

**Effets des probiotiques et prébiotiques sur  
la flore et l'immunité de l'homme adulte**

---

***Effects of probiotics and prebiotics  
on flora and immunity in adults***

**Février/February 2005**

**Coordination scientifique /*Scientific coordination***  
Jean-Christophe Boclé

**Coordination éditoriale/*Editorial coordination***  
Jean-Christophe Boclé & Carole Thomann

**Effets des probiotiques et prébiotiques  
sur la flore et l'immunité de l'homme adulte ..... 5**

***Effects of probiotics and prebiotics  
on flora and immunity in adults ..... 59***

## **Membres du groupe de travail/*Members of the working group***

---

### **| Experts**

Mme D. Baelde (DGCCRF)  
M. D. Brassart (BDN Bio sarl)  
M. G. Corthier (INRA de Jouy-en-Josas)  
M. J. Doré (INRA de Jouy-en-Josas)  
Mme M. Heyman (INSERM)  
M. P. Marteau (Hôpital Européen Georges Pompidou) - Président  
M. C. Matuchansky (ancien médecin chef de service des hôpitaux de Paris, AP-HP)  
Mme C. Michel (INRA de Nantes)

### **| Agence Française de sécurité sanitaire des aliments/*French Food Safety Agency***

M. J.-L. Berta  
M. J.-C. Boclé

### **| Représentants de l'industrie auditionnés/*Audited industry representatives***

M. J.-M. Antoine (Danone)  
Mme I. Auger (Danisco)  
M. W. Caers (Orafti)  
Mmes C. Cherbut, M.-F. Pagerey & M. C. Cavadini (Nestlé)  
Mme V. Delahaye-Sarraute et M. H. Durand (Lallemand)  
M. V. Duvillier (Tereos)  
M. C. Farrokh et R. Ducluzeau (Syndifrais)  
Mme B. Rousseau et M. A. Fazel (Yoplait)

## **Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte**

**Février 2005**

# Sommaire

---

<b>Introduction</b> .....	<b>9</b>
<b>I- Peut-on définir un bon profil de flore ?</b> .....	<b>10</b>
1. Introduction.....	10
2. Evaluation qualitative de la flore par analyse comparée de séquences de gènes bactériens .....	10
3. Détermination de la composition de la flore par recherche de signatures moléculaires .....	13
4. Microflore intestinale normale de l'Homme sain : mythe ou réalité ?.....	13
5. Maladies et déséquilibres de la microflore intestinale .....	14
5.1 Modifications de la microflore saprophyte colique au cours de diarrhées infectieuses.....	14
5.2 Modifications de la microflore endogène colique au cours de maladies inflammatoires cryptogénétiques (et chroniques) de l'intestin.....	15
<b>II- Quel est l'intérêt des produits contenant des micro-organismes vivants par rapport aux produits contenant des micro-organismes tués ?</b> .....	<b>16</b>
1. Introduction.....	16
2. Intolérance au lactose et bactéries du yaourt vivantes ou mortes .....	16
3. Effets écologiques de produits fermentés ne contenant plus de germes vivants.....	16
4. Effets immunitaires .....	17
<b>III-Survie des probiotiques alimentaires en transit dans l'intestin de l'homme</b> <b>19</b>	
1. Introduction.....	19
2. Les bifidobactéries.....	19
3. Les lactobacilles .....	19
4. Autres bactéries.....	21
4.1 Les bactéries du yaourt : <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus bulgaricus</i> .....	21
4.2 <i>Lactococcus lactis</i> .....	21
4.3 Propionibactéries .....	22
4.4 <i>Enterococcus faecium</i> .....	22
<b>IV- Les effets des probiotiques sont-ils spécifiques à la souche, à l'espèce, au genre ?</b> .....	<b>23</b>
1. Introduction.....	23
2. Preuves de "spécificités pharmacologiques ou d'effets".....	23
2.1 Entre genres microbiens et espèces .....	23
2.2 Entre souches au sein d'une même espèce.....	23
<b>V- Les effets des prébiotiques sont-ils structure-dépendants ?</b> .....	<b>25</b>
1. Introduction.....	25
2. Disparité biochimique des prébiotiques .....	26
3. Structure biochimique des prébiotiques et effets sur la flore .....	26
<b>VI- Comment peut-on démontrer l'existence d'un effet bifidogène ?</b> .....	<b>29</b>
1. Introduction.....	29
2. Modèles expérimentaux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	29
3. Protocole des études chez l'homme .....	29
4. Méthode de dénombrement et d'expression des résultats .....	31
5. Intensité et spécificité .....	32
<b>VII- Effet des probiotiques sur la flore intestinale</b> .....	<b>34</b>
1. Introduction.....	34
2. Revue et critique de quelques études les plus significatives .....	34
3. Recommandations pour le protocole des études .....	35

<b>VIII- Effet des pré- et probiotiques sur le système immunitaire.....</b>	<b>36</b>
1. Introduction.....	36
2. Effet des probiotiques sur l'immunité innée.....	36
2.1 Stimulation de l'immunité innée chez l'homme (ou dans des lignées cellulaires humaines).....	36
2.2 Stimulation de l'immunité innée chez la souris, le rat ou sur des lignées macrophagiques animales.....	38
3. Effet sur l'immunité adaptative.....	38
3.1 Immunité des muqueuses: IgA sécrétoires.....	39
3.2. Tolérance orale.....	39
3.3 Allergie.....	40
4. Effet anti-inflammatoire des bactéries lactiques et/ou de leurs produits de sécrétion.....	41
<b>IX- Effet des pré- et probiotiques sur les fonctions intestinales.....</b>	<b>43</b>
1. Introduction.....	43
2. Digestion-absorption intestinale.....	43
2.1 Digestion de disaccharides.....	43
2.2 Absorption du glucose.....	44
2.3 Absorption hydro-minérale.....	44
2.4. Absorption des protéines et de l'azote.....	45
3. Motricité intestinale et transit intra-luminal.....	45
3.1 Probiotiques.....	45
3.2 Prébiotiques.....	46
4. Barrière fonctionnelle épithéliale (non immunologique).....	46
4.1. Cellule épithéliale et interactions "bactéries-épithélium"; mucus intestinal.....	46
4.2 Perméabilité intestinale, translocation bactérienne.....	48
4.3. Apoptose.....	49
4.4 Trophicité, enzymes, synthèse protéique.....	49
<b>X- Quelles perspectives d'application des futurs probiotiques génétiquement modifiés ? .....</b>	<b>51</b>
<b>XI- Lignes directrices permettant de justifier/valider les allégations relatives aux effets des pré- et probiotiques .....</b>	<b>53</b>
1. Pré-requis.....	53
2. Exigences communes à la méthodologie des études cliniques réalisées avec des prébiotiques et des probiotiques.....	53
2.1 Conditions de réalisation de l'étude.....	53
2.2 Les caractéristiques des études.....	53
2.3 Exploitation des résultats.....	54
2.4 Exigences impératives.....	54
3. Exigences spécifiques aux probiotiques : comment démontrer qu'un micro-organisme est un probiotique ? .....	54
4. Exigences spécifiques aux prébiotiques : comment démontrer qu'une substance est prébiotique ?.....	54
5. Conclusion.....	54
<b>Synthèse.....</b>	<b>55</b>
<b>Glossaire .....</b>	<b>57</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>111</b>





Depuis plus de 10 ans, on voit apparaître sur le marché de l'agroalimentaire des spécialités laitières fermentées avec des bactéries lactiques comme le Bifidus, du sucre enrichi en FOS (Fructo-oligosaccharides) ou en inuline ou encore des compléments alimentaires contenant des bactéries. Des effets bénéfiques comme l'équilibre ou le bon fonctionnement de la flore intestinale, la régulation du système immunitaire intestinal ou le renforcement de la barrière intestinale sont revendiqués pour chacun de ces produits.

Dans ce contexte liant alimentation et santé, les probiotiques, micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte, et les prébiotiques, ingrédients alimentaires non digestibles qui stimulent de manière sélective au niveau du côlon la multiplication ou l'activité d'un ou d'un nombre limité de groupes bactériens susceptibles d'améliorer la santé de l'hôte, font l'objet de nombreuses publications scientifiques visant à démontrer des effets de ces composés tant au niveau digestif que systémique. En parallèle, l'industriel exploite ces résultats et valorise ses produits par l'intermédiaire d'allégations santé qui suggèrent qu'un bénéfice sera tiré de la consommation de ces aliments.

Les experts du CES « Nutrition humaine » de l'Afssa sont de plus en plus sollicités pour évaluer la véracité d'allégations relatives aux aliments contenant des prébiotiques ou des probiotiques. Pour compléter son rapport publié en novembre 2003 qui avait pour objectif de proposer des lignes directrices pour l'évaluation de préparations pour nourrissons et de suite contenant des prébiotiques et/ou des probiotiques destinés à modifier la flore intestinale, l'Afssa a réuni un nouveau groupe d'experts afin d'évaluer les effets des prébiotiques et probiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte.

Ainsi, le groupe fait le point sur la composition et l'évolution de la flore humaine en s'interrogeant sur la validité du concept de bonne et mauvaise flore. Sont également abordés les facteurs susceptibles de moduler les propriétés des souches telles que leur survie au cours du transit, leur caractère vivant ou pas, et la démonstration d'effets souches-dépendants des probiotiques ou ceux structure-dépendants des prébiotiques.

Le groupe se penche sur les résultats des publications afin de définir les critères méthodologiques adéquats en vue de caractériser l'effet bifidogène d'une souche ou d'un prébiotique. Cette partie est complétée par l'analyse critique des outils méthodologiques et de l'interprétation des résultats de quelques études ayant montré certains effets des probiotiques.

Les experts relativisent également les effets des prébiotiques et probiotiques sur l'immunité et les fonctions intestinales (digestion, absorption, motricité et effet barrière) de l'hôte au regard des modèles utilisés pour démontrer ces effets. Les applications actuelles et futures des MGM (Microorganismes génétiquement modifiés) sont évoquées à travers le contexte scientifique et réglementaire de ces probiotiques particuliers.

Une proposition de lignes directrices utilisables pour justifier ou valider les allégations relatives aux effets des produits contenant prébiotiques et/ou probiotiques, clôt de façon pratique le rapport.

# I- Peut-on définir un bon profil de flore ?

---

## 1. Introduction

Le but des probiotiques et des prébiotiques est parfois d'obtenir un « bon profil de flore intestinale ». La question posée est donc de savoir si un tel profil peut être (aisément ?) défini ou si de « mauvais profils de flore » éventuellement associés à des maladies peuvent être reconnus.

Le tube digestif stérile *in utero* est rapidement colonisé après la naissance. Les divers compartiments digestifs constituent un ensemble de niches écologiques offrant chacune un environnement favorable à la colonisation par les bactéries qui les atteignent lors de la naissance et dans les jours qui suivent. Le tube digestif mature héberge 100000 milliards de bactéries. S'il a bien été observé que les premiers arrivants ne sont pas nécessairement les premiers colonisateurs, les déterminants de la composition de la microflore intestinale de l'adulte ne sont pas identifiés de façon définitive. Le tube digestif évolue beaucoup au plan physiologique et physico-chimique dans les premiers mois de la vie. L'immunité se structure progressivement pour prendre le relais de la protection non spécifique apportée initialement par le lait maternel. Il est concevable qu'interviennent des interactions entre micro-organismes, les anaérobies facultatifs premiers colonisateurs préparant par exemple l'écosystème pour les anaérobies stricts qui domineront ensuite. Certains microorganismes colonisateurs exercent également un effet régulateur en s'opposant à la colonisation par d'autres microorganismes. L'hôte joue un rôle et on conçoit un dialogue entre l'épithélium intestinal et la microflore. Gordon *et al.* ont récemment stimulé un regain d'intérêt pour ces interrelations hôte-flore en soulignant, dans le contexte d'un modèle animal simple, l'importance des régulations génétiques croisées qui peuvent se tisser. Si un tel dialogue existe, les signaux moléculaires correspondants sont encore mal connus à ce jour. Quels que soient les mécanismes qui président à la mise en place de la microflore après la naissance, ceux-ci aboutissent à un complexe microbien endosymbiotique qui semble se stabiliser au plan fonctionnel et structurel vers l'âge de deux ans (Mackie *et al.*, 1997).

La microflore fécale a été plus étudiée et est mieux connue que celle d'autres niches et compartiments digestifs. Elle ne représente cependant que la microflore luminale des parties distales du côlon et diffère de la microflore luminale du côlon proximal (Marteau *et al.*, 2001) ainsi que de la microflore associée à la muqueuse intestinale (Zoetendal *et al.*, 2002 ; Lepage, communication personnelle). Quelques études basées sur la culture des bactéries ont montré que les genres dominants de la microflore fécale cultivable de l'adulte sont *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium* et *Bifidobacterium* (Moore *et al.*, 1974, Finegold *et al.*, 1983). Cependant, 70 à 80% de la biomasse microbienne fécale étant non-cultivable (Langendijk *et al.*, 1995 ; Suau *et al.*, 1999), les connaissances récentes dérivent de méthodes indépendantes de la culture *in vitro* (Blaut *et al.*, 2002 ; Suau *et al.*, 2003).

Quelques éléments de connaissance récemment acquis sont essentiels à une discussion sur la pertinence du concept de microflore intestinale normale de l'Homme. On considère que les bactéries dominantes sont celles qui représentent 1% ou plus des bactéries totales. Ainsi pour une microflore fécale totale atteignant  $10^{10}$  à  $10^{11}$  bactéries par grammes, la flore dominante représentera les bactéries présentes à des niveaux de population de  $10^8$  et plus (Ducluzeau *et al.*, 1988). Ce sont ces bactéries qui contribuent le plus significativement aux fonctionnalités de l'écosystème intestinal. Par ailleurs, la plupart des méthodes moléculaires sont précises dans des gammes de populations correspondantes à cette flore dominante.

## 2. Evaluation qualitative de la flore par analyse comparée de séquences de gènes bactériens

Les travaux pionniers de Wilson *et al.* (1996) et de Suau *et al.* (1999) ont permis les premières descriptions exhaustives des espèces microbiennes dominantes de la microflore fécale humaine sur une base purement moléculaire. L'approche développée dans ces travaux était une détermination de la composition de la flore par analyse de séquences. Le

marqueur moléculaire choisi était la séquence de l'ADN ribosomal 16S cloné, celui-ci étant reconnu comme un sémantide idéal (biopolymère marqueur de l'évolution) (Woese *et al.*, 1992). Ces travaux soulignent la complexité de la flore (grande diversité d'espèces extrapolable à une centaine d'espèces bactériennes différentes par microflore fécale humaine) et l'importance de la composante non cultivée, 75% des espèces identifiées n'ayant pas de représentants dans les collections de microorganismes actuelles. Utilisant une méthode rapide de comparaison de la diversité d'espèces dominantes, Zoetendal *et al.* (1998) et Sutren *et al.* (2000) avaient observé que la diversité d'espèces du cortège microbien intestinal dominant est spécifique de l'individu. L'extension récente des connaissances basées sur la composition de la flore par analyse de séquences va tout à fait dans ce sens, indiquant que le nombre d'espèces communes à plusieurs individus est très restreint ou nul : Mangin *et al.* (2004), comparant la flore de 4 sujets sains, identifient une seule espèce commune ; Saunier (communication personnelle), étudiant la flore fécale de 10 personnes âgées identifie une espèce commune. Par ailleurs, la diversité d'espèces de la microflore fécale dominante apparaît très stable au cours du temps pour un individu donné, durant quelques mois voire quelques années (Zoetendal *et al.*, 1998 ; Seksik *et al.*, 2003 ; Vanhoutte *et al.*, 2004). Cela traduit une aptitude de la microflore dominante à l'état d'équilibre à résister aux modifications sous la pression de facteurs endogènes ou exogènes. Par contre, la microflore sous-dominante est beaucoup moins stable au plan qualitatif et sujette à un relais constant d'espèces (Vanhoutte *et al.*, 2004 ; Rochet, communication personnelle). Ces données qui dérivent d'observations sur un nombre relativement restreint d'individus sont consolidées par l'étude de la stabilité à trois mois de la flore de plus de 20 jeunes adultes (Saunier & Lay, communication personnelle). Elles n'excluent cependant pas d'éventuels relais d'espèces comme cela a été observé au sein du genre *Bacteroides* à l'aide d'anticorps monoclonaux (Corthier *et al.*, 1996). L'aptitude de la flore à retrouver son état d'équilibre après une perturbation majeure, provoquée par une antibiothérapie par exemple, n'a été que peu étudiée à l'aide d'outils moléculaires. Un travail réalisé sur des souris à flore humaine a montré un retour à la composition initiale en quelques jours après l'arrêt du traitement antibiotique (Barc *et al.*, 2004). Chez l'homme, un travail récent indique également un retour progressif sur 2 mois à une diversité d'espèces très similaire à la flore initiale chez 6 individus sains après une prise d'amoxicilline (de la Cochetière *et al.*, communication personnelle).

Enfin l'analyse de flores de personnes âgées a montré une augmentation de la complexité et conduit à la mise en évidence de groupes phylogénétiques dominants et hautement prévalents jamais observés chez le jeune adulte (Saunier *et al.*, communication personnelle). La figure 1 illustre la diversité phylogénétique des groupes microbiens rencontrés dans la flore intestinale humaine sur la base d'une analyse comparée de séquences d'ADNr 16S.

#### **Points importants**

- Les bactéries dominantes représentent par définition au moins 1% des bactéries totales.
- On observe :
  - Un profil de flore spécifique à chaque individu
  - Une stabilité de la flore dominante et une relative instabilité de la flore sous-dominante
  - Une augmentation de la complexité de la flore avec l'âge

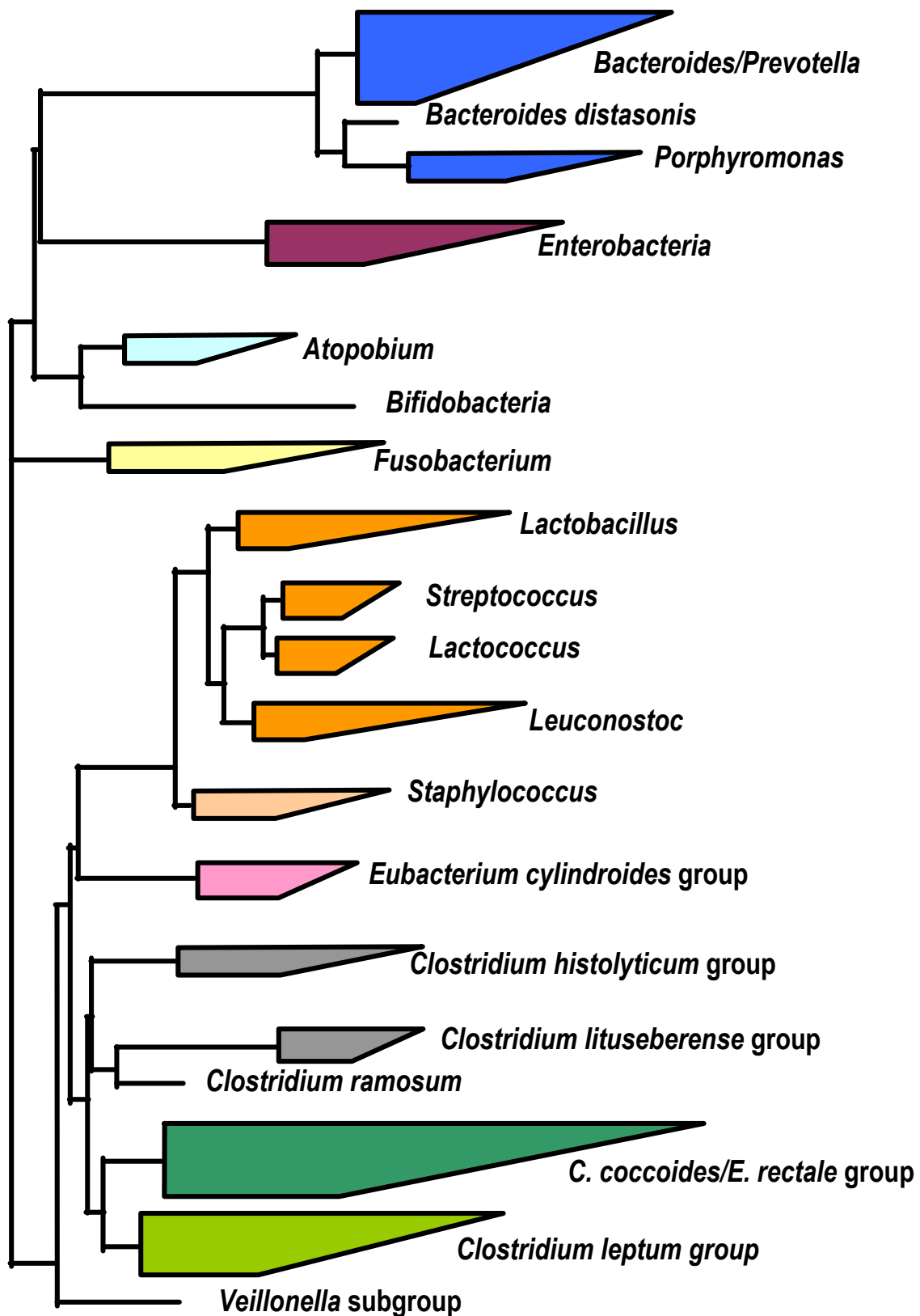


Figure 1 : Arbre phylogénétique présentant les groupes bactériens principaux ayant des représentants dans la microflore fécale dominante de l'homme adulte en bonne santé (d'après Blaut *et al.*, 2002).

### 3. Détermination de la composition de la flore par recherche de signatures moléculaires

Les séquences d'ADNr 16S connues renferment des signatures moléculaires des grands groupes bactériens. Ceci permet le développement d'outils moléculaires de recherche quantitative et directe de ces signatures dans la microflore fécale humaine dominante. Il a été montré que cette dernière est composée de quelques grands groupes phylogénétiques. Trois groupes rassemblent ainsi la plus grande part des bactéries fécales dominantes. Le groupe dit « *Eubacterium rectale* - *Clostridium coccoïdes* » est toujours représenté, et souvent le plus important [14 à 31 % des bactéries totales en moyenne suivant les études ; Franks *et al.*, 1998 ; Jansen *et al.*, 1999 ; Sghir *et al.*, 2000 ; Rigottier-Gois *et al.*, 2003 ; Seksik *et al.*, 2003]. Il comprend des espèces bactériennes appartenant aux genres *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*. Phylogénétiquement proche, le groupe « *Clostridium leptum* », qui comprend notamment les espèces *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus albus* et *R. flavefaciens*, est également très souvent dans la dominance [16 à 22% en moyenne ; Sghir *et al.*, 2000 ; Lay *et al.*, communication personnelle]. Les *Bacteroides* et apparentés (genres *Bacteroides*, *Prevotella* et *Porphyromonas*) sont toujours présents et partagent la dominance avec les groupes précédents [9 à 42% des bactéries totales en moyenne suivant les études]. Moins systématiquement détectées en dominance mais représentant en moyenne quelques pourcents des bactéries totales, on trouve les bifidobactéries [0,7 à 10%] et les bactéries du groupe *Collinsella-Atopobium* [0,3 à 3,7% en moyenne ; Harmsen *et al.*, 2000 ; Rigottier-Gois *et al.*, 2003]. Les entérobactéries sont plus rarement observées dans la microflore fécale dominante [en moyenne 0,4 à 1%], de même que les lactobacilles et streptocoques [2% selon Lay *et al.*, communication personnelle.]. On y trouve également, mais exceptionnellement, des espèces apparentées à *Clostridium ramosum*, *Eubacterium cylindroides*, *Phascolarctobacterium*, *Verrucomicrobium* ou *Sporomusa-Selenomonas-Veillonella*.

