

**UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE**

ANNEE 2005

N°

THESE
pour le
DIPLÔME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
par
Melle Aline GRELET

Présentée et soutenue publiquement le 20 Juin 2005

Intérêt des probiotiques dans la prévention et le traitement des
diarrhées post-antibiothérapie.

Président : Monsieur le Professeur A. Reynaud
Directeur de thèse : Madame le Docteur N. Caroff
Membres du Jury : Monsieur le Docteur C. Olivier
Monsieur le Docteur P. Burgaud
Madame le Docteur C. Saupin

SOMMAIRE

INTRODUCTION	6
PARTIE I : LA FLORE BACTERIENNE DU TUBE DIGESTIF	7
I/ GENERALITES	7
II/ ETABLISSEMENT DE LA FLORE	8
A/ Définitions	8
B/ Etablissement de la flore	8
1/ <i>in utero</i>	8
2/ Après l'accouchement par voie basse	9
3/ Accouchement par césarienne	9
4/ Les premiers jours de la vie	9
5/ De la naissance à la diversification alimentaire	10
6/ La diversification alimentaire vers 4 mois	12
III/ REPARTITION DE LA FLORE DANS LE TUBE DIGESTIF	12
A/ Répartition verticale	12
1/ Les flores buccale et oropharyngée	13
2/ La flore gastrique	13
3/ L'intestin grêle	13
4/ Le gros intestin (côlon)	14
5/ La flore fécale	14
B/ Répartition horizontale	16
IV/ COMPOSITION DE LA FLORE A L'AGE ADULTE	16
V/ ROLES DE LA FLORE BACTERIENNE	17
A/ La flore résidante et l'intégrité de la muqueuse	17
B/ Rôle de protection, effet barrière	18
1/ Espèces bactériennes constituant la flore de barrière	19
2/ Action par effets directs	19
3/ Action par effets indirects	19
4/ Immunité intestinale	20
5/ Tolérance orale	21
C/ Fonctions métaboliques de la flore intestinale	21
1/ Fermentation colique	22
2/ Quantité d'aliments fermentés au niveau colique	22
3/ Produits finaux de la fermentation colique	22
4/ Les effets du métabolisme colique sur la santé et les désordres intestinaux	23
D/ Fonctions trophiques : croissance et différenciation des cellules épithéliales	24
VI/ METHODES DE CARACTERISATION	25
A/ Méthodes utilisées	25
B/ Modèles d'études expérimentaux	26
VII/ VARIATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES	28
A/ Généralités, stabilité apparente de la flore	28
B/ Modifications de la composition de la flore avec l'âge	28
C/ Rôles joués par la flore dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	29
D/ Impact de l'hospitalisation sur la flore intestinale	31
E/ La prise d'antibiotiques	31

PARTIE II : LES EFFETS DES ANTIBIOTIQUES SUR LA FLORE INTESTINALE

	32
I/ GENERALITES SUR LES DIARRHEES ASSOCIEES AUX ANTIBIOTIQUES	32
A/ Evolution de la consommation d'antibiotiques en France	32
B/ Effet secondaire majeur : la diarrhée associée aux antibiotiques	33
C/ Etiologie des diarrhées associées aux antibiotiques	33
D/ Définition de la diarrhée associées aux antibiotiques	33
E/ Facteurs de risques de la diarrhée associée aux antibiotiques	34
1/ Liés à l'hôte	34
2/ Liés à l'antibiothérapie	35
F/ Les différentes formes cliniques	36
1/ Les diarrhées simples	36
2/ La colite aiguë hémorragique	36
3/ La colite pseudomembraneuse	37
G/ Mécanismes physiopathologiques des diarrhées associées aux antibiotiques	37
1/ Diarrhée par destruction de l'effet barrière	37
2/ Diarrhées métaboliques par modification de la flore digestive normale	38
3/ Diarrhées infectieuses par prolifération d'agents bactériens, cause des diarrhées post-antibiothérapie	38
II/ DIARRHEES LIEES A LA TOXICITE DES PRODUITS POUR LA MUQUEUSE INTESTINALE	39
A/ Erythromycine et motilité intestinale	39
B/ Majoration du péristaltisme de l'intestin grêle par l'association amoxicilline-acide clavulanique	39
III/ DIARRHEES LIEES A L'IMPLANTATION DE SOUCHES EXOGENES	40
A/ <i>Staphylococcus aureus</i>	40
B/ <i>Klebsiella oxytoca</i>	41
C/ <i>Candida</i> spp	42
IV/ PROLIFERATION DE BACTERIES COMMENSALES : COLITE PSEUDOMEMBRANEUSE A <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i>	43
A/ Les différentes formes cliniques de la colite à <i>C.difficile</i>	43
B/ Physiopathologie de la colite à <i>C.difficile</i>	47
C/ Facteurs de risques de la colite à <i>C.difficile</i>	48
D/ Epidémiologie de la colite à <i>C.difficile</i>	48
E/ Diagnostic de la colite à <i>C.difficile</i>	49
1/ Recherche de <i>C.difficile</i> par culture	49
2/ Détection des toxines par des méthodes immunoenzymatiques	51
F/ Traitement de la colite à <i>C.difficile</i>	53
1/ La diarrhée profuse	53
2/ La diarrhée sanglante	53
G/ Pronostic de la colite à <i>C.difficile</i>	54
V/ CONDUITE A TENIR DEVANT UNE DIARRHEE ASSOCIEE AUX ANTIBIOTIQUES	55
VI/ PREVENTION DES DIARRHEES ASSOCIEES AUX ANTIBIOTIQUES	57
VII/ CONCLUSION	57

PARTIE III : UTILISATION DES PROBIOTIQUES DANS LA PREVENTION ET LE TRAITEMENT DES DIARRHEES ASSOCIEES AUX ANTIBIOTIQUES	58
I/ DEFINITION DES PROBIOTIQUES	58
A/ Que sont les probiotiques ?	58
B/ Caractéristiques essentielles des probiotiques	58
II/ SOUCHES UTILISEES COMME PROBIOTIQUES	59
A/ Les médicaments	59
1/ Bacilor® : <i>Lactobacillus casei</i> variété <i>rhamnosus</i>	59
2/ Lyo-Bifidus® : <i>Bacillus bifidus</i>	59
3/ Ultra-Levure® : <i>Saccharomyces boulardii</i>	59
4/ Carbolevure® : <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
B/ Les compléments alimentaires	60
1/ Bion3®	60
2/ Xantis Flore®	60
3/ Matol24B®	61
4/ Effidigest®	61
5/Oemine probiotic®	62
6/ Ergyphilus®	63
7/ Lactinex®	63
C/ Les produits laitiers	63
III/ MODES DE PRODUCTION INDUSTRIELS	65
A/ Critères de sélection des souches probiotiques	65
B/ La production à l'échelle industrielle	66
IV/ MECANISMES D'ACTION DES PROBIOTIQUES	70
A/ Contrôle de la croissance des pathogènes	71
1/ Réduction du pH liée à la production d'acides organiques	71
2/ Synthèse de substances antimicrobiennes	71
a/ H ₂ O ₂	71
b/ Les bactériocines	72
B/ Obstacle à la colonisation par des pathogènes	72
1/ Encombrement des sites de fixation des bactéries pathogènes	72
2/ Production de mucines	73
C/ Probiotiques et immunité	74
1/ Immunomodulation non spécifique	74
2/ Effets spécifiques sur la réponse immunitaire	75
V/ PROBIOTIQUES ET DIARRHEES ASSOCIEES AUX ANTIBIOTIQUES	75
A/ Prévention des diarrhées associées aux antibiotiques	75
1/ <i>Lactobacilli</i>	77
2/ <i>Enterococcus faecium</i>	78
3/ <i>Bifidobacteria</i>	78
4/ Levures	78
B/ Les probiotiques dans la colite à <i>Clostridium difficile</i>	79
1/ Bactéries	79
2/ Levures	80
a/ <i>Saccharomyces boulardii</i>	80
b/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80
VI/ SURVEILLANCE ET PRECAUTIONS D'EMPLOI DES PROBIOTIQUES	81
A/ Problèmes rencontrés ou possibles	81
1/ Résistance aux antibiotiques	81
2/ Infections	82

B/ Groupes potentiellement à risques	82
C/ Tests préconisés	82
D/ Mise en place d'une veille	83
VII/ AUTRES UTILISATIONS DES PROBIOTIQUES	83
A/ Prévention et traitement des diarrhées aiguës infectieuses	83
B/ Traitement des maladies inflammatoires intestinales chroniques	84
C/ Prévention du cancer colique expérimental	84
D/ Prévention des allergies alimentaires et traitement de l'eczéma chez le nourrisson	85
E/ Infections vaginales	85
F/ Infections urinaires	86
G/ Application topique	86
H/ Infections hivernales chez les personnes âgées	86
I/ Infections à <i>Helicobacter pylori</i>	87
VIII/ INTERET DES PRODUITS CONTENANT DES MICRO-ORGANISMES VIVANTS PAR RAPPORT A CEUX CONTENANT DES MICRO-ORGANISMES TUES	87
CONCLUSION	89
LISTE DES TABLEAUX	90
LISTE DES FIGURES	91
LISTE DES ABREVIATIONS	92
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	93

INTRODUCTION

Méconnus du grand public il y a encore cinq ans, les probiotiques ont connu un essor rapide notamment grâce à l'énorme investissement dans ce domaine des industriels de l'agro-alimentaire. A l'heure actuelle, les probiotiques font partie (avec les omega 3) des ingrédients « à la mode » dans le domaine des aliments et des compléments alimentaires. Les allégations santé qu'ils affichent sont de plus en plus fortes. Ainsi, on a pu entendre qu'ils « *participent à renforcer les défenses naturelles de l'organisme.* » En effet, les fabricants jouent désormais la carte de la caution médicale pour faire valoir leurs produits auprès des consommateurs. Le marché semble juteux puisque les principaux acteurs en pharmacie ont suivi le mouvement. Ainsi, 600 000 boîtes de Bion3® (probiotique commercialisé par Merck Medication Familiale) ont été vendues en 2004.

Pourquoi cet intérêt croissant pour ces microorganismes ?

L'idée phare est d'en apporter au niveau du tube digestif pour maintenir la flore intestinale dans un état d'équilibre physiologique. Rappelons que la flore intestinale exerce des fonctions essentielles, telles que la protection contre les agents pathogènes mais aussi la stimulation du système immunitaire local et général. On comprend donc pourquoi l'équilibre de la flore intestinale est un facteur de bonne santé. A l'heure actuelle, la plupart des souches bactériennes utilisées appartiennent aux genres *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium*, sans oublier le recours à la levure *Saccharomyces boulardii* qui constitue le principe actif d'un médicament bien connu, l'Ultra-Levure®.

L'objectif de cette thèse a été d'analyser les nombreuses données bibliographiques concernant l'efficacité des probiotiques face aux perturbations digestives induites par les antibiotiques, et donc leur rôle dans la prévention et le traitement des diarrhées liées à l'antibiothérapie. En effet, les troubles digestifs conduisent souvent à un arrêt prématuré de l'antibiothérapie, avec les conséquences que l'on connaît en terme de résistance bactérienne aux antibiotiques. Si l'on tient compte de la consommation actuelle d'antibiotiques en France, il apparaît important de s'intéresser aux possibilités de prévenir ces effets secondaires majeurs. Dans ce contexte, le concept des probiotiques apparaît prometteur puisqu'ils semblent en mesure de contrecarrer les effets délétères des antibiotiques sur la flore intestinale.

PARTIE I : LA FLORE BACTERIENNE DU TUBE DIGESTIF

I/ GENERALITES

Le tube digestif humain est le lieu de prédilection pour la croissance de nombreuses bactéries. La flore bactérienne digestive est estimée à 10^{14} bactéries vivantes, soit dix fois le nombre de cellules eucaryotes de l'organisme (1). Ces bactéries appartiennent à de nombreuses espèces dont près de 500 ont été identifiées et rattachées à plus de 90 genres. Toutefois, ces estimations sont probablement fausses, les techniques actuelles ne permettant pas d'isoler et de cultiver toutes les espèces pour les identifier. Si l'on prend en compte le fait qu'une mutation sur 10^8 divisions bactériennes est une mutation viable, les 10^{14} bactéries du tube digestif vont théoriquement produire 10^6 bactéries mutantes viables à chaque cycle de division. Les bactéries présentes dans le tube digestif se divisent toutes les vingt minutes. La génération d'un aussi grand nombre de bactéries mutantes viables à chaque cycle de division permet à la flore digestive de s'adapter aux changements environnementaux susceptibles de survenir.

Le tube digestif de l'homme, initialement stérile, est colonisé en quelques heures après la naissance. La maturation de la flore est complète à l'âge de 1 ou 2 ans et sa composition reste stable pendant toute la vie de l'individu. La flore digestive réalise un écosystème complexe, susceptible d'interférer avec l'hôte dans un sens bénéfique ou néfaste. Dans cet écosystème, les communautés bactériennes cohabitent en équilibre. La flore dominante, non pathogène et majoritaire, exprime des activités métaboliques décelables. La flore sous-dominante, minoritaire et réprimée, contient des espèces potentiellement pathogènes, notamment en cas de rupture de l'intégrité de la barrière intestinale. La répartition de la flore le long du tube digestif dépend de la capacité des bactéries à survivre dans chaque milieu (acidité gastrique, bile, sécrétions pancréatiques...). Dans chaque compartiment du tube digestif, ces bactéries s'organisent en niches à l'intérieur desquelles des états d'équilibre s'installent. Les variations de la composition de la flore digestive tant au niveau quantitatif que qualitatif peuvent être à l'origine de troubles intestinaux, tels que des diarrhées ou des maladies inflammatoires chroniques (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique...). C'est pourquoi il est nécessaire de s'intéresser aux fonctions exercées par la flore digestive, parfois considérée comme un organe à part entière.

II/ ETABLISSEMENT DE LA FLORE

A/ Définitions

- **La colonisation** de l'écosystème digestif par un genre, une espèce ou une souche bactérienne se caractérise par la présence d'une population microbienne de niveau constant au cours du temps et n'exigeant pas de ré-inoculation périodique. Cela suppose que les bactéries ayant colonisé une niche donnée s'y multiplient à un taux égal au taux d'élimination pour cette niche. D'une façon générale, un microorganisme dit autochtone ou indigène colonise naturellement un habitat du tube digestif. Autochtone pour un habitat donné, le micro-organisme peut être allochtone pour d'autres habitats par lesquels il transite après élimination de son habitat d'origine.
- **L'implantation** est un terme synonyme de colonisation et les auteurs utilisent indifféremment l'un ou l'autre terme. Il est quelquefois utilisé dans un sens plus spécifique pour désigner la multiplication bactérienne qui précède la colonisation.
- **La prolifération** bactérienne correspond à une forte multiplication dans la niche écologique considérée. Si elle concerne des bactéries pathogènes (salmonelles, shigelles), elle conduit le plus souvent à une pathologie. Pour les bactéries autochtones, la prolifération permet la colonisation. Pour les bactéries en transit qui ne colonisent pas, deux situations sont possibles: la survie ou la mort.
- **La survie** est exprimée en pourcentage du nombre de microorganismes ingérés, ou en concentrations atteintes en différents sites intestinaux. Durant le transit, le microorganisme qui survit peut être inactif (cas des spores ne germant pas) ou développer une activité en fonction de l'environnement digestif (cas des probiotiques). Enfin, même en l'absence de survie, la lyse bactérienne dans la lumière intestinale peut libérer des composés biologiquement actifs.

B/ Etablissement de la flore

1/ *in utero*

In utero, l'intestin du fœtus est stérile. Il est protégé par le liquide amniotique, lui-même stérile.

2/ Après l'accouchement par voie basse

L'intestin est rapidement colonisé par une communauté bactérienne provenant des muqueuses de la mère (flores vaginale, fécale, buccale) et de l'environnement (bactéries véhiculées par le personnel soignant, l'entourage...). Les circonstances et le mode d'accouchement influencent donc le développement de la flore intestinale du nouveau-né. Un accouchement de durée prolongée favorise la présence de bactéries viables dans l'estomac et la cavité buccale du nouveau-né.

3/ Accouchement par césarienne

Une naissance par césarienne favorise l'exposition à des germes de l'environnement et de l'entourage. Dans ce cas, la flore du nouveau-né est caractérisée par l'absence de bactéries anaérobies. En effet, par définition, ces bactéries ne survivent pas au contact de l'air. Seuls les microorganismes microaérophiles, anaérobies facultatifs, et les bactéries sporulées comme celles appartenant au genre *Clostridium* colonisent les nouveaux-nés issus d'une césarienne.

4/ Les premiers jours de la vie

La colonisation des surfaces corporelles exposées, incluant la peau, l'appareil respiratoire, le système génito-urinaire et le tube digestif commence dès la naissance. Au début, quand l'espace et les éléments nutritifs ne sont pas limités, les bactéries avec un fort taux de multiplication dominant. Comme le nombre de bactéries augmente, la quantité d'éléments nutritifs diminue et les différentes régions du tube digestif se peuplent d'espèces bactériennes plus spécifiques. La complexité de la flore augmente. Les principales populations cultivables de la flore fécale du nouveau-né entre 0 et 3 jours incluent des entérobactéries (dont *Escherichia coli*), des streptocoques ainsi que des staphylocoques transitoirement dominants, et quelquefois, mais pas systématiquement, des bifidobactéries et des lactobacilles (2,3). La flore intestinale du nouveau-né, composée de seulement quelques genres bactériens pendant les premiers jours, évolue rapidement jusqu'à la diversification alimentaire en fonction de l'environnement, de l'alimentation et d'une éventuelle antibiothérapie. Après la diversification alimentaire, le profil de la flore dominante se diversifie puis se stabilise. Deux périodes apparaissent donc critiques dans la colonisation de l'intestin : la période allant de la

naissance à la diversification alimentaire et la période se situant autour de la diversification alimentaire (4).

5/ De la naissance à la diversification alimentaire

Le nourrisson peut être allaité ou alimenté exclusivement avec des préparations lactées, une troisième possibilité étant une alimentation mixte dans laquelle une préparation lactée remplace progressivement le lait maternel. La composition de la flore fécale des nourrissons a été analysée dans les deux premières situations (Figure 1, page 11). Les conséquences de la troisième situation sur le profil bactérien de la flore sont inconnues. Plusieurs études utilisant des techniques de culture conventionnelles ont montré que la flore des enfants allaités était dominée par des bifidobactéries, alors que celle des enfants recevant des préparations lactées contenait plus de *Bacteroides*, de bactéries du genre *Clostridium* et d'entérobactéries (2,5,6). Toutefois, d'autres études n'ont pas confirmé cette différence (7).

Une analyse de Tannock (1994) a montré que les populations de clostridies étaient toujours plus faibles chez les enfants allaités que chez ceux recevant une préparation lactée. Cependant, la présence de ce groupe bactérien n'entraîne pas de risque pathologique. L'analyse de la flore intestinale du nourrisson avec les méthodes moléculaires a confirmé les données ci-dessus (8). Harmsen et *al* ont analysé la composition de la flore de douze nourrissons, nés à terme, entre le premier et le vingtième jour. Six enfants étaient allaités et les six autres recevaient une préparation lactée. La composition initiale de la flore était comparable dans les deux groupes avec 40% de bifidobactéries, jusqu'à 80% de *Bacteroides* et 30% d'*E. coli*. Les autres genres occupent une position sous-dominante. En revanche, l'évolution de la composition de la flore est différente en fonction des groupes. En effet, à partir du quatrième jour, on observe une majorité de bifidobactéries (60 à 91%) chez les enfants allaités. Les bifidobactéries ne dominent pas chez les enfants recevant des préparations lactées et ne sont même pas détectables chez certains enfants de ce groupe. Chez la majorité des enfants, les *Bacteroides* diminuent à partir du quatrième jour, mais augmentent à nouveau vers le vingtième jour, atteignant un niveau compris entre 35 et 61% de la flore totale (8).

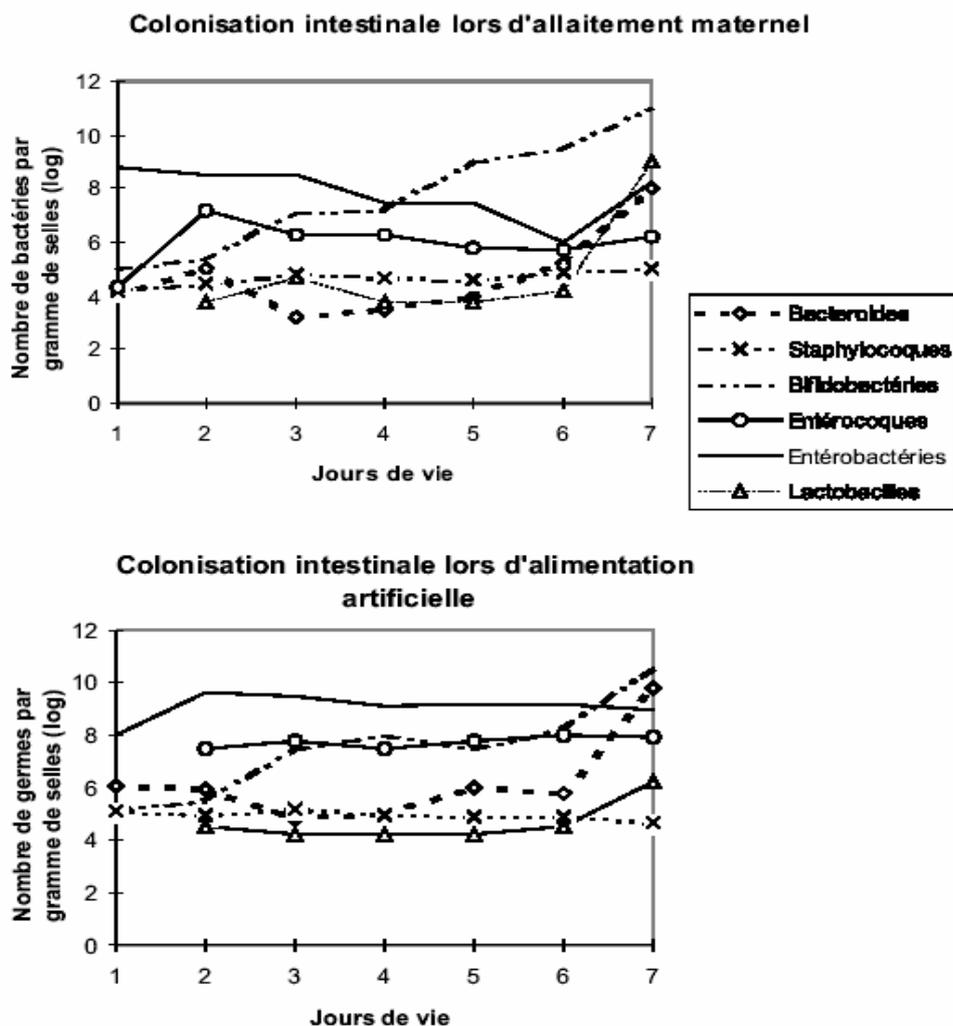


Figure 1 : Comparaison des flores intestinales de nourrissons allaités et de nourrissons recevant exclusivement des préparations lactées durant les sept premiers jours de vie (5)

D'autres études ont mis l'accent sur la diversité des espèces de bifidobactéries dans la flore intestinale des enfants allaités ou recevant des préparations lactées. Trois espèces sont fréquemment retrouvées dans la flore des nourrissons allaités: *B. breve*, *B. infantum* et *B. longum* (9). Cependant, les résultats restent contradictoires puisqu'une étude récente n'a pas observé de différence dans la distribution des espèces de bifidobactéries et de lactobacilles entre les flores d'enfants allaités et celles d'enfants recevant une préparation lactée, à l'âge de 1 mois et à l'âge de 7 mois c'est-à-dire avant et après la diversification alimentaire (10). Dans cette étude, les représentants les plus fréquemment mesurés étaient *B. infantis*, pour les bifidobactéries et les espèces appartenant au groupe *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*) pour les lactobacilles. Les populations dominantes de

ces deux genres étaient composées de seulement une ou deux espèces chez la majorité des enfants. Un autre résultat intéressant de cette étude était la similitude de composition des populations bactériennes dominantes de la flore intestinale établie à un mois entre les nourrissons allaités et ceux recevant exclusivement des préparations lactées.

6/ La diversification alimentaire vers 4 mois

La seconde période critique pour le développement de la flore intestinale est la diversification alimentaire, pendant laquelle des aliments non lactés vont être ajoutés progressivement au régime de l'enfant. Ces aliments vont exposer la flore des enfants à différents glucides complexes. Par ailleurs, l'intestin continue à se développer pendant la première année de vie. Il est donc important de préciser si les changements de composition de la flore observés à cette période sont causés par l'introduction d'aliments nouveaux ou s'ils lui sont simplement associés dans le temps. En effet, ces changements pourraient être la conséquence d'autres phénomènes (génétiques, immunitaires...). Les résultats préliminaires d'une étude longitudinale suggèrent que la flore bactérienne se diversifie avec une plus grande dominance de *Bacteroides* et de *Clostridium* avant même l'introduction d'aliments non lactés, tant chez les enfants allaités que chez ceux recevant une préparation lactée (11). Une autre étude indique que les communautés de bifidobactéries restent stables pendant la période de diversification alimentaire et que la transition vers les espèces de bifidobactéries trouvées chez l'adulte n'apparaît pas directement en réponse à l'introduction d'aliments solides dans le régime (10). Cette étude montre également que les changements du profil bactérien observés à la période de la diversification alimentaire sont comparables chez les enfants allaités et chez ceux recevant une préparation lactée.

III/ REPARTITION DE LA FLORE DANS LE TUBE DIGESTIF

A/ Répartition verticale

Les bactéries constitutives de la flore ne sont pas réparties au hasard le long du tube digestif. On retrouve des niveaux de population caractéristiques dans des régions particulières du tube digestif. Cette répartition dépend de la capacité des bactéries à survivre et à proliférer dans les différents milieux (1).

1/ Les flores buccale et oropharyngée

La cavité orale contient une microflore d'environ 200 espèces bactériennes (1). La salive contient des bactéries en transit (10^9 / mL) issues des surfaces muqueuses tapissant la langue et l'intérieur des joues. Les fentes gingivales et la plaque dentaire fournissent un environnement anaérobie avec de très faibles potentiels d'oxydoréduction, autorisant l'établissement d'une flore anaérobie diverse. La plaque dentaire contient une population bactérienne très dense (10^{11} bactéries /g).

2/ La flore gastrique

Au niveau de l'estomac, la plupart des bactéries ingérées sont détruites par l'acidification due à la sécrétion de suc gastrique (le pH descend à 2.5-3.5 et peut même être inférieur à 2). Il n'est donc pas étonnant que leur nombre ne soit que de 10^3 /g de contenu. Ce sont principalement des bactéries Gram-positives, anaérobies facultatives, appartenant aux genres *Lactobacillus* ou *Streptococcus* qui, contrairement à la majorité des microorganismes retrouvés dans la nourriture, sont des microorganismes résistants à l'acidité (12). La plupart des bactéries retrouvées au niveau gastrique sont considérées comme des microorganismes en transit plutôt que comme des commensaux (1). *Helicobacter pylori*, bactérie spiralée très mobile responsable de l'apparition d'ulcères gastriques, est présente dans la flore gastrique d'environ 50% de la population mondiale. D'autres espèces appartenant au genre *Helicobacter* peuvent également être retrouvées. Il a été suggéré qu'*H. pylori* pouvait être considéré comme un microorganisme appartenant à la flore indigène de l'estomac (1). La colonisation de l'estomac par *H. pylori* est asymptomatique dans la plupart des cas.

