , 1989, 7 , 333-5.
<i>Sac. boulardii</i>	+	<i>Fortschr Med</i> , 1993, 111 , 152-6.
<i>L. rhamnosus</i> souche GG	- 11 % (NS)	<i>Ann Med</i> , 1990, 22 , 53-6.
<i>L. rhamnosus</i> souche GG	3,9 %/j vs 7,4 %	<i>J Travel Med</i> , 1997, 4 , 41-3.

Tableau V.
Résultats des essais contrôlés testant l'efficacité de probiotiques des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Situation	Probiotique	Contrôle	Rechutes probiotique vs contrôle	P	Référence
RCH	<i>E. coli</i> Nissle 1917	5-ASA 1,2 g/j	16 vs 11,3 %	NS	<i>Aliment Pharmacol Ther</i> , 1997, 11 , 853-8.
RCH	<i>E. coli</i> Nissle 1917	5-ASA 1,2 g/j	67 vs 73 %	NS	<i>Lancet</i> , 1999, 354 , 635-9.
RCH	<i>E. coli</i> Nissle 1917	5-ASA 1,5 g/j	36,4 vs 33 %	NS	<i>Gastroenterology</i> , 2001, 120 , A139.
RCH	<i>S. boulardii</i> + 5-ASA	5-ASA seul	30 vs 35 %	NS	<i>Gut</i> , 2000, 47 (suppl III), A240 P929.
Pochite réfractaire	VSL #3	placebo	15 vs 100 %	*	<i>Gastroenterology</i> , 2000, 119 , 305-9.
Pochite réfractaire	VSL #3	placebo	15 vs 94 %	*	<i>Gastroenterology</i> 2002, 122 , abstract.
AIA, prévention de pochite	VSL #3	placebo	10 vs 40 %	*	<i>Gastroenterology</i> 2000, 118 , G1214.
MC, prévention postopératoire	VSL #3	5-ASA	20 vs 40 %	*	<i>Gastroenterology</i> 2000, 118 , G4179.
MC	<i>E. coli</i> Nissle 1917	placebo	30 vs 70 %	*	<i>J Clin Gastroenterol</i> , 1997, 25 , 653-8.
MC	<i>Sac. boulardii</i> + 5-ASA	5-ASA seul	6,3 vs 37,5 %	*	<i>Dig Dis Sci</i> , 2000, 45 , 1462-4.
MC, prévention postopératoire	<i>L. rhamnosus</i> GG	placebo	60 vs 35 %	NS échec	<i>Gut</i> , 2002, 51 , 405-9.

RCH : rectocolite hémorragique. MC : maladie de Crohn. AIA : anastomose iléo-anale. 5-ASA : acide 5-aminosalicylique. *p < 0,05.

VSL #3 est un mélange de huit souches probiotiques.