Si la microflore intestinale se stabilise assez tôt dans la vie, il est couramment admis, bien qu'assez mal démontré jusqu'ici, que la composition de la flore se modifie chez les sujets âgés (Mitsuoka, 1992) avec :

- 1) une diminution notable des bifidobactéries qui deviennent sous-dominantes,
- 2) une augmentation des entérobactéries et des bactéries lactiques qui deviennent dominantes
- 3) une augmentation de clostridies. Ces observations sont actuellement complétées par l'étude Européenne CROWNALIFE montrant que des différences existent d'un pays à l'autre entre personnes âgées vivant en France (n=26), en Allemagne (n=37), en Italie (n=39) et en Suède (n=39), mais surtout, confirmant une évolution avec l'âge par comparaison à la flore de jeunes adultes (n=20 par pays) en montrant notamment une augmentation des entérobactéries et des lactobacilles pour certains pays, mais pas de diminution significative des bifidobactéries. Ces travaux montrent aussi des différences dans les proportions relatives des groupes très dominants (groupes *Bacteroides* et *C.coccoïdes* plus élevés en Allemagne ; groupes *Bacteroides* et *C.leptum* moins élevés en Italie).

### 4. Microflore intestinale normale de l'Homme sain : mythe ou réalité ?

L'accumulation de connaissances récentes a modifié considérablement notre vision de l'écosystème microbien intestinal de l'homme. Ainsi, l'analyse de composition conduit à s'attendre à retrouver en dominance les groupes « *Eubacterium rectale* - *Clostridium coccoïdes* » et « *Clostridium leptum* », ainsi que le groupe « *Bacteroides* et apparentés », mais dans des proportions très variables d'un individu à l'autre. Il n'est pas possible de définir à ce jour un ensemble d'espèces microbiennes marqueur de la flore normale. La photographie actuelle de la microflore intestinale humaine remet totalement en question le concept dichotomique opposant « bonnes » et « mauvaises bactéries » (cité dans Mitsuoka, 1992), tout au moins sur le plan de la stricte composition de microflore de sujets sains. Ainsi, les premiers « accusés » comme *Clostridium* font communément partie de la microflore fécale dominante (même un *Clostridium difficile* toxigène n'est pas pathogène tant que la flore autochtone en équilibre maintient cette population à un niveau sous-dominant), de même que les entérobactéries sont très souvent présentes à des niveaux proches de la limite de détection chez l'adulte et fortement dominantes chez le nouveau-né.

Par delà la recherche d'une « normalité » dans la composition de la microflore intestinale dominante, il reste pertinent de se demander si une « microflore normale » peut être définie au plan fonctionnel.

### Points importants

- La diversité d'espèces du cortège microbien intestinal dominant est spécifique de l'individu et le nombre d'espèces communes à plusieurs individus est très restreint (ou nul).
- La microflore fécale dominante apparaît très stable au cours du temps pour un individu donné, au plan qualitatif sur une période de 2 mois à 2 ans.
- Les grands groupes taxonomiques ou phylogénétiques sont les mêmes chez les sujets adultes, même s'ils sont représentés dans des proportions variables d'un individu à l'autre
- Il n'est pas possible de définir la microflore intestinale de l'espèce humaine par le profil d'espèces dominantes, mais elle comprend néanmoins un ensemble limité de groupes phylogénétiques récurrents. Plus qu'une composition « idéale », exempte de bactéries que l'on voudrait considérer comme « mauvaises », ou au contraire riche en « bonnes » bactéries, il semble que la « microflore normale » soit davantage à concevoir comme un consortium adapté à l'hôte et non seulement naturellement stable mais aussi résistant à la modification. Tout facteur favorisant le maintien de cet équilibre ou sa résistance à la modification chez le sujet sain pourrait dès lors être considéré comme bénéfique.

## 5. Maladies et déséquilibres de la microflore intestinale

On ne dispose pas de beaucoup d'études sur la flore intestinale en cas de maladies. Elles ont été principalement réalisées au cours de diarrhées infectieuses ou de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Ces affections ont aussi fait l'objet d'études d'intervention utilisant des probiotiques et des prébiotiques.

### 5.1 Modifications de la microflore saprophyte colique au cours de diarrhées infectieuses

Les diarrhées infectieuses constituent la cause la plus importante des diarrhées aiguës. En France, il existe un pic hivernal important et un second plus discret en été. Les causes sont plus souvent virales en hiver et bactériennes en été. Les causes des colites sont souvent bactériennes : *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* et *Klebsiella oxytoca*.

Peu d'études se sont intéressées aux modifications de la microflore saprophyte au cours des diarrhées infectieuses. On observe habituellement une instabilité de la flore, une augmentation des bactéries aérobies et une diminution des anaérobies. Par exemple, il a été observé, chez des patients atteints de choléra, que les concentrations de *Vibrio cholerae* pouvaient atteindre  $3 \cdot 10^7$  UFC/mL de selles, tandis que le taux de *Bacteroides* diminuait à  $10^5$  UFC/mL de selles. La restitution rapide d'une microflore normale a été observée après guérison (Gorbach *et al.*, 1970). Gorbach *et al.* ont étudié la microflore fécale de 17 adultes Indiens au cours d'une diarrhée et pendant la période de guérison (Gorbach *et al.*, 1971). Au cours de la diarrhée, 8 sujets présentaient une microflore constituée de *Escherichia coli*, tandis que les autres présentaient une microflore variée associant : *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter cloacae*, *Alcaligenes faecalis*. Dans le premier groupe, la concentration de *E. coli* au cours de la diarrhée était de 100 à 1000 fois plus élevée que celle des autres bactéries aérobies et anaérobies. Ceci était dû à une conjonction d'effets : une augmentation des bactéries aérobies et une diminution des anaérobies. Au cours de la période de guérison, le niveau des coliformes diminuait, plusieurs espèces apparaissaient, et les taux de *Bacteroides*, *Lactobacillus* et *Clostridium* augmentaient significativement. Dans le second groupe, les taux de *E. coli* dans les selles n'étaient pas augmentés pendant la phase aiguë, alors que les taux de *Bacteroides*, de *Clostridium* et des bactéries micro-aérophiles étaient diminués en comparaison aux taux observés pendant la période de guérison. Fujita *et al.* (1990) ont étudié la microflore fécale de 14 enfants du Kenya ayant une diarrhée aiguë secondaire à des pathogènes variés :

*Shigella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* entéro-toxinogène, et *rotavirus* (dans 3 cas la cause n'était pas retrouvée). La microflore fécale était étudiée au moment de la diarrhée et au cours de la guérison. Au cours de la diarrhée, si l'on ne prenait pas en compte les bactéries pathogènes, les taux de bactéries aérobies étaient les mêmes pendant les deux périodes d'observation. Les taux de bactéries anaérobies *Bacteroides* et *Bifidobacterium* étaient significativement plus bas au cours de l'épisode de diarrhée qu'au cours de la période de guérison. Une même tendance était observée pour les *Lactobacillus* et les *Eubacterium*. Au cours de la diarrhée, le pH des selles était plus élevé et les acides gras volatils étaient diminués en comparaison avec la phase de guérison. Ces résultats étaient observés quel que soit l'agent pathogène responsable de la diarrhée. Albert *et al.* (1978) ont étudié la composition de la microflore fécale de 49 enfants ayant une diarrhée aiguë infectieuse ainsi que de 29 enfants sains. Chez les enfants ayant une diarrhée aiguë, les bactéries anaérobies étaient diminuées et le rapport anaérobies/aérobies était inversé par rapport aux sujets sains.

## 5.2 Modifications de la microflore endogène colique au cours de maladies inflammatoires cryptogénétiques (et chroniques) de l'intestin

La flore intestinale joue un rôle délétère pro-inflammatoire au cours des maladies inflammatoires du tube digestif (Marteau & Shanahan, 2003). La présence d'une flore dans le côlon aggrave toutes les colites expérimentales chez l'animal et plusieurs arguments suggèrent fortement qu'il en soit de même chez l'homme au cours des maladies inflammatoires cryptogénétiques intestinales (MICI). Les deux principales MICI sont la rectocolite hémorragique (qui peut se compliquer de pochite après chirurgie) et la maladie de Crohn. Les arguments cliniques les plus convaincants sont observés dans la rechute postopératoire pré-anastomotique de la maladie de Crohn qui ne s'observe que si le flux fécal est maintenu sur l'anastomose (Rutgeerts *et al.*, 1991). Certains antibiotiques (particulièrement le métronidazole et la ciprofloxacine) ont une efficacité établie pour traiter la pochite et prévenir la récurrence post-opératoire de la maladie de Crohn (Marteau & Shanahan 2003). Deux autres éléments ont été récemment acquis :

- tous les micro-organismes n'ont pas le même potentiel pro-inflammatoire car ils sont perçus différemment par les cellules intestinales ou immunitaires (par des récepteurs *toll-like* différents) (Marteau *et al.*, 2003 ; Borruel *et al.*, 2002) ;
- des différences significatives existent entre la flore intestinale de sujets sains et celle de sujets atteints de MICI, même en rémission (Marteau *et al.*, 2004).

De multiples travaux ont montré une augmentation des bactéries du groupe des *E. coli* au cours des poussées de MICI, mais aussi, à un moindre degré au cours des MICI en période de quiescence clinique (Seksik *et al.*, 2003). Il a aussi été observé une fréquence élevée d'*E. coli* entéroadhérents dans la muqueuse iléale malade au cours de la maladie de Crohn. Le rôle de certains *Bacteroides* est suspecté sur l'argument de leur concentration inconstamment accrue et de leur fort pouvoir proinflammatoire sur des cellules intestinales ou immunes et des modèles animaux. L'apparition d'un déséquilibre de la flore est aussi authentifiée par la présence en grand nombre (30% de la flore totale) d'espèces habituellement sous-dominantes. Par contre les travaux n'ont pas montré de micro-organisme unique qui pourrait être tenu pour « responsable » de ces affections (ceci étant valable aussi bien pour des pathogènes que pour des micro-organismes de la flore habituelle). Ces constatations ont conduit à étudier les effets de micro-organismes probiotiques pour moduler les MICI (expérimentales ou humaines) dans un sens bénéfique. Même si les profils de flore diffèrent « en moyenne » et légèrement entre les sujets malades et les sujets sains, ces différences ne sont ni assez prononcées ni assez systématiques pour permettre de définir un bon ou un mauvais profil de flore dans cette pathologie.

### Points importants

- Il n'est pas possible de définir un « bon profil de flore ».
- En revanche, les flores de sujets sains et de certains sujets malades, notamment atteints d'affections intestinales, sont significativement différentes sans qu'il ne soit établi à ce jour si ces modifications sont antérieures ou postérieures au développement de la maladie.

## **II- Quel est l'intérêt des produits contenant des micro-organismes vivants par rapport aux produits contenant des micro-organismes tués ?**

---

### **1. Introduction**

Les probiotiques sont par définition des micro-organismes ingérés vivants (cf. glossaire). La question a toutefois été posée de savoir si des micro-organismes non vivants (corps microbiens détruits par un processus quelconque) ou des produits du métabolisme de probiotiques (milieu de culture par exemple) pouvaient avoir tous, une partie ou aucun des effets des probiotiques.

Nous analysons ici essentiellement les études humaines ayant comparé les effets de microorganismes probiotiques vivants ou de produits « contrôles » non vivants.

### **2. Intolérance au lactose et bactéries du yaourt vivantes ou mortes**

Cet effet fait l'objet d'un consensus assez général (Salminen *et al.*, 1998 ; Salminen *et al.*, 1997). Des nombreux travaux ont montré que la lactase de certaines bactéries lactiques, participait *in situ* dans l'intestin à l'hydrolyse du lactose (étape de digestion partiellement prise en défaut chez de nombreux adultes qui peuvent alors souffrir de symptômes dits « d'intolérance » au lactose). Le digestibilité du lactose du yaourt peut aller jusqu'à 90% de la charge (Marteau *et al.*, 1990 ). La lactase du yaourt serait protégée de l'acidité gastrique et libérée dans le duodénum sous l'action des acides biliaires. Plusieurs travaux ont montré que la thermisation des yaourts aboutissait à une digestibilité significativement diminuée du lactose (Savaiano *et al.*, 1984 ; Marteau *et al.*, 1990 ; Varela-Moreiras *et al.*, 1992 ; Rizkalla *et al.*, 2000). Le traitement thermique affecte la viabilité des micro-organismes mais aussi neutralise l'activité de la lactase bactérienne. Cependant, cette différence de digestibilité n'a pas de traduction clinique évidente car les études n'ont pas montré de différence significative de tolérance (symptômes cliniques) au lactose entre yaourts et yaourts thermisés (Marteau *et al.*, 1997 ; Savaiano *et al.*, 1984).

### **3. Effets écologiques de produits fermentés ne contenant plus de germes vivants**

La littérature ne contient que quelques rares exemples de produits fermentés ne contenant pas de germes vivants capables d'avoir des effets sur des situations pathologiques, sur des germes pathogènes ou sur la flore. Un lactosérum fermenté par *B. breve* C50 administré à 10 volontaires sains permettait d'augmenter significativement la population endogène de bifidobactéries et de diminuer celles de *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* ainsi que l'excrétion de spores de *Clostridium* spp. Les activités nitro-réductase étaient significativement diminuées tandis que l'activité  $\beta$ -galactosidase était augmentée. (Romond *et al.*, 1998 ; Mullie *et al.*, 2002)

Il faut regarder du côté pharmaceutique pour trouver un exemple de produits contenant des germes tués efficaces. L'exemple le plus significatif est sans doute l'anti-diarrhéique Lacteol<sup>®</sup>. Il s'agit en fait d'un lactosérum fermenté par la souche *L. acidophilus* LB. Celui-ci est ensuite inactivé par la 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 (Xiao *et al.*, 2004). Récemment une étude en double aveugle, a montré que *L. acidophilus* LB tué était plus efficace dans le traitement de diarrhées chroniques qu'une autre souche de lactobacille administrée vivante. Cent trente-sept patients répartis en deux groupes recevaient pendant 4 semaines soit 2 capsules contenant un milieu fermenté par *L. acidophilus* LB (Lacteol<sup>®</sup> Fort, souche non vivante) ou une souche *L. acidophilus* vivante sous forme de tablettes à mâcher (5 tablettes x 3/jours). La fréquence des selles, leur consistance, les sensations abdominale étaient évaluées. La fréquence des selles était significativement plus basse au cours des deuxième et quatrième semaines de traitement ( $p < 0.05$ ). A la fin du traitement, les symptômes et les sensations abdominales subjectives étaient moins marquées dans le groupe LB. Il reste toutefois difficile



de tirer des conclusions fortes de ce type d'étude dans la mesure où les produits comparés étaient de nature différente, quant à la forme administrée. De plus, les résultats objectifs étaient significatifs à certaines périodes de l'étude et pas à d'autres (Xiao *et al.*, 2003). Il semble dans ce cas que l'effet soit dû aux produits de fermentation de la souche. Ceci est d'ailleurs confirmé par d'autres études *in vitro* et *in vivo* sur des animaux. Ainsi, il a été démontré que le surnageant de fermentation de cette souche était capable d'inhiber *in vitro* la viabilité d'*H. pylori*. Chez la souris, le surnageant de culture inhibait la colonisation de l'estomac par *H. felis* et la gastrite qui en découle. L'effet pourrait en partie s'expliquer par une inhibition de l'uréase du pathogène (Coconnier *et al.*, 1998). Le même type de résultats a été obtenu chez l'homme dans une étude en double aveugle avec un lactosérum fermenté par la souche *L. johnsonii* La1. L'administration du milieu fermenté permettait de diminuer la colonisation gastrique par *H. pylori*, mesurée par le test respiratoire à l'urée marquée (Michetti *et al.*, 1999). Cela pose tout le problème de l'action des bactéries ingérées en fonction des conditions d'ingestion, avec (yaourt) ou sans substrat.

Isolauri et son équipe (1991) ont montré la supériorité de la souche *L. rhamnosus* GG soit sous forme d'un lait fermenté, soit sous forme d'un lyophilisat ( $10^{10-11}$  ufc/jour) pour raccourcir la durée de la diarrhée chez des enfants atteints de gastroentérite à rotavirus (71 sujets ; 4-45 mois d'âge) par rapport à un groupe contrôle qui recevait du yaourt pasteurisé. Ce résultat montre la supériorité d'une souche vivante par rapport à d'autres souches tuées (Isolauri *et al.*, 1991) mais il faut reconnaître que le groupe témoin n'était pas idéal puisqu'il ne recevait pas la souche GG tuée.

Une étude menée chez des malades atteints de pancréatite a montré l'efficacité supérieure de la souche *L. plantarum* 299 vivante par rapport à la même souche tuée par la chaleur. Quarante-cinq patients avec les signes cliniques et biologiques d'une pancréatite étaient randomisés en deux groupes recevant soit la souche 299 vivante ( $10^9$  ufc) ou la même souche inactivée. Dans les deux cas, la souche bactérienne était administrée avec une fibre d'avoine. Le traitement était administré 2 fois par jour pendant 7 jours. Les auteurs rapportaient que les 22 patients recevant le traitement avec la bactérie vivante avaient moins de risque d'infection, de nécrose ou d'abcès (4.5% contre 30% dans l'autre groupe,  $p=0.023$ ) (Kecskes *et al.*, 2003).

#### 4. Effets immunitaires

Peu d'études ont comparé les effets de souches vivantes à ceux des souches mortes sur des paramètres immunitaires.

Des études récentes apportent une information importante sur l'effet de bactéries mortes et plus particulièrement de leur ADN. Dans un modèle animal de colite chimiquement induite par le DSS (Dextran Sulfate Sodium), les auteurs montrent que l'ADN d'un mélange de bactéries lactiques (Produit VSL#3<sup>®</sup>, contenant *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) administré dans l'estomac ou par voie sous cutanée réduisait l'inflammation de la muqueuse intestinale. Le même résultat était obtenu par administration intra-gastrique du mélange de probiotiques viables ou tués (irradiation). Les auteurs concluent à l'effet de l'ADN lui-même. Le mécanisme passe via la voie du récepteur TLR-9 (Rachmilewitz *et al.*, 2004).

Cependant d'autres travaux ont montré que certains effets n'étaient obtenus qu'avec des probiotiques ingérés vivants. Ainsi, Kaila *et al.* ont comparé les effets d'un lait fermenté contenant la souche *L. rhamnosus* GG ( $10^{10-11}$  ufc/jour) à ceux d'un yaourt pasteurisé chez des enfants atteints de diarrhée aiguë à rotavirus. Ces auteurs ont montré un raccourcissement de la durée de la diarrhée et une amélioration de la réponse immunitaire contre le rotavirus plus importants dans le groupe recevant le probiotique vivant. Ce groupe avait un nombre significativement plus important de lymphocytes produisant des IgA, IgG, IgM et un titre en IgA anti-rotavirus significativement supérieur (Kaila *et al.*, 1992). On peut

cependant regretter que le contrôle n'ait pas été le même produit fermenté détruit par la chaleur. Les mêmes chercheurs ont étudié 25 enfants souffrant de diarrhée à rotavirus, qui ont reçu la souche *L. rhamnosus* GG sous forme vivante ou tuée. Les sujets du groupe traité par la souche vivante avaient plus de lymphocytes produisant des IgA anti-rotavirus (différences significatives chez 10 enfants sur 12 pour le premier groupe par rapport à 2 sur 13 pour le deuxième groupe) (Kaila *et al.*, 1995).

Schiffirin *et al.* ont montré que la consommation d'un lait fermenté contenant des souches probiotiques ( $10^{9-10}$  ufc/jour) pouvait augmenter la capacité phagocytaire des cellules sanguines. L'effet était associé à une augmentation de la population fécale en *Lactobacillus johnsonii* La1 ou en *Bifidobacterium lactis* Bb12 (selon le groupe considéré) (Schiffirin *et al.*, 1995). Les mêmes auteurs ont poursuivi leurs travaux par une étude comparant un produit fermenté frais au même produit à date limite de consommation (DLC) dans lequel la population bactérienne probiotique viable a diminué, laissant néanmoins les cadavres bactériens présents dans le produit. Les volontaires consommaient 150 mL de produit ( $1.5 \cdot 10^9$ -  $1.5 \cdot 10^8$  ufc/jour en fonction du groupe), correspondant soit au même lait fermenté témoin, soit le même lait fermenté frais contenant  $10^7$  ufc/g de la souche *L. johnsonii* La1, soit le même lait fermenté 21 à 28 jours après production ne contenant plus que  $10^6$  ufc/g de la souche La1. Les résultats ont montré une absence d'effet dans les groupes témoins et dans celui recevant la dose faible de La1 (malgré la présence de corps bactériens morts). Par contre, le groupe traité par un niveau de population élevé voyait la capacité phagocytaire significativement augmentée (Donnet-Hughes *et al.*, 1999).

### Points importants

- Peu de travaux ont comparé de manière rigoureuse les effets de bactéries vivantes par rapport à ceux des bactéries tuées. Cette rigueur impose que la seule différence entre le groupe testé et le groupe contrôle soit le caractère vivant de la bactérie.
- Certains effets de préparations bactériennes peuvent être dus à certains de leurs métabolites et/ou à leur ADN. Ils peuvent alors aussi être observés avec des préparations non vivantes. Cependant, d'autres effets ne sont observés qu'avec des micro-organismes vivants.
- Une étude suggère une perte possible d'efficacité, à la DLC, du lait fermenté étudié (Donnet-Hughes *et al.*, 1999).
- La survie dans le tractus digestif de souches ingérées n'implique pas forcément l'existence d'effets bénéfiques. La non-survie n'implique pas nécessairement l'absence d'effets bénéfiques.

# III- Survie des probiotiques alimentaires en transit dans l'intestin de l'homme

---

## 1. Introduction

Les aliments sont fortement transformés durant leur transit dans le tube digestif et une grande quantité des bactéries ingérées y est détruite. Ceci a amené les chercheurs à supposer que les effets de probiotiques soient influencés par leur survie dans l'intestin et à étudier cette dernière. Les cibles d'action des probiotiques pouvant être situés dans l'intestin grêle ou dans le côlon, des études de survie ont été menées à ces deux niveaux.

## 2. Les bifidobactéries

Les bifidobactéries sont largement dominantes dans la flore du nourrisson et deviennent souvent sous-dominantes après la période de sevrage (Mitsuoka *et al.*, 1989). La prépondérance des bifidobactéries chez les nourrissons au moment où leur système immunitaire n'est pas parfaitement développé ainsi que l'effet antagoniste de la présence de bifidobactéries et d'entéropathogènes ont suscité beaucoup d'intérêt quant à l'action des bifidobactéries sur la santé. Ceci a été à la base du développement de nombreux probiotiques et prébiotiques dits « bifidogènes ».