3/ L'intestin grêle

Dans l'intestin grêle, les principaux facteurs limitant la population bactérienne sont :

- la rapidité du transit
- le caractère agressif des sécrétions pancréatique et biliaire.

Les bactéries du jéjunum (10^4 /g) sont principalement des *Lactobacillus*, des *Bifidobacterium* et des *Streptococcus*, tous Gram-positifs. L'iléon est considéré comme une zone de transition

entre la microflore relativement faible de la partie supérieure de l'intestin et la microflore colique qui est plus importante (1). Comparée avec la partie supérieure de l'intestin, la partie distale de l'intestin, dont le péristaltisme est diminué et les potentiels d'oxydoréduction inférieurs, maintient une microflore plus diversifiée et des populations bactériennes plus importantes. Les bactéries de l'iléon (10^6 à 10^7 /g) comprennent non seulement les mêmes bactéries que le jéjunum, avec un plus fort pourcentage de *Bifidobacterium*, mais aussi des *Clostridium* (Gram-positif, anaérobies strictes) et les bactéries Gram-négatives que sont les *Enterobacteriaceae* (anaérobies facultatives), les *Bacteroides* et les *Fusobacterium* (anaérobies strictes).

4/ Le gros intestin (côlon)

Le côlon est le principal site de colonisation microbienne du tube digestif humain, probablement du fait que la motilité intestinale est lente à ce niveau (temps de transit pouvant atteindre 60 heures) et que les potentiels d'oxydoréduction y sont minimes. Par conséquent, le côlon arbore une flore microbienne très importante (10^{10} à 10^{12} /g) composée de bactéries strictement anaérobies (pour plus de 99.9% de la flore colique), dont les plus importantes sont :

- des Gram-négatives telles que les *Bacteroides* et les *Fusobacterium*
- des Gram-positives telles que les *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*, *Clostridium*.

On y trouve également, mais à des concentrations plus faibles, des bactéries anaérobies facultatives, Gram-négatives (*Enterobacteriaceae*) ou Gram-positives (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*). Le côlon contient d'autres bactéries en quantité notable, par exemple des germes méthanogènes, acétogènes, réducteurs de sulfates, des *Propionibacterium*, des *Staphylococcus*, des *Veillonella* (Gram-négative et anaérobie stricte).

5/ La flore fécale

Dans les fèces, dont la composition microbienne est prise pour modèle de celle du côlon, on distingue la flore dominante et la flore sous-dominante (1) La flore dominante chez l'homme adulte correspond à des populations bactériennes représentant plus de 1% de la microflore totale. En termes de bactéries cultivables, une population dominante comprend de 10^{10} à 10^{11} Unités Formant Colonies (UFC) par gramme de selles.

La flore dominante comprend (Figure 2):

- les *Bacteroides*, les plus abondants, avec 30% du total ; à ce genre appartiennent les espèces *B. fragilis* (la plus nombreuse), *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*.
- Ensuite, les *Eubacterium*, les *Bifidobacterium*, (*B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. longum*), les *Ruminococcus*, les *Peptostreptococcus*, les *Peptococcus*.

A 10^9 et en dessous, on parle de flore sous-dominante. Il faut cependant distinguer 2 niveaux de population. Les populations représentant entre 1 et 0,1% de la microflore totale sont sous-dominantes mais de légères fluctuations de l'alimentation ou de la physiologie de l'hôte peuvent les conduire à devenir dominantes. De plus elles représentent une masse bactérienne non négligeable pouvant avoir un effet sur l'hôte. 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. C'est pourquoi les points de vue divergent sur l'estimation de ce niveau. Il semblerait néanmoins qu'en dessous de 10^8 UFC/g les effets métaboliques soient minimes. Les bactéries dont les niveaux de population sont inférieurs à 10^5 UFC/g sont réprimées par la microflore et ne pourront jouer un rôle que si leurs niveaux de population augmentent au moins de 1000 fois. La flore sous-dominante est constituée d'*Enterobacteriaceae* (surtout *E. coli*, à un moindre degré *Proteus* et *Klebsiella*), de *Clostridium* (*C. perfringens*, *C. bifermentens*), de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. casei*), de *Streptococcus* (*S. salivarius*), de *Fusobacterium* (1).

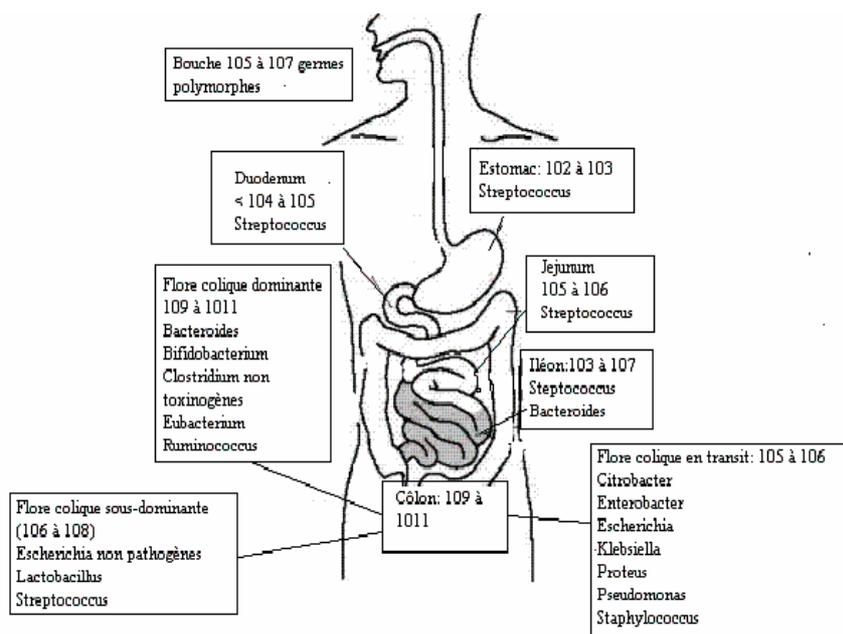


Figure 2: Répartition verticale des bactéries le long du tube digestif (13)

B/ Répartition horizontale

En addition à cette distribution verticale caractéristique des espèces bactériennes indigènes de la cavité orale au côlon, il existe une distribution horizontale caractéristique des espèces bactériennes indigènes entre la lumière intestinale et l'épithélium de la muqueuse digestive (14). Quatre habitats bactériens majeurs ont ainsi été suggérés (15) : la lumière intestinale, la muqueuse qui recouvre l'intégralité de l'épithélium digestif, les couches profondes de la muqueuse dans les cryptes intestinales, la surface des cellules épithéliales. Certains microorganismes vivent librement dans la lumière digestive, certains colonisent les cryptes intestinales de Lieberkuhn et d'autres interagissent avec la surface des cellules épithéliales. Les anaérobies stricts, qui sont prédominants dans les bactéries indigènes intestinales, s'associent avec la paroi digestive pour former différentes couches dans l'épithélium.

IV/ COMPOSITION DE LA FLORE A L'AGE ADULTE.

Le milieu intestinal du nouveau-né présente un potentiel d'oxydoréduction positif, d'où la première colonisation par des espèces anaérobies facultatives. Ces anaérobies facultatifs abaissent ce potentiel d'oxydoréduction et permettent la croissance d'anaérobies stricts que l'on retrouve ensuite dans la flore de l'adulte (Tableau I). Les principales espèces anaérobies facultatives isolées sont *Staphylococcus* (dont 4% de *S. aureus* et 20% de *S. epidermidis*), *Streptococcus* (dont 30% de *S. faecalis*, 10% de *S. faecium* et 10% de Streptocoques non hémolytiques), des *Enterobactéries* (*Escherichia coli* (20%), *Klebsiella aerogenes* (5%), *Proteus mirabilis* (2%), *Enterobacter cloacae* (1%), *Serratia* spp (1%)) et *Pseudomonas aeruginosa* (0.5%) (16). Les anaérobies stricts rencontrés sont essentiellement des bactéries appartenant au genre *Bifidobacterium*. Les plus fréquentes sont *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis* et *B. breve*. La présence de *Clostridium perfringens* a également été démontrée. D'autres espèces appartenant au genre *Clostridium* sont fréquemment isolées comme *C. paraputrificum*, *C. tertium*, *C. cochlearum*, *C. difficile*, *C. acetobutylicum*, *C. butyricum*. Toutes les espèces appartenant au genre *Bacteroides* isolées appartiennent au groupe *fragilis*. Il s'agit plus particulièrement de *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. fragilis* et *B. distasonis* (16). D'autres anaérobies préférentielles ont été mises en évidence : des espèces d'*Eubacterium* (*E. lentum*, *E. aerofaciens*, *E. limosum*, *E. rectale*, *E. contortum*), de

Propionibacterium (*P. acnes*), de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. fermentum*), de *Peptostreptococcus* (*P. intermedius*, *P. productus*), de *Peptococcus* (*P. asaccharolyticus*), de *Veillonella* (*V. parvula*, *V. alcalescens*), de *Fusobacterium* (*F. novum*, *F. varium*, *F. prausnitzii*, *F. mortiferum*) (16).

Tableau I : Flore normale d'un adulte sain (17)

Genres	Culture	FISH	
		Bactéries par gramme de fèces	
Anaérobies non sporulées			
<i>Bacteroides</i> spp	10 ¹⁰ -10 ¹¹	<i>Prevotella</i> inclue	4.10 ⁹ -2.10 ¹⁰
<i>Bifidobacterium</i> spp	10 ¹⁰ -10 ¹¹		< 10 ⁷ -4.10 ⁹
<i>Atopobium</i> grp	ND		8.10 ⁸ -1.10 ¹⁰
<i>Eubacterium</i> spp	10 ⁹ -10 ¹⁰	<i>E.cylindroides</i> grp	1.10 ⁷ -2.10 ⁹
		<i>E.rectale-C.coccoides</i> grp	3.10 ⁹ -1.10 ¹⁰
<i>Propionibacterium</i> spp	10 ⁹ -10 ¹¹		ND
<i>Veillonella</i> spp	10 ⁵ -10 ⁸		<10 ⁷ -1.10 ⁸
<i>Ruminococcus</i> grp	ND		2.10 ⁸ -1.10 ¹⁰
<i>Phascolarctobacterium</i> grp	ND		<10 ⁷ -7.10 ⁸
Anaérobies sporulées			
<i>Clostridium</i> spp	10 ⁵ -10 ⁹	<i>C.histolyticum</i> grp	<10 ⁷ -2.10 ⁸
		<i>C.litusebureuse</i> grp	<10 ⁷ -4.10 ⁷
Aérobies sporulées			
<i>Bacillus</i> spp	10 ⁴ -10 ⁶		ND
Microaérophiles			
<i>Lactobacillus</i> spp	10 ⁷ -10 ⁹	<i>Lactobacilli-enterococci</i> grp	<10 ⁷ -3.10 ⁷
<i>Streptococcus</i> spp	10 ⁷ -10 ⁹		<10 ⁷ -5.10 ⁷
<i>Enterococci</i>	10 ⁵ -10 ⁷		ND
Organismes facultatifs			
Coliformes	10 ⁷ -10 ⁹		
Autres Entérobactéries	10 ⁵ -10 ⁹	<i>Enterobacteriaceae</i>	<10 ⁷ -5.10 ⁸

Grp : groupe, spp : sous-espèces

ND : Non Déterminé ; FISH : Hybridation *in situ* Fluorescente

V/ ROLES DE LA FLORE BACTERIENNE

A/ La flore résidante et l'intégrité de la muqueuse

Des études comparatives (18) réalisées sur des animaux élevés dans des conditions stériles ont illustré l'influence de la flore bactérienne normale sur la structure et les fonctions de la muqueuse digestive. En l'absence de bactérie dans la lumière intestinale, on a observé la réduction de différents paramètres (1,19) comme le renouvellement épithélial, la fonction et la

motilité du muscle lisse, les fonctions endocrines locales et la vascularisation de la muqueuse. De plus, il a été mis en évidence une diminution du développement anatomique et fonctionnel du tissu lymphoïde associé à la muqueuse digestive et des réponses immunitaires muqueuses. Les effets de la flore sur la tolérance orale peuvent être déduits de la diminution de la tolérance orale à l'ingestion d'antigènes chez des animaux stériles et l'amélioration de cette même tolérance orale après contact avec des lipopolysaccharides bactériens (20). La flore intestinale échange donc des signaux réguliers avec les composants de l'épithélium intestinal. (21, 22) Les bases moléculaires de ces échanges ne sont actuellement pas parfaitement connues mais de nombreuses études sont en cours sur des peptides bactériens, des nucléotides bactériens, le lipopolysaccharide (LPS) les peptidoglycanes et quelques autres constituants bactériens.

B/ Rôle de protection, effet barrière

L'adaptation structurale de la muqueuse intestinale à l'absorption des nutriments, avec une seule couche d'entérocytes entourant une surface muqueuse de taille équivalente à celle d'un court de tennis, crée une vulnérabilité qui impose plusieurs lignes de défense, parmi lesquelles on retrouve la flore bactérienne. Les microorganismes de la flore colique sont responsables de « l'effet de barrière » colique (23,24). Aussi appelé « **résistance à la colonisation** », cet effet représente le pouvoir des bactéries commensales d'empêcher l'installation ou la prolifération de bactéries exogènes ou de bactéries endogènes potentiellement nocives (Figure 3).

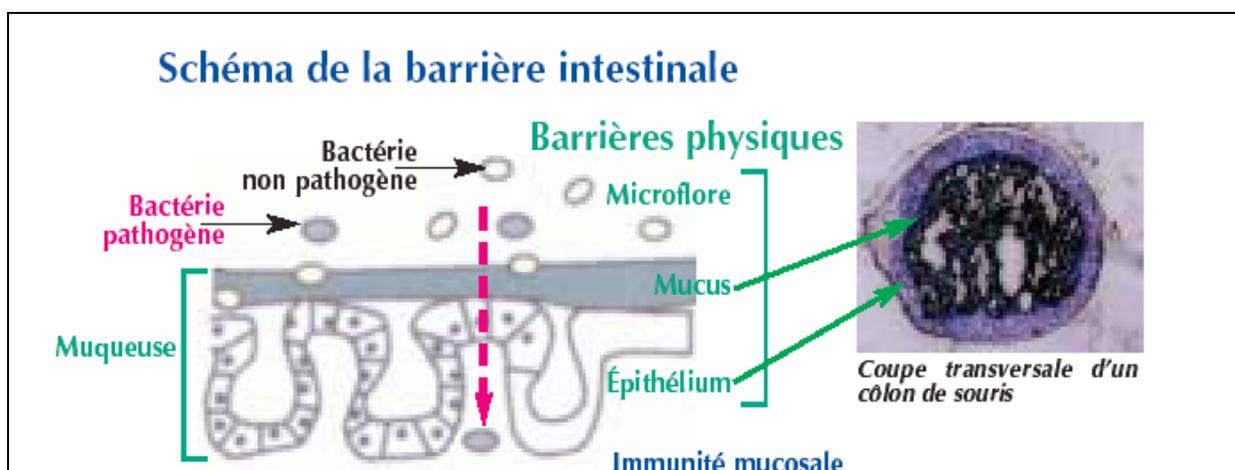


Figure 3 : Schéma de la barrière intestinale (25)

1/ Espèces bactériennes constituant la flore de barrière.

La flore de barrière se compose de différentes espèces bactériennes, réparties en flore dominante et en flore sous-dominante, la première contrôlant étroitement la croissance de la seconde (effet de barrière permissif). Par exemple, les bactéries anaérobies strictes limitent la prolifération des bactéries anaérobies facultatives. Ces bactéries, par leur simple présence mais aussi par leurs interactions avec la muqueuse intestinale, permettent d'éliminer les bactéries potentiellement dangereuses pour l'équilibre de l'ensemble (effet de barrière drastique). Cette barrière s'exerce contre la flore en transit, constituée d'espèces étrangères à la flore colique, mais aussi contre des souches différentes d'espèces présentes dans cette flore. Il semble que seules certaines espèces bactériennes, qui font toujours partie de la flore dominante, soient impliquées dans la fonction de barrière. Chez l'homme, il s'agirait notamment de souches de *Bacteroides*, de *Peptostreptococcus* et de *Clostridium*.

2/ Action par effets directs

La protection de la muqueuse par la flore met en jeu différents mécanismes, notamment des interactions compétitives entre les bactéries (compétition au niveau des substrats nutritifs ou pour des sites de liaison sur les parois de cellules de l'épithélium colique) et la production par ces bactéries de substances antimicrobiennes, les bactériocines. La capacité à synthétiser des bactériocines est largement distribuée à la plupart des communautés bactériennes colonisant le système digestif. L'hôte peut contrôler la production de ces substances puisque la plupart d'entre elles sont des composés protéiques dégradables par les protéases digestives. Le rôle des bactériocines est principalement réduit à des niches localisées du tube digestif.

3/ Action par effets indirects

La flore a également des effets indirects sur la défense de l'hôte, en amorçant la réponse immunitaire de la muqueuse et en maintenant cette réponse à un stade de réactivité modérée, toujours en alerte face à une éventuelle menace d'agression bactérienne. Ceci se reflète au niveau morphologique avec la présence d'un infiltrat diffus de cellules immunes effectrices à

l'intérieur de la muqueuse normale, qui compte pour la plus importante masse lymphoïde du corps humain et représente un état d'inflammation contrôlée physiologique.

4/ Immunité intestinale

Le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale représente le plus large tissu lymphoïde du corps humain (26). Il représente un élément majeur de la capacité immunologique totale de l'hôte. Différents événements de régulation de la réponse immunitaire se mettent en place dans les compartiments physiologiques du tube digestif : agrégation dans les follicules et les plaques de Peyer (Figure 4), distribution dans le mucus, l'épithélium intestinal et les sites de sécrétion (27).

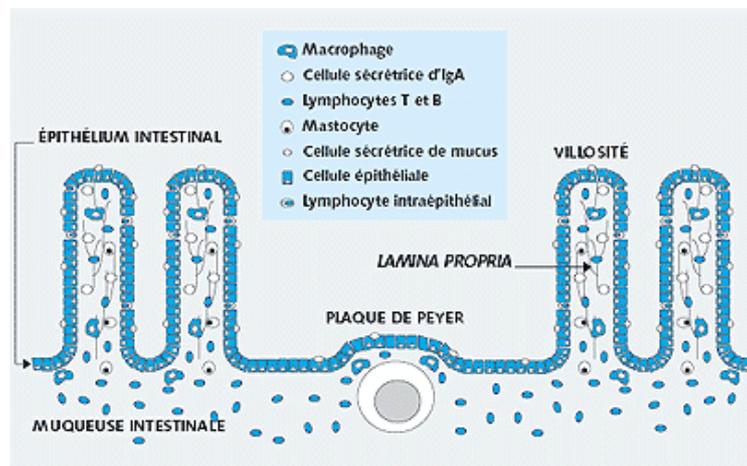


Figure 4 : Schéma d'une plaque de Peyer (28)

L'intestin est confronté à la présence d'antigènes alimentaires ou microbiens ainsi qu'à de nombreux changements de composition de la masse antigénique. La plupart de ces antigènes sont exclus par la barrière muqueuse intestinale (29). Une exclusion immune s'ajoute à cette première ligne de défense: des mécanismes spécialisés de transport des antigènes dans les villosités épithéliales (Figure 5 page 21). Les antigènes sont transportés à travers les couches épithéliales par transcytose. A ce niveau, les antigènes sont le plus souvent dégradés par les enzymes lysosomales. La seconde ligne de défense, l'élimination immune, est dirigée contre le renouvellement des antigènes ayant pénétré la muqueuse. En général, le transport des antigènes à travers cet épithélium est caractérisé par une capture rapide et un processus de dégradation. Les antigènes sont présentés aux cellules T sous-jacentes. Celles-ci se différencient en cellules effectrices, médiateurs actifs de la suppression immune (30). Après absorption, les antigènes sont transformés en une forme tolérée par le système immunitaire.

La diminution de la réponse immunitaire aux antigènes alimentaires est donc l’empreinte du système immunitaire intestinal.

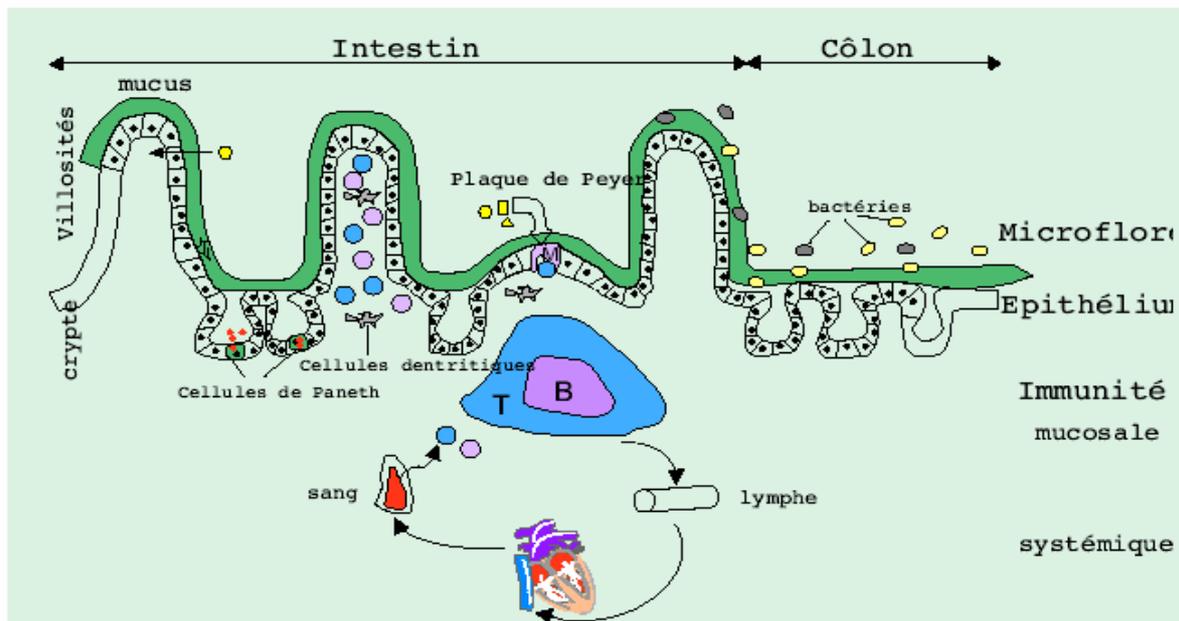


Figure 5 : Schéma : les défenses intestinales (31)

5/ Tolérance orale

Le type d’antigène, la voie d’entrée et la dose sont cruciaux dans l’induction de la réponse par les cellules T. L’établissement de la tolérance aux antigènes administrés par voie orale est dépendant de l’âge de l’hôte et de la période d’administration. Au moment de l’exposition aux antigènes, les cellules répondent par la libération de cytokines, induisant la réponse immunitaire. Chez un individu sain il existe un équilibre entre le maintien d’une immunité muqueuse de protection, incluant une réponse immunitaire efficace contre les antigènes potentiellement pathogènes et une diminution de la réponse immunitaire systémique vis-à-vis d’antigènes spécifiques comme ceux de l’alimentation. La tolérance orale est la diminution de la réponse immunitaire contre les antigènes rencontrés sur la voie entérique (30, 32).

C/ Fonctions métaboliques de la flore intestinale.

La plus grande partie des aliments ingérés est digérée dans l’estomac et le petit intestin, du fait des nombreuses enzymes digestives présentes à ces niveaux. Cependant, certains composés échappent à la digestion et sont métabolisés au niveau colique (17). L’efficacité de la digestion dans le petit intestin est influencée par plusieurs facteurs tels que le pH du

contenu luminal ou la présence de substrats compétitifs ou d'inhibiteurs enzymatiques. La motilité également, qui affecte le temps d'interaction entre substrats, enzymes et transporteurs est variable et influencée par différents facteurs tels que le stress et l'activité physique.

1/ Fermentation colique.

Une des principales fonctions métaboliques de la flore colique est la fermentation des résidus nutritifs non digérés. La diversité de la communauté bactérienne fait que la fermentation colique fait intervenir diverses enzymes et procédés biochimiques qui se distinguent des ressources constitutives de l'hôte. Les produits de cette activité métabolique complexe sont reconvertis en énergie métabolique et substrats disponibles pour l'hôte, le supplément étant utilisé pour la croissance et la prolifération bactérienne (17).

2/ Quantité d'aliments fermentés au niveau colique.

La quantité de substrats disponibles au niveau colique chez l'adulte est d'environ 20 à 60g de glucides et de 5 à 20g de protéines par jour. Normalement, les lipides sont digérés à 90-95% avant d'arriver au niveau colique, ce qui signifie que sur une quantité ingérée de 70g par jour, 3.5g entrent dans le côlon. Dans le caecum et le côlon droit, la fermentation par les bactéries est intense avec une forte production d'acides gras à chaîne courte, un pH acide (5-6), et une croissance bactérienne rapide. Au contraire, dans le côlon gauche ou côlon distal, le pH est quasiment neutre, les processus de putréfaction deviennent quantitativement moins importants et la croissance bactérienne beaucoup plus lente.

3/ Produits finaux de la fermentation colique.

Les microorganismes coliques jouent un rôle dans la synthèse de certaines vitamines, l'absorption du calcium et du magnésium. L'absorption des ions dans le caecum est augmentée par la fermentation des glucides et la production d'acides gras à chaîne courte, en particulier l'acétate, le propionate et le butyrate. Tous ces acides gras ont un rôle physiologique (33). Le butyrate est la première source d'énergie pour les cellules coliques. On retrouve l'acétate et le propionate au niveau du sang portal, le propionate est métabolisé au niveau hépatique tandis que l'acétate est utilisé par les tissus périphériques, en particulier les muscles. L'acétate et le propionate modulent le métabolisme du glucose : l'absorption de ces

acides gras à chaîne courte entraîne une diminution des réponses glycémiques après l'administration de glucose par voie orale avec une amélioration de la sensibilité à l'insuline.

4/ Les effets du métabolisme colique sur la santé et les désordres intestinaux.

Le tableau II donne un aperçu des processus métaboliques résultant des interactions entre la population bactérienne et les substrats présents au niveau colique. Ces processus peuvent avoir un effet bénéfique ou néfaste sur la santé de l'hôte.

Tableau II : Les effets du métabolisme colique sur la santé (17).