Mésalazine ou 5-ASA = acide 5-aminosalicylique

BIBLIOGRAPHIE

1. Apfeldorfer G, *Traité de l'alimentation et du corps*. Flammarion, 1994.
2. Roberfroid MB, Aliments fonctionnels : définitions, concepts et stratégies. In: *Aliments fonctionnels*. Ed. Tec & Doc, 2001.
3. Scientific Concepts of Functional Foods in Europe - Consensus Document. *British Journal of Nutrition* **81**: S1-S27, 1999.
4. Ashwell M, *Concepts of fonctionnal foods*. ILSI, 2002.
5. Directives générales Codex concernant les allégations CAC/GL 1-1979 (Rév. 1-1991). 1-3. Codex alimentarius, 1979 (révision 1991).
6. Proposition de règlement du Parlement européen et du Conseil concernant les allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires - COM(2003) 424 final 2003/0165 (COD). Rapporteur Adriana Poli Bortone (ENVI), 17 juillet 2003.
7. Directives pour l'emploi des allégations relatives à la nutrition - CAC/GL 23-1997. 1-5. Codex Alimentarius, 1997.
8. *Aliments et santé : publicité et étiquetage*. Centre Européen des Consommateurs <http://www.euro-conso.org>, avril 2001.
9. Décret n° 93-1130 du 27 septembre 1993 concernant l'étiquetage relatif aux qualités nutritionnelles des denrées alimentaires. transposition en droit français de la directive 90/496/CE du 24 septembre 1996 relative à l'étiquetage nutritionnel des denrées alimentaires.
10. Degroote D, Benaïche L and Campion M-D, Allégations santé et définition du médicament : quelle frontière ? *Bulletin de l'Ordre* **378**: 69-77, avril 2003.
11. Déniel P, Les marques vont elles trop loin dans le discours santé ? *LSA* **1865**: 30-31, 17 juin 2004.
12. *60 millions de consommateurs - Guide d'achat des aliments santé*. Hors-série n°121. Institut National de la Consommation, avril 2005.
13. *Code de la consommation*. Editions Dalloz, 2004.
14. *Code de la santé publique*. Editions Dalloz, 2004. D'après la directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain, JOCE n° L311 du 28 novembre 2001.
15. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, october 2001.
16. Schrezenmeier J and deVrese M, Probiotics, prebiotics, and synbiotics : approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73 suppl**: S361-64, 2001.
17. Règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil, du 27 janvier 1997, relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires. Journal officiel L 43 du 14.02.1997.
18. Mermet G, *Franco-scopie 2005*. Editions Larousse, 2005.
19. Déniel P, Santé : un discours à crédibiliser. *LSA* **1878**: 92-93, 14 octobre 2004.
20. Pilet M, Magras C and Federighi M, Bactéries lactiques. In: *Manuel de bactériologie alimentaire* (Ed. Polytechnica), 235-60, 1998.

21. Molin G, Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. *Am. J. Clin. Nutr.* **73 suppl**: 380S–5S, 2001.
22. Les laits fermentés. Document d'information réalisé par Syndifrais.
23. Le yaourt. Document d'information réalisé par Syndifrais.
24. Déniel P, Danone remplace Bio par Activia. *LSA* **1915**: 32, 7 juillet 2005.
25. Bengmark S, Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* **42**: 2-7, 1998.
26. Cohen J-M and Serog P, *Savoir manger : le guide des aliments*. Editions Flammarion, 2004.
27. Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F and Braesco V, The intestine and its microflora are partners for the protection of the host : report on the Danone Symposium “The Intelligent Intestine,” held in Paris, June 14, 2002. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**: 675–83, 2003.
28. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P and Vigi V, Intestinal microflora in early infancy : composition and development. *Acta Paediatrica* **91**(suppl 441): 48-55, 2003.
29. Bernier J, Adrian J and Vidon N, Chapitre XXIV : Les bactéries et les aliments dans le côlon. In: *Les aliments dans le tube digestif*, 383-412. Doins Editeurs, 1988.
30. Mai V and Morris JG, Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age. *J. Nutr.* **134**: 459–64, 2004.
31. Rapport du groupe de travail « Alimentation infantile et modification de la flore intestinale ». AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), juin 2003.
32. Ott SJ, Musfeldt M, Ullmann U, Hampe J and Schreiber S, Quantification of intestinal bacterial populations by real-time PCR with a universal primer set and minor groove binder probes: a global approach to the enteric flora. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 2566–72, 2004.
33. Schwiertz A, Gruhl B, Löbnitz M, Michel P, Radke M and Blaut M, Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full term infants. *Pediatric Research* **54**(3): 393-99, 2003.
34. Hagiage M, *La flore intestinale - de l'équilibre au déséquilibre*. Ed. Vigot, 1994.
35. Danone, *The Intestinal Microflora. Understanding the Symbiosis*. Editions John Libbey Eurotext, 2003.
36. Salminen SJ, Bouley C, Boutron-Ruault M-C, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau M-C, Roberfroid M and Rowland I, Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* **80**: S147-S71, 1998.
37. Bernalier A, Doré J and Rabot S, Structures et fonctions métaboliques de la microflore gastro-intestinale de l'homme. In: *Aliments fonctionnels* (Ed. Doc Te), 2001.
38. Langhendries JP, Paquay T, Hannon M and Darimont J, Acquisition de la flore intestinale néonatale : rôle sur la morbidité et perspectives thérapeutiques. *Arch. Pédiatr.* **5**: 644-53, 1998.
39. Couturier L, Flore intestinale du nourrisson : les bénéfices de l'alimentation lactée. *Le Quotidien du médecin*, 8 mars 2005.
40. Ducluzeau R, Installation, équilibre et rôle de la flore microbienne chez le nouveau-né. *Annales Pédiatrie* **40**: 13-22, 1993.
41. Hopkins M, Sharp R and Macfarlane G, Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acids profiles. *Gut* **48**(2): 198-205, 2001.
42. Hill M, Diet and the human intestinal bacterial flora. *Cancer Research* **41**(2): 3778-80, 1981.