Berrada *et al.* (1991) ont montré que, pour une souche acido-résistante, 80% des bactéries consommées dans du lait fermenté ( $10^9$ ) transitaient de l'estomac à l'intestin grêle. Une quantité élevée a aussi été retrouvée au niveau de l'iléon après la consommation de  $10^{10}$  *Bifidobacterium lactis* Bb12 (Pochart *et al.*, 1992). Cette étude, effectuée avec la technique de perfusion intestinale chez 6 volontaires, montrait une augmentation du débit iléal bactérien jusqu'à  $10^{8,8}$  ufc.h<sup>-1</sup>. Après ingestion du produit, les concentrations iléales des bifidobactéries passaient de  $10^{2,2}$  à  $10^{6,4}$  ufc.mL<sup>-1</sup>, ce qui permet de calculer un taux de survie de 23,5% des bifidobactéries ingérées. Dans une autre étude réalisée dans des conditions similaires, la souche de *Bifidobacterium* contenue dans le produit fermenté Ofilus<sup>®</sup> survivait à 37,5%, correspondant à une concentration des bifidobactéries de  $10^{6,4}$  ufc.mL<sup>-1</sup> dans l'iléon (Marteau *et al.*, 1992). Ces travaux ne montraient pas de colonisation durable de l'iléon.

Le devenir de bifidobactéries ingérées jusqu'au niveau fécal a été évalué dans plusieurs études. Bouhnik *et al.* (1992) ont étudié le devenir de la souche de *Bifidobacterium* contenue dans le produit fermenté Ofilus<sup>®</sup> chez 8 volontaires. Ils ont rapporté que la consommation quotidienne de  $10^{11,5}$  ufc de ces bifidobactéries, pendant 8 jours, provoquait une augmentation de la concentration fécale comprise entre  $10^{8,3}$  et  $10^{9,2}$  ufc.g<sup>-1</sup>. Après l'arrêt de la consommation, la concentration en bifidobactéries exogènes diminuait progressivement et parallèlement avec les marqueurs de transit pour disparaître complètement au bout de 8 jours. Le taux de récupération des bifidobactéries dans les selles, était estimé à 29,7% de la quantité ingérée. Dans une autre étude, une bifidobactérie exogène (souche non précisée) devenait rapidement la souche prédominante (67,2%) parmi les bifidobactéries après 8 jours de consommation par 6 volontaires, avec une concentration fécale maximale de  $10^{9,8}$  ufc.g<sup>-1</sup> (Kullen *et al.*, 1997). Cette souche étudiée était elle aussi éliminée après l'arrêt de la consommation.

En conclusion, certaines bifidobactéries survivent bien au transit intestinal et peuvent être retrouvées à une concentration de plus de  $10^6$  ufc.mL<sup>-1</sup> au niveau iléal. Dans les fèces, de nombreuses souches ont une bonne capacité de survie et la consommation continue de produits contenant ces micro-organismes augmente significativement leurs concentrations fécales. Les souches exogènes n'ont pas les avantages écologiques nécessaires pour persister au sein de la flore et sont supplantées par les souches autochtones, à l'arrêt de la consommation.

## 3. Les lactobacilles

### *Lactobacillus rhamnosus*

*Lactobacillus rhamnosus* GG est la souche probiotique la plus étudiée (environ 200 références). Goldin *et al.* (1992) ont suivi la souche GG dans les fèces en la reconnaissant sur la morphologie caractéristique de ses colonies. Les bactéries étaient consommées sous forme d'extraits congelés (15 sujets), dans du lait fermenté (15 sujets) ou dans du lactosérum (46 sujets). Pour une consommation quotidienne d'environ  $10^{11}$  ufc, les bactéries étaient retrouvées à des concentrations respectives de  $10^{6,4}$ ,  $10^{6,0}$  et  $10^{7,7}$  ufc.g<sup>-1</sup> dans les selles. Chez 33% des individus, la bactérie persistait 7 jours après l'arrêt de la consommation. La persistance de cette souche dans les fèces et au niveau de la muqueuse colique a été suivie dans une autre étude (Alander *et al.*, 1999). Après l'arrêt de la

consommation, *L. rhamnosus* GG n'était plus détectable dans les fèces à 14 jours mais la bactérie persistait au niveau de la muqueuse à 21 jours pour disparaître après 28 jours. Selon les auteurs, la persistance au niveau des muqueuses est la conséquence d'une multiplication probable de la bactérie. Saxelin *et al.* (1995) ont montré dans une étude dose-réponse que la consommation quotidienne de  $10^8$  ufc de *L. rhamnosus* GG était insuffisante pour permettre sa détection dans les fèces alors qu'une dose d'environ  $10^{10,1}$  ufc le permettait (concentration fécale moyenne obtenue :  $10^6$  ufc.g<sup>-1</sup>).

Le devenir de la souche *L. rhamnosus* DR20 a été étudié chez 10 sujets. La consommation quotidienne de cette souche à  $10^{9,2}$  ufc augmentait significativement le nombre total de lactobacilles et d'entérocoques dans les fèces. La prédominance de la souche *L. rhamnosus* DR20 au sein de la population des lactobacilles de la flore était constatée chez plusieurs individus et dépendait essentiellement des populations de lactobacilles endogènes. La concentration moyenne retrouvée était de  $10^{5,5}$  ufc.g<sup>-1</sup>. La souche disparaissait après arrêt de la consommation du produit (Tannock *et al.*, 2000).

### ***Lactobacillus casei/paracasei***

Deux études ont mesuré la survie de la souche *L. casei* Shirota dans les fèces. Dans la première qui portait sur 10 volontaires, la souche était retrouvée à la concentration de  $10^7$  ufc.g<sup>-1</sup> après l'ingestion quotidienne de  $10^{11,5}$  ufc (Spanhaak *et al.*, 1998). Yuki *et al.* (1999) retrouvaient la même concentration dans les fèces de 8 volontaires ayant consommé quotidiennement 10 fois moins de bactéries, soit  $10^{10,1}$  ufc. Bunte *et al.* (2000) ont suivi le devenir de *L. paracasei* LTH 2579 chez 3 volontaires. Après la consommation pendant 3 jours de saucisses contenant *L. paracasei* LTH 2579 ( $10^9$  ufc par jour), la souche était retrouvée à des concentrations fécales variant entre  $10^{7,1}$  et  $10^{8,2}$  ufc.g<sup>-1</sup>.

### ***Lactobacillus salivarius***

Collins *et al.* (2002) ont mesuré le devenir de la souche *L. salivarius* UCC118 dans le tube digestif et son impact sur la flore et le système immunitaire intestinal. *L. salivarius* était décelable dans l'iléon entre 2 et 7 heures après l'ingestion, avec une concentration maximale de  $10^{6,3}$  ufc.mL<sup>-1</sup>. La survie iléale chez 6 sujets après une seule prise de lait fermenté contenant  $10^{10,2}$  ufc était estimée à 11,8 %. La survie fécale de la bactérie était mesurée dans deux groupes de 20 volontaires ayant consommé  $10^{10}$  ufc par jour, dans du lait frais ou fermenté, pendant 21 jours. Les concentrations fécales oscillaient entre  $10^3$  à  $10^7$  ufc.g<sup>-1</sup>. Elles étaient plus élevées dans le groupe ayant ingéré le probiotique dans du lait frais. Chez 4 sujets, la persistance fécale dépassait 21 jours après l'ingestion et pour un, la bactérie probiotique était toujours détectable dans les selles au bout de 6 mois. Le transit du probiotique s'accompagnait d'une augmentation de la quantité totale de lactobacilles (11,5 fois plus) et des entérocoques (200 fois plus) dans les selles.

### ***Lactobacillus plantarum***

La survie iléale de la souche de *L. plantarum* NCIMB 8826 a été étudiée après ingestion de  $10^{10,2}$  ufc (Vesa *et al.*, 2000). La bactérie était détectable dans le liquide iléal entre 1h et 24h après l'ingestion, avec un pic de concentration à  $10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup> au bout de 2h. Elle se maintenait à  $10^5$  ufc.mL<sup>-1</sup> pendant au moins 5 heures. Le taux de survie était estimé à 7% dans l'iléon et le passage de la bactérie à ce niveau s'effectuait parallèlement avec le marqueur, suggérant un transit passif sans colonisation. Le profil d'élimination fécale de la souche était comparable à celui des spores après consommation quotidienne de  $10^{10,7}$  ufc pendant 7 jours. La concentration fécale était de  $10^8$  ufc.g<sup>-1</sup> avec un taux de survie à  $25 \pm 29$  %, ce qui suggère une multiplication possible du probiotique dans le côlon. La survie fécale de la souche 299v, consommée avec une boisson fermentée, a été étudiée chez 26 sujets (Johansson *et al.*, 1998). L'ingestion quotidienne de  $10^{10,3}$  ufc permettait la détection dans les selles d'environ  $10^7$  ufc.g<sup>-1</sup>. La survie de la bactérie s'accompagnait d'une augmentation concomitante des bifidobactéries et des lactobacilles. Dans une étude antérieure, la consommation d'un mélange de 19 souches de lactobacilles (chacune à la concentration de  $10^{8,7}$  ufc.g<sup>-1</sup>) augmentait la concentration des lactobacilles (10 fois plus) au niveau de la muqueuse jéjunale, jusqu'à 11 jours après l'ingestion (Johansson *et al.*, 1993). *L. plantarum* 299v et 299, présents dans le mélange probiotique ingéré, étaient majoritaires parmi les souches exogènes isolées dans la muqueuse. Cette étude est l'un des rares cas démontrés de persistance de bactéries lactiques ingérées par l'homme.

### ***Lactobacillus helveticus***

Shinoda *et al.* (2001) ont suivi sa persistance dans les fèces et le devenir de la souche CP53 par un dénombrement sur boîte (variant naturellement résistant à un antibiotique) et par une approche moléculaire. Les 7 volontaires ont consommé quotidiennement  $10^{11}$  ufc pendant 5 jours. Les résultats étaient différents suivant l'approche moléculaire  $10^{8,9}$  ufc.g<sup>-1</sup> (7/7) ou microbiologique  $10^{6,6}$  ufc.g<sup>-1</sup> (4/7), suggérant la présence d'une majorité de cellules mortes dans les fèces. Des essais *in vitro* montraient que les extraits fécaux avaient un effet bactéricide sur la souche CP53 mais pas sur la souche *L. rhamnosus* GG.

### ***Lactobacillus acidophilus***

Marteau *et al.*, (1992) ont observé qu'après la consommation de  $10^{10}$  *L. acidophilus* dans le produit fermenté Ofilus®, 1,5% des bactéries étaient retrouvées au niveau de l'iléon, à une concentration de  $10^6$  ufc.mL<sup>-1</sup>. Cette bactérie était éliminée parallèlement avec le marqueur de transit. Chez des sujets iléostomisés, d'autres auteurs trouvaient le même taux de survie d'une autre souche (Pettersson *et al.*, 1985). Peu de données récentes sur la survie fécale de cette espèce sont disponibles. Dans une étude dose-réponse, Gilliland *et al.*, (1978) montraient que l'ingestion de *L. acidophilus* à la concentration de  $10^{8,9}$  ufc.mL<sup>-1</sup>, générait une augmentation de la concentration des lactobacilles totaux dans les fèces de  $10^{4,9}$  à  $10^{7,9}$  ufc.g<sup>-1</sup>. Ils estimaient le taux de récupération de la souche entre 2 et 5%.

### ***Lactobacillus fermentum***

Vesa *et al.*, (2000) ont estimé la survie iléale de *L. fermentum* KLD. Cette souche résistait mal au transit intestinal et était détectée à une concentration maximale de  $10^{4,5}$  ufc.mL<sup>-1</sup> pendant une période de 4 heures. Seulement 0,5 % des cellules ingérées étaient récupérées à ce niveau.

## **4. Autres bactéries**

### **4.1 Les bactéries du yaourt : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus***

Les études décrivant le devenir de *L. bulgaricus* et de *S. thermophilus*, démontrent que leur survie est faible dans les parties hautes du tractus digestif (Marteau *et al.*, 1993).

Pochart *et al.* (1989) ont observé, en prélevant le liquide intestinal par intubation, que chez des sujets ayant ingéré du yaourt contenant environ  $10^{11}$  ufc, seulement 1% des bactéries, soit  $10^9$  ufc, atteignaient le duodénum. Une activité lactasique importante accompagnait les bactéries en transit au niveau du duodénum. Deux autres études, réalisées chez des sujets porteurs d'iléostomies, apportent des informations complémentaires sur le devenir intestinal de la symbiose. Lindwall *et al.* (1984) ont rapporté qu'après consommation d'un yaourt contenant  $10^9$  ufc.g<sup>-1</sup> de *L. bulgaricus*, la concentration iléale de la bactérie était de  $10^5$  chez 3 sujets et  $10^6$  chez le quatrième. Pettersson *et al.* (1985) ont rapporté qu'après consommation de 500 mL de yaourt, les bactéries lactiques atteignent l'iléon seulement chez un quart des sujets. La faible survie de ces bactéries dans les parties hautes du tube digestif n'a pas donné lieu à beaucoup d'études sur leur devenir en aval. Brigidi *et al.* (2003) ont toutefois retrouvé une souche de *S. thermophilus* dans les fèces à des concentrations de  $10^{5,6}$  ou  $10^{6,7}$  ufc.g<sup>-1</sup> suivant que la bactérie était ingérée avec du yaourt ( $10^6$ - $10^9$  ufc.g<sup>-1</sup>) ou le mélange probiotique commercial VSL#3® ( $10^{11,3}$  ufc.g<sup>-1</sup>).

### **4.2 *Lactococcus lactis***

*Lc. lactis* est largement utilisée comme bactérie modèle pour délivrer des molécules d'intérêt thérapeutique dans le tube digestif (Mercenier *et al.*, 2000 ; Bermudez-Humaran *et al.*, 2002 ; Drouault *et al.*, 2002). Vesa *et al.* (2000) ont suivi le devenir de la souche MG 1363 au niveau iléal après une seule prise de lait fermenté contenant environ  $10^{10,2}$  ufc. La bactérie apparaissait entre 1 et 3 heures après ingestion avec une concentration maximale de  $10^{5,2}$  ufc.mL<sup>-1</sup>. La quantité totale de cellules récupérées correspondait à 1 % des bactéries ingérées. La concentration de *L. lactis* en transit diminuait beaucoup plus rapidement que celle du marqueur, suggérant un effet bactéricide de l'environnement iléal sur la souche lactique. La survie fécale de *L. lactis* a été étudiée pour une autre souche dérivée de MG 1363 (Klijn *et al.*, 1995). Après consommation pendant 4 jours par 4 volontaires de  $10^{11}$  ufc dans du lait frais, 1 % des bactéries ingérées étaient récupérées dans les fèces. L'élimination fécale des lactocoques était plus rapide que celle des spores marqueurs de transit, ce qui montre la mortalité de la bactérie dans l'intestin. Une concentration fécale de

$10^4$  ufc.g<sup>-1</sup> était détectée. L'approche moléculaire qualitative utilisée dans cette étude (amplification par PCR du gène codant pour la nisine) donnait toujours des signaux positifs alors qu'aucune cellule n'était détectée sur boîte, ce qui suggère une persistance plus longue de cellules non viables ou d'ADN nu dans le tube digestif.

#### 4.3 Propionibactéries

Dans une étude *in vivo*, 7 volontaires ont consommé du *Propionibacterium freudenreichii* (souche Propiofidus<sup>®</sup> SI41) selon 3 modalités : (i) dans des gélules « classiques » à une faible dose de  $10^{9,6}$  ufc par jour, (ii) dans des gélules à une dose plus élevée de  $10^{10,6}$  ufc par jour, ou (iii) dans des gélules acido-résistantes à une faible dose de  $10^{9,6}$  ufc par jour. Dans le premier cas, les propionibactéries étaient retrouvées à plus de  $10^5$  ufc.g<sup>-1</sup> dans 8 échantillons fécaux sur 14 (Jan *et al.*, 2002). Dans les deux autres cas, elles étaient détectées dans tous les échantillons à une concentration comprise entre  $10^5$  et  $10^7$  ufc.g<sup>-1</sup>. Cette étude souligne l'importance de la dose ingérée et de la gastro-protection. Les gélules acido-résistantes amélioraient la viabilité et maintenaient celle-ci au même niveau que celui obtenu avec une dose dix fois plus élevée dans des gélules classiques.

#### 4.4 *Enterococcus faecium*

Le devenir après ingestion d'une souche d'*Enterococcus faecium* utilisée dans un produit probiotique (Gai<sup>®</sup>) a été étudié par Lund *et al.*, (2002). Ces auteurs ont montré, chez 8 volontaires sur 10 qui avaient consommé quotidiennement environ  $10^9$  ufc pendant 10 jours, que la bactérie était récupérée à des taux entre  $10^{3,1}$  et  $10^{6,6}$  ufc.g<sup>-1</sup>. Pour 3 volontaires, la souche exogène était majoritaire parmi la population d'*E. faecium*. Les auteurs montraient aussi que la prise concomitante d'antibiotiques ne permettait pas la détection de la souche *in vivo*. La présence de la souche était transitoire et ne persistait pas après l'arrêt de la consommation.

#### Points importants

- La quantité de probiotiques transitant vivants dans l'intestin dépend de la souche, de la dose ingérée, de facteurs liés à l'hôte et de l'aliment vecteur.
- La résistance des probiotiques à l'acidité, aux sels biliaires et leur survie dans l'environnement digestif sont très variables en fonction de la souche. De nombreuses souches de bifidobactéries et de lactobacilles survivent bien pendant le transit intestinal pour arriver en grande quantité dans les fèces. Les souches de *L. lactis* résistent mal au transit et peu de bactéries sont récupérées (1% dans l'iléon et la même quantité dans les fèces) après ingestion. Les souches utilisées dans le yaourt meurent en grande partie dans la partie haute du tube digestif et seulement 1% de survie est observée au niveau iléal.
- A de très rares exceptions près (Johansson *et al.*, 1993; Alander *et al.*, 1999), les bactéries ingérées persistent pendant la période de consommation et sont ensuite éliminées en quelques jours sans colonisation durable.
- L'acidité gastrique et les sécrétions bilio-pancréatiques constituent les principaux mécanismes endogènes d'inactivation des bactéries ingérées. La protection contre l'acidité gastrique peut se faire par un passage rapide dans l'estomac ou en protégeant les bactéries par le pouvoir tampon de l'aliment vecteur ou par des systèmes galéniques de protection tels que la micro-encapsulation.
- La dose ingérée de probiotiques est un facteur important pour obtenir des concentrations élevées dans les différents compartiments de tube digestif. A titre d'exemple, Saxelin *et al.* (1995), ont montré qu'une quantité de  $10^{10}$  ufc devait être consommée pour détecter *L. rhamnosus* GG dans les fèces.
- Il est souvent cité que les concentrations de probiotiques doivent être supérieures ou égales à  $10^6$  UFC/mL dans l'intestin grêle (iléon) et  $10^8$  UFC/g dans le côlon ; cependant la base scientifique de ces affirmations est fragile. Ces concentrations dans l'intestin grêle ont été proposées car de telles concentrations s'associent à des effets cliniques (diarrhée) chez des sujets ayant une colonisation bactérienne chronique de l'intestin grêle (Ducluzeau *et al.*, 1989). Ces concentrations dans le côlon ont été proposées car elles correspondent à moins de 1/1000 de la flore autochtone présente (dont il est raisonnable de penser qu'elle a le plus de chances d'être active que la flore présente à des niveaux encore plus faibles).

## IV- Les effets des probiotiques sont-ils spécifiques à la souche, à l'espèce, au genre ?

---

### 1. Introduction

Les micro-organismes probiotiques peuvent être très différents les uns des autres. En l'absence de données fiables sur leurs principes actifs impliqués dans chaque effet, il est prudent de supposer qu'ils diffèrent eux aussi, même entre souches proches. Les différences intrinsèques entre probiotiques concernent génome, composition de paroi, enzymes, propriétés technologiques, résistance à diverses agressions rencontrées dans le tube digestif (acide, bile...), capacité d'adhérence à des cellules épithéliales en culture ou à du mucus, capacité de produire des substances antimicrobiennes. Elles sont indéniables et parfois très importantes. En dehors de ces caractéristiques intrinsèques aux souches, les conditions dans lesquelles un probiotique est ingéré peuvent probablement influencer sur ses propriétés dans l'intestin. La « matrice » alimentaire a un effet tampon plus ou moins prononcé dans l'estomac, protégeant le probiotique de l'acide. Certains industriels imaginent des procédés d'encapsulation pour protéger les probiotiques de l'acidité gastrique.

### 2. Preuves de "spécificités pharmacologiques ou d'effets"

#### 2.1 Entre genres microbiens et espèces

Des nombreux travaux, y compris cliniques, ont montré des différences de propriétés intrinsèques entre espèces (et *a fortiori* entre genres).

Par exemple, la survie dans l'intestin grêle et/ou le tube digestif entier de l'homme diffère entre divers *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. johnsonii* (Marteau *et al.*, 2003). Wendakoon ont rapporté que des souches probiotiques appartenant entre autres aux espèces de *Lactobacillus casei*, *delbrueckii*, *helveticus* et *acidophilus* différaient pour leurs propriétés d'antagonisme vis à vis d'*Helicobacter pylori* (Wendakoon *et al.*, 1998). Au sein d'une même espèce, seules certaines souches sont parfois capables de synthétiser des bactériocines (Linaje *et al.*, 2004). Ces différences de propriétés sont en général exploitées par les industriels pour sélectionner les souches les plus prometteuses. Par exemple, *L. rhamnosus* GG a été sélectionné pour ses propriétés de résistance à l'acide et à la bile et a par la suite démontré des propriétés spécifiques *in vivo* par rapport à d'autres lactobacilles (Gorbach *et al.*, 2002). Il diffère aussi pour ses propriétés d'adhérence à des lignées de cellules intestinales en culture et d'exclusion compétitive de pathogènes (Lee *et al.*, 2003). Autre exemple, *L. salivarius* UCC118 a été sélectionné à partir de 1500 souches provenant d'iléon humain sain (Collins *et al.*, 2002 ; Dunne *et al.*, 2001).

Chez l'animal, d'assez nombreux travaux ont montré des différences d'effets probiotiques entre des microorganismes de genres ou d'espèces différents (Osman *et al.*, 2004 ; Dunne *et al.*, 2001). Chez l'homme, des travaux cliniques ont montré que l'addition de souches probiotiques ajoutait des propriétés à une « base » de produit pasteurisé ou contenant des bactéries vivantes, notamment celles du yaourt. Parmi d'assez nombreux exemples, on peut citer que *L. rhamnosus* GG réduit significativement plus la durée de la diarrhée au cours de gastroentérites que le yaourt pasteurisé (Kaila *et al.*, 1995). L'addition de la souche *Bifidobacterium animalis* DN 173 010 aux bactéries du yaourt (BIO®) était responsable d'effets significatifs sur la motricité colique (Marteau *et al.*, 2002). L'addition de la souche *Lactobacillus casei* DN 114 001 aux bactéries du yaourt (Actimel) était plus efficace sur la prévention des gastroentérites que le yaourt seul (Pedonne *et al.*, 2001). Cependant notre recherche bibliographique n'a pas trouvé d'études comparatives de deux genres ou espèces probiotiques réalisées dans des conditions strictement identiques.