Processus métaboliques	Effets néfastes	Effets bénéfiques
Production de métabolites toxiques	Induction d'une diarrhée	
Production de substances osmotiquement actives	Induction d'une diarrhée	
Formation de sulfites	Induction d'une colite	
Formation d'agents toxiques	Induction d'un cancer colique	
Formation d'acides biliaires secondaires	Induction d'un cancer colique	
Formation d'acides gras hydroxylés et de diacylglycerol	Induction d'un cancer colique	
Formation de nitrites	Induction d'un cancer colique	
Formation d'acides gras à chaîne courte		Prévention du cancer colique Prolifération de colonocytes Contribution au métabolisme énergétique
Production de vitamines (B, K)		Amélioration de l'état vitaminique
Incorporation de l'azote et excréation fécale		Traitement de l'encéphalopathie hépatique
Incorporation des phosphates et excréation fécale		Traitement des troubles rénaux
Production de substances osmotiquement actives		Traitement de la constipation
Dégradation des oxalates		Prévention du développement des calculs rénaux
Conversion des acides biliaires en stérols neutres		Réduction des facteurs de risques cardiovasculaires
Conversion et résorption des phyto-oestrogènes		Rôle dans le cancer du sein et la fertilité

D/ Fonctions trophiques : croissance et différenciation des cellules épithéliales

Le principal rôle des Acides Gras à Chaîne Courte issus du métabolisme des glucides et des protéines par les bactéries constituant la flore colique est leur effet trophique sur l'épithélium intestinal. Le taux de production de cellules des cryptes est diminué dans le côlon de rats nourris dans des conditions stériles et les villosités contiennent moins de cellules que celles de rats colonisés par une flore conventionnelle, suggérant que les bactéries intestinales affectent la prolifération cellulaire dans le côlon. On a démontré *in vivo* que les Acides Gras à Chaîne Courte majeurs stimulent la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales dans le petit et dans le gros intestin. Cependant, *in vitro*, dans des études sur les lignées cellulaires épithéliales d'origine néoplasique, le butyrate inhibe la prolifération cellulaire et stimule la différenciation cellulaire (Tableau III).

Tableau III : Principales fonctions physiologiques des bactéries indigènes de l'intestin humain (34).

Modifications du contenu de l'intestin	<ul style="list-style-type: none"> - pH, accroissement du potentiel redox - production de métabolites (vitamines, enzymes digestives...) - réduction des métabolites (urée, cholestérol, triglycérides...)
Modifications anatomiques du tube digestif	<ul style="list-style-type: none"> - réduction du volume caecal - accroissement du taux de renouvellement des entérocytes - réduction de la morphométrie des villosités
Modification du fonctionnement digestif	<ul style="list-style-type: none"> - accélération du transit gastrique et intestinal - accroissement de l'absorption des composants abiotiques
Amélioration de la résistance aux infections gastrointestinales	<ul style="list-style-type: none"> - effet de barrière - modulation de la sécrétion des toxines dans l'intestin
Stimulation des fonctions immunitaires	

VI/ METHODES DE CARACTERISATION (35)

A/ Méthodes utilisées

Les connaissances actuelles des microflores digestives sont basées sur des méthodes en pleine mutation, qui combinent la microscopie, la culture sur milieux spécifiques et les analyses moléculaires directes. La culture sur milieux spécifiques a plusieurs limites. De nombreuses espèces bactériennes de la flore intestinale ou fécale ne sont pas cultivables dans les conditions habituelles. Des méthodes alternatives, indépendantes de la culture, ont donc été mises au point pour améliorer la détection et l'identification des micro-organismes. Elles sont basées sur la détection moléculaire du gène codant pour l'ARNr 16S. L'amplification par la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) du gène de l'ARNr 16S directement à partir des colonies, suivie d'une analyse de la séquence, permet une caractérisation phylogénétique précise de la souche correspondante. L'application d'une telle méthode, mais directement à un ADN fécal total, a permis, après clonage, d'inventorier la diversité d'espèces dominantes d'un échantillon intestinal sans passer par aucune étape de culture. De plus, la variabilité des séquences d'ADNr ainsi obtenues a été mise à profit pour développer des sondes spécifiques pour détecter différents groupes de bactéries (grands assemblages, genres, espèces) directement dans les échantillons fécaux par PCR quantitative ou par hybridation quantitative soit sur des acides nucléiques, soit sur des cellules bactériennes fixées par hybridation *in situ* fluorescente (FISH). Ces méthodes ne nécessitant pas de culture, ont été validées pour de nombreux groupes bactériens, genres et espèces. Néanmoins, les méthodes moléculaires ont leurs limites :

- Elles sont peu sensibles : si elles permettent d'avoir une vision plus exacte des bactéries présentes, elles ne s'appliquent qu'aux populations les plus représentées dans les échantillons étudiés. Par exemple dans les selles où les bactéries atteignent des niveaux de populations de 10^{11} bactéries par gramme, les techniques d'hybridation renseignent sur la composition des populations présentes à 10^9 bactéries par gramme ou plus et les techniques basées sur des PCR spécifiques peuvent renseigner sur des espèces présentes à 10^6 bactéries par gramme ou plus.
- Elles sont sujettes à des biais : les étapes d'extraction d'acides nucléiques, d'amplification de gènes par PCR ou de fixation des cellules pour l'hybridation sont autant d'étapes qui peuvent biaiser les populations.

- Les mesures sont le plus souvent exprimées en valeur relative (pourcentage d'ARN ou pourcentage de bactéries totales) alors que les techniques classiques donnent une mesure absolue du nombre de micro-organismes ou d'unités formant colonies par gramme.
- Elles n'informent pas sur le rôle des micro-organismes *in situ*. L'utilisation de l'ARNr comme cible moléculaire informe sur l'identité phylogénétique des micro-organismes mais pas sur leur physiologie probable dans le contexte digestif. Il en découle que les méthodes moléculaires ne remplacent pas l'approche classique basée sur la culture pour l'identification des micro-organismes et la description formelle d'espèces nouvelles. Cela souligne l'intérêt de coupler les approches moléculaire et classique. Enfin la quantification des populations microbiennes totales passe idéalement par un dénombrement en microscopie des bactéries que l'on peut marquer par hybridation fluorescente à l'aide d'une sonde universelle ciblant l'ARNr.

Les principaux groupes à analyser sont les groupes typiquement dominants dans la microflore fécale de l'homme sain adulte (*Bacteroides* et genres apparentés, *Clostridium leptum* et espèces apparentées, *Clostridium coccoïdes* et espèces apparentées) ainsi que des groupes que l'on retrouvera fréquemment et en proportions potentiellement plus élevées chez le nouveau-né mais moins prévalents chez l'adulte (bifidobactéries, *Atopobium* et apparentés, entérobactéries, lactobacilles, streptocoques et entérocoques). Les sondes d'hybridation sont disponibles pour tous ces groupes tandis que les milieux sélectifs ne sont pas toujours disponibles ou satisfaisants.

B/ Modèles d'études expérimentaux

Les rongeurs élevés en conditions stériles et sans flore intestinale possèdent des caractéristiques différentes de celles des rongeurs conventionnels (1). Au niveau morphologique, on note une diminution de la taille du caecum, du poids de la paroi intestinale, de la surface de la muqueuse intestinale, des villosités intestinales, de la *lamina propria*, de la taille du foie et du cœur ainsi qu'une diminution du volume sanguin. En ce qui concerne les caractéristiques physiologiques et biochimiques, on observe une diminution de la motilité intestinale (augmentation du temps de transit), une diminution du temps de renouvellement des cellules épithéliales composant les villosités, une altération des enzymes du mucus (augmentation de la trypsine, diminution de la β -glucuronidase), une diminution du

pH du contenu intestinal, une augmentation des taux d'oxygène (potentiels oxydoréducteurs plus forts), une diminution du métabolisme basal, une diminution du rendement cardiaque, une diminution de la perfusion sanguine de certains organes (intestin, foie), une diminution de la synthèse de vitamines K et B, pas de transformation des acides biliaires au niveau intestinal, un manque d'acide gras à chaîne courte et de coprostanol. D'un point de vue immunologique, on note une diminution de la taille de la rate, de la taille des plaques de Peyer, des taux de gamma-globulines sériques, une diminution du nombre de lymphocytes producteurs d'IgA dans la *lamina propria*, une diminution du nombre de cellules T intra-épithéliales, une diminution de la réponse inflammatoire et un retard de la réponse immunitaire après présentation antigénique (1).

Il est difficile d'imaginer des modèles expérimentaux significatifs pour représenter les interactions complexes existant entre les bactéries composant la flore commensale et l'hôte. Les animaux élevés en conditions stériles représentent un « tube digestif test vivant », pouvant être colonisé par une ou plusieurs espèces bactériennes, permettant ainsi l'étude des interactions entre l'hôte et cette flore simplifiée. Les animaux élevés en conditions stériles sont des animaux mis au monde par césarienne dans des isolateurs en film plastique stériles, et maintenus à l'écart de tout microorganisme, bactéries, champignons, protozoaires, virus ou toute autre forme de vie. L'inoculation de microorganismes à ces animaux est appelée colonisation ou association, alors que la contamination est l'introduction accidentelle de microorganismes non désirés. Les animaux peuvent être « monoassociés », avec une seule bactérie, ou « polyassociés », avec plusieurs microorganismes. L'association ou colonisation implique que les microorganismes vont pouvoir survivre dans le tube digestif de l'animal sans nécessité de ré-inoculation ultérieure. Les animaux initialement stériles colonisés par des espèces prédéterminées de microorganismes connus sont appelés « gnotobiotiques », ce qui signifie « la vie connue ».

Un animal initialement stérile colonisé avec plusieurs microorganismes, ou même avec la flore intestinale complète, ne peut plus être considéré comme un animal conventionnel. En effet, le manque d'influence de la flore intestinale indigène (immunologique, biochimique, physiologique...) pendant la période précédant l'introduction de la flore à l'animal ne pourra pas être « rattrapé ». Un animal gnotobiotique colonisé avec seulement quelques espèces de bactéries indigènes est donc un modèle artificiel. Cependant, les comparaisons effectuées entre les animaux non colonisés et les animaux conventionnels ont révélé d'importants effets

de la flore sur l'hôte. Ces modèles gnotobiotiques ont donc déterminé certaines bases écologiques du milieu intestinal.

Dans le but d'obtenir un modèle plus facile à manipuler que les animaux conventionnels ou gnotobiotiques, les études sur les relations entre la flore et l'hôte ont également fait intervenir des « cultures anaérobies continues *in vitro* » inoculées avec la totalité de la flore cécale de la souris. Effet étonnant, ces cultures reproduisent les nombreuses relations répertoriées *in vivo* dans la flore gastro-intestinale de l'homme. Par exemple, différents types de bactéries indigènes atteignent des zones du caecum ou du côlon présentant les mêmes propriétés que leur milieu de culture (1). Ces études démontrent que les niveaux de population des bactéries indigènes sont principalement contrôlés par les compétitions métaboliques existant entre elles.

VII/ VARIATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES

A/ Généralités, stabilité apparente de la flore

La flore permanente varie peu chez un individu adulte en bonne santé, notamment en raison des phénomènes de compétition et d'antagonisme qui s'opposent à l'établissement de nouveaux venus (pathogènes ou non). Sa composition est toutefois modifiée par les infections et par la prise d'antibiotiques. D'autres causes peuvent la déstabiliser, notamment une modification du régime alimentaire ou le vieillissement (diminution de la concentration des *Bifidobacterium* chez les personnes âgées). Ces perturbations entraînent d'ordinaire un accroissement de la population des anaérobies strictes et des *E. coli* dans l'intestin grêle, des *Enterobacteriaceae* et des *Streptococcus* dans le côlon.

B/ Modifications de la composition de la flore avec l'âge

Il a été rapporté des variations dans la répartition de la flore bactérienne avec l'âge. Chez les enfants, on retrouve le plus fréquemment les souches appartenant aux genres *Enterobacter* et *Klebsiella*, de même que *B. longum*, alors que des espèces appartenant aux genres *Proteus* ou *Providencia* aussi bien que *B. adolescentis* se retrouvent le plus souvent chez les personnes âgées. On possède actuellement peu de connaissances sur l'influence de l'âge sur la composition de la population bactérienne du tube digestif. Il a été rapporté une diminution des

Bifidobacteria et *Bacteroides*, ainsi qu'une augmentation des *Clostridia*, *Lactobacilli*, *Streptococci* et *Enterobacteriaceae* (36,37). De plus, certaines méthodes d'analyse moléculaire ont mis en évidence une augmentation de la diversité de la flore bactérienne avec l'âge. A l'heure actuelle, on a étudié 50% de la flore bactérienne des sujets âgés contre 80% de celle des adultes sains. Les résultats obtenus avec les différentes méthodes moléculaires actuellement disponibles ont révélé que le nombre d'espèces composant la flore dominante fécale augmente avec l'âge, de 15 espèces pour les enfants à plus de 150 pour les seniors. Plus que la diversification de la flore avec l'âge, il faut souligner la présence dans la flore des personnes âgées de souches bactériennes non encore identifiées, du fait de l'impossibilité de les cultiver par les méthodes actuelles. Les causes des variations de la flore avec l'âge ne sont pour l'instant pas claires. Des changements physiologiques et immunologiques sont observés chez la personne âgée. Il a été suggéré que certaines souches bactériennes profitaient de nouvelles niches écologiques pour proliférer, induisant ainsi une modification de la composition de la flore. Une diminution de l'adhésion à la muqueuse peut également être une hypothèse de la diminution de la colonisation par *Bifidobacteria* chez certains sujets âgés.

C/ Rôles joués par la flore dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

La flore intestinale est indispensable mais peut également être un responsable potentiel de troubles, dépendants d'une susceptibilité génétique et d'autres facteurs liés à l'hôte. Que la composition de la flore digestive soit sous influence génétique explique la complexité des interactions entre la flore et l'hôte (38). En outre, distinguer une souche pathogène d'une souche commensale non pathogène devient difficile quand il s'agit d'expliquer la susceptibilité de l'hôte aux troubles gastro-intestinaux et aux circonstances environnementales. *H. pylori*, associé à l'acidité gastrique et à d'autres facteurs liés à l'hôte est un exemple du rôle des bactéries commensales dans la pathogénie des états inflammatoires des muqueuses et des néoplasies. Les relations complexes entre la flore bactérienne intestinale, la susceptibilité génétique et la réponse de l'hôte étayent les concepts actuels sur la pathogénie de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse (39,40). Bien que les progrès sur les maladies inflammatoires intestinales aient été retardés par le manque de connaissances sur la composition et les fonctions de la flore intestinale, il y a eu de réelles avancées ces dix dernières années. Les mécanismes et les médiateurs intervenant dans les lésions tissulaires

associées à ces maladies sont actuellement partiellement élucidés. *M. paratuberculosis*, préalablement mis en cause dans la pathogénie de la maladie de Crohn a été ensuite écarté. Bien que des changements de type qualitatif aient été décrits chez des patients souffrant de maladies inflammatoires intestinales, les différents résultats obtenus sont inconsistants ou contradictoires. Plusieurs souches d'*E. coli* ont été retrouvées dans la muqueuse iléale de patients souffrant de maladie de Crohn par un groupe d'investigateurs (41) mais pas par un autre (42). Récemment, une nouvelle séquence bactérienne a été associée aux lésions observées chez les patients souffrant de maladie de Crohn (43). Ceci requiert une confirmation. D'après la plupart des résultats expérimentaux, il paraît plus probable que les lésions tissulaires résultent d'une réaction immunitaire anormale par rapport à la flore normale chez un individu ayant une susceptibilité génétique plutôt que d'une réaction immunitaire dirigée contre un pathogène spécifique. Cependant, cette dernière hypothèse ne peut pas être écartée (39). Plusieurs arguments permettent d'impliquer la flore intestinale dans les maladies inflammatoires intestinales :

- Les lésions apparaissent dans les régions de l'intestin où les concentrations bactériennes sont les plus importantes.
- La déviation du trajet d'émission des fèces chez les patients atteints de maladie de Crohn a un effet bénéfique sur les troubles distaux.
- Ces troubles réapparaissent après restauration de la continuité de l'émission (44,45).
- La relation entre la récurrence des troubles et le contact direct avec le contenu luminal a été montré directement (46,47).

Par ailleurs, les études sur les réponses lymphocytaires vis-à-vis des bactéries autologues ou hétérologues ont indiqué une diminution de la tolérance immunologique à la flore entérique chez des patients souffrant de maladies inflammatoires intestinales et sur des modèles expérimentaux d'entéocolites (48,49). De plus, les modèles animaux ont montré que les gènes, les bactéries et les cellules T sont des paramètres essentiels à la pathogénie des maladies inflammatoires intestinales. Sans tenir compte d'une éventuelle déficience génétique sous-jacente, la colonisation par les bactéries intestinales est essentielle pour l'expression de l'inflammation intestinale, médiée par les cellules T (50,51). Les espèces présentes dans la flore de l'hôte possèdent une capacité variable d'induction de maladie inflammatoire intestinale. Certaines d'entre elles, comme celles appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, n'ont apparemment pas de capacité pro-inflammatoire.

D/ Impact de l'hospitalisation sur la flore intestinale

L'hospitalisation est incriminée dans le changement de la flore microbienne normale (16). L'hospitalisation, même sans traitement antibiotique préalable, produit des changements dans la microflore bactérienne intestinale normale (51). Chez des nouveaux-nés hospitalisés, la colonisation par *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, aussi bien que par *E. coli* apparaît plus fréquemment que chez des nouveaux-nés non hospitalisés. Un délai dans la colonisation par *Bifidobacterium*, la prédominance de *Bacteroides*, et une augmentation de l'incidence des espèces de *Clostridium*, notamment de *C. perfringens* ont été observés.

E/ La prise d'antibiotiques

La rupture de l'équilibre écologique du tube digestif apparaît souvent quand les patients reçoivent des antibiotiques par voie orale, du fait que le traitement antibiotique élimine habituellement seulement une portion de la totalité des bactéries indigènes du tube digestif. Les bactéries survivantes peuvent alors proliférer et coloniser l'intestin provoquant le plus souvent des diarrhées. Ces bactéries peuvent quelquefois traverser la barrière épithéliale intestinale et causer des infections dans des sites extra-intestinaux ou des septicémies létales. La rupture de l'équilibre de la microflore bactérienne intestinale diminue également la capacité intestinale de résistance à la colonisation, autorisant l'établissement de bactéries exogènes plus pathogènes.

PARTIE II : LES EFFETS DES ANTIBIOTIQUES SUR LA FLORE INTESTINALE

I/ GENERALITES SUR LES DIARRHEES ASSOCIEES AUX ANTIBIOTIQUES

A/ Evolution de la consommation d'antibiotiques en France.

Actuellement, la consommation d'antibiotiques en France est d'environ un traitement par personne et par an hors hôpital (52). Si l'on considère que chaque cure représente approximativement 10g de produit, on peut donc estimer la consommation médicale à 500 tonnes d'antibiotiques par an en France. Une étude publiée en 1998 (53) montre que dans notre pays l'augmentation de la consommation annuelle d'antibiotiques au cours de la décennie 1980 a été de 3.7% par an (Tableau IV). La progression des bêtalactamines a atteint 9.3% par an. Cette surconsommation d'antibiotiques pose trois problèmes :

- le coût pour la collectivité
- le développement de résistances
- les effets secondaires attribués aux antibiotiques (allergies, troubles digestifs...)

Tableau IV : Evolution de la consommation d'antibiotiques dans la population générale en France (en pourcentage de sujets)

Période	Nombre de sujets	Toutes familles confondues (%)	Bêtalactamines (% de l'ensemble)
1980-1981	20 072	17.1	5.9
1991-1992	21 441	25.4	16.0
Augmentation (% par an)		3.7	9.3

B/ Effet secondaire majeur : la diarrhée associée aux antibiotiques.

La diarrhée post-antibiothérapie est un phénomène fréquent (54). Le plus souvent cette diarrhée est bénigne, de mécanisme présumé fonctionnel et peut être considérée comme un effet secondaire du traitement. Plus rarement, la diarrhée révèle une infection intestinale favorisée par l'antibiothérapie (55). Dans ce contexte, la colite pseudomembraneuse représente le tableau clinique le plus évocateur mais il existe cependant des formes cliniques moins graves.

C/ Etiologie des diarrhées associées aux antibiotiques.

La pathogénie des diarrhées associées aux antibiotiques n'est pas parfaitement connue. Certaines souches bactériennes peuvent être responsables de diarrhée par leur simple prolifération (*Clostridium difficile*, *Klebsiella oxytoca*). Dans certains cas, on évoque la toxicité de produits pour la muqueuse intestinale (amoxicilline/acide clavulanique, clindamycine). Le rôle de germes opportunistes comme *Candida albicans* a été lui aussi mis en avant.

D/ Définition de la diarrhée associée aux antibiotiques.

Au plan anatomo-clinique, on considère la diarrhée banale, caractérisée par trois à cinq selles quotidiennes survenant quelques jours après le début du traitement, qui correspond à de simples perturbations fonctionnelles digestives ou encore à des infections mineures à *Clostridium difficile*, sans lésion de colite associée. Au contraire, les colites pseudomembraneuses sont des formes sévères de diarrhée, compliquées d'une atteinte colique organique liée à l'action conjuguée de deux toxines pathogènes (A et B) produites par cette bactérie. Chez les patients hospitalisés, la diarrhée associée aux antibiotiques est à l'origine d'une augmentation de la mortalité, de la durée d'hospitalisation et du coût de la prise en charge médicale (53).

E/ Facteurs de risques de la diarrhée associée aux antibiotiques

Les facteurs de risque des diarrhées associées aux antibiotiques peuvent être regroupés en deux catégories : ceux liés à l'antibiothérapie et ceux liés à l'hôte (56,57). Ils sont résumés dans le Tableau V.

Tableau V : Facteurs de risques des diarrhées associées aux antibiotiques (58).

Facteurs liés à l'antibiothérapie	Facteurs liés à l'hôte
Antibiotiques à large spectre <ul style="list-style-type: none">- amoxicilline- amoxicilline /acide clavulanique- céphalosporines de 2^e et 3^e génération- clindamycine	Agés extrêmes de la vie <ul style="list-style-type: none">- < 6 ans- > 65 ans
Durée de l'antibiothérapie <ul style="list-style-type: none">- traitements longs- traitements répétés	Terrain : <ul style="list-style-type: none">- antécédents de diarrhées associées aux antibiotiques- maladie sous-jacente sévère- affections digestives chroniques- comorbidité- immunodépression
Utilisation de plusieurs antibiotiques	Hospitalisation <ul style="list-style-type: none">- durée du séjour- chirurgie- interventions gastrointestinales- alimentation par sonde nasogastrique
Antibiotiques d'excrétion biliaire	

1/ Liés à l'hôte.

L'âge est un facteur de risque significatif de diarrhée associée aux antibiotiques, puisque leur fréquence varie selon une courbe en « U », avec un taux plus élevé chez les enfants de moins de six ans et chez les personnes âgées de plus de 65 ans (59). Les diarrhées semblent plus fréquentes avec l'ampicilline chez les enfants (60) et avec les céphalosporines chez les sujets

âgés (61). Les études réalisées à ce jour n'ont pas montré de différence significative entre hommes et femmes dans la survenue de diarrhée associée aux antibiotiques.

Les **affections digestives chroniques** sont également mises en cause. Le rôle favorisant des maladies inflammatoires de l'intestin et du côlon n'a pas été formellement démontré mais une diarrhée post-antibiotique est fréquemment observée chez ces patients (58).

Le **statut immunitaire** peut jouer un rôle dans la survenue d'une diarrhée post-antibiotique ou d'une colite pseudomembraneuse mais cela reste à préciser. Une diarrhée à *Candida albicans* est observée chez les patients immunodéprimés. L'efficacité d'un traitement par immunoglobulines dans les colites pseudomembraneuses pouvant plaider en faveur du rôle joué par le système immunitaire, n'a pas été prouvée (59).

La **durée d'hospitalisation** constitue un facteur de risque significatif. Dans les études contrôlées, la durée d'hospitalisation est habituellement plus longue chez les patients présentant une diarrhée post-antibiotique. Une contamination nosocomiale, les antibiothérapies multiples et répétées, les gestes médicaux et chirurgicaux sont généralement en cause. La fréquence des diarrhées associées aux antibiotiques varie également en fonction des disciplines médicales et des services de chaque hôpital.

Le rôle causal de **l'alimentation** par sonde digestive est sujet à caution dans la mesure où la fréquence des diarrhées suite à l'utilisation de cette technique varie selon les études de 2 à 68% (58).

La **rupture de l'intégrité du tube digestif** et les perturbations de la flore colique liées à la chirurgie sont fréquemment citées comme facteurs de risque de diarrhée post-antibiothérapie (62). Néanmoins, le rôle causal de la chirurgie doit être envisagé avec prudence dans la mesure où une antibiothérapie est fréquemment associée à la chirurgie.

2/ Liés à l'antibiothérapie.

L'incidence des diarrhées associées aux antibiotiques varie en fonction de l'antibiotique prescrit. Les traitements par des céphalosporines, la clindamycine ou les pénicillines à large spectre sont associés à une augmentation de la fréquence d'apparition des diarrhées associées aux antibiotiques : 5 à 10% pour l'ampicilline, 10 à 25% pour l'association amoxicilline-acide clavulanique, 15 à 20% pour les céphalosporines de 3^{ème} génération, 2 à 5% pour les

fluoroquinolones, les macrolides et les tétracyclines (58). Si les diarrhées associées aux antibiotiques sont le plus souvent observées après des traitements par lincosamides et bêtalactamines, elles peuvent compliquer la prise de tout antibiotique. La dose totale et la voie d'administration n'ont pas d'influence significative sur la fréquence des diarrhées associées aux antibiotiques, mais le nombre d'antibiotiques prescrits et la durée de l'antibiothérapie augmentent nettement le risque de survenue de diarrhée (63). Logiquement, plus le spectre de l'antibiotique est large, plus la flore sera détruite.

F/ Les différentes formes cliniques.

1/ Les diarrhées simples.

Elles sont de loin les plus fréquentes, surviennent quelques jours après le début du traitement par amino-pénicillines ou céphalosporines, mais parfois après l'arrêt des antibiotiques. La symptomatologie se résume à une diarrhée modérée, parfois accompagnée de douleurs abdominales voire de fièvre. L'endoscopie n'est pas indiquée. Si elle était réalisée, elle montrerait une muqueuse habituellement normale ou une muqueuse simplement congestive, fragile, voire pétéchiale ou ecchymotique. Les études épidémiologiques ont montré que *Clostridium difficile* était l'agent le plus fréquemment identifié, et aurait une responsabilité probable dans 20 à 30% des diarrhées post-antibiotiques sans pseudomembrane (55, 64). Par ailleurs, *C. difficile* a été retrouvé dans les selles de patients recevant des antibiotiques et ne présentant pas de diarrhée (65).

2/ La colite aiguë hémorragique.

Elle est plus rare et survient entre deux et sept jours après le début du traitement par bêtalactamines ou pristinamycine (66). Le tableau est bruyant, associant diarrhée sanglante, douleurs abdominales sans fièvre avec une évolution rapidement favorable en quelques jours à l'arrêt du traitement. L'endoscopie montre une atteinte continue segmentaire, prédominant sur le côlon droit, épargnant en règle générale le côlon gauche et toujours le rectum. La muqueuse est hémorragique, parfois ulcérée, mais il n'y a pas de fausse membrane. *Klebsiella oxytoca* est souvent retrouvée sur les coprocultures (67).

3/ La colite pseudomembraneuse.