43. Gibson GR and Roberfroid MB, Dietary modulation of the human colonic microbiota : introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **125(6)**: 1401-12, 1995.
44. Collins MD and Gibson GR, Probiotics, prebiotics, and synbiotics : approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* **69 suppl**: S1052-57, 1999.
45. Guarner F and Malagelada JR, Gut flora in health and disease. *Lancet* **360**: 512-19, 2003.
46. Rochat F, Effets biologiques des modificateurs de la flore intestinale. *Arch. Pédiatr.* **11**: 576-57, 2004.
47. Ogawa K, Ben RA, Pons S, Paolo MId and Fernandez LB, Volatile fatty acids, lactic acid, and pH in the stools of breast-fed and bottle-fed infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **15(3)**: 248-52, 1992.
48. Parrett AM and Edwards CA, In vitro fermentation of carbohydrate by breast fed and formula fed infants. *Arch. Dis. Child.* **76(3)**: 249-53, 1997.
49. http://academic.pgcc.edu/~aimholtz/AandP/206_ONLINE/Digest/digest2.html.
50. Deplancke B and Gaskins HR, Microbial modulation of innate defense : goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am. J. Clin. Nutr.* **73 suppl**: S1131-41, 2001.
51. Campeotto F, Waligora-Dupriet AJ, Dupont C and Butel MJ, Peut-on prévenir l'atopie de l'enfant par l'administration de probiotiques chez la femme enceinte ? *Cah. Nutr. Diét.* **38**: 369-75, 2003.
52. Lu L and Walker WA, Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am. J. Clin. Nutr.* **73 suppl**: 1124S-30S, 2001.
53. <http://www.people.virginia.edu/~rjh9u/gif/irsum.gif>.
54. http://hfournie.free.fr/new_icons/book/stifik/hepato.jpg.
55. Rigaud D, L'intestin : un prodige d'adaptation et de coopération. *Objectif Nutrition* **67**, janvier 2003.
56. Moreau M-C, Flore intestinale, prébiotiques et effets sur la réponse immunitaire intestinale à IgA. *Arch. Pédiatr.* **7 suppl**: 247-8, 2000.
57. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization) Expert Consultation, Córdoba (Argentina), 1-4 octobre 2001.
58. Fuller R, Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* **66**: 365-78, 1989.
59. Schaafsma G, State of art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutr News Lett* **5**: 23-4, 1996.
60. Schrezenmeier J and DeVrese M, Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. *Am J Clin Nutr* **73**: 361-4, 2001.
61. Reid G and Bruce A, Urogenital infections in women : can probiotics help ? *Postgrad Med. J.* **79**: 428-32, 2003.
62. Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte. AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), février 2005.
63. Coeuret V, Gueguen M and Vernoux J-P, Numbers and strains of *Lactobacilli* in some probiotic products. *International Journal of Food Microbiology* **97**: 147-56, 2004.
64. Mombelli B and Gismondo MR, The use of probiotics in medical practice. *International Journal of Antimicrobial Agents* **16**: 531-36, 2000.
65. *Vidal*® 2003 - *Le Dictionnaire 79ème édition*. Editions Vidal.
66. Amores R, Calvo A, Maestre JR and Martinez-Hernandez D, Probiotics. *Rev. Esp. Quimioterap.* **17**: 131-39, 2004.
67. Kaur IP, Chopra K and Saini A, Probiotics : potential pharmaceutical applications. *Europ J Pharm Sci* **15**: 1-9, 2002.