#### 2.2 Entre souches au sein d'une même espèce

De nombreux travaux ont montré des différences intrinsèques de propriétés physiologiques entre souches d'une même espèce. Le lecteur doit être attentif car si de nombreux articles mentionnent des comparaisons de souches (ce qui n'est pas faux), les micro-organismes

comparés sont souvent aussi d'espèces différentes. De nombreux travaux ont rapporté des différences de propriétés antimicrobiennes entre diverses souches de bifidobactéries (Bevilacqua *et al.*, 2003 ; Gagnon *et al.*, 2004). Ceci a aussi été observé entre souches de lactobacilles (Santos *et al.*, 2003), ou entre souches de *Bacillus* (Le Duc *et al.*, 2004). D'autres travaux ont rapporté des différences entre souches d'une même espèce en ce qui concerne leur adhérence à des cellules épithéliales comme Caco-2 (Tumuola *et al.*, 1998) ou au mucus (Ouwehand *et al.*, 2001).

Peu de travaux chez l'animal, mais aucun chez l'homme (à notre connaissance) ont recherché des différences d'effets probiotiques entre souches d'une même espèce. Dans certains cas, il est hautement probable que certaines souches aient des propriétés identiques. Ainsi par exemple, plusieurs travaux (mais qui n'étaient pas réalisés chez les mêmes sujets) ont montré que des yaourts différents (et donc très probablement contenant des souches différentes de *L. bulgaricus* et de *S. thermophilus*) amélioraient la digestion du lactose chez l'homme déficient en lactase (Marteau *et al.*, 2003 ; Martini *et al.*, 1987). Aucune étude n'a cependant comparé ces souches entre elles selon un protocole rigoureux. Dans d'autres cas, des souches différentes avaient des effets cliniques différents chez l'animal. Par exemple, Paubert-Braquet *et al.* (1995) ont rapporté que des souches de *L. casei* (LAB-1, LAB-2 et Yakult®) différaient dans leur capacité à stimuler la phagocytose par les macrophages péritonéaux chez la souris et dans leur capacité de protéger des souris contre une infection létale par *Salmonella typhimurium*. Nous n'avons pas trouvé d'exemple d'étude chez l'homme, ayant comparé des effets cliniques de deux souches probiotiques d'une même espèce. Il a par contre été observé que deux souches de *L. crispatus* (sauvage et mutant non adhérent) différaient par leur capacité *in vitro* d'adhérence à des cellules Caco-2 et *in vivo* par leur capacité de survivre dans le côlon ou de persister sur la muqueuse colique, résultats obtenus à partir de biopsies (Cesena *et al.*, 2001).

#### Points importants

- Les différences de propriétés entre souches ne signifient pas de manière certaine que tous leurs effets sur l'hôte seraient différents ; cependant elles doivent jusqu'à preuve du contraire le laisser envisager. Rien n'exclut que l'on démontre que la présence d'un principe actif bien identifié dans un probiotique suffise pour permettre une prédiction fiable de l'obtention d'un effet. Néanmoins, ceci est improbable dans un futur proche et nécessitera une validation solide.
- Il est donc admis de manière consensuelle que les effets d'une souche ne peuvent être extrapolés à une autre. En d'autres termes, des études cliniques sur la souche elle-même sont nécessaires pour toute allégation.
- Les industriels peuvent utiliser cette caractéristique pour protéger les spécificités de leurs produits. Les communications ou allégations se référant à des souches voisines ne doivent pas être utilisées dans des dossiers ou brochures scientifiques ou publicitaires (ni *a fortiori* prises en compte dans leur évaluation).



## V- Les effets des prébiotiques sont-ils structure-dépendants ?

### 1. Introduction

La définition des prébiotiques nécessite les caractères « non digestibles » et « fermentescibles » mais n'impose aucune caractéristique chimique. Les prébiotiques avérés à ce jour sont tous des glucides et la plupart possède un faible degré de polymérisation à l'exception des amidons résistants (cf tableau ci dessous).

La question de l'incidence de la structure chimique sur la fonctionnalité des prébiotiques prend tout son sens quand on considère que les produits prébiotiques disponibles ne correspondent pas, pour la plupart, à des composés biochimiques clairement définis mais plutôt à des familles de composés. L'appartenance à une même famille (ex : fructanes) est conditionnée par la similarité de nature chimique des monomères constitutifs, et la disparité au sein de la famille résulte de différences de degrés de polymérisation et/ou de types de liaisons osidiques (Crittenden & Payne, 1996 ; Grizard & Barthomeuf, 1999 ; Frank *et al.*, 2002). Les seules exceptions sont le lactulose (peu utilisé en alimentation) et le tagatose.

**Tableau des différents prébiotiques avérés et supposés (d'après Kennedy & White , 1983 ; Pavis *et al.*, 2001; Roberfroid & Delzenne, 1998; Gibson & Fuller, 2000 ; Frank, 2002)**

Substance	Composition	Degré de polymérisation	Procédé d'obtention
Fructanes <ul style="list-style-type: none"> <li>• Linéaires :               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Inuline</li> <li>○ FOS</li> <li>○ Levanes</li> </ul> </li> <li>• Branchés (graminanes)</li> </ul>	Glucose, fructose <ul style="list-style-type: none"> <li>• liaisons <math>\beta</math>-2,1</li> <li>• liaisons <math>\beta</math>-2,1</li> <li>• liaisons <math>\beta</math>-2,6</li> <li>• liaisons <math>\beta</math>-2,6 &amp; <math>\beta</math>-2,1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 à 60</li> <li>• 2 à 9</li> <li>• 20-30 (lorsque d'origine végétale)†</li> <li>• inconnu</li> </ul>	Extraction Hydrolyse enzymatique Biosynthèse enzymatique
<i>Lactulose</i>	Galactose, fructose, liaisons beta-1,4	2	Synthèse chimique
<i>Oligo (trans)galactosides (TOS)</i>	Glucose, galactose, liaisons beta-1,6	2 à 5	Biosynthèse enzymatique
<i>Oligoxylosides (XOS)</i>	Xylose, liaisons beta-1,4	2 à 9	Hydrolyse enzymatique
<i>Oligosides de soja (Raffinose &amp; stachyose)</i>	Galactose, glucose, fructose liaisons alpha 1,6 et 1,2	3 à 4	Extraction
<i>Isomaltooligosides</i>	Glucose, liaisons alpha-1,6	2 à 5	Hydrolyse enzymatique Bioconversion enzymatique
<i>Oligolaminaranes (beta-glucanes)</i>	Glucose, ( $\pm$ mannitol) liaisons beta-1,3 et 1,6	5 à 25	Hydrolyse enzymatique
<i>D-tagatose</i>	Tagatose	1	Extraction
<i>Amidons résistants</i>	Glucose, liaisons alpha-1,4 et 1,6	> 1000	Extraction

En **gras** : prébiotiques avérés ; en italique : prébiotiques supposés

† : les levanes produits par les microorganismes présentent généralement des poids moléculaires supérieurs à  $10^6$ .

## 2. Disparité biochimique des prébiotiques

La disparité biochimique des prébiotiques trouve son origine dans la diversité naturelle, la coexistence de composés naturels et de composés de synthèse, et dans les procédés technologiques « post-production ». Par exemple, la famille des fructanes regroupe des composés obtenus par extraction, hydrolyse enzymatique partielle ou biosynthèse enzymatique. Elle est composée de 3 sous-groupes [fructanes de type « inuline », fructanes de type « levanes » et fructanes branchés, quelquefois dénommés « graminaranes » (Pavis *et al.*, 2001)]. Les fructanes linéaires sont naturellement présents dans de nombreux végétaux (jeunes céréales, fruits, légumes). La chicorée et le pâtisson (artichaut de Jérusalem) sont les deux sources exploitées industriellement pour la production des fructanes linéaires. Illustrant la diversité naturelle, le degré de polymérisation moyen de l'inuline extraite diffère selon la source végétale (10 à 20 pour la chicorée, 6 pour le pâtisson). En outre, l'inuline extraite de chicorée est composée à la fois de polymères contenant uniquement du fructose (FFn) et de polymères contenant du glucose (GFn) (Grizard & Barthelemy, 1999 ; Flamm *et al.*, 2001). Les fructo-oligosaccharides (FOS) sont produits soit par hydrolyse enzymatique partielle de l'inuline (ex : Raftilose<sup>®</sup>), soit par biosynthèse enzymatique à partir d'un mélange de saccharose, glucose et fructose (ex : Actilight<sup>®</sup>). La coexistence de ces composés naturels et synthétiques accroît la diversité des structures chimiques rencontrées sous une même appellation. En effet, les composés issus de chacun de ces procédés technologiques ne sont pas identiques : les FOS obtenus par hydrolyse renferment un mélange de structures GFn et FFn ( $2 < n < 7$ ) alors que seules les structures GFn ( $2 < n < 4$ ) sont présentes dans les FOS de synthèse (Frank *et al.*, 2002). Enfin, l'application ou non de procédés technologiques post-production complexifie encore la diversité de nature chimique des fructanes. Ainsi, alors que l'inuline native regroupe des DP compris entre 2 et 60, de l'inuline présentant un DP moyen de 25 peut être obtenue par élimination, après séparation physique, des fractions d'inuline de faibles DP (ex : Raftiline<sup>®</sup> HP) (Frank *et al.*, 2002). De façon similaire, l'application ou non d'un traitement de purification des FOS influe considérablement sur la teneur réelle en oligomères de type GFn ou FFn dans les produits commercialisés. D'après Grizard & Barthelemy (1999), ces teneurs peuvent ne représenter que 55 % dans les FOS de synthèse du fait de la persistance des précurseurs de synthèse (saccharose, glucose et fructose). Une teneur du même ordre (60%) est rapportée pour Raftilose<sup>®</sup> L60, issu d'hydrolyse partielle et qui contient 30% de saccharose et 10% de glucose + fructose (Menne *et al.*, 2000).

L'exemple des fructanes illustre l'hétérogénéité des structures chimiques regroupées sous une même appellation. Bien que moins bien documentée dans le cas des autres prébiotiques, cette hétérogénéité leur est, au moins en partie, transposable (Grizard & Barthelemy, 1999 ; Frank *et al.*, 2002). Cette hétérogénéité constitue un obstacle à la comparabilité des travaux visant à démontrer les effets physiologiques des prébiotiques et pourrait être à l'origine de controverses quant au réel caractère prébiotique de certaines substances comme les amidons (Bird *et al.*, 2000, Topping *et al.*, 2003) ou les oligolaminaranes (Michel *et al.*, 1999). En outre, dans les cas où des dimères ou des monomères osidiques coexistent dans le produit commercial et qu'ils ne sont pas éliminés avant expérimentation, la validité des résultats obtenus est sujette à caution du fait de l'éventuelle digestibilité de ces composés (diminution de la dose réelle de prébiotique, contribution énergétique *in vivo*, contribution non pertinente aux fermentations *in vitro*...).

## 3. Structure biochimique des prébiotiques et effets sur la flore

La structure chimique des fructanes affecte leur utilisation par des souches pures bactériennes. Ainsi :

- L'acidification des milieux de culture contenant des FOS est supérieure à celle des milieux contenant de l'inuline (Roberfroid *et al.*, 1998) ;
- Les GF4 sont plus rapidement fermentés par *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus GG* que les GF3 et GF2 (Kaplan & Hutkins, 2000) ;

- Les FOS sont plus rapidement fermentés que l'inuline par *Lactobacillus paracasei* (Kaplan & Hutkins, 2003) ;
- Les oligofructosides branchés et linéaires permettent une croissance supérieure de *Bifidobacterium catenulatum* comparativement à l'inuline (Gibson & Wang, 1994a) ;
- Raftilose® P95 et Raftiline® synergy1 (un mélange de FOS et d'inuline) permettent la croissance de *Bifidobacterium animalis* et de *B. lactis*, contrairement à Raftiline® HP (Van der Meulen *et al.*, 2004 ; Janer *et al.*, 2004) ;
- La production de lactate par des souches pures de *Bifidobacterium* sp. apparaît inversement proportionnelle au DP des fructanes fournis (Perrin *et al.*, 2002) ;
- Le degré d'hydrolyse de l'inuline par la beta-fructofuranosidase de *B. lactis* est nettement inférieur (10 à 37%) à celui de Raftilose® ou d'Actilight® (80 à 100%) (Erhmann *et al.*, 2003 ; Janer *et al.*, 2004).

Une influence de la structure chimique est également observée pour les pectines dont l'utilisation par des souches pures bactériennes est affectée par les degrés de polymérisation et de méthylation (Olano-Martin *et al.*, 2002).

La structure chimique des fructanes semble également affecter leur vitesse de fermentation par la flore intestinale totale (Roberfroid *et al.*, 1998 ; Smiricky *et al.*, 2003) mais n'altérerait pas l'intensité de la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC) qui en résulte (Wang & Gibson, 1993 ; Campbell *et al.*, 1997 ; Rycroft *et al.*, 2001 ; Kleessen *et al.*, 2001 ; Vickers *et al.*, 2001 ; Smiricky *et al.*, 2003). Inversement, dans le cas d'oligo-xylosides, la présence et la nature de ramifications affecteraient à la fois la vitesse de fermentation et la quantité totale d'AGCC produits (Kabel *et al.*, 2002).

L'intensité de l'effet bifidogène des fructanes semble relativement indépendant de leur structure chimique (Gibson *et al.*, 1995 ; Campbell *et al.*, 1997 ; Rycroft *et al.*, 2001 ; Palframan *et al.*, 2002), bien qu'un effet bifidogène supérieur ait été initialement attribué aux FOS comparativement à l'inuline (Gibson & Wang, 1994b). Inversement, le caractère bifidogène d'oligo-dextranes est présenté comme dépendant de leur degré de polymérisation (Olano-Martin *et al.*, 2000).

L'incidence des différents fructanes sur les autres populations bactériennes de la flore intestinale est moins documentée et semble structure dépendante. En effet, Raftilose® P95 et Raftiline® LS n'ont pas exactement les mêmes effets *in vitro* (Rycroft *et al.*, 2001), et les effets de Raftilose® et de Raftiline® HP diffèrent *in vivo* (Kleessen *et al.*, 2001)

La structure chimique des fructanes interagit avec leur capacité à stimuler l'absorption et la captation minérale du calcium. Ainsi l'inuline apparaît plus efficace que les FOS ou qu'un mélange FOS + inuline pour stimuler la captation minérale osseuse de calcium chez le rat (Kruger *et al.*, 2003). De même, un mélange inuline + FOS stimule plus efficacement l'absorption intestinale du calcium chez des adolescentes que les seuls FOS (Griffin *et al.*, 2002). Enfin, un mélange FOS + inuline est plus efficace que les seuls FOS pour augmenter l'absorption intestinale de calcium chez le rat (Coudray *et al.*, 2003). La structure chimique la plus efficace reste cependant à établir puisque dans cette dernière étude, le mélange FOS-inuline se révélait plus efficace que l'inuline seule, alors qu'une situation inverse était rencontrée dans l'étude de Kruger *et al.* (2003). La structure chimique des fructanes semble également interagir avec leur aptitude à prévenir le développement de foyers de cryptes aberrantes et de tumeurs dans des modèles animaux de cancérogenèse (induction chimique ou modèles génétiques). L'inuline induit un moindre nombre de foyers de cryptes aberrantes (Reddy *et al.*, 1997). Ceci a été confirmé dans une seconde étude (Verghese *et al.*, 2002) qui démontrait en outre que l'effet protecteur maximal était exercé par un mélange FOS + inuline.

### Points importants

- La structure chimique des fructanes interfère souvent avec leurs propriétés fonctionnelles. Les rares informations disponibles suggèrent qu'il en est de même pour les autres prébiotiques.
- Les caractéristiques chimiques des prébiotiques utilisés doivent être communiquées précisément dans les dossiers, car une même appellation (« familles de prébiotiques ») cache souvent une extrême variabilité de structures chimiques.
- Considérant les différences d'effet physiologique observées entre des prébiotiques de même famille, la démonstration d'un effet pour un composé ne peut pas être extrapolée à un autre composé, même si ce dernier appartient à la même famille de prébiotiques.
- Les études *in vitro* visant à simuler une situation *in vivo* doivent tenir compte de l'éventuelle absorption dans l'intestin grêle d'une partie des produits testés. En d'autres termes, si un produit alimentaire contient des nutriments absorbables et un prébiotique, seul ce dernier doit être utilisé dans les simulations *in vitro* des effets sur la flore.

# VI- Comment peut-on démontrer l'existence d'un effet bifidogène ?

---

## 1. Introduction

Un effet bifidogène se définit indépendamment d'un effet santé. On peut le définir comme l'augmentation du niveau de population et/ou de l'activité des bifidobactéries totales.

On en reste habituellement en pratique à une augmentation du niveau de population de bifidobactéries au sein de la flore fécale. En effet, la quantification de fonctions spécifiques des bifidobactéries n'est pas utilisée à ce jour, bien qu'une voie métabolique caractéristique de ce genre bactérien (l'activité fructose-6-phosphokinase) en offre la possibilité théorique. De même, la prévalence du portage de bifidobactéries en dominance (au-dessus de  $10^8 \cdot g^{-1}$  de selles) pourrait être aussi considérée dans le futur comme un indicateur d'un effet bifidogène.

Un effet bifidogène peut être induit par un prébiotique ou par un probiotique. Les prérequis nécessaires à la validation de l'effet sont identiques dans les deux cas. Pour certains experts, l'augmentation des bifidobactéries totales uniquement expliquée par l'apport de bifidobactéries exogènes n'est pas à proprement parler un effet bifidogène. Selon eux, dans le cas d'un probiotique contenant une souche de *Bifidobacterium* sp., la quantification spécifique de cette souche devrait alors être réalisée parallèlement à celle des bifidobactéries autochtones, afin de distinguer leur contribution respective à l'augmentation des bifidobactéries totales. Les nouvelles techniques de biologie moléculaire offrent cette possibilité, avec par exemple le développement d'amorces oligonucléotidiques spécifiques d'une souche et applicables en PCR (Brigidi *et al.*, 2000).

Les paramètres à considérer pour évaluer la validité d'un effet bifidogène sont à rattacher au choix du modèle expérimental, au protocole d'étude, à la méthode de dénombrement des bifidobactéries et à l'intensité et la spécificité de l'effet observé (Rycroft *et al.*, 1999 ; Gibson & Fuller, 2000).

## 2. Modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo*

La plus grande part des études ont été réalisées *in vitro*. Elles consistent en cultures de flores fécales mises en présence du substrat testé dans des systèmes clos, semi-continus ou continus (Gibson & Wang, 1994 ; Michel *et al.*, 1998 ; Rycroft *et al.*, 2001 ; Palframan *et al.*, 2002 ; Bello *et al.*, 2001). De plus rares essais ont été réalisés chez des animaux conventionnels (rongeurs, porc...) (Campbell *et al.*, 1997 ; Smiricky-Tjardes *et al.*, 2003) ou hétéroxéniques (chez lesquels une flore humaine a été inoculée) (Kleessen *et al.*, 2001). La validité de ces études pour prédire un effet chez l'homme est inconnue. Les modèles *in vitro* ne reproduisent ni les phénomènes d'adhésion des bactéries à la muqueuse, ni les échanges (absorption/sécrétion) (Rycroft *et al.*, 1999). D'autre part, la flore intestinale des animaux diffère qualitativement et quantitativement de la flore humaine et la physiologie colique de l'animal hétéroxénique reste différente de celle de l'homme (Rycroft *et al.*, 1999 ; Gibson & Fuller, 2000). En conséquence, malgré leur intérêt pour identifier un potentiel et/ou comparer plusieurs substances, ces modèles ne confèrent pas un niveau de preuve suffisant d'une capacité bifidogène pouvant s'exprimer chez l'homme. La démonstration définitive d'un effet bifidogène requiert donc la mise en œuvre d'études chez l'homme.

## 3. Protocole des études chez l'homme

Une vingtaine d'études spécifiquement dédiées à la caractérisation de l'incidence de prébiotiques sur la composition de la flore fécale a été menée *in vivo* chez l'homme sain : Alander *et al.*, 2001 ; Alles *et al.*, 1999 ; Bounnik *et al.*, 1996 ; 1997 ; 1999 ; 2004 ; Brighenti *et al.*, 1999 ; Buddington *et al.*, 1996 ; Campbell *et al.*, 1997 ; Cherbut *et al.*, 2003 ; Gibson *et al.*, 1995 ; Hidaka *et al.*, 1986 ; 1991 ; Ito *et al.*, 1990 ; 1993a ; 1993b ; Kleessen *et al.*, 1997 ; Kruse *et al.*, 1999 ; Le Blay *et al.*, 1999 ; Matteuzi *et al.*, 2004 ; Menne *et al.*, 2000 ; Ohkusa *et al.*, 1995 ; Rao, 2001 ; Tuohy *et al.*, 2001 ; Williams *et al.*, 1994.

Ces études présentent une forte variabilité, principalement sur le plan du protocole d'intervention nutritionnelle mais également sur le mode de traitement des selles.

## Protocole d'étude :

**Nature du prébiotique** (cf. chapitre 5) : la plupart de ces études sont consacrées aux fructanes, ensuite par ordre décroissant figurent les galactosides et le lactulose, puis certains substrats spécifiques qui n'ont été étudiés qu'en une unique occasion (germe de blé, lactosucrose, gomme d'acacia). Les études pionnières omettaient généralement de renseigner précisément la nature exacte du prébiotique utilisé (ex. : Hidaka *et al.*, 1991). Les études plus récentes ne présentent généralement pas ce défaut et mentionnent le nom commercial du produit (ex. : Kruse *et al.*, 1999), voire la composition réelle en oligosides du produit commercial (ex. : Alles *et al.*, 1999).

**Quantité du prébiotique** : la dose journalière de prébiotique administrée est généralement comprise entre 2,5 et 15 g, ce qui apparaît réaliste. Des doses supérieures (34 et 40 g.j<sup>-1</sup>) n'ont été étudiées que dans le cas des fructanes (Kruse *et al.*, 1999, Kleessen *et al.*, 1997, respectivement). Il est à souligner que les effet-dose n'ont été qu'exceptionnellement considérés (Bouhnik *et al.*, 1999 ; Ito *et al.*, 1990 ; Cherbut *et al.*, 2003).

**Durée de la supplémentation** : Des durées de supplémentation supérieures à un mois n'ont été considérées qu'exceptionnellement (Ohkusa *et al.*, 1995 ; Kruse *et al.*, 1999 ; Bouhnik *et al.*, 2004). Il est regrettable que les réels effets à long terme (> 6 mois) n'aient été envisagés chez l'homme que dans l'étude de Hidaka *et al.* (1991), par ailleurs très critiquable, alors que des résultats obtenus chez le rat suggèrent que l'effet bifidogène n'est que transitoire (Le Blay *et al.*, 1999).

**Nombre de volontaires** : Il doit être suffisant pour répondre à la question posée (cf chapitre 11). A l'exception de l'étude de Matteuzi *et al.* (2004) qui incluait 32 volontaires, les études d'intervention nutritionnelle commentées ici portent généralement sur moins d'une dizaine d'individus.