Elle est la forme la plus sévère des diarrhées post-antibiotiques, due à la prolifération *in situ* de *C. difficile* (68,69). La diarrhée débute habituellement entre le quatrième et le neuvième jour après le début du traitement, mais peut survenir jusque dans les six semaines suivant son interruption. Tous les antibiotiques à l'exception des aminosides par voie injectable peuvent être en cause, avec un risque variable selon les antibiotiques. Elle est typiquement faite de trois à huit selles liquides par jour, une fièvre modérée présente dans $\frac{3}{4}$ des cas étant un bon élément clinique d'orientation. A l'examen histologique des biopsies coliques, il existe une nécrose de l'épithélium superficiel, associée à un exsudat fibrinoleucocytaire discret.

G/ Mécanismes physiopathologiques des diarrhées associées aux antibiotiques.

Les antibiotiques modifient la flore dominante normale, ce qui a pour effet (54) :

- de détruire l'effet barrière
- d'altérer l'activité métabolique normale de la flore colique
- de permettre l'émergence et le développement de bactéries endogènes ou exogènes naturellement résistantes à l'antibiotique prescrit.

Les mécanismes des diarrhées sont multiples, parfois associés.

1/ Diarrhée par destruction de l'effet barrière.

Par leur action sur la flore intestinale, les antibiotiques entraînent la destruction des effets de barrière. Une étude (70) montre l'évolution du nombre de *Pseudomonas* par gramme de fèces après l'introduction d'une décontamination intestinale par l'association de bacitracine, de néomycine et de streptomycine. Relativement faible avant le début de la décontamination (de l'ordre de $10^5/g$), le nombre de *Pseudomonas* est multiplié par 10^4 à 10^5 dès le dixième jour du traitement. Le retour à l'état antérieur intervient en une dizaine de jours après l'arrêt du traitement. Cette augmentation considérable des bactéries intestinales potentiellement pathogènes à Gram négatif peut avoir des conséquences individuelles très graves chez les sujets immunodéprimés ou neutropéniques, du fait du risque élevé de translocation et de bactériémie. De plus, elle augmente le risque de dissémination à d'autres malades.

2/ Diarrhées métaboliques par modification de la flore digestive.

Les DAA sont le plus souvent la conséquence d'un déséquilibre de la flore digestive entraînant une réduction du métabolisme des glucides et des sels biliaires par les bactéries anaérobies digestives. La réduction de la fermentation des glucides non digérés par la flore colique conduit à une diminution de la synthèse des acides gras à chaîne courte (AGCC). Comme ces AGCC favorisent l'absorption hydroélectrolytique par la muqueuse colique, la réduction de leur production entraîne la survenue de diarrhées hydrosodées. En outre, l'accumulation de glucides dans le côlon s'accompagne de diarrhées osmotiques. Les sels biliaires, qui ne sont plus déconjugués, ni déhydroxylés par les bactéries anaérobies de la flore digestive, peuvent stimuler la sécrétion colique et provoquer des diarrhées sécrétoires. Ces diarrhées métaboliques par modification de la flore digestive sont le plus souvent bénignes et régressent à l'arrêt de l'antibiothérapie. Ce sont les antibiotiques à large spectre, actifs sur les bactéries anaérobies, qui sont les principaux pourvoyeurs de DAA.

3/ Diarrhées infectieuses par prolifération d'agents bactériens, cause des diarrhées post-antibiothérapie.

Deux mécanismes sont à l'origine de la prolifération d'agents bactériens :

- La multiplication bactérienne : les lésions intestinales résultent de l'envahissement bactérien de la paroi colique. Deux germes saprophytes fréquents de la flore fécale sont le plus souvent rencontrés. *Klebsiella oxytoca* est souvent isolé dans la muqueuse colique et/ou les selles des patients recevant des bêtalactamines ou de la pristinamycine et présentant une colite hémorragique. *K. oxytoca* est un germe naturellement résistant à certaines bêtalactamines et peut donc proliférer sous traitement. *Candida albicans* peut être impliqué dans les diarrhées sévères, chez des sujets hospitalisés sous antibiotiques.
- La production de toxine : le germe lui-même n'est pas invasif, les lésions intestinales sont liées à l'action d'entérotoxines. *C. difficile* est la cause de la quasi totalité des colites pseudomembraneuses associées au traitement antibiotique. Son rôle pathogène est dû à l'action de deux toxines (toxines A et B). Chez un malade ayant une diarrhée, la mise en évidence du germe est insuffisante pour affirmer la responsabilité de *C. difficile*. Celle-ci repose sur la détection de la toxine dans les selles.

II/ DIARRHEES LIEES A LA TOXICITE DES PRODUITS POUR LA MUQUEUSE INTESTINALE

A/ Erythromycine et motilité intestinale

L'érythromycine et d'autres macrolides reproduisent les effets de la motiline sur l'activité contractile gastro-intestinale. La motiline, peptide linéaire de 22 acides aminés, est présent tout le long du tube digestif, mais surtout au niveau de la muqueuse antro-duodénale. Les effets secondaires de l'érythromycine (nausées, diarrhées, douleurs abdominales, vomissements) avaient déjà été constatés chez l'homme, mais faussement rapportés à une éventuelle action sur la flore microbienne digestive. Ils sont en réalité provoqués par l'action de l'érythromycine sur les centres bulbaires et paraissent être dose-dépendants. Ils sont retrouvés chez environ 50% des patients traités par voie orale à forte dose. Il n'y a pas de parenté structurale entre les dérivés de l'érythromycine et la motiline mais des ressemblances existent dans l'organisation spatiale au niveau du site actif et peuvent expliquer des interactions avec des récepteurs identiques. La motiline et l'érythromycine semblent agir à deux niveaux différents mais probablement complémentaires. La première voie, neurogène indirecte, passe par la libération d'acétylcholine au niveau des fibres post-ganglionnaires cholinergiques en faisant intervenir des récepteurs 5HT₃. La deuxième est une voie myogène directe avec fixation sur des récepteurs spécifiques au niveau de la cellule musculaire lisse et activation d'une protéine G stimulant elle-même une phospholipase C qui aboutit à la formation d'inositol triphosphate. Ce dernier entraîne l'ouverture des canaux calciques au niveau du reticulum endoplasmique, la libération de calcium intracellulaire et par là, une contraction musculaire.

B/ Majoration du péristaltisme de l'intestin grêle par l'association amoxicilline-acide clavulanique

L'association amoxicilline-acide clavulanique (AUGMENTIN[®]), l'un des antibiotiques les plus fréquemment utilisés, induit fréquemment des troubles gastro-intestinaux tels que des nausées, des vomissements ou des crampes abdominales (prévalence de 3 à 6%) ou des diarrhées (prévalence de 4 à 15%). Ces taux de prévalence sont supérieurs à ceux relevés avec les autres β -lactamines administrées par voie orale. Comme pour les autres antibiotiques à large spectre, la perturbation de la flore intestinale a été incriminée. Il semble cependant

que cette perturbation ne soit pas la seule en cause dans les effets secondaires observés avec l'association amoxicilline-acide clavulanique. C'est pourquoi une étude a testé la motilité intestinale chez des volontaires sains recevant de l' AUGMENTIN® à la dose de 1g/250mg deux fois par jour pendant trois jours (71). Les résultats de cette étude indiquent que l'association amoxicilline-acide clavulanique administrée par voie orale aux doses thérapeutiques modifie de façon significative la motilité duodeno-jejunale chez tous les sujets traités. Le mécanisme pathogénique de cette augmentation de la motilité intestinale au niveau duodeno-jejunal reste incertain à l'heure actuelle. Deux hypothèses sont émises :

- La perturbation de la motilité intestinale pourrait être due à la libération d'un médiateur intestinal tel que la motiline, comme pour les macrolides
- Par ailleurs, les β -lactamines interagissent directement avec les récepteurs au GABA post-synaptiques du système nerveux central. Un effet direct similaire de l'association amoxicilline-acide clavulanique au niveau du tube digestif pourrait être évoqué, puisque la présence de récepteurs au GABA a été décrite au niveau du plexus mésentérique.

Cependant, à l'heure actuelle, il n'a pas été démontré de corrélation individuelle entre les changements de motilité intestinale et l'apparition d'effets secondaires à la prise d'AUGMENTIN®.

III/ DIARRHEES LIEES A L'IMPLANTATION DE SOUCHES EXOGENES

A/ *Staphylococcus aureus*

La responsabilité de *Staphylococcus aureus* (Figure 6) en tant qu'agent étiologique des diarrhées associées aux antibiotiques et des colites pseudomembraneuses a été évoquée dès 1950 car la bactérie a été isolée de façon prédominante dans les selles des patients présentant des diarrhées survenues après une antibiothérapie (57). Par la suite, son rôle a été contesté, notamment en l'absence de modèle animal. A partir de 1990, la responsabilité de *S. aureus* dans certaines diarrhées post-chirurgicales et post-antibiotiques a été évoquée à nouveau ; ces souches de *S. aureus* sont presque toujours méticilline-résistantes et produisent une entérotoxine A et une leucotoxine LukE-LukD qui expérimentalement dégrade l'épithélium

intestinal. Les diarrhées à *S. aureus* surviennent essentiellement après la prescription de fluoroquinolones associées ou non à d'autres molécules anti-infectieuses. Elles entraînent un déséquilibre de la flore digestive et permettent la sélection de *S. aureus* résistants à la méticilline, retrouvés dans la majorité des diarrhées à *S. aureus* post-antibiotiques.



Figure 6 : Photo de *Staphylococcus aureus* en microscopie électronique (73)

B/ *Klebsiella oxytoca*

Klebsiella oxytoca provoque des colites hémorragiques chez des patients traités par pénicillines. Les symptômes, à type de crampes abdominales et de diarrhées hémorragiques, apparaissent quelques jours après le traitement antibiotique, souvent par une pénicilline du groupe A. L'endoscopie digestive ne retrouve pas de fausse membrane, mais visualise des hémorragies muqueuses, parfois des érosions et des ulcérations coliques droites. Des taux de *K. oxytoca* supérieurs à 10^7 CFU/g ont été mis en évidence dans les selles des malades. Ces souches de *K. oxytoca* sont responsables de lésions iléales chez le lapin.

C/ *Candida* spp

Le rôle de *Candida* (Figure 7) dans la survenue de diarrhées associées aux antibiotiques (DAA) est controversé. Il a été rapporté, pour 24 malades âgés en moyenne de 74 ans, ayant présenté des DAA que sept patients avaient dans leurs selles des concentrations de *Candida* supérieures à 10^5 CFU/mL, alors qu'aucune personne du groupe témoin traité par antibiotiques n'avait dans ses selles des levures à de telles concentrations (75). Un traitement par nystatine, instauré par voie orale chez cinq patients ayant des diarrhées persistantes et chez lesquels l'antibiothérapie a été poursuivie a permis la régression des diarrhées et la diminution des colonies de *Candida* à une concentration inférieure à 10^4 CFU/mL ; chez les deux autres malades ayant plus de 10^5 CFU/mL de *Candida* les diarrhées ont disparu spontanément et la concentration de levures a diminué à l'arrêt du traitement antibiotique. Chez les 17 autres patients n'ayant pas de concentration élevée de *Candida* dans leurs selles, les diarrhées persistaient jusqu'à l'arrêt de l'antibiothérapie.



Figure 7 : Photo de *Candida albicans* (74)

Pour préciser le rôle de *Candida* dans les DAA, Krause a comparé la présence et le nombre de colonies de *Candida* dans les selles de 98 malades ayant des diarrhées associées aux antibiotiques (A+D+), de 93 patients prenant des antibiotiques mais n'ayant pas de diarrhées (A+D-), de 97 personnes ne prenant pas d'antibiotique mais ayant des diarrhées (A-D+) et de 107 sujets témoins ne prenant pas d'antibiotique et n'ayant pas de diarrhée (76). Dans le groupe témoin (A-D-), la présence de *Candida* était significativement plus faible que dans les trois autres groupes. La présence et le nombre de colonies de *Candida* étaient comparables dans les groupes (A+D+) et (A+D-). Ces résultats suggèrent que la présence de *Candida* dans les selles serait plutôt la conséquence de l'antibiothérapie que la cause des diarrhées associées aux antibiotiques.

IV/ PROLIFERATION DE BACTERIES COMMENSALES : **COLITE PSEUDOMEMBRANEUSE A CLOSTRIDIUM** **DIFFICILE**

Certaines bactéries commensales de la flore colique peuvent devenir potentiellement dangereuses. L'exemple type en est la colite pseudo-membraneuse à *Clostridium difficile*. *C. difficile* est un bacille anaérobie Gram positif sporulé responsable de diarrhées et de colites associées à l'antibiothérapie (Figure 8). Il existe différentes souches présentant des caractéristiques de virulence et des capacités de toxinogénèse très variables.



Figure 8 : Photo de *Clostridium difficile* (77)

A/ Les différentes formes clinique de la colite à *Clostridium difficile*.

Le spectre clinique des infections à *C. difficile* s'étend de l'état de porteur asymptomatique à la colite fulminante (Tableau VII, page 44). Chez l'adulte en bonne santé, la prévalence du portage varie entre 0 et 3 % (Tableau VI, page 44). En revanche, jusqu'à 50 % des nourrissons en milieu hospitalier peuvent excréter *C. difficile* et ses toxines dans leurs fèces, mais sont asymptomatiques (79).

Tableau VI : Prévalence de *Clostridium difficile* et de ses toxines dans les selles de différentes populations (78)

Population étudiée	Taux d'isolement de <i>C. difficile</i> (%)	Présence de toxine (%)
Patients atteints de CPM post-antibiotiques	95-100	95-100
Patients atteints de diarrhées post-antibiotiques	15-25	10-25
Patients asymptomatiques sous antibiotiques	10-25	5-10
Patients hospitalisés	10-25	2-8
Adultes sains	<3	<1
Nouveaux-nés sains	5-70	5-63

Tableau VII : Les formes cliniques de l'infection à *Clostridium difficile* (80).

Forme clinique	Diarrhée	Signes et symptômes	Endoscopie
Asymptomatique	Absente	Normal	Normal
Diarrhée sans colite	Légère à modérée	Légère douleur Crampes abdominales	Normal
Colite sans pseudomembrane	Profuse	Distension abdominale avec nausées, anorexie, fièvre, déshydratation	Erythème non spécifique
Colite avec pseudomembrane	Profuse	Distension abdominale avec nausées, anorexie, fièvre, déshydratation	Pseudomembranes
Colite fulminante	Modérée à profuse	Distension, péritonisme, léthargie, fièvre avec ou sans iléus	Pseudomembranes (dangereux)

La plupart des infections à *C. difficile* font suite à une antibiothérapie (Figure 9). Bien que la clindamycine et la lincomycine soient historiquement les principaux antibiotiques responsables de ce type d'infection, des études plus récentes indiquent que la quasi-totalité des antibiotiques peuvent entraîner une diarrhée ou une colite à *C. difficile* (Tableau VIII, page 46).

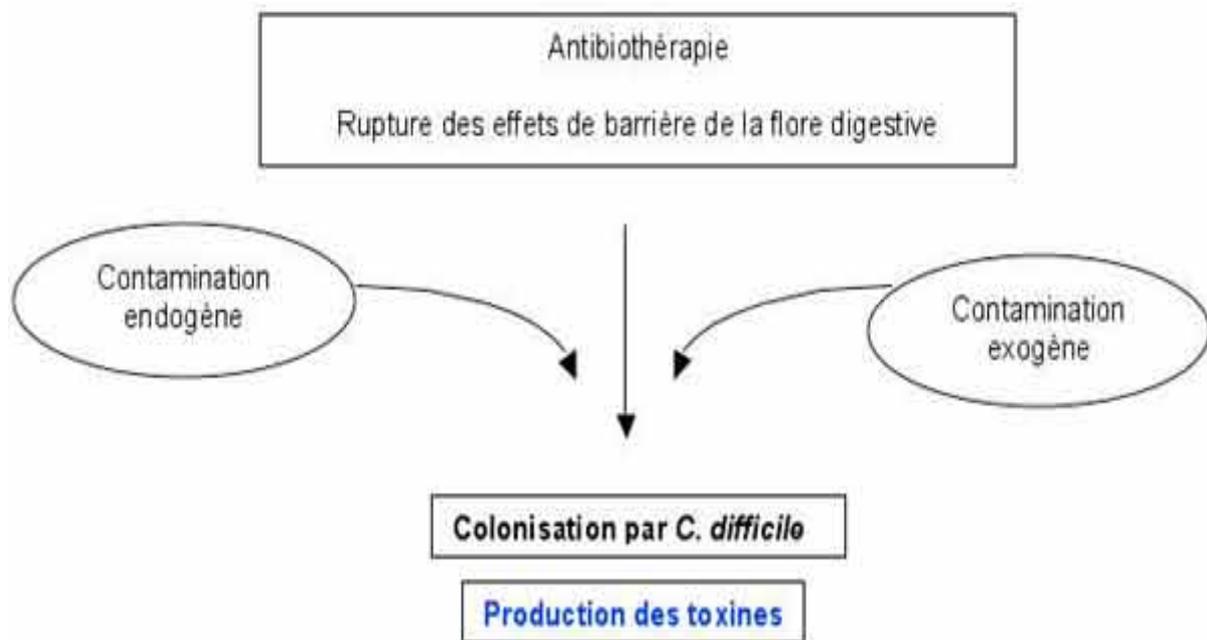


Figure 9 : Mécanisme de la colonisation par *Clostridium difficile* (78).

Les symptômes surviennent trois à dix jours après le début du traitement ; dans un tiers des cas, ils apparaissent après l'arrêt de l'antibiothérapie, rendant le diagnostic plus difficile. La relation entre la diarrhée associée aux antibiotiques et l'infection à *C. difficile* n'est pas clairement établie. Une diarrhée bénigne survenant pendant ou après un traitement antibiotique est associée dans 20 % des cas seulement à l'identification de *C. difficile*.

Tableau VIII : Fréquence de diarrhées/colites à *Clostridium difficile* et familles d'antibiotiques (28)

Fréquent	Peu fréquent	Rare
Ampicillines	Quinolones	Aminoglycosides
Amoxicillines et dérivés	Sulfamides	Metronidazole
Céphalosporines	Tétracyclines	Vancomycine
Clindamycine	Macrolides	

La sigmoïdoscopie révèle le plus souvent une muqueuse colique normale dans les diarrhées associées aux antibiotiques. Dans la plupart des cas, la diarrhée s'arrête avec l'interruption des antibiotiques. En revanche, la colite pseudo-membraneuse (vérifiée endoscopiquement, Figure 10) est associée presque systématiquement avec *Clostridium difficile*.

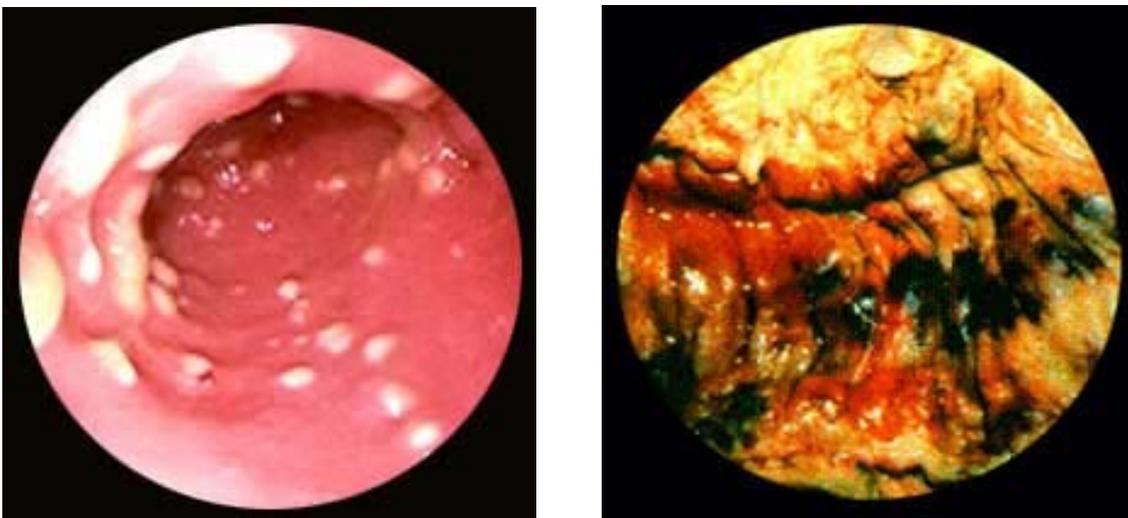


Figure 10 : Muqueuse colique d'un patient atteint de colite à *Clostridium difficile* (78)

La colite fulminante à *C. difficile* affecte le plus souvent les patients âgés, présentant de nombreuses co-morbidités. Elle peut se compliquer d'une perforation colique ou d'un mégacôlon toxique.

B/ Physiopathologie de la colite à *Clostridium difficile*.

Le mécanisme de survenue des diarrhées et colites dues à *C. difficile* est complexe et non complètement élucidé ; il est cependant admis que celles-ci ne sont pas liées au germe lui-même mais à la production de toxines. *C. difficile* libère deux exotoxines puissantes. La toxine A, en plus de son activité d'entérotoxine, possède, comme la toxine B, une activité cytotoxique (Figure 11). Des récepteurs spécifiques pour la toxine A ont été mis en évidence sur les membranes entérocytaires.

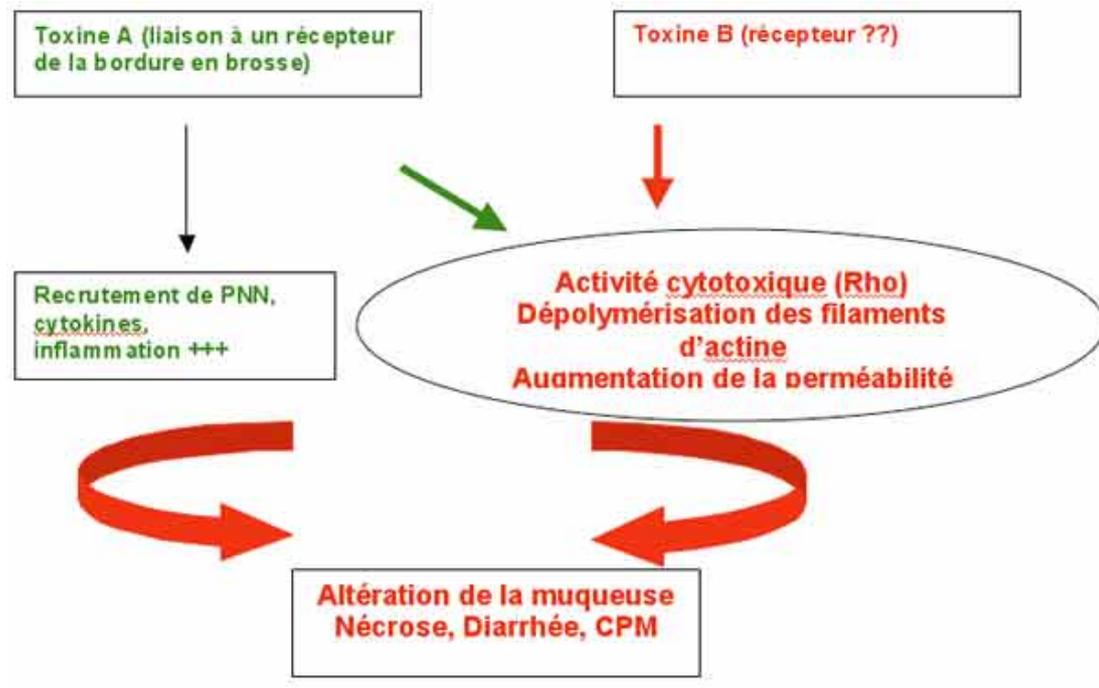


Figure 11 : Mécanismes d'action des toxines produites par *Clostridium difficile* (78)

Les deux toxines A et B se lient aux cellules épithéliales de l'intestin, pénètrent dans les cellules et provoquent le réarrangement du cytosquelette d'actine. Ceci entraîne une désorganisation des microfilaments cytosquelettiques, suivie d'une destruction cellulaire. Il s'ensuit une altération de la perméabilité des jonctions intercellulaires provoquant une augmentation de la perméabilité de la muqueuse intestinale, suivie d'une infiltration de la *lamina propria* par des neutrophiles.

La thermorésistance de la spore du *C. difficile* (ce qui lui permet de persister dans l'environnement) et la production de toxines sont deux caractéristiques essentielles de cette bactérie (81). La toxine A peut intoxiquer les neurones et favoriser une libération aberrante de calcium. Enfin, la toxine A exerce son effet sur les leucocytes en altérant le chimiotactisme des neutrophiles, l'activation des macrophages et des mastocytes ainsi que l'induction de la libération des médiateurs inflammatoires. La sécrétion liquidienne, les dommages muqueux et l'inflammation interstitielle résultent de l'activité des toxines dans l'intestin.

C/ Facteurs de risque de la colite à *Clostridium difficile*.

Le seul facteur de risque connu pour la colite à *C. difficile* est la perturbation de la flore. Il n'est pas prouvé à l'heure actuelle que le fait d'être porteur de *C. difficile* soit un facteur de risque pour la colite.

D / Epidémiologie de la colite à *Clostridium difficile*

C. difficile est une bactérie ubiquitaire, que l'on retrouve à l'état naturel dans le sol, les milieux hospitaliers, les centres de la petite enfance et les foyers pour personnes âgées. C'est un bacille sporulé Gram positif qui peut se propager par voie orofécale. La transmission entre patients est d'ailleurs bien documentée en milieu hospitalier. La période d'incubation des maladies associées au *C. difficile* est difficile à établir avec précision. Une pléthore d'antibiotiques oraux (pénicillines, clindamycine, céphalosporines...) et de produits chimiothérapeutiques (fluorouracil, méthotrexate) peut modifier la flore gastrointestinale et favoriser l'émergence de *C. difficile*. Cependant, on ne sait pas si la durée du traitement et le nombre d'utilisations d'antibiotiques et de produits chimiothérapeutiques accroissent la possibilité d'observer le *C. difficile* dans les selles. Les patients hypogammaglobulinémiques ou souffrant d'autres types d'immunosuppression semblent présenter un risque plus élevé de porter *C. difficile* dans leurs selles, mais on ne peut pas préciser si ce phénomène est causé par le recours accru à l'antibiothérapie au sein de cette population vulnérable. Les nourrissons et les enfants sont plus susceptibles que les adultes d'être des porteurs asymptomatiques du *C. difficile* dans le tractus gastrointestinal. Ainsi, on estime que de 15 % à 63 % des nouveau-nés, de 3 % à 33 % des nourrissons et des tout-petits de moins de deux ans et jusqu'à 8,3 % des enfants de plus de deux ans sont des porteurs asymptomatiques (82). Puisque le taux de portage symptomatique (accompagné de diarrhée) ressemble à celui du portage

asymptomatique, il est souvent difficile d'établir le rôle précis du *C. difficile* dans l'apparition d'une maladie gastrointestinale bénigne chez les enfants.

E/ Diagnostic de la colite à *Clostridium difficile*

Le diagnostic de laboratoire des infections provoquées par *C. difficile* (ICD) est basé sur les résultats de la culture et de la détection de toxines dans les matières fécales du patient.

1/ Recherche de *Clostridium difficile* par culture

La culture est réalisée dans des **conditions d'anaérobiose stricte** (sachet individuel, jarre) par ensemencement direct des selles sur milieux sélectifs comme le CCFA (cycloserin cefoxitin fructose agar) ou le milieu TCCA (gélose cœur cerveau + 5% de sang de cheval, 0,1% de taurocholate, 250 mg/l de cyclosérine et 10 mg/l de céfoxitine) (Figure 12). La culture est très sensible mais, lorsqu'elle est utilisée seule sans test de toxigénicité, son manque de spécificité peut mener à de faux diagnostics de ICD lorsqu'il y a portage de souches non toxigènes.