68. Jacobsen C, Rosenfeldt V, Hayford A, Moller P, Michaelsen K, Paerregaard A, Sandstrom B, Tvede M and Jakobsen M, Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five strains. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4949-56, 1999.
69. Hirsch M, AFSSA – Saisine n° 2003-SA-0200 : Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation des justificatifs scientifiques concernant les allégations présentes sur l'étiquetage d'un lait fermenté contenant notamment du *Lactobacillus casei* DN-114 001. AFSSA, 23 janvier 2004.
70. Bezkorovainy A, Probiotics : determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* **73 suppl**: 399-405, 2001.
71. Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Isolauri E and Salminen SJ, The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol Letters* **167**: 185-89, 1998.
72. Gopal PK, Prasad J and Gill HS, Effects of the consumption of *Bifidobacterium lactis* HN019 (DR10TM) and galacto-oligosaccharides on the microflora of the gastrointestinal tract in human subjects. *Nutr. Res.* **23**: 1313-28, 2003.
73. Chierici R, Fanaro S, Saccomandi D and Vigi V, Advances in the modulation of the microbial ecology of the gut in early infancy. *Acta Paediatrica* **91**(suppl 441): 56-63, 2003.
74. Tannock GW, A special fondness for *Lactobacilli*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(6): 3189-94, 2004.
75. Narva M, Nevala R, Poussa T and Korpela R, The effect of *Lactobacillus helveticus* fermented milk on acute changes in calcium metabolism in postmenopausal women. *Eur. J. Nutr.* **43**: 61-8, 2004.
76. Kaur IP, Chopra K and Saini A, Probiotics : potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* **15**: 1-9, 2002.
77. Plummer S, Weaver MA, Harris JC, Dee P and Hunter J, Clostridium difficile pilot study : effects of probiotic supplementation on the incidence of C. difficile diarrhoea. *Int. Microbiol.* **7**: 59-62, 2004.
78. Van De Guchte M, Ehrlich S and Maguin E, Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *J. Appl. Microbiol.* **91**: 147-53, 2001.
79. Marteau PR, Daniel F, Morales E, Seksik P and Jian R, Protection contre des maladies intestinales par des probiotiques. *Cah. Nutr. Diét.* **38**: 363-68, 2003.
80. Marteau PR, Vrese MD, Cellier CJ and Schrezenmeier J, Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.* **73 suppl**: S430-36, 2001.
81. Harms HK, Bertele-Harms RM and Bruer-Kleis D, Enzyme substitution therapy with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in congenital sucrase-isomaltase deficiency. *N Engl J Med* **316**: 1306-9, 1987.
82. Pool-Zobel BL, Neudecker C, Domizlaff I, Ji S, Schillinger U, Rumney C, Moretti M, Vilarini I, Scassellati-Sforzolini R and Rowland I, Lactobacillus- and Bifidobacterium-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr Cancer* **26**: 365-80, 1996.
83. Burns AJ and Rowland IR, Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr Issues Intest Microbiol* **1**: 13-24, 2000.
84. Roberfroid MB, Prebiotics and probiotics : are they fonctionnal foods ? *Am. J. Clin. Nutr.* **71 suppl**: S1682-S87, 2000.
85. Wollowski I, Rechkemmer G and Pool-Zobel BL, Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr* **73**: S445-51, 2001.