**Caractéristiques des volontaires** : A l'exception des études menées par Hidaka *et al.* (1986 & 1991) et Kleessen *et al.* (1997), les sujets impliqués sont généralement présentés comme des volontaires sains. La vérification de l'absence de médication (en particulier antibiothérapie) préalablement à l'inclusion est quasiment systématique mais la durée pendant laquelle porte cette vérification est extrêmement variable : depuis 2 semaines (Ito *et al.*, 1990 et 1993a) jusqu'à 12 mois (Alles *et al.*, 1999). On peut regretter que le caractère lactase-déficient des volontaires ne soit qu'exceptionnellement vérifié (Alles *et al.*, 1999 ; Cherbut *et al.*, 2003), l'absence de cette information lorsque du lactose est utilisé comme placebo étant particulièrement dommageable (ex. : Kleessen *et al.*, 1997).

L'âge moyen des volontaires est généralement mentionné. Il est le plus souvent de l'ordre de 30-45 ans mais une disparité élevée est fréquemment rencontrée (18-75 ans : Alles *et al.*, 1999 ; 20-55 ans : Tuohy *et al.*, 2001 ; 20-50 ans : Menne *et al.*, 2000). Cette disparité peut influencer sur les effets observés puisqu'une diversification de la flore est observée avec l'âge (cf. chapitre I).

**Type de protocole** : La conduite du protocole en double aveugle n'est qu'exceptionnellement précisée (Kleessen *et al.*, 1997 ; Tuohy *et al.*, 2001 ; Tuohy *et al.*, 2002 ; Bouhnik *et al.*, 2004 ; Matteuzi *et al.*, 2004). Certaines études, en particulier celles menées par l'équipe de Bouhnik (Bouhnik *et al.*, 1996 ; 1997 ; 1999 ; 2004 ; Campbell *et al.*, 1997 ; Alander *et al.*, 2001 ; Tuohy *et al.*, 2002), impliquent 2 groupes d'individus (un groupe « témoin », un groupe « test ») mais dans la plupart des cas, les sujets sont utilisés comme leurs propres témoins, sans que cet appariement ne soit clairement indiqué lors de l'analyse statistique (test apparié signalé uniquement chez Gibson *et al.*, 1995 ; Tuohy *et al.*, 2001 ; Rao *et al.*, 2001 ; Ito *et al.*, 1993a ; Bouhnik *et al.*, 1996). La moitié des études ne comprend pas de placebo et la composition de la flore observée après consommation du produit testé est alors comparée à celle observée avant le test nutritionnel. De ce fait, seule l'étude de Ito *et al.* (1990) fait mention de l'usage d'un mode aléatoire de distribution des régimes.

**Régime** : Le régime alimentaire consommé par les sujets au cours du test nutritionnel est rarement strictement contrôlé (Gibson *et al.*, 1995 ; Buddington *et al.*, 1996 ; Kleessen *et al.*, 1997 ; Campbell *et al.*, 1997 ; Alles *et al.*, 1999 ; Cherbut *et al.*, 2003) mais très fréquemment restreint : les aliments bannis sont le plus souvent les sources de fructanes (salsifis, oignons, asperges, poireaux, pâtisson, banane,...) et les produits fermentés (laits fermentés principalement). Dans certains cas, des aliments supposés induire des symptômes

d'inconfort intestinal sont également évincés du régime (Bouhnik *et al.*, 1996). De façon originale, Menne *et al.* (2000) évaluent l'effet bifidogène du Raftilose L60 chez des volontaires successivement soumis à un régime contrôlé puis à un régime non contrôlé : l'une et l'autre de ces conditions permettaient la détection d'une stimulation des bifidobactéries comparativement au contrôle et aucune différence n'était détectée entre elles.

**Placebo** : L'utilisation d'un placebo n'est rapportée que dans 14 des études analysées. Ce placebo est le plus souvent du saccharose (Gibson *et al.*, 1995 ; Bouhnik *et al.*, 1996 ; Bouhnik *et al.*, 1997 ; Rao, 2001 ; Bouhnik *et al.*, 2004 ; Cherbut *et al.*, 2003), placebo qui est exceptionnellement indigestible (Brighenti *et al.*, 1989). Cette nature digestible rend la spécificité de l'effet bifidogène décrit (comparativement à d'autres substances indigestibles) difficile à établir. Dans la mesure où aucun glucide indigestible n'a été à ce jour unanimement reconnu comme dépourvu d'effet bifidogène, le groupe de travail n'est pas en mesure de recommander l'usage d'un placebo particulier.

#### **Point important**

Le groupe considère que le meilleur protocole est une étude randomisée, menée en double aveugle sur un nombre suffisant d'individus incluant un contrôle du régime alimentaire et un placebo adaptés.

#### **4. Méthode de dénombrement et d'expression des résultats**

Dans les premiers travaux, le niveau de population des bifidobactéries était mesuré par culture de selles fraîchement récoltées sur milieu sélectif (Ito *et al.*, 1990 ; Hidaka *et al.*, 1991 ; Williams *et al.*, 1994 ; Ohkusa *et al.*, 1995 ; Gibson *et al.*, 1995 ; Buddington *et al.*, 1996 ; Bouhnik *et al.*, 1996 ; Campbell *et al.*, 1997 ; Bouhnik *et al.*, 1997 ; Kleessen *et al.*, 1997 ; Alles *et al.*, 1999 ; Bouhnik *et al.*, 1999 ; Menne *et al.*, 2000 ; Alander *et al.*, 2001 ; Cherbut *et al.*, 2003 ; Bouhnik & Bornet, 1998). Cette technique doit être appliquée à des selles fraîchement récoltées et maintenues (=1heure) en anaérobiose, pour être valide et les cultures de selles congelées (Campbell *et al.*, 1997 ; Kleessen *et al.*, 1997) sont déconseillées.

Bien que plusieurs milieux aient été proposés pour dénombrier sélectivement les bifidobactéries, aucun ne possède une sélectivité satisfaisante (Hartemink & Rombouts, 1999 ; Roy *et al.*, 2001 ; Mikkelsen *et al.*, 2003). Une vérification de l'identité (au niveau du genre) des colonies dénombrées doit donc être réalisée. Différents procédés (galeries d'identification, recherche de l'activité fructose-6-phosphate kinase, observation microscopique après coloration de Gram, identification des métabolites fermentaires, PCR genre-spécifique) peuvent être employés à cette fin. Cette étape n'est pas systématiquement appliquée (Ito *et al.*, 1990 ; 1993a ; 1993b ; Bouhnik *et al.*, 1996 ; 1997 ; 1999 ; 2004 ; Campbell *et al.* ; 1997 ; Alander *et al.*, 2001), ce qui limite la fiabilité des dénombrements effectués.

Les résultats des cultures sont alors exprimés en UFC (unité-formant-colonie) par gramme de selles (poids frais ou poids sec) ou en logarithme décimal (Log<sub>10</sub>) de cette valeur. Une expression en pourcentage des bactéries totales cultivables est quelquefois rencontrée (Ito *et al.*, 1990 ; Hidaka *et al.*, 1991 ; Ito *et al.*, 1993a ; Buddington *et al.*, 1996 ; Bouhnik *et al.*, 1996 ; Roberfroid *et al.*, 1998) mais elle est très critiquable et nous semble devoir être rejetée compte tenu de la proportion de bactéries non cultivables dans la flore intestinale.

Depuis une dizaine d'années, la détermination du niveau de population des bifidobactéries peut aussi se faire au moyen d'outils moléculaires plus spécifiques (mais cependant moins sensibles) que les méthodes classiques de culture. Ces techniques sont applicables sur selles congelées, après prétraitement de fixation ou non (fixées au paraformaldéhyde immédiatement après collecte des selles, les suspensions bactériennes fécales sont conservées à -80°C et restent analysables durant 8 à 10 mois, Rochet *et al.*, 2004) A quelques exceptions près (ex : Requena *et al.*, 2002), les méthodes ciblent l'ADN codant pour l'ARN ribosomal. Certaines sont quantitatives, de façon absolue (hybridation *in situ* à l'aide de sondes oligonucléotidiques marquées « ISH » ; PCR quantitative) ou relative (hybridation sur membrane ou « Dot Blot »). Les méthodes purement qualitatives sont à

bannir ; ainsi, l'extrapolation des résultats de séquençage de quelques-unes des bandes obtenues par DGGE pour conclure en un effet bifidogène n'est pas valide (Bello *et al.*, 2001). L'hybridation *in situ* est la technique la plus utilisée (Kruse *et al.*, 1999 ; Tuohy *et al.*, 2001a ; Tuohy *et al.*, 2001b ; Matteuzzi *et al.*, 2004). Toutefois des premiers travaux font référence à l'emploi de la PCR quantitative (Vitali *et al.*, 2003 ; Matsuki *et al.*, 2004 ; Gueimonde *et al.*, 2004) La validité de ces techniques dépend de la spécificité des séquences oligonucléotidiques utilisées comme sondes ou comme amorces. Dans le cas de la PCR quantitative ciblant le genre *Bifidobacterium*, les autres limites sont l'hétérogénéité de l'efficacité des amorces vis à vis des différentes espèces et la variabilité au sein du genre du nombre de copies de l'ADN codant pour l'ARN ribosomal. Ces réserves n'ont plus lieu d'être quand les amorces sont spécifiques d'une espèce ou d'une souche.

Les résultats des méthodes indépendantes de la culture sont exprimables en UFC par gramme de selles ou en équivalents génomes ou encore en Log10 de ces valeurs. Une expression en pourcentage peut également être acceptée, sous réserve qu'un dénombrement de la flore totale ait été effectué lui aussi par une méthode indépendante de la culture (en général au moyen d'une sonde universelle « eubacteria » : Kruse *et al.*, 1999 ; DAPI : Tuohy *et al.*, 2001a ; Bactlight kit : Matteuzzi *et al.*, 2004).

## 5. Intensité et spécificité

Pour comparer l'intensité de l'effet prébiotique exercé par différents produits, certains auteurs ont proposé de définir des « indices prébiotiques » (IP) (Olano-Martin *et al.*, 2002 ; Palframan *et al.*, 2003 ; Vulevic *et al.*, 2004 ; Roberfroid *et al.*, 2004). Les 3 premières propositions reposent sur une analyse de plus en plus exhaustive des principaux genres bactériens de la flore et sur un calcul de la somme des modifications observées (augmentations et diminutions exprimées de façon relative ou non par rapport aux bactéries totales).

<p>IP Olano-Martin = IP Palframan =  <math>(? \text{ Bifidobacterium} / ? \text{ total}) + (? \text{ Lactobacillus} / ? \text{ total}) - (? \text{ Bacteroides} / ? \text{ total}) - (? \text{ Clostridium} / ? \text{ total})</math></p> <p>IPm Vulevic = <math>\mu_{\max} \text{ Bifidobacterium} + \mu_{\max} \text{ Lactobacillus} + \mu_{\max} \text{ Eubacterium} - \mu_{\max} \text{ Bacteroides} - \mu_{\max} \text{ Clostridium} - \mu_{\max} \text{ E.coli} - \mu_{\max} \text{ bactéries sulfatoréductrices}</math></p>
--

Le groupe de travail ne retient pas ces suggestions d'indices prébiotiques car elles reposent sur le concept de « bonne flore en comparaison à une mauvaise flore » rejeté au chapitre 1. La dernière proposition consiste à calculer le rapport entre la variation de la concentration en bifidobactéries observée et la quantité de prébiotique consommée :

<p>IP Roberfroid = <math>? \text{ Bifidobactéries} / \text{quantité de substance prébiotique ingérée}</math></p>
--

Cet indice, qui prend en compte l'effet-dose, pourrait permettre de hiérarchiser les différents prébiotiques. Toutefois, la diversité des méthodologies employées rend sans doute la transposabilité de cet indice d'une étude à l'autre discutable.

Quelle que soit la méthodologie utilisée, la significativité statistique est obligatoire pour affirmer la stimulation des populations microbiennes et ceci suscite plusieurs commentaires. Les bifidobactéries ne font pas systématiquement partie de la microflore fécale dominante, aussi, la distribution des populations observées par des outils ne donnant accès qu'à la dominance est-elle le plus souvent non gaussienne. Cet élément doit être pris en compte dans le choix des tests statistiques.

Certaines études séparent les populations étudiées en « sujets répondeurs et non répondeurs » en se basant sur l'hypothèse que l'effet bifidogène serait inversement proportionnel au niveau basal de population en bifidobactéries (Rao *et al.*, 2001 ; Tuohy *et al.*, 2001a ; Cherbut *et al.*, 2003). Un effet non significatif sur la population générale pourrait alors masquer une hétérogénéité réelle entre individus : aussi la typologie et la dispersion des réponses méritent-elles un certain degré d'attention. Une analyse séparée des « répondeurs/non répondeurs » revient cependant à discuter d'un effet non-systématique et ne peut avoir de pertinence que si a



*priori* l'effet recherché concerne une population cible particulière. Et surtout, la comparaison statistique correcte dans ce cas particulier doit être faite contre un groupe contrôle ayant les mêmes caractéristiques (randomisé) et ne recevant pas le produit mais un contrôle (étude randomisée contrôlée dans le sous-groupe de sujets « cibles »).

La spécificité de l'effet bifidogène, en termes de populations bactériennes stimulées, peut difficilement être appréciée sur la seule base de la non-évolution du niveau de population des bactéries totales du fait de la disproportion numérique existant entre ces deux populations bactériennes. Dans le futur, il conviendrait de réaliser une analyse large des différents groupes dominants.

### Points importants

- A ce jour, on retient comme définition « pratique » d'un effet bifidogène une augmentation du niveau de population de bifidobactéries au sein de la flore colique et/ou fécale. D'autres critères pourraient également être utilisés, tels la prévalence de ces bactéries ou la stimulation d'une ou plusieurs fonctions qui leur sont spécifiques.
- La démonstration d'un effet bifidogène ne peut reposer sur la seule utilisation de modèles *in vitro* mais requiert une ou des études contrôlées chez l'homme (études randomisées, menées idéalement en double aveugle sur un nombre suffisant d'individus, incluant un contrôle du régime alimentaire et un « placebo » adapté). Le groupe de travail n'est pas en mesure de recommander l'usage d'un placebo particulier, valable quelle que soit l'étude.
- La méthode utilisée pour le dénombrement des bifidobactéries peut être indifféremment la culture, l'hybridation *in situ* à l'aide de sondes oligonucléotidiques spécifiques ou la PCR quantitative en présence d'amorces spécifiques, sous réserve d'une application correcte (selles fraîches et stockées pendant moins d'une heure en conditions anaérobies et vérification de l'appartenance des colonies dénombrées au genre *Bifidobacterium* sp. dans le cas de la culture, validation de la spécificité des sondes et des amorces dans le cas des techniques de biologie moléculaire, précision quant à l'efficacité des amorces dans le cas de la PCR quantitative) et d'un mode d'expression des résultats adapté (expression en pourcentage réservée aux techniques de biologie moléculaire).
- L'utilisation d'indices prébiotiques basés sur le concept de « bonne flore en comparaison avec une mauvaise flore » n'est pas acceptable.
- La reconnaissance d'un effet bifidogène doit dans tous les cas reposer sur une analyse statistique valide. La démonstration de l'effet bifidogène est insuffisante pour revendiquer un effet santé.

## VII- Effet des probiotiques sur la flore intestinale

---

### 1. Introduction

Peu d'études ont porté spécifiquement sur l'incidence de suppléments en produits laitiers fermentés et probiotiques sur la composition de la microflore intestinale de l'homme adulte. Nous analysons et commentons ci-après les plus intéressantes.

### 2. Revue et critique de quelques études les plus significatives

Dans l'étude randomisée contrôlée de Collins *et al.* (2002), 80 volontaires recevaient pendant 21 jours un lait fermenté contenant  $10^{10}$  ufc de *L. salivarius* UCC118/jour (n=20) en comparaison avec du lait frais (n=20) ou les contrôles correspondants (n=20, chaque groupe). L'apport de UCC118 entraînait une élévation significative des comptes de lactobacilles et d'entérocoques fécaux. Bifides, *Bacteroides* et entérobactéries n'étaient pas significativement modifiés. Une augmentation concomitante des IgA salivaires et de l'activité phagocytaire des granulocytes était observée avec le probiotique. Les méthodologies de bactériologie classique utilisées dans cette étude sont correctes car elles concernent des micro-organismes non extrêmement oxygène-sensibles.

Dans l'étude de Fujiwara *et al.* (2001), 7 volontaires sains recevaient par voie orale  $10^{11}$  ufc de *B. longum* lyophilisés dans 200 mL de lait chaque jour durant 7 jours. A l'exception des entérobacteriaceae et des clostridies lécininase-négatives (non *C. perfringens*) qui étaient significativement diminuées d'environ 1 unité logarithmique, aucune des nombreuses populations analysées n'était affectée significativement par le transit à  $10^7$ - $10^8$  du bifide (anaérobies totaux, bifides, *Eubacterium*, bacteroidaceae, peptococcaceae, *Veillonella*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*). Une réduction significative des activités bêta-glucuronidases et bêta glucosidases des selles était observée en parallèle. Les méthodologies de bactériologie anaérobie utilisées dans cette étude sont correctes pour des microorganismes anaérobies, même extrêmement oxygène-sensibles.

Dans l'étude randomisée contre placebo de Spanhaak *et al.* (1998), 20 volontaires sains inclus recevaient par voie orale soit  $10^{11}$  ufc de *L. casei* Shirota par jour dans 3x100mL de lait fermenté, soit 3x100mL de lait non fermenté par jour, durant 28 jours. Par rapport au groupe contrôle dans lequel la flore fécale restait inchangée durant toute l'étude, la prise du *L. casei* Shirota s'accompagnait d'une élimination fécale du probiotique à  $10^7$  / g selles et d'une augmentation significative mais transitoire des bifidobactéries. Les nombreux autres groupes microbiens testés (anaérobies totaux, *Bacteroidaceae*, entérocoques, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*..) restaient inchangés comme chez les contrôles. Les paramètres fonctionnels suivis (activités enzymatiques des selles ou paramètres immunologiques) n'étaient pas modifiés de façon concluante.

L'étude de Tannock *et al.* (2000) portant sur 10 volontaires sains comprenait une période de suivi de 15 mois durant laquelle tous les volontaires recevaient des mois 6 à 12 un produit laitier fermenté contenant  $1,6 \cdot 10^9$  *Lactobacillus rhamnosus* DR20 par jour. L'utilisation de diverses méthodes classiques et moléculaires mises en œuvre pour l'analyse mensuelle des flores fécales conduisait aux observations suivantes :

- *L. rhamnosus* DR20 transitait à des niveaux plus ou moins élevés suivant le volontaire et ce paramètre semblait influencé par la diversité des lactobacilles autochtones.
- La consommation du produit laitier fermenté contenant *L. rhamnosus* DR20 s'accompagnait d'une élévation significative transitoire des comptes de lactobacilles totaux ( $4,8 > 5,1 \log_{10} \cdot g^{-1}$  selles) et d'entérocoques ( $3,5 > 5,2 \log_{10} \cdot g^{-1}$  selles). Elle

s'accompagnait également d'une élévation transitoire de la fréquence de détection des lactobacilles (de 76 à 100 %).

- Les quelques différences observées pour d'autres groupes et pour certains sujets seulement ne conduisaient pas à une évolution significative pour la population étudiée.
- La consommation du produit laitier fermenté contenant *L. rhamnosus* DR20 ne s'accompagnait pas de modifications significatives de paramètres biochimiques tels que les AGCC et les activités bêta-glucuronidase ou azoréductase.

Les méthodologies de bactériologie anaérobie utilisées dans cette étude sont appropriées. Les selles étaient traitées dans l'heure suivant leur émission.

### 3. Recommandations pour le protocole des études

- **Quels groupes microbiens analyser ?** Il est important de caractériser de la façon la plus exhaustive possible les composantes dominantes de la flore telles que *Bacteroides* (et apparentés), le groupe *Eubacterium rectale-Clostridium coccoïdes* et le groupe *Clostridium leptum*, ainsi que les bifidobactéries. Les lactobacilles, les streptocoques et entérocoques et les entérobactéries sont des populations sous-dominantes dont le suivi peut être décidé en fonction du genre microbien auquel appartient le probiotique. Les approches de bactériologie classique ne permettent pas le suivi de ces groupes, si bien que les approches moléculaires devraient être privilégiées. A défaut, il reste important de caractériser la flore dominante de la façon la plus exhaustive possible à l'aide des milieux sélectifs disponibles et des techniques anaérobies les plus strictes.
- **Quelles méthodes d'analyse ?** L'hybridation in situ (HIS) fluorescente semble bien adaptée à ces besoins et quand cela a pu être comparé pour les bifides et les *Bacteroides* par exemple, culture et HIS n'étaient pas significativement différentes (Langendijk *et al.*, 1995, Tannock *et al.*, 2000). La PCR quantitative semble devoir apporter une alternative tout à fait propice à l'analyse d'échantillons fécaux offrant un seuil de quantification de  $4 \log_{10} \cdot g^{-1}$ , mais les systèmes nécessaires n'ont pas encore été validés.
- **Quelles unités de mesure ?** La mesure absolue en  $ufc \cdot g^{-1}$  est la référence pour la culture. La PCR quantitative permet de s'en approcher en donnant accès à une mesure des équivalents  $gènes \cdot g^{-1}$  de selles ; voire en  $UFC \cdot g^{-1}$  pour une souche donnée. L'utilisation de l'HIS a conduit à quelques rares quantifications absolues ( $bactéries \cdot g^{-1}$  ou  $\log_{10}(bactéries \cdot g^{-1})$ ), la quantification relative en pourcents des bactéries totales marquées à l'aide d'une sonde générale étant préférée par rigueur expérimentale.

## VIII- Effet des pré- et probiotiques sur le système immunitaire

---

### 1. Introduction

L'homéostasie intestinale résulte de nombreux paramètres mutuellement dépendants. L'établissement d'un équilibre dépend de la capacité de la muqueuse intestinale à absorber les nutriments, des échanges hydro-électrolytiques et du maintien de la barrière épithéliale vis à vis des pathogènes et des antigènes alimentaires. Cet équilibre implique de multiples interactions entre les cellules épithéliales, endocrines, stromales, immunitaires et la microflore. Tout dysfonctionnement peut conduire à une inflammation chronique locale, conduisant au déséquilibre des mécanismes d'absorption (nutriments, ions) et de sécrétion (ions, mucus, IgA). La microflore bactérienne tient une place importante dans la maturation et l'intégrité épithéliale ainsi que dans la modulation des réponses immunitaires vis à vis des antigènes luminaux. Tout comme la flore résidente, les probiotiques peuvent interférer avec le système immunitaire de l'hôte. Ils transitent dans la lumière intestinale et sont normalement séparés du système immunitaire local par la barrière épithéliale. Ils peuvent communiquer avec les cellules de la *lamina propria* soit indirectement en envoyant des signaux (cytokines) via les entérocytes, soit directement par contact, en cas de translocation vers la *lamina propria* et les ganglions mésentériques. Ce phénomène de translocation est minime en condition normale. Les probiotiques peuvent aussi libérer des composés dans la lumière intestinale, qui sont susceptibles d'être absorbés par l'épithélium intestinal et d'agir sur les cellules immunitaires.