Figure 12 : Isolement de *Clostridium difficile* par culture (78)

Les subcultures peuvent être effectuées sur gélose au sang ou milieu de Wilkins-Chalgren. **Après 48 h d'incubation en anaérobiose à 37°C**, les colonies sont faciles à repérer, elles présentent les caractéristiques suivantes:

- colonies circulaires à bords irréguliers (3-5 mm), non hémolytiques, (Figure 13).
- colonies présentant un aspect de verre fritté à la loupe binoculaire,
- odeur caractéristique de crottin de cheval (libération de crésol);
- colonies fluorescentes sous UV (mais dépend du milieu utilisé), (Figure 14).



Figure 13 : Subculture de *Clostridium difficile* sur gélose au sang (78)

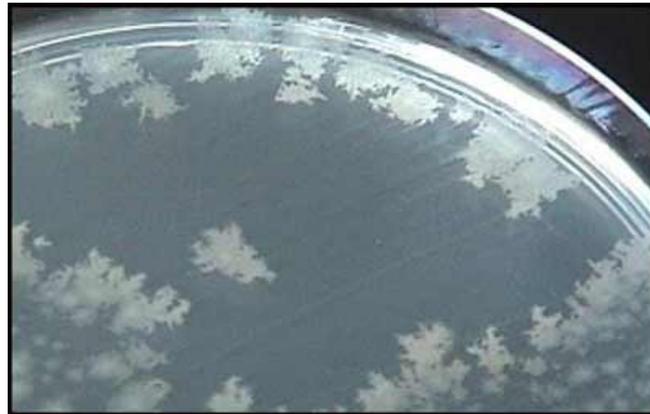


Figure 14: Colonies de *Clostridium difficile* fluorescentes sous UV (78)

2/ Détection des toxines par des méthodes immunoenzymatiques

La détection de toxine sur culture cellulaire par mise en évidence d'un effet cytopathogène, neutralisable par un antisérum spécifique est considérée comme un « gold standard ». Cependant, cette technique manque de sensibilité et ne permet de diagnostiquer que de 70% des ICD. Des nombreux tests immunoenzymatiques permettent la détection de la toxine A ou

des deux toxines A et B (Figure 15). Ces examens rapides donnent des résultats en quelques minutes ou quelques heures : les immunoessais enzymatiques, la polymérisation en chaîne (PCR), l'agglutination au latex et l'Immunocard (Meridian Diagnostics, USA). Ces examens sont hautement spécifiques mais manquent de sensibilité (jusqu'à 20 % de faux négatifs). Des études comparatives ont montré que la sensibilité et la spécificité de ces tests étaient légèrement inférieures à celles des tests de cytotoxicité sur cultures cellulaires.

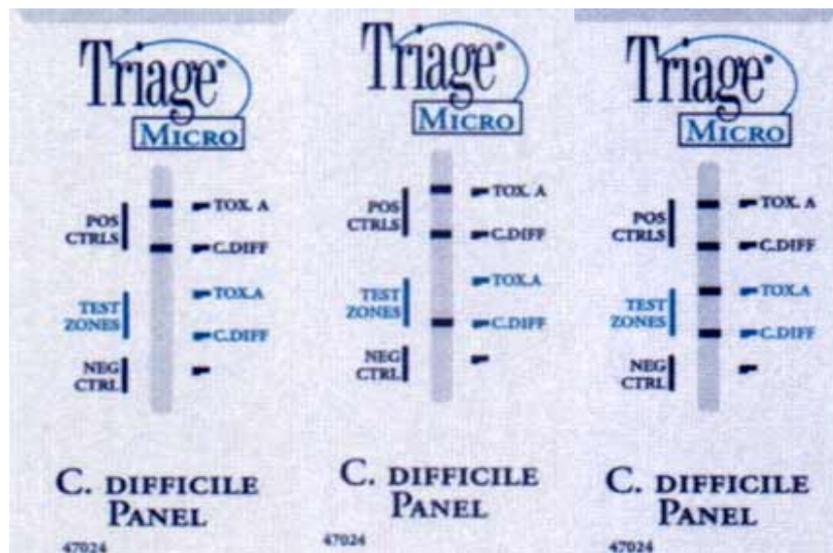


Figure 15 : Exemples d'un test rapide (Triage®) détectant la toxine A (+ à droite) et un antigène bactérien (glutamate déshydrogénase) (+ au milieu et à droite) (78).

Le test de 'culture toxigénique' enfin consiste à tester la toxigénicité *in vitro* des colonies isolées sur milieu de culture par un test immunoenzymatique ou par un test de cytotoxigénicité. L'effet cytopathogène correspond à une ballonnisation des cellules (arrondissement du noyau et effondrement du cytoplasme, Figure 16, page 52). Il est observé après dépôt d'un filtrat de selles sur les cellules. C'est le test qui permet d'obtenir les meilleures sensibilité et spécificité mais il requiert un délai supplémentaire.



**Figure 16 : Recherche de l'effet cytopathogène de la toxine B de *Clostridium difficile*.
A gauche : culture cellulaire normale. A droite: ballonnisation des cellules (78)**

En procédure de routine, la culture et la recherche de toxine (par cytotoxicité sur culture cellulaire ou par un test immunoenzymatique) devraient être pratiquées sur tous les échantillons de selles. Pour les cas où la culture est positive et la recherche de toxine négative, un test de 'culture toxigénique' devrait être réalisé. Dans certains cas, il peut être souhaitable de confirmer le diagnostic au moyen d'une coloscopie. La coloscopie permettra en effet de caractériser les lésions coliques. La mise en évidence de fausses membranes (Figure 17) confirmera le diagnostic de colite à *C. difficile*. Cependant, la majorité des colites à *C. difficile* correspondent à des formes non pseudomembraneuses.



**Figure 17 : Fausses membranes caractéristiques observées sur une pièce de colectomie
(83)**

F/ Traitement de la colite à *Clostridium difficile*

Le traitement a trois objectifs : corriger et/ou prévenir les complications liées aux pertes hydroélectrolytiques, limiter l'évolution de l'infection et prévenir le risque de récurrence.

1/ La diarrhée profuse.

La fréquence élevée de *C. difficile* et de ses toxines dans le tube digestif d'enfants en bonne santé complique le diagnostic de maladie secondaire due à *C. difficile* chez un enfant souffrant de diarrhée profuse bénigne à modérée lorsqu'une toxine se trouve dans les selles. La décision thérapeutique devrait dépendre de plusieurs facteurs, dont la gravité de la diarrhée, la présence d'un autre pathogène présumé et la coexistence d'un trouble d'immunodéficience (inné ou acquis). Dans tous les cas de diarrhée associée aux antibiotiques, l'agent déclenchant doit être immédiatement supprimé, dans la mesure du possible. Si la diarrhée s'aggrave ou ne s'atténue pas dans les 48 heures et qu'on décide de traiter un *C. difficile*, l'agent de choix demeure le métronidazole par voie orale. Il faut souligner que de nombreux cas de diarrhées sécrétoires, dans lesquelles on a repéré le *C. difficile* ou ses toxines, ont probablement d'autres étiologies (81).

2/ La diarrhée sanglante

Si un patient souffre de colite et qu'une toxine du *C. difficile* est décelée, un traitement spécifique est indiqué. Tout comme dans le cas de la diarrhée sécrétoire, l'agent déclenchant devrait être immédiatement supprimé. Plusieurs antibiotiques oraux sont efficaces dans le traitement de la colite associée au *C. difficile*, mais le métronidazole représente le traitement de choix en raison de son excellent rendement démontré et de son coût minime. Très peu d'études ont porté sur les enfants, mais chez les adultes, le métronidazole, la vancomycine, la bacitracine, la téicoplanine et l'acide fusidique par voie orale sont très efficaces (93 %) pour résoudre les symptômes de la maladie. Cependant, chaque antibiotique s'accompagne d'un taux de récurrence élevé (16 % pour le métronidazole et la vancomycine, 7 % pour la téicoplanine et 28 % pour l'acide fusidique (72)). De plus, le recours à la vancomycine par voie orale peut favoriser l'émergence d'entérocoques résistant à la vancomycine. Dans le cas de patients incapables de tolérer les médicaments par voie orale, le métronidazole par voie intraveineuse (35 mg/kg/jour à 50 mg/kg/jour) représente le médicament de choix parce qu'il est excrété dans l'intestin.

G/ Pronostic de la colite à *Clostridium difficile*

Le pronostic de rétablissement complet est excellent chez les enfants auparavant en bonne santé et souffrant de diarrhée profuse secondaire au *Clostridium difficile*. En règle générale, l'arrêt de l'antibiotique déclenchant suffit à faire disparaître les symptômes. Chez les patients souffrant d'une colite pseudomembraneuse secondaire au *Clostridium difficile*, le pronostic d'une maladie non traitée est beaucoup plus grave. La maladie peut rapidement progresser en un mégacôlon toxique associé à une morbidité importante, surtout chez les adultes. Le traitement de ces patients devrait être institué sur-le-champ, et l'agent déclenchant, supprimé. La diarrhée chronique ou récurrente représente une complication de la véritable maladie secondaire due à *Clostridium difficile*. Cependant, la plupart des cas se résolvent entièrement grâce à des traitements répétés (Tableau IX).

Tableau IX: Le traitement des récurrences de colite à *Clostridium difficile* (80)

<u>Première récurrence</u> <ul style="list-style-type: none">- confirmer le diagnostic- reprendre le traitement initial
<u>Deuxième récurrence</u> <ul style="list-style-type: none">- confirmer le diagnostic- administration de vancomycine en dose décroissante :<ul style="list-style-type: none">➤ 125 mg, 4 fois par jour pendant 7 jours➤ 125 mg, 2 fois par jour pendant 7 jours➤ 125 mg, 1 fois par jour pendant 7 jours➤ 125 mg, 1 jour sur 2 pendant 7 jours➤ 125 mg, 1 jour sur 3 pendant 14 jours
<u>Autres récurrences</u> <ul style="list-style-type: none">- <i>Saccharomyces boulardii</i> (500 mg, 2 fois par jour pendant 14 jours) plus vancomycine ou métronidazole- Vancomycine à doses décroissantes et cholestyramine (4 mg 2 fois par jour)- Vancomycine (125 mg 4 fois par jour) et rifampicine (600 mg 2 fois par jour pendant 7 jours)- Immunoglobulines

V/ CONDUITE A TENIR DEVANT UNE DIARRHEE ASSOCIEE AUX ANTIBIOTIQUES

La symptomatologie des diarrhées associées aux antibiotiques est variable, allant des diarrhées simples à des colites infectieuses avec colectasie. L'arrêt de l'antibiothérapie permet le plus souvent une régression spontanée en quelques jours des diarrhées bénignes non compliquées, par reconstitution de la flore digestive habituelle. Comme la majorité des diarrhées associées aux antibiotiques de cause infectieuses sont dues à *Clostridium difficile*, l'arbre décisionnel proposé par Högenauer (Figure 18) mérite d'être retenu et de servir de base à toute démarche diagnostique devant une diarrhée associée aux antibiotiques. Aux critères de sévérité que sont fièvre, crampes abdominales, rectorragies, déshydratation, hyperleucocytose et hypoalbuminémie, il faudrait ajouter la fragilité du terrain que propose Beaugerie (72). Toute la difficulté de la démarche consiste à distinguer d'une part les diarrhées simples des diarrhées sévères, et d'autre part à dépister les sujets âgés fragiles pour lesquels des précautions d'hydratation et nutritionnelles devront être prises même en cas de diarrhées apparemment banale. La réhydratation par voie orale sera privilégiée. En cas de troubles de la vigilance, d'un état hémodynamique instable, de vomissements importants, de diarrhées profuses à l'origine d'une perte de poids supérieure à 10%, une réhydratation parentérale par voie intraveineuse est nécessaire. Une entéropathie exsudative peut aggraver en quelques jours une dénutrition protéino-énergétique préexistante, nécessitant une évaluation rapide de l'état nutritionnel du sujet âgé permettant une renutrition adaptée. Devant une diarrhée modérée sans fièvre, l'antibiothérapie sera arrêtée si son indication n'est pas formelle et la diarrhée régressera rapidement. Si la poursuite de l'antibiothérapie est indiquée mais proche de son terme, elle pourra être associée à des modulateurs de la flore et à des antidiarrhéiques antisécrétoires (privilégiés aux ralentisseurs du transit qui favorisent la pullulation intestinale de bactéries invasives et la survenue d'un mégacôlon toxique). Si l'antibiothérapie doit être poursuivie, un changement de classe d'antibiotique exposant à un risque moindre de diarrhée associée aux antibiotiques sera proposé. Une recherche de toxine de *C. difficile* sera effectuée et, en cas de positivité, un traitement par métronidazole sera instauré pendant au moins dix jours et jusqu'au terme de l'antibiothérapie. En cas de diarrhée profuse, fébrile, dysentérioriforme ou persistante après l'arrêt de l'antibiothérapie, ou survenant sur un terrain fragilisé, le premier examen complémentaire à réaliser est la recherche de toxines de *C. difficile* dans les selles ; le traitement par métronidazole ou vancomycine pourra être initié avant le résultat de la coproculture. Dans un second temps, une

rectosigmoïdoscopie pourra être programmée pour visualiser une colite pseudomembraneuse, voire une coloscopie totale pour repérer des hémorragies coliques droites.

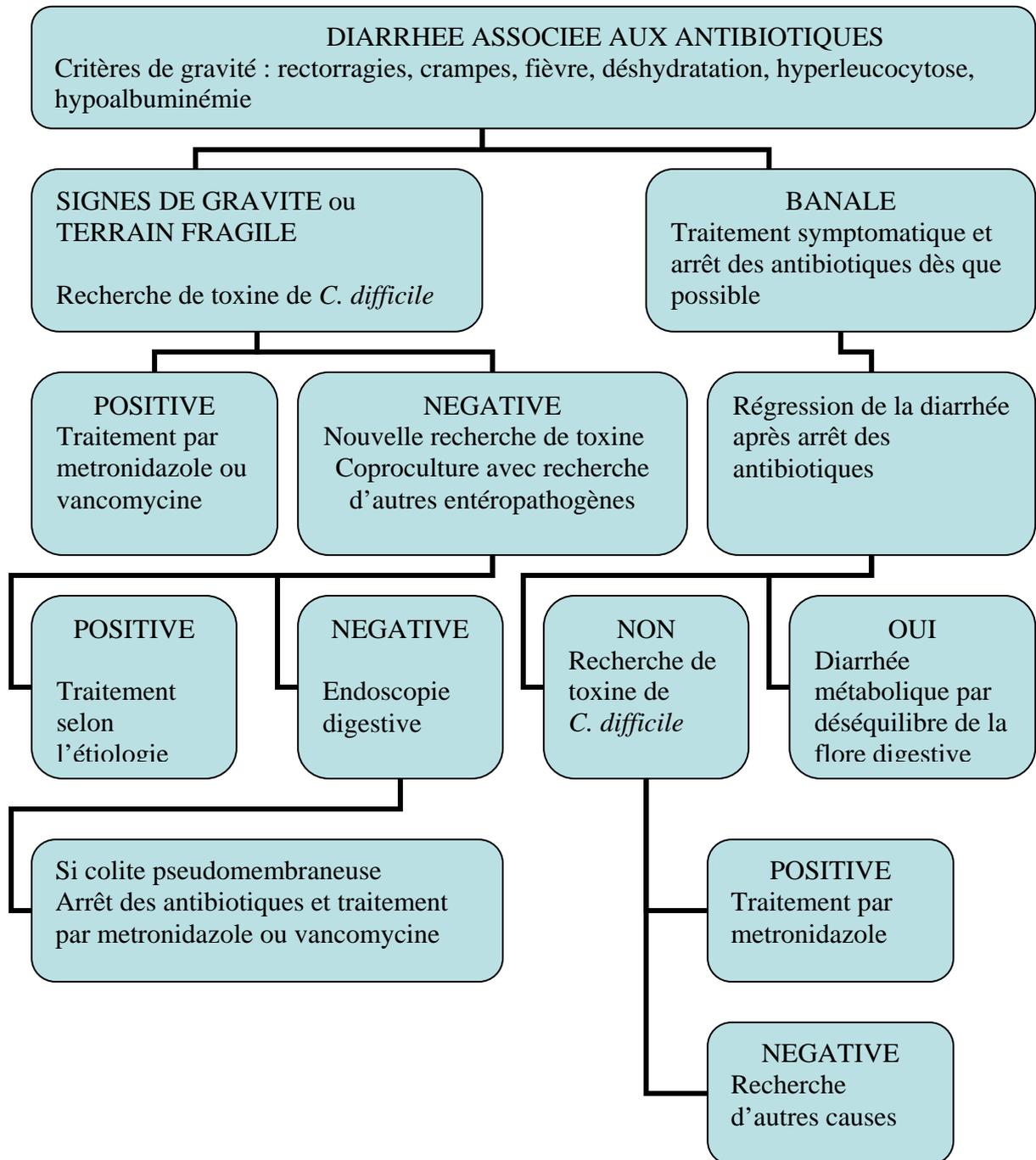


Figure 18 : Arbre décisionnel proposé par Högenauer devant une diarrhée associée aux antibiotiques (57).

VI/ PREVENTION DES DIARRHEES ASSOCIEES AUX ANTIBIOTIQUES.

La prévention des diarrhées associée aux antibiotiques repose d'abord sur l'indication justifiée d'une antibiothérapie puis sur le choix de l'antibiotique. Une fois l'antibiothérapie prescrite, l'association de micro-organismes de substitution, modulant la flore digestive, est une prophylaxie qui a fait l'objet de plusieurs études (voir en troisième partie).

VII/ CONCLUSION.

Même si les diarrhées associées aux antibiotiques sont le plus souvent bénignes, liées à un déséquilibre de la flore digestive, et régressent spontanément à l'arrêt de l'antibiothérapie, elles peuvent avoir des conséquences graves chez le sujet âgé fragile en déstabilisant un état précaire par le biais d'une déshydratation ou d'une dénutrition. L'association de micro-organismes de substitution, qui ont montré une efficacité potentielle en prévention des diarrhées associées aux antibiotiques et dans le traitement des rechutes des diarrhées à *Clostridium difficile* en association au metronidazole ou à la vancomycine mériterait d'être mieux documentée, car l'enjeu de santé publique est important, les diarrhées compliquant jusqu'à 25% des antibiothérapies.

PARTIE III : UTILISATION DES PROBIOTIQUES DANS LA PREVENTION ET LE TRAITEMENT DES DIARRHEES ASSOCIEES AUX ANTIBIOTIQUES.

I/ DEFINITION DES PROBIOTIQUES

A/ Que sont les probiotiques ?

Les probiotiques sont des micro-organismes ingérés vivants dont on considère qu'ils sont capables d'avoir un effet bénéfique sur l'hôte en ayant une action sur la flore intestinale (84). Les plus connus sont les bactéries lactiques (Figure 19) et les bifidobactéries largement utilisées dans les yaourts et d'autres produits laitiers fermentés.



Figure 19 : Lactobacilles (85)

B/ Caractéristiques essentielles des probiotiques

Parmi la vingtaine de critères proposés pour caractériser ces micro-organismes particuliers reconnus comme ayant un effet probiotique, cinq font l'unanimité :

- 1- l'appartenance à la flore intestinale humaine
- 2- le caractère non pathogène
- 3- la tolérance à l'acide et à la bile : ils doivent pouvoir survivre lors de leur passage dans l'appareil digestif.
- 4- la résistance aux procédés technologiques et la stabilité pendant la conservation
- 5- des effets bénéfiques pour la santé avérés.

En pratique il existe plusieurs façons d'intégrer un probiotique à un produit : seuls ou associés à d'autres micro-organismes, sous forme d'aliment, de médicament, d'additif ou de complément alimentaire.

II/ SOUCHES UTILISEES COMME PROBIOTIQUES

Les différentes souches utilisées comme probiotiques sont : *Bacillus bifidus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus GG*, *Lactobacillus LB*, *Streptococcus thermophilus*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae*. Il ne s'agit pas ici de présenter une liste exhaustive de tous les probiotiques commercialisés en France, mais plutôt d'avoir un aperçu de ce qui existe et des allégations santé qui y sont associées.

A/ Les médicaments

1/ Bacilor® : *Lactobacillus casei* variété *rhamnosus*

Il est commercialisé sous forme de gélule de 250 mg titrées à 8.10^8 germes par gramme et de poudre pour solution buvable. La posologie conseillée chez l'adulte est de 2 à 8 gélules par jour.

2/ Lyo-Bifidus®: *Bacillus bifidus*

Il est commercialisé sous forme de poudre pour solution buvable utilisable chez l'adulte et chez l'enfant de plus de trois ans. La posologie conseillée est d'un sachet soit 1 milliard de germes de *B. bifidus* par jour.

3/ Ultra-Levure® : *Saccharomyces boulardii*

Ce produit est un médicament commercialisé sous forme de gélules dosées à 56.5 mg de *S. boulardii* lyophilisé. La posologie conseillée chez l'adulte est de quatre gélules par jour, en deux prises.

4/ Carbolevure® : *Saccharomyces cerevisiae*

Cette levure est commercialisée associée à du charbon activé. Chaque gélule est dosée à 108.5mg de levure déshydratée vivante, contenant au minimum 10^8 cellules de *S. cerevisiae* par gramme.

B/ Les compléments alimentaires.

1/ Bion3®

Bion[®]3 est un complément nutritionnel associant dans un seul comprimé trois catégories de composants naturels : probiotiques, vitamines et minéraux. Trois souches probiotiques ont été sélectionnées : *Lactobacillus gasseri*, *Bifidobacterium longum* et *Bifidobacterium bifidum*. *L. gasseri* agit essentiellement sur l'intestin grêle dont il diminue le pH jusqu'à un état acide, ce qui crée des conditions de survie favorables pour les bifidobactéries dans l'intestin. L'enrobage protecteur des comprimés Bion3[®] permet à la majorité des souches d'arriver dans l'intestin, leur destination principale. Cet enrobage est revendiqué par le laboratoire qui commercialise le produit puisqu'il garantit le passage d'une quantité suffisante de bactéries dans l'intestin, et par là même l'efficacité réelle du probiotique.

2/ Xantis[®](86)

Transit accéléré

Se régénérer

Défenses
fragiles

- Peau et intestins
- Agressés

Le concentré protecteur pour renforcer son organisme, grâce à un écosystème intestinal revivifié.

Ingrédients :

Ferments probiotiques (6 variétés de lactobacilles et de bifidobactéries)
Plantes : réglisse, guimauve, ronce, tilleul.
Grains fermentés.



Flacon de 90 comprimés de 700 mg pour un programme de régénération intestinale d'un mois.

Conseils d'utilisation : 3 comprimés par jour à croquer ou avaler au début ou en dehors des repas.
Accompagner votre programme régénérant par la revitalisation de votre sphère hépato-digestive, celle-ci influençant directement la qualité du milieu intestinal.

3/ Matol 24B® (87)



Usage recommandé : pour rétablir et maintenir en santé la flore intestinale.

Posologie recommandée (adultes et enfants de plus de 12 ans) : Prendre 1 à 3 capsules par jour après les repas.

Ingrédients médicinaux : Chaque capsule contient les souches de cultures probiotiques suivantes :

- *Lactobacillus rhamnosus* HA - 111 6.0 Milliards ufc
- *Lactobacillus acidophilus* HA - 122 4.8 Milliards ufc
- *Lactobacillus casei* HA - 108 4.8 Milliards ufc
- *Bifidobacterium longum* HA - 135 2.4 Milliards ufc
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HA - 136 2.4 Milliards ufc
- *Bifidobacterium bifidum* HA - 132 1.2 Milliards ufc
- *Bifidobacterium breve* HA - 129 1.2 Milliards ufc
- *Lactobacillus planturum* HA - 119 1.2 Milliards ufc

Ingrédients non médicinaux : Fructo-oligosaccharides, capsule végétale, octadécanoate de magnésium et acide ascorbique.

4/ Effidigest® (88)

Actions

EFFIDIGEST FLORE INTESTINALE vous apporte des ferments lactiques, améliorant ainsi votre digestion, votre hygiène intestinale, notamment en cas de désordres intestinaux et/ou de prise d'antibiotiques.

Vous renforcez ainsi votre flore intestinale.

Conseils d'utilisation

2 gélules par jour à la fin du repas principal. Conserver le flacon au frais.

Composition

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*.

Flacon de 60 gélules.



5/ Oemine probiotic® (89)

OEMINE PROBIOTIC



Complexe de 3 bacilles vivants



Formule inédite composée d'un complexe de 3 bacilles vivants pour restaurer la flore intestinale et améliorer les fonctions digestives. A base de *bifidus*, *lactobacillus acidophilus* et *rhamnosus*.

Composition et intérêt :

Lactobacillus acidophilus : Ce bacille résiste à l'acidité gastrique et à la bile, stimule le système immunitaire et contrebalance les germes entéro-pathogènes,

Lactobacillus rhamnosus : Il colonise le colon, avec des effets bénéfiques aussi bien contre la diarrhée que la constipation ainsi que contre le météorisme. Il est capable de diminuer les produits de l'inflammation (cytokines).

Bifidobacter : il possède une action spécifique sur le transit intestinal qu'il améliore. Il colonise le colon pour contrebalancer la flore pathogène.

Présentation

Boite de 60 gélules de 350 mg contenant chacune un mélange de 5 milliards de bacilles probiotiques.

Posologie

Nourrissons : 1 gélule/ jour (5 milliards de bacille)
enfants: 2 gélules / jour (10 milliards de bacille)
après 10 ans : 3 gélules / jour (15 milliards de bacille)
adultes : 4 gélules / jour (20 milliards de bacille)
grossesse : 3 gélules / jour (15 milliards de bacille)
seniors : 3 gélules / jour (15 milliards de bacille)

6/ Ergyphilus® (90)

Flore probiotique revivifiable au LGG*



ERGYPHILUS, scientifiquement équilibré en lactobacilles et bifidobactéries, contribue à **maintenir l'équilibre de la flore intestinale** et à **renforcer les défenses naturelles** de l'organisme.

* Ce complexe innovant apporte la souche ***Lactobacillus rhamnosus GG*** aux propriétés essentielles démontrées par de nombreux travaux de recherche.

Conseils d'utilisation 2 à 4 gélules par jour au cours des repas. A conserver au réfrigérateur (+4°C).

Composition par gélule

2 milliards de Lactobacilles revivifiables	
<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	1,00 Milliard
<i>Lactobacillus casei</i>	0,62 Milliard
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0,25 Milliard
<i>Bifidobactérium bifidus</i>	0,12 Milliard

Ingrédients : Lactobacilles et bifidus lyophilisés, amidon de riz, stéarate de magnésium.