86. Gill HS, Stimulation of the immune system by lactic cultures. *Int Dairy J* **8**: 535-44, 1998.
87. Isolauri E, Probiotics in human disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**(suppl): 1142-46, 2001.
88. Majamaa H, Isolauri E, Saxelin M and Vesikari T, Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **20**: 333-38, 1995.
89. Vaarala O, Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli. *Clin. Exp. Allergy* **33**: 1634-40, 2003.
90. Turchet P, Laurenzano M, Auboiron S and Antoine JM, Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 on winter infections in free-living elderly subjects : a randomised, controlled pilot study. *J. Nutr. Health Aging* **7**: 75-7, 2003.
91. Marcos A, Warnberg J, Nova E, Gomez S, Alvarez A, Alvarez R, Mateos JA and Cobo JM, The effect of milk fermented by yogurt cultures plus *Lactobacillus casei* DN-114 001 on the immune response of subjects under academic examination stress. *Eur. J. Nutr.* **43**: 381-89, 2004.
92. Hirsch M, AFSSA – Saisine n° 2004-SA-0244 : Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation du fondement scientifique des allégations concernant un lait fermenté contenant un probiotique, notamment au regard des quantités recommandées sur l'étiquetage. AFSSA, 16 décembre 2004.
93. Pfeifer A, Les aliments fonctionnels : un défi scientifique et un défi en matière de communication. In: *Forum sur les aliments fonctionnels, Strasbourg, 1998*.
94. Young RJ and Huffman S, Probiotic use in children. *J. Pediatr. Health Care* **17**: 277-83, 2003.
95. Van Niel C, Feudtner C, Garrison M and Christakis D, *Lactobacillus* Therapy for Acute Infectious Diarrhea in Children: A Meta-analysis. *Pediatrics* **109**: 678-84, 2002.
96. Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, Perman JA and Yolken RH, Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infant in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* **344**: 1046-9, 1994.
97. Chouraqui JP, Van Egroo LD and Fichot MC, Acidified milk formula supplemented with *bifidobacterium lactis* : impact on infant diarrhea in residential care settings. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **38**: 288-92, 2004.
98. Thibault H, Aubert-Jacquin C and Goulet O, Effects of long-term consumption of a fermented infant formula (with *Bifidobacterium breve* C50 and *Streptococcus thermophilus* 065) on acute diarrhea in healthy infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **39**: 147-52, 2004.
99. Saavedra JM, Bauman N, Oung I, Perman JA and Yolken RH, Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* **334**: 1046-49, 1994.
100. Kirjavainen PV, Apostolou E, Arvola T, Salminen SJ, Gibson GR and Isolauri E, Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **32**: 1-7, 2001.
101. Kirjavainen PV, Arvola T, Salminen SJ and Isolauri E, Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants : a target of bifidobacterial therapy at weaning ? *Gut* **51**(1): 51-55, 2002.
102. Rosenfeldt V, Benfeldt E, Valerius NH, Paerregaard A and Michaelsen KF, Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *J. Pediatr.* **145**: 612-6, 2004.