### 2. Effet des probiotiques sur l'immunité innée

L'immunité innée utilise essentiellement des mécanismes visant à éliminer de façon rapide et non spécifique des microorganismes pathogènes par les phagocytes ou à éliminer des molécules du non-soi par la stimulation de l'activité des lymphocytes natural killer (NK). Ces mécanismes impliquent la phagocytose de bactéries pathogènes par les macrophages *via* une reconnaissance de motifs bactériens hautement conservés appelés « PAMPS » pour « Pathogen Associated Molecular Patterns », par les cellules immunitaires. Les récepteurs impliqués dans la reconnaissance de ces motifs sont les TLRs (Toll-like receptors), et leur activation induit une cascade de signaux intracellulaires conduisant à la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et à la libération de cytokines ou de chemokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  ou l'IL8. TLR4 est un récepteur du lipopolysaccharide (LPS), composant majeur des parois de bactéries gram (-), TLR2 reconnaît le peptidoglycane des bactéries gram (+), TLR3 l'ARN double brin, TLR5 la flagelline et TLR9 l'ADN bactérien (motifs CpG non méthylés).

L'immunité innée est généralement évaluée par le relargage de cytokines, la phagocytose ou l'activation NK sous l'effet stimulant des bactéries (parois).

#### 2.1 Stimulation de l'immunité innée chez l'homme (ou dans des lignées cellulaires humaines)

Il convient de distinguer les études cliniques et les études *in vitro* dans lesquelles les cellules sanguines mononucléées sont mises en contact direct avec des probiotiques.

##### 2.1.1 Essais cliniques non contrôlés

L'ingestion de lait fermenté par *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium bifidum* pendant 3 semaines chez des volontaires sains n'induisait pas de modifications de la distribution des sous-types lymphocytaires, mais induisait une augmentation de la phagocytose (Schiffrin *et al.*, 1995). Chez des volontaires sains recevant 150 mL/jour de lait fermenté par *Lactobacillus johnsonii*, l'activité phagocytaire était augmentée avec  $10^7$  UFC/mL mais pas avec  $10^6$  UFC/ml (Donnet-Hughes *et al.*, 1999). L'administration de *Lactobacillus rhamnosus* GG pendant 5 semaines conduisait à une augmentation de l'activation T CD4<sup>+</sup> par la flore fécale. Cependant, la sécrétion des cytokines TNF $\alpha$ , IL6 et IFN $\gamma$  stimulée par la

flore était moins importante en présence de *Lactobacillus rhamnosus* GG, alors que les sécrétions d'IL10 et d'IL4 étaient augmentées (suggérant l'implication de cellules T régulatrices). Ceci indique une diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et une augmentation des cytokines suppressives par *Lactobacillus rhamnosus* GG (Schultz *et al.*, 2003). Une autre étude a rapporté une réduction de la dépression de l'activité NK observée chez les sportifs de haut niveau (Pujol *et al.*, 2000) lors de la consommation de 500 mL de lait fermenté par *Lactobacillus casei* DN-114001, *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*.

### 2.1.2 Essais cliniques contrôlés en double aveugle

Chez des sujets sains, *Lactobacillus rhamnosus* GG avait un effet immunostimulant (augmentation de récepteurs de phagocytose CR1 et CR3 et récepteurs aux IgG et IgA) alors que chez des sujets présentant une hypersensibilité au lait, on observait au contraire une diminution de l'expression élevée de ces récepteurs (Pelto *et al.*, 1998). Un essai clinique en double aveugle contre placebo comportant 25 sujets (60-83 ans) ayant consommé pendant 6 semaines du lait supplémenté ou non avec *Bifidobacterium lactis*,  $1.5 \times 10^{11}$  UFC/jour montrait une sécrétion accrue d'IFN $\alpha$  (sang périphérique), une augmentation de la phagocytose par les polymorphonucléaires (PMN) et une activité bactéricide accrue 3, 6 et 12 semaines après la fin de l'intervention (Arunachalam *et al.*, 2000). Chez 52 volontaires sains (63 ans) recevant en 3 phases (wash in, essai, wash out) *Lactobacillus rhamnosus* ( $5 \times 10^{10}$  UFC/jour), l'activité phagocytaire des PMN augmentait de 15% et l'activité tumoricide NK de 70 à 150%, ces valeurs revenant lentement à l'état initial après arrêt du traitement (Sheih *et al.*, 2001). Les mêmes résultats étaient obtenus dans un essai utilisant la souche *Bifidobacterium lactis* HN019 (Chiang *et al.*, 2000). Egalement, chez 30 volontaires sains âgés de 64 à 84 ans consommant pendant 3 périodes de 3 semaines, du lait écrémé, du lait écrémé + *Bifidobacterium lactis* à forte dose ( $5 \times 10^{10}$  /jour) ou à faible dose ( $5 \times 10^9$  /jour), puis à nouveau du lait écrémé, on observait, quelle que soit la dose, que *Bifidobacterium lactis* induisait une augmentation de la proportion de cellules T activées (CD4+ CD25+) et de cellules NK. D'autre part, une augmentation de la phagocytose et de l'activité NK était aussi observée (Gill *et al.*, 2001). L'effet stimulant de l'activité NK n'est cependant pas retrouvé pour toutes les souches probiotiques (Spanhaak *et al.*, 1998). Bien que la plupart de ces études aillent dans le sens d'un renforcement de l'immunité innée agissant comme première ligne de défense lors d'infections, très peu d'études ont analysé l'impact d'une supplémentation probiotique sur l'incidence des épisodes infectieux. Turchet *et al.* (2003) ont cependant étudié 360 personnes âgées, divisées en 2 groupes recevant ou non pendant 3 semaines une supplémentation par un lait fermenté (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus* et *L. casei* DN-114001), et montré que le groupe supplémenté avait le même taux d'infections hivernales que le groupe témoin, mais que la durée des épisodes infectieux était plus courte (7 jours contre 8.7 jours) chez les individus supplémentés.

### 2.1.3. Etudes *in vitro* des réponses cytokiniques de cellules mononucléées périphériques (PBMC) stimulées par les probiotiques

Les parois des bactéries gram (+) stimulent les monocytes/macrophages *via* le TLR-2. Il existe en effet une augmentation de la réponse des macrophages en présence d'acides lipotéichoïques, composant des membranes de bactéries gram (+). Les cellules mononucléées périphériques (PBMC) humaines, stimulées par *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp ou *Lactobacillus helveticus* sécrètent de l'IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et de l'IFN $\gamma$  (Solis Pereyra & Lemonnier, 1993). Cette sécrétion non spécifique de cytokines (TNF $\alpha$ , IL6, IL10) semble plus importante en présence de bactéries vivantes qu'en présence de bactéries tuées (Miettinen *et al.*, 1996). Différentes souches de *Streptococcus thermophilus* stimulent aussi la sécrétion des cytokines TNF $\alpha$  et IL6, l'intensité de la réponse étant souche et dose-dépendante, et souvent de façon plus intense que *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium adolescentis* ou *Bifidobacterium Bifidum* (Marin *et al.*, 1998).

La sécrétion d'interleukines pourrait être différente selon que l'on stimule avec des bactéries gram (+) (IL12) ou gram (-) (IL10) (Hessle *et al.*, 1999). Ce phénomène a été confirmé dans une étude plus récente dans laquelle *Lactobacillus johnsonii* et *Lactobacillus sakei* augmentaient la sécrétion d'IFN $\gamma$  et IL12 (Th1) alors qu'*E.coli* stimulait plutôt la sécrétion d'IL10 (Th2), les deux types bactériens stimulant par ailleurs l'activation NK (augmentation de CD69 et CD25) et la prolifération cellulaire (Haller *et al.*, 2000).

Enfin, en ce qui concerne la sécrétion de la chemokine IL8, facteur chimiotactique des polynucléaires neutrophiles, les lactobacilles, bifidobactéries et streptocoque contenus dans le mélange probiotique VSL#3<sup>®</sup> ainsi que *Lactobacillus rhamnosus GG* (tous gram +) n'induisaient pas de sécrétion d'IL8 par les entérocytes (lignée intestinale humaine HT29) alors qu' *E.coli* Nissle1917 (gram -) l'induisait (Lammers *et al.*, 2002).

## 2.2 Modulation de l'immunité innée chez la souris, le rat ou sur des lignées macrophagiques animales

De nombreux travaux montrent une *stimulation des macrophages* (migration, sécrétion de cytokines, phagocytose) chez l'animal (Hidemura *et al.*, 2003 ; He *et al.*, 2002 ; Gill & Rutherford, 2001 ; Gill *et al.*, 2000 ; Hatcher & Lambrecht, 1993). Des résultats similaires de stimulation ont été obtenus sur des cellules immunitaires isolées de plaques de Peyer (Yasui & Ohwaki, 1991).

### Points importants

- Les études *in vitro* indiquent que des probiotiques peuvent entraîner une stimulation de la sécrétion de cytokines, Th1 le plus généralement (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ ), par les cellules immunitaires, avec des effets dépendant des souches.
- Cependant, ces études impliquent un contact direct bactérie/cellule immunitaire, ce qui n'est probablement pas représentatif de la physiologie intestinale.
- Les études *in vitro* ne tiennent pas compte de l'environnement cytokinique et des interactions avec d'autres types cellulaires intervenant *in vivo*, ce qui pose la question de la pertinence des réponses obtenues dans ce contexte simplifié.
- La sécrétion de cytokines étudiée sur les cellules immunitaires circulantes (et pas sur les cellules locales intestinales) ne reflète probablement pas les phénomènes locaux. Par exemple, on sait que le tonus suppresseur (TGF $\beta$ ?IL10) présent dans la muqueuse intestinale régule négativement l'expression des récepteurs du LPS (CD14) sur les macrophages locaux et que ces cellules isolées de la *lamina propria* ne répondent donc pas ou peu au LPS (Zareie *et al.*, 2001) contrairement aux cellules circulantes. Aucune allégation ne peut donc être étayée sur ces tests *in vitro*.
- L'ensemble des études cliniques chez l'homme convergent vers une modulation de l'immunité innée (activation de la phagocytose et de lymphocytes NK) par l'administration orale de différentes souches de lactobacilles et de bifidobactéries. Cependant, les conséquences réelles sur une meilleure efficacité de la réponse immunitaire en cas d'infections bactériennes ou virales sur l'issue de cette infection (rapidité de la guérison, influence sur les taux d'anticorps, incidence sur les taux d'infection dans une classe d'âge, etc...) ne sont que très peu connues.

## 3. Effet sur l'immunité adaptative

L'immunité adaptative est spécifique d'un antigène et plus lente à mettre en œuvre que l'immunité innée. Après un contact avec un antigène ou un microorganisme, le système immunitaire répond par la production d'anticorps protecteurs (IgG, IgA) et par l'activation de cellules T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Cette immunité spécifique peut être locale pour la protection des muqueuses (IgA), ou périphérique (IgG) pour une réponse plus générale de l'organisme.

### 3.1 Immunité des muqueuses: IgA sécrétoires

Lorsque des antigènes infectieux (antigènes bactériens ou viraux) pénètrent par voie orale, une réponse IgA sécrétoire est induite visant à bloquer l'entrée des agents pathogènes dans la muqueuse. Lorsque l'on administre une flore intestinale à des souris axéniques, on observe l'apparition rapide de plasmocytes à IgA dans la *lamina propria* intestinale (Moreau *et al.*, 1982). Il a donc été suggéré que l'administration de probiotiques par voie orale pourrait être utilisée pour activer l'immunité sécrétoire. Cependant, une augmentation des IgA ne veut pas dire nécessairement effet bénéfique sur la santé sauf dans les modèles infectieux.

#### Chez l'Homme

La plupart des études ont concerné l'enfant : dans les diarrhées à rotavirus, *Lactobacillus rhamnosus* GG induisait une augmentation de la sécrétion d'IgA anti-rotavirus (Kaila *et al.*, 1992) plus importante lorsque les bactéries étaient vivantes (Kaila *et al.*, 1995). Chez l'enfant également, lors de la vaccination orale contre le rotavirus, une supplémentation en *Lactobacillus rhamnosus* GG conduisait à une réponse IgM anti-rotavirus plus élevée que chez les témoins non supplémentés (Isolauri *et al.*, 1995). Deux études cliniques en double aveugle contre placebo chez l'enfant ont rapporté des résultats contradictoires sur l'effet préventif de probiotiques dans la prévention d'infections nosocomiales à rotavirus. Saavedra *et al.* ont rapporté que l'addition de *B. bifidum* et *S. thermophilus* à une formule lactée infantile protégeait les enfants de la survenue d'une diarrhée à rotavirus (Saavedra *et al.*, 1994) alors qu'une récente étude clinique en double aveugle a montré l'absence d'effet de *Lactobacillus rhamnosus* GG sur l'infection nosocomiale à rotavirus dans un contexte hospitalier (Mastretta *et al.*, 2002).

Dans une étude menée chez des enfants sains, l'administration d'un produit fermenté contenant des bifidobactéries entraînait une augmentation significative des IgA fécales totales et des IgA anti-poliovirus pendant la consommation du produit (Fukushima *et al.*, 1998).

Chez des volontaires sains adultes (étude non contrôlée), l'ingestion de lait fermenté par *Lactobacillus johnsonii* LA1 et de bifidobactéries pendant 28 jours, jointe à un stimulus infectieux (*Salmonella typhi* atténuée) conduisait à une augmentation de la concentration des IgA sériques spécifiques de *Salmonella*, celle-ci étant 4 fois plus élevée que celle observée chez des sujets ne recevant pas de lait fermenté (Link Amster *et al.*, 1994). Cependant l'ingestion de *Lactobacillus johnsonii* LA1 pendant 28 jours n'induisait qu'une faible augmentation des IgA totales sériques et aucune modification des autres Ig (Marteau *et al.*, 1997).

#### Chez l'animal

Chez des souris recevant des protéines de lactosérum dans l'alimentation, les IgA totales et spécifiques de la  $\beta$ -lactoglobuline mesurées au niveau intestinal étaient plus élevées chez les animaux recevant des *B. longum* (Takahashi *et al.*, 1998). Chez des rats monocolonisés par *E.coli* pathogène (type I fimbriae) ou *E.coli* + *Lactobacillus plantarum*, la réponse IgA dirigée contre *E.coli* était plus importante et l'activation T (CD25<sup>+</sup>) dans la *lamina propria* plus élevée chez les rats ayant reçu le lactobacille (Herias *et al.*, 1999).

#### **Point important**

Ces résultats indiquent la possibilité d'un renforcement de l'immunité sécrétoire IgA vis à vis de pathogènes viraux ou bactériens, au niveau de la muqueuse intestinale, par certains probiotiques. Cependant, le nombre d'études reste restreint, surtout chez l'adulte. De plus, la corrélation existant entre les taux plus élevés d'IgA sécrétoires et la prévention des infections reste controversée.

### 3.2. Tolérance orale

Seules des études chez la souris sont disponibles. L'étude de la tolérance orale (cellulaire et humorale) à la  $\beta$ -lactoglobuline chez la souris a montré que son développement était meilleur chez les souris conventionnelles que chez les souris axéniques ou monoxéniques colonisées par *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii* ou *Bifidobacterium lactis* Bb12 (Prioult *et*

*al.*, 2003). Par ailleurs, *Lactobacillus paracasei* était un meilleur inducteur de tolérance que les deux autres souches de probiotiques (Prioult *et al.*, 2003).

### 3.3 Allergie

L'idée de l'utilisation de probiotiques dans le traitement des désordres allergiques est basée sur le fait que cette pathologie pourrait être associée à une dysrégulation des réponses lymphocytaires Th1/Th2 vis à vis des antigènes exogènes. Plusieurs théories incluant l'hypothèse de l'hygiène ont suggéré qu'un style de vie moderne et aseptisé pouvait être à l'origine de la recrudescence des maladies allergiques. Dans les pays développés, le système immunitaire est moins sollicité par les infections stimulant la réponse Th1 (cytokines pro-inflammatoires, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ). En théorie, une réponse Th1 peut protéger contre le développement de maladies allergiques car les réponses Th1 et Th2 sont considérées comme mutuellement inhibitrices. En l'absence de stimuli infectieux, le système de défense anti-parasitaire impliquant les cytokines Th2 (IL4) et la sécrétion d'IgE pourraient être « redirigés » vers les antigènes alimentaires. Cependant, d'autres mécanismes immuno-régulateurs impliquant les cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices ont été mis en évidence. En effet, des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs (T<sub>H</sub>3, T<sub>R</sub>1, T<sub>R</sub>, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) peuvent inhiber et contrôler les réponses immunitaires spécifiques, soit par un contact cellulaire direct, soit par la libération de cytokine suppressives (IL10, TGF $\beta$ ).

On dispose de très peu d'études chez des adultes et elles sont assez contradictoires. Dans une étude clinique en double aveugle contre placebo, l'ingestion pendant 5 mois de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 n'avait pas d'effet chez 18 patients atteints d'allergie au pollen de bouleau et à la pomme (Helin *et al.*, 2002). Certaines études, essentiellement du groupe d'Erika Isolauri en Finlande, ont suggéré que *Lactobacillus rhamnosus* GG pouvait aider à la diminution des symptômes de dermatite atopique chez des enfants allergiques aux protéines du lait de vache et nourris par des hydrolysats de protéines de lait de vache supplémentés en *Lactobacillus rhamnosus* GG ou en *Bifidobacterium lactis* Bb12 (Majamaa & Isolauri, 1997 ; Isolauri *et al.*, 2000). Une étude randomisée en double aveugle contre placebo a aussi démontré que *Lactobacillus rhamnosus* GG donné aux mères atopiques avant la naissance de leur enfant et à l'enfant pendant les 6 premiers mois de vie, conduisait à une nette diminution de la dermatite atopique, puisque celle-ci se développait chez 23% des couples mère/enfant traités et chez 46% des non-traités (Kalliomaki *et al.*, 2001). La persistance de cet effet bénéfique a été retrouvée chez ces mêmes enfants à l'âge de quatre ans (Kalliomaki *et al.*, 2003). Chez l'enfant présentant une rhinite allergique, l'ingestion de lait fermenté par *Lactobacillus paracasei*-33 induisait une amélioration des symptômes et de la qualité de vie. Cependant ces résultats étaient basés uniquement sur les réponses à un questionnaire, rendant l'étude très incomplète (Wang *et al.*, 2004). Enfin, dans une étude contrôlée en double aveugle, l'ingestion journalière de 200 g de yogourt « vivant » (non thermisé) pendant 1 an, a conduit à une diminution du taux d'IgE totales chez les jeunes adultes (n=20) et à un degré moindre, chez les personnes âgées (n=20), bien que les taux sériques d'IgE spécifiques d'allergènes individuels n'aient pas été modifiés (Van de Water *et al.*, 1999). Dans cette étude, seule une évaluation subjective des symptômes allergiques a été effectuée, ne permettant pas de conclure fermement à un bénéfice clinique.

Certaines études chez la souris montrent que *Lactobacillus casei* ou *Lactobacillus plantarum* peuvent inhiber la production d'IgE spécifiques d'antigènes (Matsuzaki *et al.*, 1998 ; Shida *et al.*, 1998 ; Murosaki *et al.*, 1998). Cependant, dans un modèle d'allergie aux protéines du lait chez le cobaye, l'administration orale de lait ou de lait fermenté par *Streptococcus thermophilus* et *Bifidobacterium breve* conduisait à la même sensibilisation allergique dans les deux groupes, suggérant que le lait fermenté a les mêmes capacités sensibilisantes que le lait non fermenté (Terpend *et al.*, 1998). Enfin, l'administration par voie nasale chez la souris de *Lactobacillus plantarum* recombinant exprimant un peptide d'acarien (der p 1) résultait en une inhibition de la production d'IFN $\gamma$  et d'IL5 (activateur d'éosinophiles) chez les



animaux sensibilisé à der p 1, suggérant un effet anti-allergique de la bactérie recombinante exprimant l'allergène (Kruisselbrink *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces résultats suggère que la réponse Th1 induite par les bactéries lactiques pourrait induire une suppression Th2. Cependant cette interprétation est certainement très simpliste car elle n'est pas compatible avec le fait que certaines bactéries lactiques sont capables d'atténuer des colites inflammatoires (de type Th1) chez la souris et d'agir positivement dans certaines maladies inflammatoires de l'intestin (voir chapitre effets anti-inflammatoires).

#### Points importants

- On ne dispose d'aucun travail montrant un effet significatif d'un probiotique ou d'un prébiotique sur des affections de nature allergique chez l'adulte.
- Un seul groupe finlandais (E. Isolauri) a pu montrer que l'administration de *Lactobacillus rhamnosus* GG ou *Bifidobacterium lactis* Bb12 chez la mère et l'enfant en période néonatale diminue d'une part l'apparition de l'allergie (dermatite atopique) et d'autre part les symptômes chez les nourrissons allergiques traités (action préventive et action bénéfique lors du traitement par les formules lactées extensivement hydrolysées). Les études effectuées sur les allergies respiratoires (rhinite, asthme) avec deux souches de lactobacilles (*rhamnosus* et *paracasei*) sont peu nombreuses et contradictoires, et laissent donc la question en suspens.

#### 4. Effet anti-inflammatoire des bactéries lactiques et/ou de leurs produits de sécrétion

Un effet bénéfique de bactéries lactiques (et tout particulièrement du mélange probiotique VSL#3<sup>®</sup> qui contient des lactobacilles, des bifidobactéries et un streptocoque) a été observé pour la prévention des rechutes ou de l'apparition de pochites (Gionchetti *et al.*, 2000 ; Gionchetti *et al.*, 2003 ; Mimura *et al.*, 2004). Ces pochites sont des maladies inflammatoires du réservoir iléal réalisé après anastomose iléoanale en cas de rectocolite hémorragique.

Les mécanismes impliqués dans l'effet thérapeutique ne sont que peu connus. Ils pourraient impliquer la sécrétion de molécules immunomodulatrices induisant des signaux anti-inflammatoires. En effet, une étude de l'interaction de bactéries commensales (*Salmonella* non pathogène) avec des cellules épithéliales montre que la bactérie, en inhibant l'ubiquitination de I $\kappa$ B, diminue la translocation nucléaire de NF $\kappa$ B et le relargage de cytokines pro-inflammatoires (Neish *et al.*, 2000). D'autres études indiquent un pouvoir anti-inflammatoire de certains probiotiques, lactobacilles, bifidobactéries, mélange VSL#3<sup>®</sup> dans des modèles d'inflammation intestinale chez l'animal (Madsen *et al.*, 2001 ; 1999 ; Caplan *et al.*, 1999) et dans les maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin chez l'homme (Gupta *et al.*, 2000 ; Borruel *et al.*, 2002). Cependant une étude clinique contrôlée a montré que *Lactobacillus* GG n'était pas efficace dans la prévention des rechutes après résection intestinale dans la maladie de Crohn (Prantera *et al.*, 2002).

*In vitro*, les produits de sécrétion de *Lactobacillus rhamnosus* GG ont un effet inhibiteur de la production de TNF $\alpha$  en présence de LPS par les macrophages (Pena & Versalovic, 2003).

D'autre part, un effet inhibiteur sur la sécrétion de TNF $\alpha$  par des PBMC, induit par le LPS en présence de surnageants de culture de *B.breve* et *S.thermophilus* est aussi observé, l'activité inhibitrice étant capable de franchir la barrière épithéliale (Ménard *et al.*, 2004).

D'autres études récentes montrent que le NO sécrété par *Lactobacillus farciminis* a un pouvoir anti-inflammatoire important dans la colite à TNBS chez le rat (Lamine *et al.*, 2004). Le butyrate sécrété par certaines souches de bactéries est également considéré comme anti-inflammatoire car il inhibe NF $\kappa$ B et la dégradation de I $\kappa$ B (Segain *et al.*, 2000).