7/ Lactinex®

La préparation Lactinex® est une association de *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

C/ Les produits laitiers

Bien que le premier lait fermenté par des bifidobactéries ait été commercialisé il y a près de 50 ans, le marché des aliments probiotiques ne s'est développé que dans les années 1970. Les laits fermentés sont issus d'une fermentation par des bactéries lactiques qui aboutit à l'acidification et à la gélification du lait. Le plus consommé dans les pays occidentaux est le yaourt. Réglementairement, il est issu de l'action de deux bactéries lactiques : *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. Un produit laitier fermenté est un yaourt contenant une troisième souche bactérienne, probiotique ou non. Une nouvelle catégorie de produits se profile, celle des laits fermentés vecteurs de principes actifs à finalité

thérapeutique. Dans ces laits fermentés probiotiques, les microorganismes du yaourt sont associés à d'autres lactobacilles (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. johnsonii*) et/ou à des bifidobactéries (*B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*). En 1997, plus de 70 produits laitiers industriels (laits fermentés, fromages blancs...) contenaient des probiotiques. Aujourd'hui, les marques **LC1** (Nestlé) et **Actimel** (Danone) ont émergé comme chefs de file. Par ailleurs, les laits fermentés '**AB milk**' et '**Cultura**' contenant *L. acidophilus* et *B. bifidum* sont très populaires au Danemark. D'autres produits comme les yaourts acidophilus-bifidus (contenant *L. acidophilus* et *B. bifidum*, ou *B. longum* et les ferments du yaourt), les laits '**Bifidus**' (*B. bifidum* ou *B. longum*), '**Biogarde**' (*L. acidophilus*, *B. bifidum* et *S. thermophilus*), '**Biomild**' (*L. acidophilus* et *Bifidobacterium* sp) en Allemagne et les laits '**Diphilus**' (*L. acidophilus* et *B. bifidum*) et '**Ophilus**' (*L. acidophilus*, *B. bifidum*, et *S. thermophilus*, ou *L. acidophilus*, *B. bifidum*, et *L. cremoris*) en France ne sont que quelques exemples de l'utilisation variée des bifidobactéries comme bactéries probiotiques dans des ferments mixtes en combinaison avec *L. acidophilus* ou les ferments du yaourt (91).



Actimel est le leader incontestable du marché des probiotiques en France avec ses 400 millions de fioles vendues en 2004 (132)

Les bifidobactéries peuvent être utilisées seules mais sont souvent associées à des bactéries lactiques pour des raisons organoleptiques et technologiques. De plus, la présence de bactéries protéolytiques, en particulier *L. bulgaricus*, favorise la croissance des bifidobactéries. Cependant, pour la production du ferment mixte probiotique, c'est-à-dire bifidobactéries et lactobacilles, les bifidobactéries ne peuvent pas être cultivées conjointement aux bactéries lactiques en raison de leur faible compétitivité en culture mixte. Ainsi, pour assurer une quantité de bactéries probiotiques suffisante dans les produits fermentés, les ferments probiotiques commerciaux consistent en des cultures pures de bifidobactéries mélangées aux

cultures lactiques au moment de la fabrication du produit ou encore directement ajoutées au produit fermenté à la concentration finale recherchée.

III/ MODES DE PRODUCTION INDUSTRIELS

La propagation des bifidobactéries pose problème du fait de leur grande sensibilité à l'oxygène, de leur faible tolérance aux acides issus de leur métabolisme et de leurs exigences nutritionnelles (91).

A/ Critères de sélection des souches probiotiques

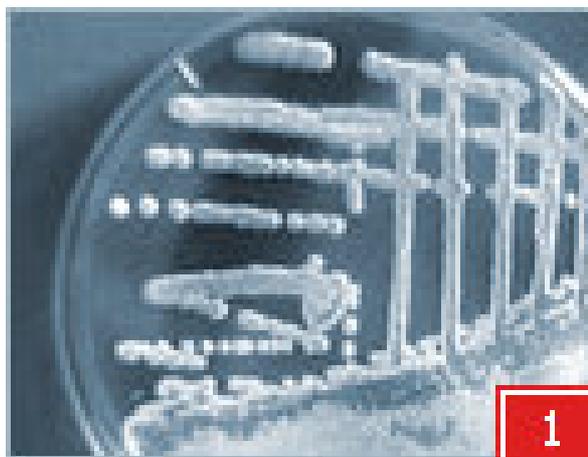
Alors que les bactéries lactiques sont sélectionnées pour leurs activités acidifiantes et protéolytiques dans les ferments classiques, d'autres propriétés sont recherchées dans le cas des probiotiques. Pour exercer un effet sur la santé, les probiotiques doivent survivre aux procédés de fabrication, à la lyophilisation éventuelle et à l'entreposage qui s'en suit. Il est admis qu'un minimum de **10⁷ cellules viables par gramme de produit** est nécessaire pour exercer un effet probiotique. Cependant, la stabilité physique et génétique des cellules doit également être assurée. De plus, ces souches doivent être viables sans se multiplier pour ne pas provoquer d'effet indésirable sur le goût ou l'arôme du produit ni en augmenter l'acidité. C'est pourquoi les bactéries en **phase stationnaire de croissance**, plus tolérantes aux stress environnementaux que celles en phase exponentielle, sont privilégiées pour la mise au point de produits contenant des probiotiques. Les interactions possibles entre bactéries lactiques et bifidobactéries sont également prises en compte pour sélectionner la meilleure combinaison de souches afin d'optimiser le procédé et la survie cellulaire dans le produit entreposé. Enfin, ces bactéries probiotiques doivent être capables de survivre aux conditions acides de l'estomac et aux sels biliaires intestinaux lors de la consommation du produit, puis d'adhérer aux cellules épithéliales de l'intestin afin de produire les effets désirés le plus longtemps possible. Des travaux *in vitro* effectués lors d'une étude portant sur l'incorporation de bifidobactéries dans des yaourts glacés ont montré que les cellules pouvaient résister pendant deux heures à une concentration en sels biliaires de 0.45%, mais pas à de l'acide chlorhydrique 0.1 N. Il semblerait toutefois que la résistance à l'acidité dépende de la souche de bifidobactéries utilisée, certaines souches pouvant résister jusqu'à 90 minutes à pH 3. Les résistances aux sels biliaires et à l'acidité des sucs gastriques constituent par conséquent deux

caractéristiques importantes à prendre en compte lors de la sélection des cultures probiotiques pour une utilisation dans les produits laitiers fermentés (91).

B/ La production à l'échelle industrielle (92)

1) Conservation des souches.

Après avoir été isolée, étudiée et sélectionnée, la souche bactérienne est conservée à -80°C . Lors du démarrage d'une nouvelle production, la souche est alors repiquée sur boîte de Pétri.



2) Pré-cultures

Une première, puis une seconde pré-culture est réalisée par l'inoculation de fioles de capacité croissante contenant un milieu de culture spécialement étudié pour permettre la croissance de la souche à produire.



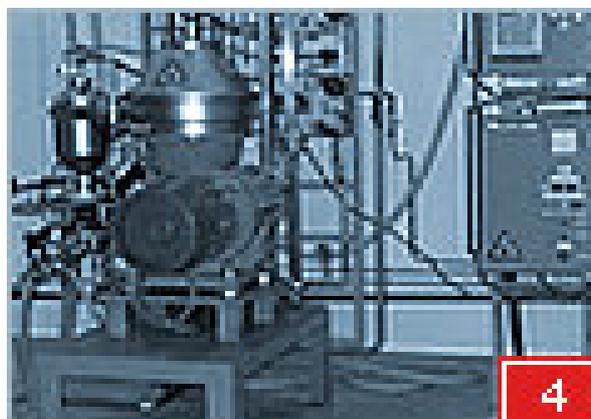
3) Cultures

Le fermenteur, véritable bio-réacteur pouvant contenir jusqu'à 2.000 litres de milieu de culture est ensuite inoculé avec les pré-cultures. Généralement, la culture dure moins de 24 heures, durant lesquelles il importe de réguler précisément les paramètres de température, acidité, aération et agitation afin de parvenir à un optimum de concentration bactérienne à l'intérieur de la cuve.



4) Récolte et conditionnement

En fin de fermentation, la biomasse est récupérée par centrifugation. Elle se présente alors sous forme de "pâte bactérienne" très concentrée, qu'il s'agit alors de sécher avec précaution afin de maintenir un maximum de bactéries en vie.



5) Séchage

La méthode utilisée est dans bien des cas la lyophilisation. Il s'agit d'une opération de déshydratation du produit, par sublimation de l'eau qu'il contient. Cette phase peut durer de 1 à 3 jours. Le produit se présente alors sous forme de gâteaux secs.



6) Cultures pures

Après un dernier traitement physique, on aboutit finalement à une poudre bactérienne, que l'on appellera encore "culture pure". Dans la plupart des cas, la culture pure, très concentrée, sera alors diluée de manière à atteindre la concentration souhaitée au sein du produit fini.



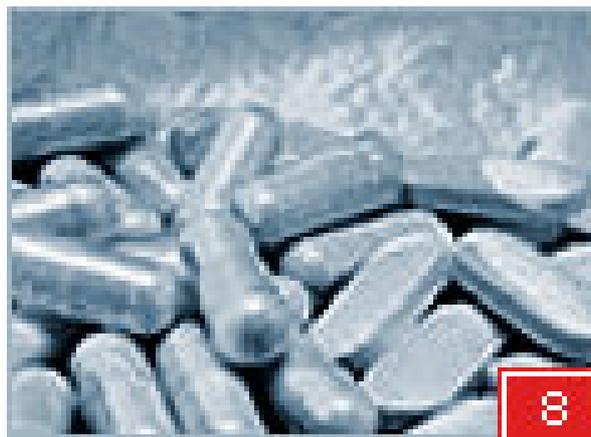
7) Formulation

Selon le but recherché, une formulation plus complexe peut être mise au point. La culture pure sera alors mélangée à d'autres principes actifs tels que d'autres cultures bactériennes pures, des fibres prébiotiques, des enzymes digestives, etc.



8) Conditionnement

Le produit peut être conditionné sous forme de gélules, de comprimés ou bien encore de sachets. Gélules, comprimés ou sachets peuvent encore par la suite faire l'objet d'une mise sous blister, en pots ou en boîtes afin d'être livrés dans un packaging prêt à être distribué.



IV/ MECANISMES D'ACTION DES PROBIOTIQUES

Il est maintenant largement admis que les probiotiques pourraient représenter des outils réellement efficaces dans le contrôle de la croissance de pathogènes et par conséquent, dans le contrôle et la prévention d'infections. Effectivement, plusieurs études réalisées *in vitro* et *in vivo* avec plusieurs types de bactéries probiotiques ont montré la capacité de ces bactéries à interférer avec la croissance et la virulence de différents pathogènes. Les mécanismes d'action de ces bactéries restent peu connus ; leurs propriétés pourraient être dues à la réduction du pH, liée à la production d'acides organiques, à l'activité intrinsèque de certains métabolites ou à la synthèse de certaines substances antimicrobiennes. En parallèle, l'adhérence des bactéries probiotiques aux cellules épithéliales intestinales et leur colonisation temporaire de l'intestin est probablement d'une importance cruciale dans leurs effets.

A/ Contrôle de la croissance des pathogènes

1/ Réduction du pH lié à la production d'acides organiques

Par la production de métabolites tels que l'acide acétique et l'acide lactique, et par conséquent la diminution du pH, un grand nombre de lactobacilles inhibent la croissance de pathogènes. Il a été observé que le mécanisme par lequel *Lactobacillus rhamnosus* GG empêche l'invasion des cellules Caco-2 par *Salmonella typhimurium*, sans modifier la viabilité du pathogène, est aboli après que la culture ait été neutralisée à pH 7, ce qui suggère un mécanisme pH dépendant (93).

2/ Synthèse de substances antimicrobiennes

a/ l'H₂O₂

La production de peroxyde d'hydrogène pourrait être un mécanisme de défense non spécifique des *Lactobacillus* spp. Les *Lactobacillus* producteurs d'H₂O₂ appartiennent à la flore vaginale normale de la plupart des femmes normales mais sont beaucoup moins fréquents dans la flore des femmes avec des vaginoses bactériennes. A l'inverse, chez les femmes atteintes de vaginoses, on observe une augmentation des souches de *Lactobacillus* sp non producteurs d'H₂O₂. *L. crispatus* et *L. jensenii*, les lactobacilles les plus communs de la flore vaginale, inhibent les gonocoques en produisant de l'H₂O₂. Quand on examine l'activité

antimicrobienne de 22 souches de *Lactobacillus* sp d'origine vaginale, on constate que 80% de ces souches produisent H₂O₂, acide lactique, acides organiques et bactériocines et que ces espèces sont actives contre plusieurs souches, mais pas toutes, de *Gardnerella vaginalis*. *L. brevis* CD2, *L. salivarius* LV2 et *L. gasseri* MB335 adhèrent aux cellules épithéliales, déplacent les bactéries pathogènes et produisent de grandes quantités d' H₂O₂. Ils inhibent la croissance de *G. vaginalis*. *L. crispatus* F117 et *L. paracasei* F2 et F28 sont les souches qui produisent la plus grande quantité d' H₂O₂. *L. delbrueckii* VI1007 produit au moins trois facteurs d'inhibition de croissance autres que l'acide lactique, dont l'un est identifié comme étant H₂O₂ (93).

b/ les bactériocines

Les bactériocines sont des protéines ou des complexes protéiques à effet bactéricide dirigées contre les espèces généralement apparentées aux bactéries productrices. Elles sont réparties en quatre classes en fonction de leur poids moléculaire.

B/ Obstacle à la colonisation par des pathogènes

1/ Encombrement des sites de fixation des bactéries pathogènes

Une étude a caractérisé et évalué l'activité d'une espèce de *Lactobacillus casei rhamnosus* (Lcr 35) exploitée comme probiotique depuis plus de vingt ans (93). Les capacités d'adhérence de cette espèce bactérienne à des cellules intestinales humaines (cellules Caco-2, une lignée cellulaire de carcinome colique humain, exprimant plusieurs marqueurs caractéristiques des cellules des villosités intestinales) ainsi que la possibilité d'empêcher l'adhérence de plusieurs pathogènes ont été étudiées *in vitro*. L'étude a montré que l'adhérence du lactobacille était dépendante de la concentration de la bactérie et du temps de contact entre les bactéries et les cellules. Les souches bactériennes utilisées pour étudier l'inhibition de l'adhérence de pathogènes sont une souche d'*E. coli* entéro-toxinogène (ETEC), une autre entéropathogène (EPEC), une souche de *Klebsiella pneumoniae*, d'*Enterococcus faecalis*, de *Shigella flexneri*, de *Salmonella typhimurium*, de *Pseudomonas aeruginosa*, d'*Enterobacter cloacae* et de *C. difficile*.

Trois procédures ont été mises en œuvre pour différencier l'exclusion, la compétition et le déplacement des pathogènes par Lcr 35 :

- Dans la procédure d'exclusion, les cellules sont pré-incubées avec le lactobacille qui s'y fixe puis on incube les pathogènes et on évalue leurs possibilités de fixation aux cellules.
- Pour la compétition, les lactobacilles sont co-incubés avec les bactéries pathogènes.
- Pour évaluer le déplacement des pathogènes par les lactobacilles, on incube les pathogènes avec les cellules puis on ajoute les lactobacilles, c'est la post-incubation.

Dans tous les cas, on observe une diminution significative du nombre de pathogènes adhérant aux cellules en présence de lactobacilles. La présence de lactobacilles empêcherait l'accès des pathogènes aux récepteurs par encombrement stérique, entraînant une diminution de l'adhérence des bactéries pathogènes aux cellules intestinales (Figure 20). Cependant, cette hypothèse ne semble pas être la seule cause d'inhibition des pathogènes en présence de bactéries lactiques.

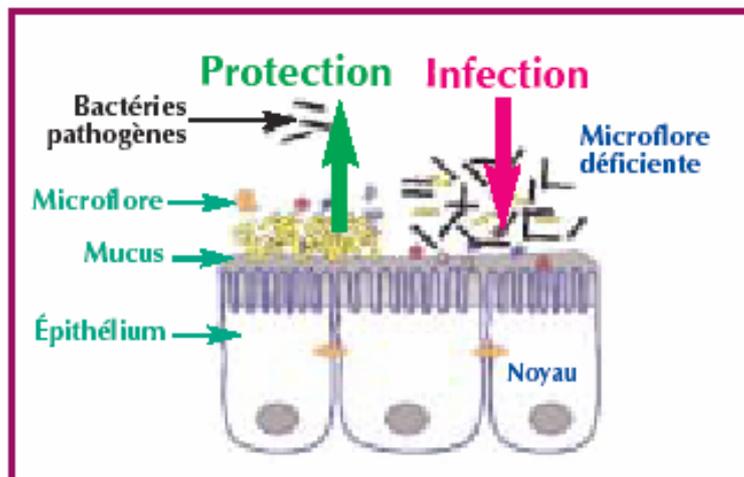


Figure 20 : Protection de l'infection par encombrement des sites de fixation des bactéries pathogènes (25).

2/ Production de mucines

La surface de l'épithélium intestinal est recouverte d'une couche visco-élastique, constituée principalement de glycoconjugués (Figure 21, page 73). Ce gel muqueux est formé de

mucines sécrétées par les cellules caliciformes. Les mucines et les glycoconjugués jouent un rôle essentiel dans l'effet barrière. Non seulement la couche de mucus forme une barrière physique, mais les glycoconjugués interfèrent avec l'adhérence des bactéries pathogènes à l'épithélium. Du fait de leur localisation sur la surface des cellules, les mucines et la partie glycane de certains glycoconjugués comportent un grand nombre de sites de liaison pour les bactéries et les toxines. Ces glucides complexes sont également des nutriments pour la microflore intestinale. Bien que l'adhérence aux mucines et à des glycoconjugués spécifiques puisse protéger l'hôte en empêchant les microorganismes de se fixer à la muqueuse sous-jacente, elle peut favoriser les pathogènes en leur servant d'ancrage à la paroi intestinale, ce qui ralentit leur élimination, favorise la colonisation et facilite les infections. La conséquence bénéfique ou nuisible de la fixation des pathogènes aux glycoconjugués intestinaux peut dépendre d'autres facteurs, tels que la composition et la quantité des mucines ou la motricité intestinale.

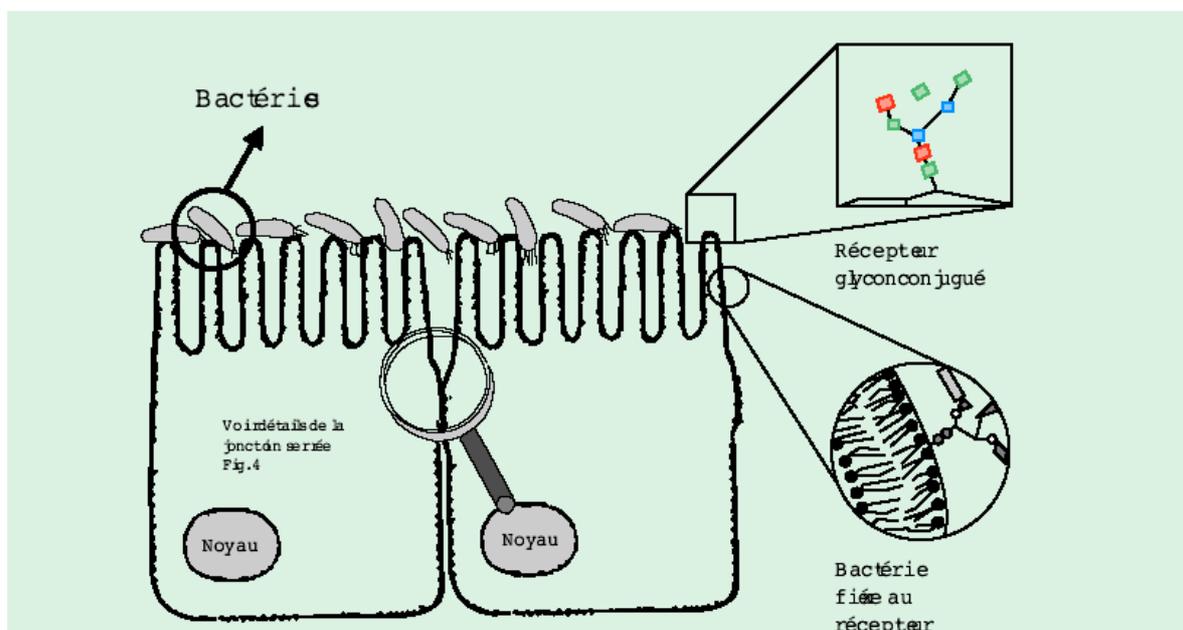


Figure 21: Fixation des pathogènes aux glycoconjugués des cellules épithéliales de l'intestin (31)

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que des espèces et des souches de bactéries spécifiques sont capables de stimuler la sécrétion de mucus bien que les données concernant spécifiquement les probiotiques soient limitées. Une étude récente a démontré un effet direct des probiotiques par induction de l'expression d'un gène de mucine intestinale dans les cellules épithéliales (31). Le rôle biologique de la modification de l'expression de

glycoconjugués complexes et de mucus n'est pas encore connu. Cependant, des études récentes démontrent que les modifications biochimiques induites par les probiotiques pourraient inhiber l'adhésion de pathogènes à des cellules intestinales cultivées *in vitro*.

C/ Probiotiques et immunité

Les probiotiques sont considérés comme des promoteurs des mécanismes de défense endogènes de l'hôte. En plus de leurs effets sur les défenses intestinales non immunologiques, les probiotiques renforcent la réponse immunitaire humorale et par conséquent stimulent la barrière immunologique intestinale (94, 95). Par ailleurs, les probiotiques stimulent la résistance non spécifique de l'hôte aux micro-organismes pathogènes (96,97), aident à l'élimination immune et modulent la réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis d'éléments potentiellement pathogènes en régulant les réactions d'hypersensibilité (98,99).

1/ Immunomodulation non spécifique

L'introduction de lactobacilles par voie orale peut renforcer la résistance non spécifique de l'hôte et faciliter l'exclusion de micro-organismes pathogènes du milieu intestinal (96,97). Il a été montré *in vitro* que plusieurs espèces de lactobacilles vivants étaient capables d'induire la libération de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) et l'interleukine 6, reflétant la stimulation de l'immunité non spécifique de l'hôte. L'introduction par voie orale de *L. casei* et *L. bulgaricus* activent également la production de macrophages et la phagocytose (100). L'activité phagocytaire entraîne le recrutement de cellules immunocompétentes et engendre une réponse inflammatoire. Paradoxalement, l'ingestion de lactobacilles potentialise la production d'INF γ par les cellules mononucléées du sang périphérique (101,102). L'INF γ favorise la capture des antigènes au niveau des plaques de Peyer dans lesquelles sont localisées les cellules sécrétrices d'IgA (103). L'administration de lactobacilles conduit à une augmentation de la sécrétion d'IgA systémique et muqueuse contre les antigènes alimentaires (94, 95, 104). De plus, il a été mis en évidence *in vitro* que certaines espèces de bactéries probiotiques peuvent normaliser une production aberrante d'INF γ induite par des antigènes (99). Ces informations indiquent que les effets immunomodulateurs des bactéries probiotiques peuvent dépendre de l'état immunologique de l'hôte.

2/ Effets spécifiques sur la réponse immunitaire

Une augmentation de la réponse humorale et une augmentation des cellules sécrétant des anticorps spécifiques de Rotavirus ont été mises en évidence chez des enfants recevant *Lactobacillus rhamnosus* GG en traitement curatif de la diarrhée. Il y a également une augmentation des IgA chez les sujets recevant *L. rhamnosus* GG (95). En parallèle, l'introduction orale de lactobacilles à des rats allaités sensibilisés avec du lait de vache provoque une augmentation des cellules sécrétant des anticorps contre les β -lactoglobulines (94). Chez les enfants, l'allergie au lait de vache est associée à une hypersensibilité retardée aux protéines de lait de vache et un défaut de génération de réponse locale sous-forme d'IgA, de même qu'une hypersensibilité immédiate médiée par les IgE (105). La flore intestinale contribue à la reconnaissance des antigènes alimentaires. Certaines espèces bactériennes isolées de la flore intestinale peuvent libérer des peptides de faible poids moléculaire qui déclenchent la réponse immunitaire. Les protéases des probiotiques peuvent dégrader la caséine du lait de vache ce qui génère des peptides avec des effets suppresseurs sur la prolifération lymphocytaire chez des sujets sains (98). Pour caractériser l'effet immunomodulateur des probiotiques, une étude a analysé si les caséines dégradées par les enzymes des probiotiques pouvaient moduler la production de cytokines par des cellules mononucléées du sang périphérique chez des enfants atopiques présentant une allergie aux protéines de lait de vache (99). Sans hydrolyse, les caséines augmentent la production d'IL4 chez des patients présentant une dermatite atopique tandis que la caséine hydrolysée par *L. rhamnosus* GG réduit la production d'IL4. Ces résultats indiquent que les probiotiques modifient la structure d'antigènes potentiellement nuisibles et altèrent ainsi leur immunogénicité.

V/ PROBIOTIQUES ET DIARRHEES ASSOCIEES AUX ANTIBIOTIQUES

A/ Prévention des diarrhées associées aux antibiotiques.

Une méta-analyse (Tableau X, page 76) récente a évalué neuf études dont les résultats indiquent que les lactobacilles et *Saccharomyces boulardii* pouvaient prévenir la diarrhée associée aux antibiotiques (106). Dans cette méta-analyse, c'est le test d'homogénéité de Mantel-Haenszel qui est utilisé. Pour considérer qu'une souche est significativement efficace

dans la prévention des diarrhées associées aux antibiotiques, il faut obtenir un risque relatif inférieur à 1.

Tableau X : Récapitulatif des résultats obtenus dans différentes études sur l'utilisation des probiotiques en prévention de diarrhées associées aux antibiotiques (106).

Etudes	Probiotique	Dose quotidienne	Durée de traitement	Antibiotique étudié	Patients sans diarrhée (%)		
					traités	placebo	Risque relatif
Adam (107)	<i>S.boulevardii</i>	4 cp/j	variable	variés	96	83	0.22
Gotz (108)	<i>L.acidophilus</i> <i>L.bulgaricus</i>	4 sachets de Lactinex®/j	5 jours	Ampicilline	100	86	0.34
Surawicz (109)	<i>S.boulevardii</i>	1g/j	variable	variés	91	78	0.37
Wunderlich (110)	<i>E.faecium</i> <i>SF68</i>	2 cp/j	7 jours	variés	91	73	0.25
Tankanow (111)	<i>L.acidophilus</i> <i>L.bulgaricus</i>	4 sachets de Lactinex®/j	10 jours	amoxicilline	34	31	0.88
Orrhage (112)	<i>L.acidophilus</i> et <i>B.longum</i>	500mL de lait fermenté par jour	21 jours	clindamycine	80	30	0.58
McFarland (113)	<i>S.boulevardii</i>	1g/j	49 jours	variés	93	85	0.46
Lewis (114)	<i>S.boulevardii</i>	226 mg par jour	14 jours	variés	79	83	1.67
Vanderhooft (115)	<i>Lactobacillus</i> <i>GG</i>	1 à 2 cp /j (10 ¹⁰ CFU/cp)	10 jours	variés	93	74	0.23

Une étude confirmant ces résultats comporte des essais sur trois régimes probiotiques différents pour prévenir les diarrhées associées à l'antibiothérapie mise en place pour traiter une infection à *Helicobacter pylori* ; on rapporte 5% de diarrhées dans le groupe recevant les trois probiotiques (*Lactobacillus GG*, *S. boulevardii* et un mélange de *L. acidophilus* et de *B.*

lactis) contre 30% dans la population recevant le placebo, ce qui correspond à une efficacité significative des probiotiques (116).

a/ *Lactobacilli*

Plusieurs études sont disponibles sur l'efficacité de *Lactobacillus rhamnosus GG* dans la diminution et la prévention des diarrhées associées aux antibiotiques, tant au niveau du nombre de jours de diarrhées que du nombre d'épisodes diarrhéiques par jour (Tableau XI).