103. Pessi T, Sütas Y, Hurme M and Isolauri E, Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clinical and Experimental Allergy* **30**: 1804-8, 2000.
104. Pohjavuori E, Viljanen M, Korpela R, Kuitunen M, Tiittanen M, Vaarala O and Savilahti E, Lactobacillus GG effect in increasing IFN-gamma production in infants with cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**: 131-6, 2004.
105. Vancikova Z, Lodinova-Zadnikova R, Radl J and Tlaskalova-Hogenova H, The early postnatal development of salivary antibody and immunoglobulin response in children orally colonized with a nonpathogenic, probiotic strain of *E. coli*. *Folia Microbiol.* **48**: 281-7, 2003.
106. Lodinova-Zadnikova R, Cukrowska B and Tlaskalova-Hogenova H, Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years). *Int. Arch. Allergy Immunol.* **131**: 209-11, 2003.
107. Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P and Isolauri E, Probiotics in primary prevention of atopic disease : a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **357**: 1076-79, 2001.
108. Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H and Isolauri E, Probiotics and prevention of atopic disease : 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **361**: 1869-71, 2003.
109. Rautava S, Kalliomäki M and Isolauri E, Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J. Allergy Clin. Immunol.* **109**: 119-21, 2002.
110. Isolauri E, Arvola T, Sütas Y, Moilanen E and Salminen S, Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical and Experimental Allergy* **30**: 1604-10, 2000.
111. Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen SD, Michaelsen KF, Jeppesen DL, Valerius NH and Paerregaard A, Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**: 389-95, 2003.
112. Millar M, Wilks M and Costeloe K, Probiotics for preterm infants ? *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* **88**: 354-58, 2003.
113. Agarwal R, Sharma N, Chaudhry R, Deorari A, Paul VK, Gewolb IH and Panigrahi P, Effects of oral *Lactobacillus* GG on enteric microflora in low-birth-weight neonates. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **36**: 397-402, 2003.
114. Kitajima H, Sumida Y, Tanaka R, Yuki N, Takayama H and Fujimura M, Early administration of *Bifidobacterium breve* to preterm infants : randomised controlled trial. *Archives of Disease in Childhood* **76**: 101-07, 1997.
115. Duffy LC, Interactions Mediating Bacterial Translocation in the Immature Intestine. *J. Nutr.* **130**: 432S-36S, 2000.
116. Mäkeläinen H, Tahvonen R, Salminen S and Ouwehand AC, *In vivo* safety assessment of two *Bifidobacterium longum* strains. *Microbiol. Immunol.* **47**: 911-14, 2003.
117. Hirsch M, AFSSA – Saisine n° 2002-SA-0188 : Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation de la sécurité d'emploi de *Bifidobacterium lactis* souche Bb12 dans les préparations pour nourrissons, les préparations de suite et les préparations à base de céréales pour nourrissons et enfants en bas âge et à l'évaluation des allégations formulées sur des préparations pour nourrissons, des préparations de suite et des préparations à base de céréales pour nourrissons et enfants en bas âge. AFSSA, 5 mai 2003.
118. Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N and Yolken RH, Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria : tolerance and safety. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**: 261-7, 2004.

119. Wolf B, Wheeler K, Ataya D and Garleb K, Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* supplementation to a population infected with the Human Immunodeficiency Virus. *Food and Chemical Toxicology* **36**: 1085-94, 1998.
120. Programme de gestion 2005 de l'autorité européenne de sécurité des aliments. EFSA, 18 janvier 2005.

Nom – Prénoms : AUGER Hélène Nathalie

Titre de la Thèse : Probiotiques et aliments fonctionnels : intérêt en prévention nutritionnelle.

Résumé de la Thèse :

Il y a une vingtaine d'années, le concept des aliments fonctionnels est né : il s'agit d'aliments exerçant des effets bénéfiques sur la santé au-delà de leur valeur nutritionnelle intrinsèque. Les probiotiques en sont un exemple et leur consommation a pour objectif de moduler la flore intestinale. Celle-ci, très active métaboliquement, constitue un écosystème complexe qui intervient dans la physiologie intestinale et le système immunitaire. Les effets des probiotiques sont difficiles à étudier et à démontrer mais cela est indispensable pour que le consommateur puisse faire un choix éclairé : les industriels de l'agroalimentaire mettent aujourd'hui sur le marché toute une gamme de produits et communiquent sur ces derniers par le biais d'allégations portant sur le maintien de l'équilibre de la flore intestinale et la stimulation des défenses immunitaires.

Mots clés : PROBIOTIQUES, ALIMENT FONCTIONNEL, FLORE INTESTINALE, PREVENTION NUTRITIONNELLE

JURY

Président :	M. BARD	Professeur de Biochimie Faculté de Pharmacie de Nantes
Assesseurs :	M. OLIVIER	Maître de Conférences de Toxicologie Faculté de Pharmacie de Nantes
	Mme CAROFF	Maître de Conférences de Bactériologie Faculté de Pharmacie de Nantes
	Mme MAVIEL	Docteur en Pharmacie 21, rue du Pré Joli 44640 Saint Jean de Boiseau

Adresse de l'auteur : 5 rue Grande Biesse 44200 NANTES