Enfin, l'ADN bactérien et ses motifs CpG pourraient avoir un rôle à jouer dans la suppression des réponses inflammatoires. Dans une étude de cellules mononuclées du sang

périphérique de volontaires sains incubées avec l'ADN bactérien de huit souches probiotiques ou avec la flore résidente avant et après administration des probiotiques, l'ADN des probiotiques a induit une sécrétion d'IL10 par les PBMC. L'ADN extrait de la flore après traitement probiotique a diminué la sécrétion d'IL1 $\beta$  et augmenté celle d'IL10, suggérant un effet « tolérogène » et anti-inflammatoire de ces probiotiques (Lammers *et al.*, 2003). Enfin, dans un modèle de colite expérimentale chez la souris, l'effet anti-inflammatoire de VSL#3<sup>®</sup> était lié à leur ADN et à l'interaction ADN/TLR-9 (Rachmilewitz *et al.*, 2004).

### **Points importants**

Certains essais cliniques en double aveugle ont démontré un effet bénéfique d'un mélange de probiotiques sur la prévention d'apparition ou de rechute de pochites. Bien que les mécanismes d'inhibition de la sécrétion de TNF $\alpha$  par les surnageants ou l'ADN de probiotiques soient assez bien documentés, les résultats cliniques sont plus incertains et doivent être confirmés chez l'Homme atteint de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique.

### **CONCLUSION GENERALE**

- Ingérer des microorganismes à activité probiotique n'est pas sans effet pour le système immunitaire : en condition physiologique (Homme sain) et pour de nombreuses souches, la plupart des études allant de la cellule isolée à l'essai clinique montrent un effet immunomodulateur (immunité innée et immunité spécifique notamment Th1). Les conséquences de cet effet immunomodulateur sur la santé ne sont pas connues. Dans certaines conditions pathologiques (effet seulement démontré pour les pochites), certains probiotiques exercent un effet anti-inflammatoire dont le mécanisme reste à élucider.
- Dans l'état actuel de nos connaissances, on ne peut pas établir une liste positive de marqueurs universels de l'influence des pré- et probiotiques sur le système immunitaire. La relation entre un effet biologique sur l'immunité, quel qu'en soit le sens, et un effet santé est à démontrer aussi bien chez le sujet sain que dans les conditions pathologiques.

## IX- Effet des pré- et probiotiques sur les fonctions intestinales

---

### 1. Introduction

Les prébiotiques et les probiotiques alimentaires revendiquent en général des allégations fonctionnelles et s'intègrent dans le groupe large des « aliments fonctionnels ». La démonstration d'un effet sur une fonction intestinale n'est pas synonyme d'une action sur la santé : la relation effet physiologique-santé doit faire l'objet d'une analyse attentive et documentée, de même que les éventuelles variations des résultats d'une population à une autre. En matière d'affirmation d'effets de prébiotiques et de probiotiques sur les fonctions intestinales, il faut bien distinguer les effets décrits à partir d'études physiologiques (c'est à dire sur intestin normal -humain et/ou animal- *in vivo* et/ou *in vitro*) et ceux déduits d'études physiopathologiques -humaines et/ou animales- *in vivo* et/ou *in vitro*.

### 2. Digestion-absorption intestinale

#### 2.1 Digestion de disaccharides

##### 2.1.1 Lactose

Un effet stimulant de plusieurs souches probiotiques sur la digestion du lactose a été démontré par des études physiopathologiques *in vivo* chez l'homme adulte hypolactasique ou ayant un syndrome du grêle court :

- le yaourt ( c'est à dire souches *Lactobacilli delbruecklii subsp. Bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) augmente la digestion du lactose dans l'intestin grêle, par comparaison à un lait standard [*hypolactasie* : Kolars *et al.*, 1984 ; Savaiano *et al.*, 1984 ; Marteau *et al.*, 1990 ; Adolfsson *et al.*, 2004 ; *grêle court* : Arrigoni *et al.*, 1994], ou fermenté thermisé (Piaia *et al.*, 2003). Le yaourt améliore aussi la tolérance clinique au lactose, sans que celle-ci soit en stricte corrélation avec le degré de malabsorption du disaccharide (de Vrese *et al.*, 2001) ;
- de nombreux autres probiotiques ont aussi un effet favorable, bien qu'en général quantitativement moins prononcé. Ainsi, améliorent l'absorption du lactose [par ordre d'intensité décroissante au test d'excrétion respiratoire de l'hydrogène (de Vrese *et al.*, 2001)] les laits fermentés suivants : laits à *L. Bulgaricus* (Martini *et al.*, 1987) , à *S. thermophilus* (Martini *et al.*, 1987), à *L. acidophilus* (Martini *et al.*, 1987 ; Lin, 1995) notamment après sonication (McDonough *et al.*, 1987 ; Martini *et al.*, 1987). Chez le volontaire sain, *Saccharomyces boulardii* (250 mg x 4/j d'un lyophilisat à 10<sup>9</sup>/100 mg) augmente l'activité lactasique du jéjunum (Buts *et al.*, 1986) et du duodénum (Jahn *et al.*, 1996) ;
- quantitativement, les souches probiotiques du yaourt réduisent la maldigestion d'une charge en lactose (par comparaison au pourcentage mal digéré avec un lait fermenté thermisé ou standard) de 6 % à 33 % chez les sujets hypolactasiques (Kolars *et al.*, 1984;Savaiano *et al.*, 1984 ; McDonough *et al.*, 1987 ; Marteau *et al.*, 1990), et de 26 % au cours du syndrome du grêle court (Arrigoni *et al.*, 1994). Il n'y a pas d'effet dose-réponse clairement rapporté ; les doses habituellement étudiées correspondent, pour le yaourt, aux doses commerciales ;
- les mécanismes de l'effet favorable des probiotiques sur la digestion du lactose sont : (a) principalement, l'ajout intra-luminal de lactase d'origine bactérienne [lactase résistant probablement à l'hydrolyse enzymatique intraluminal (Marteau *et al.*, 1990)] libérée par lyse cellulaire notamment sous l'effet de l'acidité gastrique et des sels biliaires dans le grêle proximal [P. Marteau : commentaries *In* : (Midtvedt, 2003)], et/ou produite par les corps bactériens vivants et en transit [effet démontré pour *S. thermophilus* chez la souris gnotoxénique (Drouault *et al.*, 2002a)] ; (b) l'activité de la perméase bactérienne (du probiotique), permettant l'entrée du lactose dans la cellule probiotique et son hydrolyse lactasique, ce qui implique la conservation, au moins partielle, de l'intégrité bactérienne (Adolfsson *et al.*, 2004) ; (c) peut-être et de façon complémentaire pour ce qui est du

yoghourt, un ralentissement de son transit oro-coecal et/ou de sa vidange gastrique (de Vrese *et al.*, 2001) ;

-des données préliminaires suggèrent que l'ajout intra-luminal d'autres enzymes digestives [sucrase : (Harms *et al.*, 1987) ; lipase : (Drouault *et al.*, 2002b)] pourrait être assuré par des vecteurs probiotiques naturels ou génétiquement modifiés.

### 2.1.2. Saccharose

Expérimentalement, *Saccharomyces boulardii* (lyophilisat à  $10^9/100$  mg pendant 7 jours) augmente l'activité de la saccharase (mais pas celle de la maltase) dans l'iléon résiduel de rats entérectomisés, pour la ramener au niveau de celle de rats non réséqués (Buts *et al.*, 1999).

Chez l'homme, *Saccharomyces cerevisiae*, levure riche en saccharase, aide (à raison de 0,3 g de lyophilisat administré en aigü avec une charge de 2 g/kg de saccharose) à la digestion du saccharose et supprime les signes cliniques d'intolérance au cours de la carence congénitale en saccharase-isomaltase, situation clinique exceptionnelle surtout observée chez l'enfant (Harms *et al.*, 1987).

## 2.2 Absorption du glucose

Dans l'intestin résiduel (iléon) de rat entérectomisé recevant 1 mg/kg pendant 7 jours d'un lyophilisat de *S. boulardii* à  $10^9/100$  mg, la levure stimule fortement *in vitro* l'absorption sodium-dépendante du D-glucose par la bordure en brosse et double l'expression du co-transporteur 1 sodium-glucose (Buts *et al.*, 1999).

## 2.3 Absorption hydro-minérale

### 2.3.1. Eau et sodium

Les prébiotiques, en dehors de leur effet propre -et de celui des métabolites issus de leur fermentation- sur la motricité colique (cf. chapitre 2), peuvent avoir un effet stimulant sur la réabsorption colique de l'eau et du sodium, *via* les AGCC, notamment le butyrate (Topping & Clifton, 2001). Quantitativement, l'intérêt pour l'homme sain de cet effet physiologique n'est pas clairement connu ; certainement plus marqué avec les oligosaccharides non digestibles (NOS) les plus fermentescibles à dose faible ou moyenne, il s'efface, avec les fortes quantités de NOS et la diminution relative de leur fermentation, derrière leur effet laxatif.

Divers modèles physiopathologiques ont montré que certains probiotiques pouvaient inhiber ou prévenir la sécrétion entérocytaire de chlore d'origine bactérienne ou toxinique conduisant à une diarrhée infectieuse. Dans les lignées intestinales humaines HT29/cl.19A et Caco-2, *S. thermophilus* ATCC19258 et *L. acidophilus* ATCC4356 n'ont pas d'effet sur la sécrétion basale de chlore mais bloquent celle induite par *Escherichia coli* entéropathogène (Resta-Lenert & Barrett, 2003). Expérimentalement, l'effet antisécrétoire de *S. boulardii* vis à vis des toxines cholérique et d'*E. coli* a été documenté dans plusieurs modèles (Marteau *et al.*, 1990). Sur l'intestin de rat *in vitro*, *S. boulardii* stimule fortement le co-transporteur 1 sodium-glucose (Buts *et al.*, 1999).

### 2.3.2. Calcium et magnésium

De nombreux travaux expérimentaux ont suggéré, sur des modèles animaux et notamment chez le rat, que les prébiotiques stimulent l'absorption colique du calcium et du magnésium, comme celle du fer et du zinc (Scholz-Ahrens *et al.*, 2001; Scholz-Ahrens & Schrezenmeir, 2002). Dans une étude, le mélange oligofructosides + inuline était plus efficace que chacun d'eux séparément (Coudray *et al.*, 2003). Chez l'homme, les résultats sont divergents mais intéressants (Van Loo *et al.*, 1999): les prébiotiques, notamment inuline et FOS, stimuleraient l'absorption colique du calcium à la faveur de l'abaissement du pH colique et d'une solubilisation accrue, *via* peut-être les AGCC qui pourraient induire une absorption calcique jusque dans le côlon distal (Trinidad *et al.*, 1996). Cet effet stimulant, qui n'a pas été retrouvé par certains travaux (Tahiri *et al.*, 2003), serait positivement corrélé aux besoins en calcium (adolescence, post-ménopause) (van den Heuvel *et al.*, 1999) et à la dose ingérée

de FOS (Scholz-Ahrens *et al.*, 2001). Un mélange inuline + oligofructosides stimule significativement, par comparaison aux seuls oligofructosides, l'absorption du calcium chez des adolescentes (Griffin *et al.*, 2002). Le lactose stimule aussi l'absorption colique du calcium, surtout chez l'adulte hypolactasique, à la faveur de sa fermentation colique (Griessen *et al.*, 1989): quantitativement, la place physiologique de cet effet n'est pas établi. *In vivo* chez l'homme volontaire sain, un lait fermenté (yoghourt) augmente de 23 %, par rapport à un lait non fermenté, le taux d'absorption duodénale du calcium (67 % versus 44%) (Mahe *et al.*, 1994). L'augmentation de l'absorption du magnésium par les FOS a été montrée sur des modèles animaux (Rémésy *et al.*, 2002) et chez l'homme lors de l'administration de FOS pendant 5 semaines à des femmes ménopausées, chez qui néanmoins l'augmentation de 11 % de l'absorption intestinale relative du cation était contrebalancée par une augmentation de son excrétion urinaire (Tahiry *et al.*, 2001).

#### 2.4. Absorption des protéines et de l'azote

Chez le porc *in vivo*, les souches probiotiques du yaourt optimisent, par comparaison à un lait fermenté thermisé ou à un lait standard, l'absorption d'azote N<sup>15</sup> (jugée à partir de prélèvements dans le sang portal) en l'étalant sur 4 h – par rapport à 2h - post-prandiales (Mpassi *et al.*, 2001 ; Rychen *et al.*, 2002). Un mécanisme possible est un ralentissement de la vidange gastrique et/ou de son transit oro-coecal induite par le yaourt (Gaudichon *et al.*, 1994). Chez l'homme sain volontaire, un lait fermenté (yaourt) retarde, par rapport à un lait non fermenté, la vidange gastrique de l'azote (Mahe *et al.*, 1994 ; Gaudichon *et al.*, 1995), sans modifier le haut niveau d'hydrolyse des protéines ni le taux d'absorption de N<sup>15</sup> ni la sécrétion intestinale endogène d'azote (Gaudichon *et al.*, 1995). Le retard de vidange gastrique et de l'apport d'azote peut être néfaste chez le sujet âgé, chez lequel il faut au contraire apporter le maximum d'azote le plus vite possible, pour des problèmes d'accrétion digestive et de montée rapide des acides aminés sériques.

#### Points importants

- Un effet stimulant de plusieurs souches probiotiques sur la digestion-absorption du lactose a été démontré *in vivo* chez l'homme adulte hypolactasique et dans le syndrome du grêle court. Il n'y a pas d'effet dose-réponse clair; les doses habituellement étudiées correspondent, pour le yaourt, aux doses commerciales.
- Il n'y a pas d'effet favorable démontré, chez l'homme, des probiotiques sur l'absorption d'autres hydrates de carbone ni sur celle des protéines.
- L'effet des probiotiques et prébiotiques sur l'absorption de l'eau et du sodium a surtout été étudié chez l'animal et sur des lignées intestinales humaines *in vitro*.
- Un effet stimulant des prébiotiques, notamment inuline et FOS, sur l'absorption colique du calcium et du magnésium à la faveur de l'abaissement du pH colique et de la production d'acides gras à chaîne courte, est probable ; son impact dans des situations de carence en l'un et/ou l'autre de ces cations reste à formellement démontrer chez l'homme.

### 3. Motricité intestinale et transit intra-luminal

#### 3.1 Probiotiques

La seule variable étudiée a été le temps de transit intraluminal oro-anal ou colique, total et/ou segmentaire. Une souche de propionibactéries ( $5.10^{10}$  UFC/j, x 14 j) accélère le transit colique gauche chez l'adulte sain (essai non contrôlé) (Bouglé *et al.*, 1999). Un lait fermenté par *Bifidobacterium animalis* souche DN-173 010 ( $10^8$  UFC/g, x 14j) et par des bactéries lactiques ( $10^8$  UFC/g, x 14j) accélère significativement le transit oro-anal chez des volontaires sains âgés de 60 à 75 ans, de façon d'autant plus prononcée que le temps de transit initial est plus long (essai randomisé) (Meance *et al.*, 2001). Cet effet a été confirmé dans un autre essai contrôlé randomisé (*B. animalis* souche DN-173 010 - $10^8$  UFC/g- plus souches du yoghurt - $10^7$  UFC/g-, x 14 j) chez des volontaires sains âgés de 50 à 75 ans : l'effet a été jugé dose-dépendant et prolongé jusqu'à 6 semaines après l'arrêt du probiotique (Meance *et*

*al.*, 2003). La même souche DN-173 010 de *B. animalis* administrée en lait fermenté ( $10^8$  UFC/g, x 21 j) accélère le transit colique total de volontaires sains de 20 à 40 ans, hommes ou femmes, l'effet chez la femme étant plus prononcé que chez l'homme et concernant aussi le transit segmentaire sigmoïdien (essai contrôlé en double aveugle) (Bouvier *et al.*, 2001). Cet effet de *B. animalis* sur le temps de transit colique total et sigmoïdien a été confirmé chez des femmes volontaires saines âgées de 18 à 45 ans dans un essai cross-over en double aveugle ( $10^8$  UFC/g, x 10 j) : poids, pH, masse bactérienne et concentrations d'acides biliaires des selles n'étaient pas modifiés (Marteau *et al.*, 2002). Le mélange probiotique VSL#3 n'a pas d'effet, au cours du syndrome du côlon irritable, sur la vitesse du transit gastro-intestinal tout en atténuant certains signes cliniques tels que le météorisme abdominal (Kim *et al.*, 2003). Le(s) mécanisme(s) de l'effet des probiotiques sur le temps de transit intraluminal n'est (ne sont) pas établi(s).

### 3.2 Prébiotiques

Les NOS augmentent chez l'adulte le poids de selles (Gibson *et al.*, 1995 ; Cummings *et al.*, 2001 ; Cummings & Macfarlane, 2002 ; Marteau & Boutron-Ruault, 2002), variable qui est corrélée positivement à la vitesse du transit (Spiller *et al.*, 1986 ; Cummings *et al.*, 1992). Cet effet, dont l'intensité - pouvant conduire à un effet laxatif - dépend notamment de la dose ingérée et du degré de polymérisation de l'oligoside, relève de plusieurs mécanismes (Cummings *et al.*, 2001 ; Marteau *et al.*, 2004) : pouvoir osmotique (limité, à faibles doses, par la fermentation du NOS), augmentation de la biomasse bactérienne (notamment exprimée par l'augmentation de l'excrétion fécale d'azote) (Gibson *et al.*, 1995 ; Cummings & Macfarlane, 2002), stimulation de la motricité colique par les produits finaux de la fermentation des NOS tels que les AGCC [qui stimulent la motricité colique à faibles concentrations, et l'inhibent à fortes concentrations (Cherbut *et al.*, 1997)] même si ceux-ci augmentent par ailleurs l'absorption colique proximale d'eau et de sodium. L'augmentation du poids de selles induite par les NOS est utilisée en thérapeutique avec le lactulose ou le lactitol (*via* surtout l'effet osmotique de ceux-ci lorsqu'ils sont donnés à doses suffisantes).

Les prébiotiques augmentent la production de gaz intestinaux, issus de leur fermentation ( $H_2$ ,  $CH_4$ ,  $CO_2$ ) et, partant, peuvent induire un inconfort clinique en règle modéré (ballonnement abdominal, éructations, douleurs abdominales) (Cummings *et al.*, 2001 ; Cummings & Macfarlane, 2002). Il y a un effet dose-réponse pour la production de  $H_2$  ; en outre, celle-ci diminuerait avec les NOS ayant les chaînes les plus longues et ayant donc une fermentation colique plus lente (Livesey *et al.*, 1993 ; Cummings *et al.*, 2001). L'effet gazogène a été suggéré comme un possible facteur déclenchant de l'accélération du transit que peuvent induire les prébiotiques.

#### Points importants

- Les prébiotiques ont, chez l'homme, un effet gazogène, augmentent le poids de selles et peuvent avoir à forte dose un effet diarrhéogène.
- Certains probiotiques accélèrent le transit intraluminal oro-anal ou le transit colique, total et/ou segmentaire notamment sigmoïdien ; l'impact clinique, chez l'homme sain, de cet effet accélérateur reste à préciser. La démonstration d'une accélération du transit chez des sujets sains ne garantit pas un effet clinique significatif chez des sujets se plaignant de constipation.

## 4. Barrière fonctionnelle épithéliale (non immunologique)

### 4.1. Cellule épithéliale et interactions "bactéries-épithélium"; mucus intestinal

#### 4.1.1. Probiotiques

##### *Sur la cellule épithéliale*

Chez le souriceau, la colonisation par la flore conventionnelle de l'intestin est nécessaire à la fucosylation complète des glycoprotéines de la membrane entérocytaire (Bry *et al.*, 1996). *L. rhamnosus* GG, *L. acidophilus* et *B. bifidum* ne dégraderaient pas les glycoprotéines du mucus intestinal, ce qui serait un gage de leur sécurité d'emploi (Ruseler-van Embden *et al.*, 1995). *In vitro*, *L. casei* DN-114 001 (facteurs solubles -modulines- dans le surnageant de culture) modifie, en lignée HT-29 MTX de cellules épithéliales humaines, la galactosylation

cellulaire de surface (en augmentant l'expression du galactose, de l'acide sialique et en diminuant celle de la N-acétyl-galactosamine) (Freitas *et al.*, 2001), alors que *L. acidophilus* donne un profil très différent de glycosylation (augmentation du fucose et de la N-acétyl-glucosamine) (Freitas *et al.*, 2003a). Or, les récepteurs épithéliaux aux germes pathogènes dépendent largement de leur état de glycosylation (Freitas & Cayuela C., 2000), *L. casei* DN-114 001 inhibe fortement l'infection des cellules HT-29 MTX par le rotavirus, comme le fait *Bacteroides thetaiotaomicron*, importante bactérie commensale dominante de l'intestin qui modifie (augmente) la galactosylation (Freitas *et al.*, 2001) de la surface de la cellule épithéliale d'une façon similaire à *L. casei* DN-114 001 (Freitas *et al.*, 2003b).

#### Sur le mucus

*L. plantarum* 299v augmente l'expression des gènes de MUC2 et MUC3 -mucines prédominantes de l'iléon et du côlon- dans des lignées HT-29 ; cet effet explique probablement l'inhibition, par divers probiotiques comme *L. plantarum* 299v, de l'adhérence épithéliale de bactéries pathogènes, notamment *E. coli* entéroinvasif (Mack *et al.*, 1999). L'expression augmentée de l'ARNm de MUC3 est bien corrélée avec une sécrétion extracellulaire de cette mucine (Mack *et al.*, 2003). *L. rhamnosus* GG augmente aussi l'expression de MUC2 dans la lignée Caco-2 de cellules intestinales (Mattar *et al.*, 2002). Dans les lignées épithéliales humaines T84 et HT-29, VSL#3<sup>®</sup> augmente aussi l'expression des mucines (Otte & Podolsky, 2004).

#### 4.1.2. Prébiotiques

Chez le rat axénique, l'inuline augmente la quantité de mucines de la muqueuse et de la lumière cæcales (mucines neutres et/ou acides), et de la lumière colique (mucines sulfatées) (Fontaine *et al.*, 1996). Chez le rat à flore humaine (dont les mucines coliques ont une distribution muqueuse-lumière différente de celle de l'animal axénique), les FOS (50 g/kg/j) et l'inuline ont également un effet différent de celui produit chez l'animal axénique : ils augmentent l'épaisseur globale de la couche de mucus et le nombre de cellules à mucus du colôn distal (Kleessen *et al.*, 2003), diminuent les mucines acides dans la muqueuse (et/ou la lumière) cæcale et colique, augmentent les sulfomucines dans la muqueuse cæcale, et les sulfomucines et les mucines neutres dans la lumière colique (Fontaine *et al.*, 1996). Un autre prébiotique (transgalacto-oligosaccharide, 40 g/kg/j) modifie aussi la répartition des cellules à mucus dans le côlon (mais non le cæcum) du rat axénique, réduit leur nombre (mucines acides) de moitié dans le cæcum chez le rat à flore conventionnelle, mais n'a aucun effet chez l'animal à flore humaine (Meslin *et al.*, 1993). Chez le rat à flore conventionnelle, certaines fibres en majorité solubles (ispaghule), augmentent aussi, contrairement à d'autres (pectines) et à des fibres en majorité insolubles (cellulose), l'épaisseur du gel et la sécrétion totale de mucus colique (Brownlee *et al.*, 2003). Chez la souris, un régime supplémenté en FOS stimule la sécrétion de mucus colique (augmentation de l'épaisseur du gel et du nombre de cellules à mucus) sans modifier la distribution entre les cellules contenant des mucines neutres, acides et sulfatées (Hoebler *et al.*, 2002). L'effet des fructanes sur la production de mucus pourrait être *medié*, au moins en partie, par la production de butyrate, puisque celui-ci augmente l'expression de certains gènes des mucines (MUC3) dans la lignée colique humaine HT29-C116E (Gaudier *et al.*, 2004).