Tableau XI : Etudes sur l'efficacité de souches de *Lactobacillus* dans la prévention de diarrhées associées aux antibiotiques (117)

Etude	Nombre de patients	Age des patients	Antibiotiques utilisés	Durée de traitement	Risque relatif
Armuzzi (118)	60	28-52 ans	Tinidazole, clarithromycine	14 jours	0.13
Arvola (119)	119	2 semaines 12.8 ans	Antibiotique oral	7 à 14 jours	0.3
Gotz (108)	79	adultes	Ampicilline	5 jours	0.39
Vanderhoof (115)	188	6 mois – 10ans	Antibiotique oral	7 à 14 jours	0.28

Ces quatre études concluent à l'efficacité des espèces de *Lactobacillus* en prévention des diarrhées associées aux antibiotiques.

Etudes sur l'efficacité de la Préparation Lactinex®

Il n'a pas été mis en évidence une réelle efficacité de cette association dans la prévention de la diarrhée associée aux antibiotiques. En effet, dans une étude sur des adultes hospitalisés traités par amoxicilline, on a pu noter 8% de diarrhées dans le groupe consommant Lactinex® contre 21% dans le groupe prenant le placebo, ce qui n'est pas une différence significative (108). De même, dans une autre étude réalisée sur des enfants traités par amoxicilline, il n'y avait pas non plus d'efficacité prouvée du Lactinex® (111) Un auteur a suggéré que la variabilité des souches de probiotiques pouvait expliquer sa faible efficacité puisque des patients traités par néomycine montraient moins de diarrhées lorsqu'ils étaient traités avec une souche plutôt qu'avec une autre (120). Ceci illustre les difficultés du travail avec des micro-

organismes vivants : les différences entre les souches probiotiques mais également entre les patients et les antibiotiques utilisés ne permettent pas toujours de conclure sur l'efficacité du produit.

b/ *Enterococcus faecium*

Enterococcus faecium SF68 est commercialisé sous le nom de **Bioflorin**[®]. Cet organisme est retrouvé chez les adultes en bonne santé, produit de l'acide lactique, survit dans un environnement de faible pH, résiste aux antibiotiques et inhibe les espèces pathogènes. *Enterococcus faecium* a montré son efficacité dans la prévention de la diarrhée associée aux antibiotiques dans deux études cliniques. Le pourcentage de diarrhées dans le groupe recevant SF68 est de 9% contre 27% pour le groupe recevant le placebo, cette étude étant effectuée sur des patients ayant pris différents antibiotiques (110). De même, 3% de diarrhée dans le groupe recevant SF68 contre 18% pour ceux recevant le placebo chez des patients recevant une thérapie pour la tuberculose pulmonaire (121).

c/ *Bifidobacteria*

Les études ont montré un bénéfice à l'utilisation des bifidobactéries comme probiotiques dans la prévention de diarrhée associées à la clindamycine et à l'érythromycine. En effet, associée à la prise de clindamycine, la consommation de lait fermenté avec *B. longum* et *L. acidophilus* induit une amélioration de l'inconfort intestinal (112). De même, l'administration de *B. longum* à des volontaires sains recevant de l'érythromycine entraîne une réduction significative du poids des selles et de leur fréquence (122).

d/ Levures

Plusieurs études ont démontré l'efficacité de *S. boulardii* dans la prévention des diarrhées associées aux antibiotiques. Parmi les quatre études présentées dans le tableau XII, page 79, les trois premières (patients de toutes catégories d'âge) ont montré une efficacité significative d'Ultra-Levure[®], avec une réduction du taux de diarrhées. La quatrième étude (personnes âgées de plus de 65 ans) n'a pas montré de bénéfice de *S. boulardii* par rapport au placebo. Toutefois, l'effectif de l'étude était restreint. Ces résultats discordants peuvent s'expliquer par

les disparités dans les posologies et les durées de traitement, ainsi que dans les périodes de suivi. En effet, deux de ces études utilisent des doses correspondant à 20 gélules par jour.

Tableau XII : Etudes randomisées de prévention des diarrhées associées aux antibiotiques par *Saccharomyces boulardii*.

Etude	Nombre de patients inclus	Dose de <i>S.boulardii</i> quotidienne	Durée du traitement	Patients présentant une diarrhée (%)		
				<i>S. boulardii</i>	Placebo	<i>p</i>
Adam 1977 (107)	388	226 mg	Pendant l'antibiothérapie (7 jours en moyenne)	4.5	17.5	<0.05
Surawicz 1989 (109)	180	1000 mg	Pendant l'antibiothérapie puis poursuivi 2 semaines après son arrêt	9.5	21.8	0.04
McFarland 1995 (113)	193	1000 mg	Pendant l'antibiothérapie puis poursuivi 3 jours après son arrêt	7.2	14.6	0.02
Lewis 1998 (114)	69	226 mg	Pendant l'antibiothérapie	21	17	NS

B/ Les probiotiques dans la colite à *Clostridium difficile*

Parce qu'une altération de la flore intestinale influence la physiopathologie de la colite à *C. difficile*, le traitement par des probiotiques paraît intéressant. Les probiotiques utilisés dans la prévention de la récurrence de colite à *C. difficile* incluent des bactéries et des levures.

1/ Bactéries

Des études sur *Lactobacillus GG* ont suggéré très tôt sa possible efficacité dans la colite à *C. difficile* récurrente. Dans trois études différentes, 8 adultes sur 11 (123), 2 enfants sur 4 (124), et 5 adultes sur 9 (125) furent guéris. Un rapport préliminaire d'une étude randomisée suggérait l'efficacité de *Lactobacillus GG* dans la colite à *C. difficile* mais aucun résultat définitif n'a finalement été publié (126). Dans leurs efforts pour reconstituer la flore, les chercheurs ont utilisés plusieurs approches. La plus utilisée est l'instillation rectale de micro-organismes, environ 10 espèces d'aérobies et anaérobies, montrant le rôle important des

espèces de *Bacteroides* (127). Moins esthétiques, il y a eu des études sur la transfusion de selles (128). Une étude récente sur l'administration de selles au cours d'une coloscopie s'est avérée efficace chez deux femmes (129). Toutes les études publiées jusqu'à aujourd'hui incluent un trop faible nombre de participants pour être interprétées.

2/ Levures

a/ *Saccharomyces boulardii*

Une étude sur des modèles animaux (hamster) a montré l'efficacité de *S. boulardii* dans la colite à *C. difficile* récidivante (130). Une étude ancienne (1989) sur des adultes a montré l'efficacité de *S. boulardii*, administré à la dose de 500mg 2 fois par jour, dans la colite à *C. difficile* récidivante (11 sur 13, 85%) (131). Elle ne peut cependant pas être retenue puisqu'elle n'a pas été réalisée en double aveugle. Deux études randomisées en double aveugle sont répertoriées dans le tableau XIII.

Tableau XIII : Etudes randomisées en double aveugle portant sur l'efficacité de *Saccharomyces boulardii* dans les récurrences de colites à *Clostridium difficile*.

Etudes	Dose	% récurrence de Colite à <i>Clostridium difficile</i>		
		Patients traités	Placebo	p
McFarland (133)	500 mg 2 fois / jour	34	64	<0.05
Surawicz (134)	500 mg 2 fois / jour	17	50	<0.05

b/ *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae est l'ingrédient actif de levures utilisées en boulangerie. Une étude a rapporté l'intérêt de cette préparation chez une femme atteinte de récurrence de colite à *C. difficile*. Cependant, il n'existe aucun essai randomisé impliquant cet agent dans cette indication.

L'efficacité de *S. boulardii* et de certaines espèces de *Lactobacillus* dans la prévention des diarrhées associées aux antibiotiques est donc prouvée. Cependant, il convient d'être prudent quand aux conclusions de ces études. En effet, il semble que les résultats soient dépendants des souches probiotiques utilisées, de leurs doses, de la durée du traitement mais également de la nature des antibiotiques utilisés. L'élargissement des résultats d'une étude à d'autres catégories de probiotiques n'est donc pas possible.

VI/ SURVEILLANCE ET PRECAUTIONS D'EMPLOI

Le principal argument mis en avant pour prescrire des germes de substitution serait leur parfaite innocuité (135).

A/ Problèmes rencontrés ou possibles

1/ Résistance aux antibiotiques

Les échanges génétiques sont fréquents au sein de la flore, c'est sans doute un facteur positif d'évolution. La flore digestive contient des populations bactériennes renfermant des éléments génétiques mobiles (transposons, plasmides). De plus la lyse bactérienne dans le tractus digestif conduit au relargage d'ADN bactérien qui peut être incorporé (en tout petit nombre) par des bactéries de la microflore. Des transferts de gènes de pathogénicité ou de gènes de résistance aux antibiotiques sont donc théoriquement possibles dans la flore intestinale, et les probiotiques pourraient constituer soit des donneurs de gènes, soit des receveurs intermédiaires ou définitifs. Un contrôle doit donc être effectué sur les souches probiotiques et la preuve que la souche ne contient pas de gènes de résistance aux antibiotiques portés par des éléments génétiques mobiles, donc transférables, doit être apportée. Ces résistances portées par des éléments mobiles sont à distinguer des résistances intrinsèques des espèces, considérées comme non transférables. L'hypothèse que les probiotiques pourraient être des receveurs intermédiaires ou définitifs de gènes de pathogénicité est peu probable, compte tenu de la durée de vie et de la faible prolifération dans le tube digestif des principaux probiotiques utilisés. Cette hypothèse devrait cependant être testée dans des cas où le risque est important (par exemple résistance à la vancomycine). Néanmoins dans l'état actuel des connaissances, cette considération ne doit pas limiter la consommation de probiotiques.

2/ Infections

Le risque d'infection par des probiotiques est considéré comme négligeable pour la population adulte en bonne santé. Par exemple, en Finlande, le nombre de cas de bactériémies à *Lactobacillus* GG a été évalué à 0,3 cas pour 100 000 personnes/an, alors que ce probiotique est très fortement consommé dans ce pays (136). En revanche, des cas d'infections provoquées par des bactéries de même espèce que les probiotiques usuels ont été rapportés chez des patients ayant de graves problèmes de santé, avec des défenses immunitaires diminuées (137-140), présentant une rupture de la barrière intestinale (141), atteints de valvulopathies ou porteuses d'un cathéter central (142). Aucun cas d'infection liée à l'ingestion de probiotiques n'a été rapporté chez les prématurés. Néanmoins, les connaissances étant actuellement très insuffisantes dans cette population, des études spécifiques doivent être réalisées chez les prématurés avant que les préparations contenant des probiotiques soient utilisées de manière plus large, d'autant que cette population est caractérisée par son immaturité immunologique. Dans l'état actuel des connaissances, les préparations contenant des probiotiques sont à éviter chez les enfants ayant un déficit immunitaire congénital ou acquis (traitement par immunosuppresseurs, corticothérapie, etc.).

B/ Groupes potentiellement à risques

Le risque d'infections opportunistes est plus élevé chez les enfants ayant un déficit immunitaire, congénital ou acquis. C'est pourquoi, dans l'état actuel des connaissances, les préparations contenant des probiotiques sont déconseillées chez ces d'enfants. La supplémentation de l'alimentation des prématurés avec des probiotiques nécessiterait l'étude préalable de l'impact de ces aliments sur la flore du nouveau-né prématuré. Il n'est en effet pas possible d'extrapoler les effets décrits chez le nourrisson né à terme aux effets potentiels chez le nouveau-né prématuré n'abritant pas forcément dans sa flore intestinale les mêmes espèces bactériennes (4).

C/ Tests préconisés

Afin d'assurer la sécurité de l'utilisation des préparations contenant des probiotiques, il est nécessaire de vérifier la sécurité des ingrédients pour la dose recommandée, la fréquence

d'association de l'espèce bactérienne avec une infection ou une allergie, la fréquence d'association de l'ingrédient avec une allergie, l'éventuelle production de métabolites délétères ou de toxines, etc. Il est également nécessaire de considérer les consommateurs qui pourraient présenter des risques plus importants d'effets indésirables avec ces produits. Pour les probiotiques ou les microorganismes non vivants présents dans les préparations, les critères permettant l'évaluation de l'innocuité du microorganisme sont ceux qui ont été recommandés par l'AFSSA (135).

D/ Mise en place d'une veille.

L'utilisation de préparations contenant des probiotiques étant relativement récente pour certaines d'entre elles, la mise en place d'une veille ou vigilance (nutrivi-gilance pour faire un parallèle avec pharmacovigilance) est nécessaire pour mieux identifier les éventuels effets indésirables. Un tel système pourrait aussi être utilisé pour évaluer les bénéfices à long-terme de ces produits. D'autre part, dans le cas où des probiotiques sont administrés, la mise en place et l'application d'outils de suivi de la souche ou de l'espèce correspondant au probiotique utilisé est essentielle. De plus, l'analyse de l'impact sur la diversité d'espèces au sein des bactéries lactiques (lactobacilles, streptocoques,..) et des bifidobactéries serait à encourager lors de l'utilisation des ingrédients destinés à modifier la flore intestinale.

VII/ AUTRES UTILISATIONS DES PROBIOTIQUES

On peut distinguer trois grandes situations où les probiotiques ont démontré leur effet chez l'homme : la prévention ou le traitement des diarrhées infectieuses, le traitement des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) ; la prévention du cancer colique expérimental.

A/ Prévention et traitement des diarrhées aiguës infectieuses

Plusieurs essais contrôlés randomisés ont démontré que les probiotiques permettaient de prévenir ou de raccourcir de façon significative la durée d'évolution des gastro-entérites aiguës, notamment la diarrhée du voyageur.

B/ Traitement des Maladies Inflammatoires Intestinales Chroniques.

De nombreux arguments épidémiologiques, cliniques et expérimentaux suggèrent l'intervention de la flore intestinale dans l'initiation et/ou la persistance des lésions muqueuses au cours de ces affections. L'induction d'une inflammation intestinale par la flore pourrait être consécutive à une augmentation de la perméabilité intestinale laissant ainsi passer des bactéries, avec pour conséquence un recrutement des cellules inflammatoires périphériques dans le tube digestif et leur activation par les antigènes bactériens. Ou bien, seconde hypothèse, l'inflammation serait secondaire à une réponse immunitaire intestinale inadaptée de l'hôte du fait d'une rupture de la tolérance vis-à-vis de sa propre flore. Ce rôle de la flore intestinale a en tout cas été bien démontré dans les récurrences endoscopiques de la maladie de Crohn après chirurgie. L'autre argument majeur qui démontre l'implication de la flore intestinale dans la survenue d'une maladie de Crohn est qu'il est quasiment impossible d'induire une colite expérimentale chez un animal dépourvu de flore intestinale. Chez l'homme les essais thérapeutiques se multiplient et très récemment une équipe italienne a pu montrer que l'administration de probiotiques permettait de maintenir en rémission 15 malades sur 20 à un an, alors qu'ils étaient atteints de recto-colite hémorragique. La même équipe a montré que l'administration du même mélange probiotique évalué en double aveugle chez 40 patients atteints de colite et mis en rémission par un premier traitement antibiotique, a permis de maintenir en rémission 85 % des patients recevant un probiotique contre 15 % dans le groupe placebo. Enfin une équipe anglaise a publié des résultats d'un essai contrôlé randomisé qui comparait l'efficacité d'un traitement par probiotiques à la mésalazine au cours des RCH en poussée. Cette étude a permis de conclure à une équivalence des deux traitements en terme de mise en rémission et de rechute. Il faut reconnaître cependant qu'actuellement l'utilisation de probiotiques et la nature de ceux qui sont utilisés sont purement empiriques et ne reposent sur aucune base scientifique quant à leur mécanisme d'action (84).

C/ Prévention du cancer colique expérimental

Plusieurs arguments suggèrent un effet anti-tumoral des bactéries lactiques. La paroi cellulaire des bactéries lactiques adsorbe des mutagènes produits par la cuisson à haute température ; la paroi cellulaire de *Bifidobacterium* induit l'activation de phagocytes qui bloquent la croissance des cellules tumorales ; *in vitro* certaines souches de *Bifidobacterium* diminuent la croissance de lignées cellulaires cancéreuses coliques. De plus, ingérés seuls ou en association

avec un probiotique, *Bifidobacterium* diminue l'incidence des tumeurs coliques induites chez le rat par l'azoxyméthane. Ces bactéries diminuent également l'apparition de cryptes aberrantes qui est la première étape histologique de la cancérisation colique ; elles inhibent également la prolifération cellulaire et l'expression de certains proto-oncogènes (84).

D/ Prévention des allergies alimentaires et traitement de l'eczéma chez le nourrisson

Depuis plus de dix ans on évoque à l'origine des maladies atopiques de l'enfance, une diminution des contacts infectieux, liée au progrès de l'hygiène et à la réduction des fratries. Partant de cette hypothèse, M.Kalliomäki et al ont estimé que les bactéries intestinales commensales devaient avoir un rôle préventif plus important que les infections sporadiques avec des germes pathogènes. Aussi, ont-ils entrepris une étude contrôlée en double aveugle contre placebo du lactobacille dans la prévention de l'atopie (148). 159 femmes enceintes appartenant à des familles à risque d'atopie ont été randomisées en deux groupes, l'un recevant 2 gélules contenant 10^{10} lactobacilles et l'autre deux gélules placebo deux à quatre semaines avant la date prévue pour l'accouchement. Après la naissance le même traitement était poursuivi pendant 6 mois chez l'enfant ou chez la mère si celle ci allaitait. Les enfants ont été suivis jusqu'au 24ème mois, mais 27 ont été perdus de vue. La fréquence de l'eczéma atopique a été divisée par deux dans le groupe lactobacille (15/64 contre 31/68 ; $p=0,008$) avec un risque relatif de 0,51 (IC 95 % : 0,32 à 0,84). Pour les auteurs, leur étude démontre que la flore intestinale possède des propriétés immunomodulatrices jusqu'ici peu explorées, susceptibles, notamment, d'être utilisées pour diminuer la fréquence de la maladie atopique dans les pays développés.

E/ Infections vaginales

Les femmes sujettes à des infections vaginales chroniques ou à répétition souvent associées à une diminution en lactobacilles vaginaux seraient des candidates à un traitement par un probiotique. On a démontré l'efficacité de comprimés et suppositoires intravaginaux à base de lactobacilles pour rétablir l'équilibre de la flore vaginale. La prise de yaourt riche en lactobacilles a aussi permis de prévenir les récurrences d'infections.

F/ Infections urinaires

On tente actuellement d'établir que l'usage oral d'un probiotique pourrait avoir une influence favorable sur le taux de récurrence des infections du tractus urinaire. Les travaux sont basés sur la même théorie appliquée aux infections vaginales. Jusqu'à présent, on a démontré que l'insertion intravaginale d'une préparation contenant des souches sélectionnées de lactobacilles peut réduire la fréquence des infections urinaires récurrentes. Mais ce mode d'administration n'étant pas très pratique, des recherches sont en cours pour la mise au point d'une préparation destinée à la voie orale. Il faut signaler par ailleurs qu'une étude comparant l'effet de la supplémentation en *Lactobacillus* GG versus certains jus de fruits (jus de canneberge, connu pour son rôle synergique dans le traitement des infections urinaires) dans la prévention des infections urinaires chez la femme ne retrouve pas d'effet significatif du *Lactobacillus* GG (143).

G/ Application topique

Des études sont en cours afin de produire un probiotique provenant d'une souche de bactéries présentes dans la flore normale de la peau et qu'on pourrait utiliser contre certaines infections cutanées.

H/ Infections hivernales chez les personnes âgées

On a évalué une souche de lactobacilles dans une base de yaourt sur l'incidence et la gravité des infections gastro-intestinales et pulmonaires chez des personnes âgées. On n'a observé aucune différence dans le nombre d'infections hivernales, mais celles-ci dureraient beaucoup moins longtemps.

I/ Infections à *Helicobacter pylori*

L'infection à *H. pylori* est très répandue et provoque principalement des gastrites. Elle est aussi reliée à la plupart des ulcères gastroduodénaux. Une synthèse parue en 2003 a passé en revue 13 essais cliniques au cours desquels des probiotiques avaient été utilisés (principalement des lactobacilles de différents types) pour traiter cette infection. Dans six de ces études (180 sujets) les probiotiques étaient utilisés seuls : cinq d'entre elles ont donné des résultats encourageants. Aux cours des sept autres essais (682 sujets), on a jumelé les probiotiques au traitement classique (antibiotiques et inhibiteur de la pompe à protons) : dans deux études, les probiotiques ont augmenté l'efficacité du traitement et dans les cinq autres, ils ont réduit les effets indésirables (diarrhée) du traitement aux antibiotiques. Certains de ces essais n'étaient pas à double insu avec placebo et portaient sur un nombre restreint de patients, mais l'auteur de la synthèse conclut que les données indiquent que les probiotiques peuvent être un traitement adjuvant intéressant et pourraient prévenir les infections à *H. pylori* (144). Notez que la plupart de ces études ont porté sur des porteurs sains, c'est-à-dire des patients infectés par cette bactérie, mais qui n'avaient pas de symptômes. Depuis cette synthèse, trois essais à double insu avec placebo sont venus confirmer l'efficacité des probiotiques pour réduire la colonisation de cette bactérie chez des porteurs sains (145,146).

VIII/ INTERET DES PRODUITS CONTENANT DES MICROORGANISMES VIVANTS PAR RAPPORT A CEUX CONTENANT DES MICROORGANISMES TUES.

Les probiotiques sont par définition des produits ingérés vivants. La question se pose toutefois de savoir si des micro-organismes non vivants (corps microbiens détruits par un processus quelconque) ou des produits du métabolisme des probiotiques (milieu de culture par exemple) peuvent présenter les mêmes effets que les probiotiques. Quelques études ont comparé les effets des probiotiques à ceux de produits « contrôles » non vivants. L'exemple le plus significatif est sans doute l'anti-diarrhéique Lactéol®. Il s'agit en fait d'un lactosérum fermenté par la souche *L. acidophilus* LB. Celui-ci est ensuite inactivé par chaleur puis l'ensemble est lyophilisé. Plusieurs études ont montré que ce produit qui ne contient aucun

germe vivant possède une certaine efficacité dans le traitement de diarrhées infectieuses. Il semble dans ce cas que l'effet soit dû aux produits de fermentation de la souche. En effet, comme il a été dit précédemment, les bactéries produisent des substances qui peuvent inhiber la croissance de bactéries pathogènes, les bactériocines. Si l'on veut réellement comparer l'efficacité des souches administrées mortes par rapport aux souches probiotiques administrées vivantes, il faudrait que les microorganismes administrés morts le soient sans le surnageant de culture. Par ailleurs, parmi les études actuelles qui comparent l'efficacité des probiotiques aux microorganismes tués, aucune ne concerne exactement la même souche bactérienne. La rigueur impose que la seule différence entre le groupe testé et le groupe contrôle soit le caractère vivant de la bactérie. Ces études sont donc ininterprétables pour l'instant (147).

CONCLUSION

Au vu des données de la littérature, et compte tenu de leur innocuité, l'intérêt porté aux bactéries probiotiques dans le cadre de la prévention des diarrhées associées aux antibiotiques semble justifié. En effet, la plupart des études publiées à ce jour concluent à une bonne efficacité des souches de *Lactobacillus* et de *Saccharomyces boulardii*. Des travaux de plus en plus nombreux démontrent des effets biologiques de multiples souches, ces effets étant d'ailleurs « **souche-dépendants** ». La corrélation de ces effets avec les caractéristiques pharmacocinétiques des probiotiques permettra sans doute, à l'avenir, une **sélection plus efficace et plus rationnelle des souches**. En ce qui concerne les données sur l'efficacité des probiotiques dans le traitement de ces diarrhées, la multiplicité des études, pas toujours standardisées, rend difficile l'interprétation. Par ailleurs, le mécanisme d'action des probiotiques mériterait d'être mieux renseigné. Il a été prouvé *in vitro* que ces souches étaient capables de produire des substances antimicrobiennes, de stimuler l'immunité et de faire obstacle à la colonisation par des pathogènes. Cependant, les conséquences de ces activités multiples *in vivo* restent pour l'instant du domaine de l'hypothèse.

En ce qui concerne les probiotiques administrés sous forme de produits laitiers ou de compléments alimentaires, il existe actuellement un niveau de preuve très faible de leur efficacité. Le principal obstacle à leur efficacité est la survie dans le tractus digestif. Mais faut-il exiger des denrées alimentaires ou des compléments nutritionnels un niveau de preuve identique à celui d'un médicament ? Tout est question d'honnêteté vis-à-vis du consommateur... L'AFSSA poursuit un travail d'évaluation de l'intérêt des probiotiques. Un récent rapport, portant sur les réalités scientifiques des probiotiques, pose plus de questions qu'il n'apporte de réponses : L'efficacité du probiotique est-elle dépendante de la survie ? Y a-t-il un bon profil de flore ?

Dans tous les cas, les probiotiques sont au centre de plusieurs projets de recherche et leur avenir semble prometteur. Les disciplines médicales qui s'y intéressent sont nombreuses et variées. De leurs effets sur l'immunité à ceux sur la modulation de l'inflammation intestinale et les conséquences en matière de cancérologie, les perspectives d'application des propriétés des probiotiques sont multiples. Reste donc à mettre en place des études cliniques parfaitement standardisées afin de définir plus précisément les indications précises de ces produits, mais aussi les formes galéniques et les « posologies » les mieux adaptées.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Flore normale d'un adulte sain.

Tableau II : Les effets du métabolisme colique sur la santé.

Tableau III : Principales fonctions physiologiques des bactéries indigènes de l'intestin humain.

Tableau IV : Evolution de la consommation d'antibiotiques dans la population générale en France.

Tableau V : Facteurs de risques des diarrhées associées aux antibiotiques.

Tableau VI : Prévalence de *Clostridium difficile* et de ses toxines dans les selles de différentes populations.

Tableau VII : Les formes cliniques de l'infection à *Clostridium difficile*.

Tableau VIII : Fréquence des diarrhées/colites à *Clostridium difficile* et familles d'antibiotiques.

Tableau IX : Le traitement des récurrences de colites à *Clostridium difficile*.

Tableau X : Récapitulatif des résultats obtenus dans différentes études sur l'utilisation des probiotiques en prévention des diarrhées associées aux antibiotiques.

Tableau XI : Etudes sur l'efficacité des souches de *Lactobacillus* dans la prévention de diarrhées associées aux antibiotiques.

Tableau XII : Etudes randomisées de prévention des diarrhées associées aux antibiotiques par *Saccharomyces boulardii*.

Tableau XIII : Etudes randomisées en double aveugle portant sur l'efficacité de *Saccharomyces boulardii* dans les récurrences de colites à *Clostridium difficile*.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Comparaison des flores intestinales de nourrissons allaités et de nourrissons recevant exclusivement des préparations lactées.
- Figure 2 : Répartition des bactéries tout au long du tube digestif.
- Figure 3 : Schéma de la barrière intestinale.
- Figure 4 : Schéma d'une plaque de Peyer.
- Figure 5 : Schéma : Les défenses intestinales.
- Figure 6 : Photo de *Staphylococcus aureus* en microscopie électronique.
- Figure 7 : Photo de *Candida albicans*.
- Figure 8 : Photo de *Clostridium difficile*.
- Figure 9 : La colonisation par *Clostridium difficile*.
- Figure 10 : Muqueuse colique d'un patient atteint de colite à *Clostridium difficile*.
- Figure 11 : Mécanismes d'action des toxines produites par *Clostridium difficile*.
- Figure 12 : Isolement de *Clostridium difficile* par culture.
- Figure 13 : Subculture de *Clostridium difficile* sur gélose au sang.
- Figure 14 : Colonies de *Clostridium difficile* fluorescentes sous UV.
- Figure 15 : Exemple d'un test rapide (Triage®) détectant la toxine A et un antigène bactérien (glutamate déshydrogénase).
- Figure 16 : Recherche de l'effet cytopathogène de la toxine B.
- Figure 17 : Fausses membranes caractéristiques observées sur une pièce de colectomie.
- Figure 18 : Arbre décisionnel proposé par Högenauer devant une diarrhée associée aux antibiotiques.
- Figure 19 : Photo de *Lactobacillus*.
- Figure 20 : Protection de l'infection par encombrement des sites de fixation des bactéries pathogènes.
- Figure 21 : Fixation des pathogènes aux glycoconjugués des cellules épithéliales de l'intestin.

LISTE DES ABREVIATIONS

- **UFC** : Unités Formant Colonies
- **LPS** : Lipopolysaccharide
- **AGCC** : Acide Gras à Chaîne Courte
- **PCR** : Réaction en chaîne de la polymérase
- **FISH** : Hybridation In Situ Fluorescente
- **DAA** : Diarrhées Associées aux Antibiotiques
- **CPM** : Colite Pseudo Membraneuse
- **ICD** : Infection à *Clostridium difficile*
- **TNF** : Tumor Necrosis Factor
- **INF** : Interféron
- **AFSSA** : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
- **Ig** : Immunoglobuline
- **IL** : Interleukine
- **MICI** : Maladie Inflammatoires Intestinales Chroniques
- **RCH** : Rectocolite Hémorragique
- **EPEC** : *Escherichia coli* entérotoxigène
- **ETEC** : *Escherichia coli* entérotoxigène

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Berg RD. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4: 430-435.
2. Stark PL, Lee A. (1982). The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula fed infants during the first year of life. *J. Med. Microbiol.* 15:189-203.
3. Hudault S. Microbial colonization of the intestine of the newborn. In “Recent developments in infant nutrition”, Bindels JG et al (eds), pp 307-317. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
4. Rapport de l’AFSSA “Alimentation infantile et modification de la flore intestinale”. Juin 2003.
5. Yoshioka H, Iseki KI, Fujita K. (1983) Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle fed infants. *Pediatrics.* 72(3):317-321.
6. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. (1999). Development of microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69:1035-1045.
7. Lundquist B, Nord CE, Winberg J. (1985). The composition of the faecal microflora in breast-fed and bottle fed infants from birth to eight weeks. *Acta. Paediatr. Scand.* 74:45-51.
8. Harmsen HMJ, Vibleboer-Veloo ACM, Rangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Wellings GW. (2000). Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30:61-67.
9. Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H. (1999). Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4506-4512.

10. Satokari RM, Vaughan EE, Favier CF, Doré J, Edwards CA, de Vos WM. (2002). Diversity of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp, in breast-fed and formula-fed infants as assessed by 16S rDNA sequence differences. *Microb. Ecol. Health Dis.* 14:97-105.
11. Martin F, Savage SAH, Parrett AM, Gramet G, Doré J, Edwards CA. (2000). Investigation of bacterial colonisation of the colon in breast-fed infants using novel techniques. *Proc Nutr Soc.* 59:64A.
12. Tannock GW. Normal microflora. Chapman & Hall (1995).
13. http://www.institutdanone.org.comprendre.publications.objectif_nutrition.041.dossier.php
14. Savage DC. (1977). Human intestinal microflora in health and disease. Hentges, DJ.Ed. 55-78. Academic press.
15. Freter R. Probiotics. Fuller R ed. 111-144. Chapman & Hall.
16. Bezirtzoglou E. (1997). The intestinal microflora during the first week of life, *Anaerobe.* 3:173-177.
17. Priebe MG, Vonk RJ, Sun X, He T, Harmsen HJM, Welling GW. (2002). The physiology of colonic metabolism. Possibilities for interventions with pre- and probiotics. *Eur. J. Nutr.* 41(Suppl 1):2-10.
18. Shanahan F. (2002). Gut flora in gastrointestinal disease. *Eur. J. Surg. Suppl* 587:47-52.
19. Midtvedt T. Microbial functional activities. (1999). Hanson LA, Yolken RH (eds, Intestinal microflora, Nestle Nutrition Workshop Series, Philadelphia: Lippincott-Raven, 42: 79-96).
20. Faria AM, Weiner HL. (1999). Oral tolerance: mechanism and therapeutic applications. *Adv. Immunol.* 73:153-264.

21. Bry L, Falk PG, Midtvedt T, Gordon JL. (1996). A model system of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science*. 273:1380-1383.
22. Gordon JL, Hooper LV, McNevin SM, Wong M, Bry L. (1997). Epithelial cell growth and differentiation. Promoting diversity in the intestine: conversations between the microflora, epithelium and diffuse GALT. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 273:565-570.
23. Shanahan F. The intestinal immune system. (1994). Johnson LR, Alpers D, Christensen J, Jacobson E, Walsh JH eds. *Physiology of the gastrointestinal tract* 3rd ed, New York, Raven press. 643-684.
24. Shanahan F. (2000). Mechanisms of immunologic sensation of intestinal contents. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278 :191-196.
25. C.Hoebler et G.Nicol, Unité de Recherche sur les Fonctions digestives et la nutrition humaine & Service communication, INRA
26. Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpaa P, Arvilommi H, Salminen S. (2001). Probiotics effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(Suppl):444-450.
27. Brandtzaeg P. (1995). Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *APMIS*. 103:1–19.
- 28.http://www.institutdanone.org.comprendre_publications.objectif_nutrition.067.dossier.php
29. Sanderson IR, Walker WA. (1993). Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders (an update). *Gastroenterology*.104:622–39.
30. Strober W, Kelsall B, Marth T. (1998). Oral tolerance. *J. Clin. Immunol.*18:1–30.
- 31.[http://www.danonevitapole.fr/extranet/vitapole/Nutritopics.nsf/0/E8F45E263654EC6FC1256D240046EF0B/\\$File/NT25FR.pdf](http://www.danonevitapole.fr/extranet/vitapole/Nutritopics.nsf/0/E8F45E263654EC6FC1256D240046EF0B/$File/NT25FR.pdf)

32. Strobel S, Mowat A.M. (1998). Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol. Today*. 19:173–81.
33. Mortense PB, Clause MR. (1996). Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastro-intestinal health and disease. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl* 216:132-148.
34. Moreau MC, Gaboriau-Routhiau V. (2000). Influence of resident intestinal microflora on the development and functions of the intestinal-associated lymphoid tissue, Fuller and Perdigon eds, Probiotics vol 3: 69-114, (Kluwer academic publishers).
35. Hart AL, Stagg AJ, Frame M, Graffner H, Glise H, Falk P, Kamin MA. (2002). The role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. *Aliment Pharmacol. Ther.* 16:1383-1393.
36. Saunier K, Doré J. (2002). Gastrointestinal tract and the elderly: functional foods, gut microflora and healthy ageing, *Digest. Liver Dis.* 34(Suppl 2):19-24.
37. Gorbach SL, Nahas L, Lerner PI, Weinstein L. (1967). Studies of intestinal microflora.I. Effects of diet, age and periody sampling on numbers of fecal microorganisms in man. *Gastroenterology*. 53:847-855
38. Van de Merwe JP, Stegeman JH, Hazenberg MP. (1983). The resident faecal flora is determined by genetic characteristics of the host. Implications for Crohn's disease? *Antonie van Leeuwenhoek*. 49:119-124.
39. Shanahan F. (2000). Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflamm. Bowel Dis.* 6:107-115.
40. Shanahan F. (2001). Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics and ecotherapeutics. *Gastreterology*. 120:622-635.
41. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A, Colombel JF. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 115:1405-1413.

42. Targan SR, Hanauer SB, Van Deventer SJH, Mayer L, Present DH, Braakman T, De Woody KL, Schaible TF, Rutgeerts PJ. (1997). A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor α for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 337:1039-1035.
43. Sutton CL, Kim J, Yamane A, Dalwadi H, Wei B, Landers C, Targan SR, Braun J. (2000). Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 119:23-31.
44. Janowitz HD, Croen EC, Sacher DB. (1998). The role of the fecal stream in Crohn's disease: a historical and analytical review. *Inflamm. Bowel Dis.* 4:29-39.
45. Tytgat GNJ, Mulder CJJ, Brummelkamp WH. (1988). Endoscopic lesions in Crohn's disease early after ileocecal resection. *Endoscopy.* 20:260-262.
46. D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rytgeerts P. (1998). Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology.* 114:262-267.
47. Sartor RB. (1997). Enteric microflora in IBD: pathogens or commensals? *Inflamm Bowel Dis.* 3:230-235.
48. Duchmann R, Scmitt E, Knolle P, Meyer zum Büschenfelde KH, Neurath M. (1996). Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin 10 or antibodies to interleukin 12. *Eur. J. Immunol.* 26:934-938.
49. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Büschenfelde KH. (1995). Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.* 102:448-455.
50. Blumberg RS, Saubermann LJ, Ströber W. (1999). Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Immunol.* 11:648-656.

51. Fuss IJ, Strober W. (1998). Animal models of inflammatory bowel disease: insights into the immunopathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 14:476-482.
52. Andremont A. (2000). Conséquences de l'antibiothérapie sur l'écosystème intestinal, *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 19:395-402.
53. Guillemot D, Maison P, Carbon C, Balkau B, Vauzelle-Kervroëdan F, Sermet C. (1998). Trends in antimicrobial use in the community France, 1981-1992. *J. Infect. Dis.* 177 :492-7.
54. Gabaron-Kerleguer A, C.P Soler, C. Desideri-Vaillant, E. Garrabé, J.D Cavallo. (2001). Diarrhées post-antibiothérapie. *Med. Mal. Infect.* 31 :650-655.
55. Caron F, Lerebourse E. (1991). Les effets secondaires gastro-intestinaux des antibiotiques. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 15 :604-612.
56. McFarland LV. (1998). Facteurs de risque de la diarrhée associée aux antibiotiques, une revue de littérature. *Ann. Med. Interne.* 149:261-266.
57. Kaltenbach G, Heitz D. (2004). Antibiotic-associated diarrhoea in elderly. *La revue de la médecine interne.* 25: 46-53.
58. Wiström J, Norrby SR, Myhre EB, Eriksson S, Granström G, Lagergren L, Englund G, Nord CE, Svenungsson B. (2001). Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. *J. Antimicrob. Chemother.* 47:43-50.
59. McFarland LV. (1995). Epidemiology of infectious and iatrogenic nosocomial diarrhea in a confort mediane patients. *Am. J. Infect. Control.* 23:295-305.
60. Philips JA, Lovejoy JA, Matsu Muja Y. (1976). Ampicillin-associated diarrhea: effect of dosage and route administration. *Pediatrics.* 58:869-872.
61. Norrby SR. (1987). Side-effects of cephalosporins. *Drugs.* 34:105-120.

62. Thibault A, Millet MA, Gaese C. (1991). Risk factors for the development of *Clostridium difficile* associated diarrhoea during a hospital outbreak. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 12:345-348.
63. Bartlett JG. (2002). Antibiotic-associated diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 346:334-339.
64. Levecq H, Cerf M. (1990). Diarrhées des antibiotiques. *Ann. Gastreenterol. Hepatol.* 26:147-156.
65. Surawicz CM, Elmer GW, Speelman P, McFarland LV. (1989). Prevention of antibiotic-associated diarrhoea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology.* 96:981-988.
66. Blanchi A, Pariente E.A. (1992). Colite aiguë hémorragique après prise d'amoxicilline. *Gastreenterol. Clin. Biol.* 16:1012-1014.
67. Benoit R, Dauquechin-Dorval E, Loubergue J, Bacq Y, Olivier JM, Audurier A, Metman EH. (1992). Diarrhées post-antibiotique : rôle de *Klebsiella oxytoca*. *Gastreenterol. Clin. Biol.* 16 :860-864.
68. Beaugerie L. (1996). Diarrhées des traitements antibiotiques. *Rev. Prat.* 46 :171-176.
69. Barbut F, Petit JC. (1996). Epidémiologie des infections à *Clostridium difficile*. *Press. Med.* 25 :385-392.
70. Tancrède C, Azizi P, Raibaud P, Ducluzeau R. (1977). Conséquences de la destruction des barrières écologiques de la flore du tube digestif par les antibiotiques. Perturbation des relations entre l'hôte et les bactéries potentiellement pathogènes. *Med. Mal. Infect.* 7:147-9.
71. Caron F, Ducrotte P, Lerebours E, Colin R, Humbert G, Denis P. (1991). Effects of amoxicillin clavulanate combination on the motility of the small intestine in human beings. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1085-8.

72. Wenisch C, Parschalk B, Hasenhundl M, Hirschl AM, Graninger W. (1996). Comparison of vancomycin, teicoplanin, metronidazole, and fusidic acid for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis*. 22:813-8.

73. http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/staphylococcus_aureus.htm

74. <http://www.meddean.luc.edu/lumen/DeptWebs/microbio/med/gram/slides/slide16.htm>

75. Danna Pl. (1991). Role of *Candida* in pathogenesis of antibiotic-associated diarrhea in elderly inpatients. *Lancet*. 337(8740):511-4.

76. Krause R, Schwab E, Bachhiesl D, Daxböck F, Wenisch C, Krejs GJ, Reisinger EC. (2001). Role of *Candida* in antibiotic associated diarrhea. *J. Infect. Dis*. 184:1065-9.

77. http://www.uwcm.ac.uk.study.medicine.medical_microscopy

78. <http://www.microbes-edu.org.etudiant.difficile.htm>

79. <http://www.chuv.ch/swiss-noso/cf23a2.htm>

80. <http://www.stacommunications.com/journals/pdfs/2004/Clinicien/clinicienpdffeb04/drjobindifficile.pdf>

81. <http://www.cps.ca/francais/enonces/ID/id00-02.htm>

82. Cerquetti M, Luzzi I, Caprioli A, Sebastianelli A, Mastrantonio P. (1995). Role of *Clostridium difficile* in childhood diarrhea. *Pediatr Infect Dis J*. 14:598-603.

83. <http://www.md.ucl.ac.be.entites.mint.intr.hainaut.dossierprojet.dossierdocsem.clostridium.html>

84. <http://afa.asso.fr/presse/02snfgBI.htm>

85. http://www.nutripages.fr/article.php3?id_article=7

86. <http://www.bio-forme.fr.xantis.htm>

87. http://www.matol.com.corpo.HBoutique.wpCatalogue4200_niv3.aspx?lang=EN_CA&item=02980105&E=2

88. <http://www.oemine.com>

89. <http://www.ponroy.com.fr/dietetique.efdigest.html>

90. http://www.nutergia.com/produits.presentation_produits.htm

91. <http://www.theses.ulaval.ca.2003.20742.20742.pdf>

92. http://www.tht.be.fr/ferments_production.htm

93. Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly B. (2001). Probiotics activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res. Microbiol.*152:167-173.

94. Isolauri E, Majamaa IF, Arvola T, Rantala I, Virtanen E, Arvilommi H. (1993). *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology.* 105:1643–50.

95. Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virtanen E, Laine S, Arvilommi H. (1992). Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *lactobacillus* strain. *Pediatr. Res.*32:141–4.

96. Perdigón G, de Macías ME, Alvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AA. (1986). Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect. Immun.* 53:404–10.

97. Perdigón G, de Macías ME, Alvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AP. (1998). Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology.*63:17–23.

98. Sütas Y, Soppi E, Korhonen H, et al. (1996). Suppression of lymphocyte proliferation *in vitro* by bovine caseins hydrolyzed with *Lactobacillus casei* GG-derived enzymes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:216–24.

99. Sütas Y, Hurme M, Isolauri E. (1996) Downregulation of antiCD3 antibody-induced IL-4 production by bovine caseins hydrolysed with *Lactobacillus* GG-derived enzymes. *Scand. J. Immunol.*43:687–9.

100. Miettinen M, Vuopio-Varkila J, Varkila K. (1996). Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect. Immun.* 64:5403–5.
101. De Simone C, Salvadori BB, Negri R, Ferrazzi M, Baldinelli L, Vesely R. (1986). The adjuvant effect of yogurt on production of gamma-interferon by ConA-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Nutr. Rep. Int.* 33:419–33.
102. Halpern GM, Vruwink KG, Van de Water J, Keen CL, Gershwin ME. (1991). Influence of long-term yoghurt consumption in young adults. *Int. J. Immunother.* 7:205–10.
103. Sütas Y, Autio S, Rantala I, Isolauri E. (1997). IFN- γ enhances macromolecular transport across Peyer's patches in suckling rats: implications for natural immune responses to dietary antigens early in life. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 24:162–9.
104. Shroff KE, Meslin K, Cebra JJ. (1995). Commensal enteric bacteria engender a self limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect. Immun.* 63:3904–13.
105. Isolauri E. (1997). Intestinal involvement in atopic disease. *J. R. Soc. Med.* 90:15–20.
106. D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. (2002). Probiotics in prevention of antibiotic-associated diarrhea. *BMJ.* 324:1341-1345.
107. Adam J, Barrett C, Barrett-Bellet A. (1977). Essais cliniques contrôlés en double insu de l'Ultra-Levure® lyophilisée. Etude multicentrique par 25 médecins de 388 cas. *Gaz. Med. Fr.* 84:2072-2081.
108. Gotz V, Romankievicz JA, Moss J, Murray HW. (1979). Prophylaxis against ampicillin associated diarrhea with *Lactobacillus* preparation. *Am. J. Hosp. Pharm.* 36:757-757.
109. Surawicz CM. (1989). Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*. *Gastroenterology.* 96:981-986.

110. Wunderlich PF, Braun L, Fumagalli I. (1980). Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus* SF68 in the prevention of AAD and in the treatment of acute diarrhea, *J. Int. Med. Res.* 17:333-338.
111. Tankanow RM, Ross MB, Ertel IJ, Dickinson DG, McCormick LS, Garfinkel JF. (1990). A double-blind, placebo-controlled study of the efficacy of Lactinex in the prophylaxis of amoxicillin-induced diarrhea. *DICP.* 24:382-384.
112. Orrhage K, Brignar B, Nord CE. (1994). Effects of supplements of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* on intestinal microbiota during administration of clindamycin. *Microbiol. Ecol. Health. Dis.* 7:17-25.
113. Mc Farland LV, Surawicz CM, Greenberg RN. (1995). Prevention of β -lactam associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am. J. Gastroenterol.* 90: 439-448.
114. Lewis SJ, Potts LF, Barry RE. (1998). The lack of therapeutic effect of *S. boulardii* in the prevention of antibiotic related diarrhea in elderly patients. *J. Infect.* 36:171-4.
115. Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DI. (1999). *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children. *J. Pediatr.* 135(5):564-8.
116. Cremonini F, Di Caro S, Covino M. (2002). Effect of different probiotic preparations on anti-*Helicobacter pylori* therapy-related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study. *Am. J. Gastroenterol.* 97:2744-2749.
117. Cremonini F, Di Caro S, Nista EC, Bartolozzi F, Capelli G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. (2002). Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol. Ther.* 16:1461-1467.
118. Aramuzzi A, Cremonini F, Ojetti V. (2001). Effect of *Lactobacillus* GG supplementation on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy: a pilot study. *Digestion* 63:1-7.

119. Arvola T, Laiho K, Torkkeli S (1999). Prophylactic *Lactobacillus* GG reduces of AAD in children with respiratory infections: a randomized study. *Pediatrics*. 104:1121-1122.
120. Clements ML, Levine MM, Ristaino PA. (1983). Exogenous lactobacilli fed to man – their fate and ability to prevent diarrhoeal disease. *Prog. Food Nutr. Sci.* 7:29-37.
121. Borgia M, Sepe N, Brancato V, Borgia B. (1982). A controlled clinical study on *Streptococcus faecium* preparation for the prevention of side reactions during long-term antibiotic treatments. *Curr Ther Res.* 31; 266-271.
122. Colombel JF, Cortot A, Neut C. (1987). Yoghurt with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin-induced gastrointestinal effects. *Lancet*. 2:43 letter.
123. Gorbach SL, Chang T, Goldin B. (1978). Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *Lancet*. ii:1519
124. Biller JA, Katz AJ, Flores AF, Buie TM, Gorbach SL. (1995). Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *J. Ped. Gastroenterol Nutr.* 21(2):224-226.
125. Bennet RG, Laughon B, Lindsay J. *Lactobacillus* GG treatment of *Clostridium difficile* infection in nursing home patients. Abstract of the 3rd International Conference on Nosocomial Infection, Atlanta, Georgia (1990).
126. Pochapin M. (2000). The effect of probiotics on *C. difficile* diarrhea. *Am. J. Gastroenterol.* 95 (Supplement): 11-13.
127. Tvede M, Rask-Madsen J. (1989). Bacteriotherapy for chronic relapsing *Clostridium difficile* diarrhea in six patients. *Lancet*. i 8648:1156-1160.
128. Bowden TA, Mansberger AR, Lykins LE. (1981). Pseudomembranous enterocolitis: mechanism for restoring floral homeostasis. *Am. Surg.* 47:178-183.

129. Persky S, Brandt LJ. (2000). Treatment of recurrent *Clostridium difficile* associated diarrhea by administration of donated stool directly through a colonoscope. *Am. J. Gastroenterol.* 95:3283-3285.
130. Toothaker RD, Elmer GW. (1984). Prevention of clindamycin-induced mortality in hamsters by *Saccharomyces boulardii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26:552-556.
131. Surawicz CM, McFarland LV, Elmer G, Chinn G. (1989). Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with vancomycin and *Saccharomyces boulardii*. *Am. J. Gastroenterol.* 84:1285-1287.
132. Popoola J, Swann A, Warwick G. (2000). *Clostridium difficile* in patients with renal failure-management of an outbreak using biotherapy. *Nephrol Dial Transplant.* 15:571-574.
133. McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Fekety R, Elmer GW, Moyer KA, Melcher SA, Bowen KE, Cox JL, Noorani Z. (1994). A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *JAMA.* 271:1913-1918.
134. Surawicz CM, McFarland LV, Greenberg RN. (2000). The search of a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. *Clin. Infect. Dis.* 31:1012-1017.
135. <http://www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/Floreintestinale.pdf>
136. Salminen MK, Tynkynnen S, Rautelin H. (2002). *Lactobacillus* bacteriemia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG. Finland. *Clin. Inf. Dis.* 35:1155-1160.
137. Rautio M, Jousimies-Somer H, Kauma H, Pietarini I, Saxelin M, Tynkynnen S, Koskela M.. (1999). Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L.rhamnosus* strain. *Clin. Infect. Dis.* 28:1159-1160.

138. Mackay AD, Taylor MB, Kibler CC, Hamilton-Miller JMT. (1999). *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. *Clin. Microbiol. Infect.* 5:290-292.
139. Antony SJ. (2000). Lactobacillemia: an emerging cause of infection in both the immunocompromised and the immunocompetent host. *J. Natl. Med. Assoc.* 92: 83-86.
140. Marteau P. (2001). Safety aspects of probiotic products. *Scand. J. Nutr.* 45:22-24.
141. Farina C, Arosio M, Mangia M, Moioli F. (2001). *Lactobacillus casei* sp *rhamnosus* sepsis in a patient with ulcerative colitis. *J. Clin. Gastroenterol.* 33(3):251-252.
142. Jureen R, Sondena K, Hoiby EA, Digranes A. (2001). *Lactobacillus rhamnosus* septicemia in a patient with a graft in the inferior vena cava. *Scand. J. Infect. Dis.* 34; 135-136.
143. Hattaka K. (2001). Effect on long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *BMJ.* 322(7298):1327-1329.
144. Hamilton-Miller JM. (2003). The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 22(4):360-6.
145. Wang KY, Li SN, Liu CS, Perng DS, Su YC, Wu DC, Jan CM, Lai CH, Wang TN, Wang WM. (2004). Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yoghurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori* . *Am. J. Clin. Nutr.* 80(3):737-41.
146. Cruchet S, Obregon MC, Salazar G, Diaz E, Gotteland M. (2003) Effect of the ingestion of a dietary product containing *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in children. *Nutrition.* 19 (9):716-21.
147. <http://www.afssa.fr/ftp/afssa/28176-28177.pdf>

148. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. (2001). Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 357(9262):1076-9.

Nom – Prénom : GRELET Aline

Titre de la thèse : Intérêt des probiotiques dans la prévention et le traitement des diarrhées post-antibiothérapie.

Résumé de la thèse :

Les probiotiques ont été projetés sur le devant de la scène médiatique par les géants de l'agro-alimentaire et les allégations santé qu'ils affichent sont de plus en plus fortes. L'objectif de cette thèse était de faire la synthèse des données bibliographiques récentes concernant leur efficacité dans la prévention et le traitement des troubles digestifs associés aux antibiotiques. Après un rappel détaillé sur la composition, les fonctions métaboliques et les méthodes d'étude de la flore intestinale, nous avons étudié les effets délétères liés à la consommation d'antibiotiques, dont on sait qu'elle est particulièrement massive dans notre pays. Ceux-ci peuvent être dus à une perturbation de l'équilibre de la flore intestinale, une destruction de l'effet barrière qu'elle exerce ou encore à la prolifération d'agents bactériens pathogènes. Les conséquences cliniques de ce déséquilibre sont variables et peuvent aller de la diarrhée simple à la colite aiguë hémorragique ou encore à la colite pseudomembraneuse. Les probiotiques, souches bactériennes ou levures, administrées vivantes, et résistantes à l'acidité gastrique, permettent de contrecarrer certains effets délétères des antibiotiques. Cependant, la diversité des souches utilisées, des formes galéniques et des posologies ne permet pas de conclure de manière définitive sur l'efficacité, *in vivo*, de ces microorganismes.

Mots-clé : PROBIOTIQUES, FLORE INTESTINALE, DIARRHEES ASSOCIEES AUX ANTIBIOTIQUES.

JURY :

Président :	Mr Reynaud	Professeur de Bactériologie Faculté de Pharmacie de Nantes
Assesseurs :	Mme Caroff	Maître de Conférences de Bactériologie Faculté de Pharmacie de Nantes
	Mr Olivier	Maître de Conférences de Toxicologie Faculté de Pharmacie de Nantes
	Mr Burgaud	Docteur en pharmacie 2, Rue du Commerce, 85160 St Jean de Monts
	Mme Saupin	Docteur en pharmacie 11, Rue de la Boule au Lièvre, 85800 St Gilles Croix de Vie

Adresse de l'auteur : 5, Allée des Roses
85670 Saint Christophe du Ligneron.