#### Points importants

- Certains probiotiques augmentent *in vitro*, sur des lignées intestinales humaines, l'expression de mucines et modifient la glycosylation apicale des cellules ; cet effet pourrait être relié à l'inhibition, observée par ailleurs avec certains probiotiques, de l'adhérence apicale intestinale de divers micro-organismes.
- Certains prébiotiques modifient, chez l'animal, la quantité et la répartition des mucines dans le côlon.
- L'impact de ces données en physiologie humaine n'est pas établi.

## 4.2 Perméabilité intestinale, translocation bactérienne

### 4.2.1 Perméabilité

Expérimentalement, la flore commensale et divers probiotiques agissent sur la fonction barrière et la perméabilité intestinales (Heyman & Ménard, 2002, Fioramonti *et al.*, 2003). Chez la souris axénique, il y a augmentation de la résistance électrique muqueuse et diminution du transport des macromolécules (Heyman *et al.*, 1986) Le mélange probiotique VSL#3 restaure la fonction barrière d'animaux invalidés pour le gène de l'IL-10 (Madsen *et al.*, 2001). Chez le rat, *L. brevis*, germe commensal du côlon, réduit l'hyperperméabilité aux petites molécules induite par d'autres germes (Garcia-Lafuente *et al.*, 2001), et *L. GG* fait de même sur celle induite par des agents viraux (Isolauri *et al.*, 1993a ; Isolauri *et al.*, 1993b). Chez le cobaye, un lait fermenté par *S. thermophilus* et *B. breve* augmente la résistance électrique transépithéliale de base, donc renforce la barrière muqueuse, et diminue la perméabilité (transport de  $\beta$ -lactoglobuline) de la muqueuse jéjunale montée en chambre de Ussing (Terpend *et al.*, 1999).

Les données concernant la muqueuse digestive humaine sont encore limitées. *In vitro*, dans les lignées intestinales HT29/cl.19A et Caco-2, *S. thermophilus* ATCC19258 et *L. acidophilus* ATCC4356 augmentent la résistance électrique transépithéliale et bloquent la sécrétion de chlore induite par *E. coli* entéropathogène (Resta-Lenert & Barrett, 2003). VSL#3 augmente (*via* un hypothétique facteur soluble de nature protéique sécrété par ce mélange de probiotiques) la résistance électrique et diminue la perméabilité de monocouches épithéliales T84 (Madsen *et al.*, 2001). Sur ces mêmes lignées T84, *S. boulardii* maintient la résistance électrique transépithéliale et l'intégrité structurale (jugée sur la distribution, par immunochimie et analyse en microscopie confocale, de la protéine ZO1 associée à la *zonula occludens*) des jonctions serrées intercellulaires et prévient les altérations induites par *E. coli* entéropathogène (Czerucka *et al.*, 2000) ; *S. boulardii* supprime aussi, dans des cellules T84, la phosphorylation des chaînes légères de la myosine induite par *E. coli* entérohémorragique (Dahan *et al.*, 2003). *In vivo*, chez le volontaire sain, *L. GG* réduit significativement l'hyperperméabilité de la muqueuse gastrique (mais pas celle de la muqueuse intestinale) aux disaccharides, induite par l'indométacine (Gotteland *et al.*, 2001). Chez des patients subissant une chirurgie abdominale majeure, *L. plantarum* 299V (500 mL/j d'un produit à  $10^7$  ufc/mL, sur une brève période médiane de 9 jours pré-opératoires et 5 jours post-opératoires) ne modifie pas des indices cliniques jugés représentatifs de la fonction « barrière » du tractus digestif (translocation bactérienne dans les ganglions mésentériques, colonisation bactérienne gastrique, incidence de complications septiques post-opératoires) (McNaught *et al.*, 2002). Chez des patients de soins intensifs, un symbiotique associant *L. acidophilus* La5, *B. lactis* Bb12, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* ( $10^9$  ufc par capsule, x 3/24h) aux oligofructosides (7,5 g x 2 /24h) et administré par voie orale ou par sonde naso-gastrique sur une période médiane courte de 10 jours, diminue significativement la fréquence de contamination du liquide gastrique par des pathogènes mais n'a pas d'effet significatif sur la perméabilité intestinale (test lactulose / rhamnose) ni sur l'incidence des complications septiques ou la mortalité (Jain *et al.*, 2004).

Finalement, l'effet des probiotiques sur la barrière muqueuse non-immune semble être la conjonction (a) d'effets directs sur l'expression des mucines, sur le maintien (structure, localisation, phosphorylation) des protéines du cytosquelette et des jonctions serrées intercellulaires, donc sur la résistance électrique, la perméabilité, et les flux hydro-ioniques trans-épithéliaux ; et (b) de la probable interface de ces effets avec le versant immun de la barrière muqueuse (adhérence bactérienne et interférence avec les pathogènes, translocation, réponse immune non-spécifique et de type humoral, interférence avec l'inflammation et réponse cytokinique) (Heyman & Ménard, 2002 ; Ménard & Heyman, 2005).

### 4.2.2. Translocation bactérienne

Elle est, en dehors de ses aspects proprement immunologiques et bactériologiques, une expression au moins partielle de la fonction « barrière » de la muqueuse intestinale.



Chez l'homme *in vivo*, l'absence d'effet protecteur d'un probiotique (*L. plantarum* 299V) sur la translocation bactérienne [jugée en peropérateur dans les ganglions mésentériques (McNaught *et al.*, 2002)] a été confirmée par la même équipe et la même méthodologie pour un symbiotique associant *L. acidophilus*, *B. lactis* Bb12, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* ( $10^9$  ufc par capsule, x 3/24h) aux oligofructosides (16g x 2 /24h) (Anderson *et al.*, 2004) : dans ces 2 études, la durée d'administration médiane était courte, de 9 et 12 jours pré-opératoires et de 5 et 4 jours post-opératoires respectivement (McNaught *et al.*, 2002 ; Anderson *et al.*, 2004).

Dans des modèles expérimentaux chez la souris et le rat, plusieurs travaux ont montré que certains probiotiques [*B. longum* (Suzuki *et al.*, 1997); *Propionibacterium acnes* (Suzuki *et al.*, 1997 ; Berg, 1999) ; *S. boulardii* (Berg *et al.*, 1993) ; ou fibres (Spaeth *et al.*, 1990)] diminuaient la translocation de bactéries pathogènes. Inversement, certains prébiotiques peuvent l'augmenter ; ainsi, un très récent travail a montré, chez le rat *in vivo*, qu'inuline et FOS augmentaient la translocation hépato-splénique de salmonelles, peut-être à la faveur d'altérations de la barrière muqueuse induites dans l'intestin distal par les acides organiques issus de la fermentation des FOS ; le phosphate de calcium prévenait cet effet, peut-être en contrecarrant l'acidification excessive de la lumière intestinale (Ten Bruggencate *et al.*, 2004). Des travaux antérieurs avaient montré que des prébiotiques (galacto-oligosaccharides) associés à des bifidobactéries augmentaient, au contraire, la résistance de la souris à la translocation de salmonelles (Asahara *et al.*, 2001).

#### 4.3. Apoptose

*L. rhamnosus* GG a un effet anti-apoptotique aussi bien dans une lignée de cellules coliques de souris que dans la lignée colique humaine HT-29 : il active la protéine kinase B anti-apoptotique Akt et inhibe l'activation de la MAP-kinase pro-apoptotique p38 par diverses cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) (Yan & Polk, 2002). *S. boulardii* retarde, dans la lignée colique humaine T84, l'apoptose induite par *E. coli* entéropathogène (Czerucka *et al.*, 2000). Ces données sont potentiellement intéressantes, notamment pour ce qui est du traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin au cours desquelles la déficience de la barrière muqueuse implique au premier chef une production accrue de cytokines pro-inflammatoires et une augmentation marquée de l'apoptose des cellules intestinales.

#### 4.4 Trophicité, enzymes, synthèse protéique

Expérimentalement, *S. boulardii* (100 mg/j de lyophilisat) stimule fortement les activités sucrase et maltase du jéjunum de rat, effet trophique supposé être induit par la libération endoluminale de spermine et de spermidine par cette levure (Buts *et al.*, 1994). Ce probiotique stimule aussi l'activité aminopeptidase jéjunale et iléale du rat (Buts *et al.*, 2002) et *L. casei* DN-114 001 a un effet similaire sur cette protéase et sur la prolifération épithéliale chez la souris (Thoreux *et al.*, 1998). Dans l'iléon résiduel de rat entérectomisé recevant 1 mg/kg d'un lyophilisat de *S. boulardii* à  $10^9/100$  mg, la levure double l'expression du co-transporteur 1 sodium-glucose (Buts *et al.*, 1999). *L. casei* ( $10^7$  UFC/j) et *Clostridium butyricum* ( $10^7$  UFC/j) stimulent la prolifération épithéliale cryptique dans le jéjuno-iléon et surtout le côlon proximal et distal du rat, effet principalement attribué à la production d'AGCC (Ichikawa *et al.*, 1999). De même, *L. reuteri* R2LC et *L. plantarum* DSM 9843 augmentent la masse intestinale muqueuse au cours de l'entérocolite du rat induite par le méthotrexate (Mao *et al.*, 1996).

Chez l'homme volontaire sain, *S. boulardii* (250 mg x 4/j d'un lyophilisat à  $10^9/100$  mg) augmente les activités saccharase, lactase et maltase du jéjunum sans modifier la teneur en protéines (Buts *et al.*, 1986). Dans une autre étude sur le volontaire sain, ce même probiotique stimule l'activité lactase, glucosidase et phosphatase alcaline de la muqueuse duodénale (Jahn *et al.*, 1996).

### Points importants

- Plusieurs probiotiques ont chez l'animal un effet favorable, à l'instar de la flore commensale, sur la fonction barrière de l'intestin, augmentant la résistance transépithéliale et diminuant la perméabilité notamment aux macromolécules. Des effets comparables ont été observés *in vitro* sur des lignées cellulaires intestinales humaines ; aucune extrapolation à la situation *in vivo* n'est actuellement possible.
- Certains probiotiques diminuent chez l'animal la translocation intestinale de bactéries pathogènes. Aucune donnée positive de ce type n'est disponible chez l'homme : plusieurs travaux en période péri-opératoire n'ont constaté aucun effet protecteur des probiotiques testés sur des indices cliniques et bactériologiques de translocation.
- Quelques probiotiques expriment *in vitro* un effet anti-apoptotique, dans des lignées cellulaires animales et humaines. Aucune donnée de ce type n'est disponible en physiologie ni en clinique humaine, mais il s'agit d'un champ d'investigation intéressant, notamment pour ce qui est des affections (comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin) associées à une augmentation marquée de l'apoptose des cellules intestinales.
- Divers probiotiques expriment chez l'animal un effet inducteur d'activités enzymatiques intestinales. Quelques données comparables existent chez l'homme pour un petit nombre de probiotiques, mais demandent confirmation.

## X- Quelles perspectives d'application des futurs probiotiques génétiquement modifiés ?

---

Les progrès de la génétique ont récemment rendu possible l'insertion de gènes d'intérêt dans des probiotiques, notamment des bactéries lactiques. Les applications peuvent être d'améliorer les propriétés technologiques et/ou les effets physiologiques des souches. Les probiotiques peuvent dans ce cas véhiculer des activités biologiques nouvelles dans l'intestin (voire en assurer à ce niveau une synthèse et une libération régulières). Ceci suscite un intérêt des chercheurs mais l'acceptation du public et des autorités pour de tels produits dans l'avenir est encore incertaine.

Depuis les années 80, les Micro-organismes Génétiquement Modifiés (MGM) cultivés dans des conditions de confinement maîtrisées, sont utilisés en tant qu'organismes producteurs de molécules d'intérêt thérapeutique en médecine tel que des hormones (ex: insuline, hormone de croissance humaine) ou des vaccins (le vaccin de l'hépatite B fabriqué par la levure *Saccharomyces cerevisiae*) ainsi que dans le cadre de production d'enzymes, d'arômes et d'auxiliaires technologiques en alimentation humaine ou animale. Les MGM sont ainsi utilisés comme des micro-usines métaboliques, puis les substances produites sont purifiées et commercialisées. C'est le cas par exemple, de la chymosine, enzyme utilisée dans l'industrie fromagère, qui peut être produite par des souches génétiquement modifiées d'*Escherichia coli*, *Aspergillus Niger* et *Kluyveromyces lactis* ou encore d'amylases de *Bacillus* sp. utilisées dans la panification ou l'industrie brassicole. Les MGM pourraient aussi à l'avenir être incorporés directement lors de la fabrication de certains aliments. En effet, ces dix dernières années, un ensemble de travaux a permis d'accroître de façon importante les outils permettant d'obtenir des constructions génétiques dans les MGM.

### Points importants

- Aucun MGM n'est actuellement autorisé à la commercialisation pour être utilisé en tant que tel dans l'alimentation humaine.
- Différents MGM sont actuellement considérés, au moins par leurs « constructeurs », comme prêts à être utilisés en technologie alimentaire.

Parmi les projets les plus aboutis, on notera ceux concernant la bactérie lactique *Lactococcus lactis*, dont certaines souches ont été génétiquement manipulées pour permettre une accélération de l'affinage des fromages ou une meilleure résistance à certains virus qui lui sont spécifiques<sup>1</sup> (Forde & Fitzgerald, 1999). D'autres projets concernent la construction de levures génétiquement modifiées pour optimiser la fabrication du vin ou du pain.

Un nouveau domaine d'utilisation des MGM semble émerger : le MGM vivant qui pourrait remplacer le principe actif (médicament, enzyme, effet probiotique autre) et serait consommé par l'homme *via* des préparations alimentaires. Cette nouvelle approche permettrait potentiellement d'utiliser un MGM pour délivrer un médicament dans les parties basses du tractus digestif sans avoir recours à des formes galéniques plus sophistiquées.

Il est important de remarquer que les concepteurs de ces nouvelles souches de micro-organismes font une distinction entre MGM transgénique, c'est à dire porteur d'un ou plusieurs gènes ou structures génétiques issus d'un organisme différent de celui qui est modifié, et MGM non transgénique, construit par autoclonage (SAGE : Sans Addition de Gène Extérieur) et donc n'étant pas soumis à la même réglementation<sup>1</sup>. Toutefois, cette distinction n'est pertinente que lorsque le MGM est utilisé en milieu confiné : la directive 90/219/CEE exclut effectivement de son champ d'application les micro-organismes autoclonés. En revanche, lorsque le MGM a pour vocation d'être disséminé (ingestion directe

<sup>1</sup> <http://www.inra.fr/actualites/DOSSIERS/OGM/OGM.htm>

par le consommateur par exemple), il relève des mêmes dispositions communautaires, qu'il soit autocloné ou transgénique, dans la mesure où la directive 2001/18/CE ou le règlement 1829/2003 pour les applications alimentaires n'excluent pas l'autoclonage.

Un premier domaine concerne la vaccination orale, parentérale ou nasale. L'expression d'antigènes viraux ou tumoraux, d'anticorps neutralisants ou la production concomitante de différentes interleukines et d'antigènes semble moduler la réaction immunitaire de façon intéressante. Dans le cas d'allergies alimentaires, une désensibilisation orale à partir de MGM produisant un allergène modifié pourrait être envisagée.

Un deuxième domaine concerne la sécrétion dans le tractus digestif par le MGM ingéré d'enzymes ou de médiateurs pouvant jouer un rôle bénéfique (préventif ou curatif) sur la santé humaine. L'exemple le plus marquant, à l'heure actuelle, est celui de l'équipe de Steidler (2000) qui concerne la production d'interleukine 10 par *Lactococcus lactis* dans le tractus digestif. Il a été possible par ce procédé de réduire une inflammation digestive expérimentale. Forts des résultats animaux encourageants et après avoir mis au point un système de confinement de la souche, Steidler a débuté un essai clinique de cette souche recombinante chez des hommes atteints de maladie de Crohn aux Pays Bas (communication personnelle). D'autres probiotiques véhiculant d'autres molécules immunorégulatrices comme des peptides en trèfle ou la superoxyde dismutase sont aussi en développement (pour l'instant chez l'animal) (Steidler *et al.*, 2003 ; Vandebroucke *et al.*, 2004). Il a aussi été montré, sur modèle animal, que le relargage d'une lipase par un *L. lactis* pouvait améliorer la digestibilité des lipides chez des animaux à qui on a ligaturé le canal pancréatique pour provoquer une déficience en lipase (Drouault *et al.*, 2002). Toutes ces approches nécessitent une consommation de bactéries vivantes, certaines exprimant des protéines d'eucaryote. Des études bénéfice/risque doivent être mises en place.

Ces nouvelles perspectives liées aux avancées techniques considérables donneront inévitablement lieu à un débat entre les différents acteurs de la Société afin d'évaluer l'opportunité, si nécessaire, de l'adaptation de la réglementation. En l'état actuel de celle-ci, il existe deux domaines très distincts : celui du médicament et celui de l'aliment. Le règlement communautaire n° 1829/2003 du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, prévoit les modalités d'évaluation et de décision de mise sur le marché des aliments ou ingrédients alimentaires produits à partir d'organismes génétiquement modifiés pour animaux, en contenant ou consistant en de tels organismes. Par ailleurs un projet de règlement communautaire vise à compléter le dispositif réglementaire relatif aux allégations nutritionnelles et relatives à la santé.

# **XI- Lignes directrices permettant de justifier/valider les allégations relatives aux effets des pré- et probiotiques**

## **1. Pré-requis**

Autant que faire se peut, il est important de juger dans les études cliniques non seulement de l'efficacité mais de la tolérance des produits.

Il est rappelé que la réduction d'un facteur de risque de maladie constitue la limite acceptable des allégations pouvant être proposées pour un produit alimentaire.

## **2. Exigences communes à la méthodologie des études cliniques réalisées avec des prébiotiques et des probiotiques**

### **2.1 Conditions de réalisation de l'étude**

- L'étude doit être réalisée avec le produit pour lequel une allégation est revendiquée afin de prendre en compte et l'effet souche ou structure-dépendant et l'effet de la matrice alimentaire.

*De nombreux travaux cités dans notre analyse de la littérature montrent que les effets des probiotiques sont souvent (bien que non obligatoirement peut-être) dépendants des souches, aussi est-il impossible d'extrapoler le résultat d'une souche à une autre. Certains des effets des prébiotiques sont dépendants de leur structure chimique et par exemple, mais non exclusivement, de leur degré de polymérisation.*

- Les doses du produit administrées doivent être identiques ou proches de celles qu'il est recommandé de consommer et les plus proches des conditions usuelles de consommation.

*Les effets, du moins pour certains, des probiotiques et des prébiotiques étant dépendants de leur dose, il est impossible d'extrapoler les résultats obtenus avec des doses différentes de celles utilisées dans les produits finaux*

- Les groupes testés doivent être identiques à la population visée par le produit

*L'idéal est de disposer d'études cliniques humaines sur la population devant finalement recevoir et/ou consommer le produit.*

### **2.2 Les caractéristiques des études**

- Les groupes testés doivent être définis *a priori*

*Les tests statistiques doivent être effectués sur une population définie a priori en début d'essai et non a posteriori en fin d'essai*

*Exemple : Ceci s'applique par exemple à la démonstration d'effets bifidogènes, seulement pour des sous-groupes de malades dont les bifidobactéries dans le côlon sont initialement basses. Une telle affirmation est recevable si un groupe de sujets ayant les bifidobactéries basses dans le côlon est divisé par tirage au sort en deux sous-groupes pour recevoir soit un prébiotique soit un placebo et s'il est alors montré que le prébiotique entraîne une augmentation plus importante des bifidobactéries que le placebo. Par contre, cette affirmation ne serait pas recevable s'il était montré seulement dans un groupe défini rétrospectivement de sujets à bifidobactéries à concentrations faibles dans le côlon, une augmentation de ces bactéries après ingestion d'un prébiotique. Il s'agit-là d'une remarque méthodologique générale, valable dans toutes les études, qu'elles soient médicamenteuses ou alimentaires.*

- Essais randomisés (tirage au sort des sujets incorporés dans l'étude)
- Double-aveugle
- Pertinence des groupes contrôles
- Pertinence des placebos choisis

*Dans ce domaine, la matrice, le rythme d'ingestion et notamment avec ou sans alimentation annexe (repas), voire l'horaire d'absorption, méritent d'être regardés, dans certains cas, avec attention. Il doit en tout cas ne pas s'agir d'un placebo<sup>2</sup>.*

### 2.3 Exploitation des résultats

- Les résultats doivent être statistiquement significatifs
- L'interprétation des résultats doit être rigoureuse et non excessive (pas d'extrapolation d'un effet sur une fonction à un effet santé)

### 2.4 Exigences impératives

- Le pétitionnaire devra présenter au moins une étude clinique réalisée et interprétée selon les méthodes faisant l'objet d'un consensus scientifique

*Il est évident qu'au minimum une étude bien conduite et indiscutable est nécessaire. Des expériences réalisées sur des effectifs plus petits dans des conditions non randomisées ou réalisées chez l'animal ou réalisées sur des modèles in vitro peuvent apporter des informations complémentaires. La pertinence de chacun de ces modèles qui ne peut être discutée ici doit être analysée dans le détail avant de faire l'étude.*

- Si plusieurs études ont été réalisées sur les produits, l'ensemble de ces études et de leurs résultats doit être présenté par le pétitionnaire

## **3. Exigences spécifiques aux probiotiques : comment démontrer qu'un micro-organisme est un probiotique ?**

L'appellation probiotique ne peut être attribuée à un micro-organisme qu'après démonstration d'un effet bénéfique sur la physiologie de l'hôte (fonctions) ou sur la santé de l'hôte. Le micro-organisme doit être vivant dans le produit, selon la définition de probiotiques et parce qu'on peut ainsi s'assurer de sa présence effective et de sa stabilité en fin de DLC dans le produit. Cette remarque n'exclut pas que certains micro-organismes morts puissent avoir des effets positifs (cf. chapitre II). La viabilité du probiotique en fin de transit digestif est un critère intéressant mais non indispensable.

## **4. Exigences spécifiques aux prébiotiques : comment démontrer qu'une substance est prébiotique ?**

La démonstration d'un effet bifidogène impose une mesure valide des bifidobactéries et un test statistique adapté (cf. chapitre VI). Beaucoup de produits prébiotiques consistent en des mélanges de composés chimiques différents, aussi est-il impossible d'extrapoler le résultat d'études cliniques réalisées avec un prébiotique à un autre afin d'obtenir des allégations. La démonstration de l'effet bifidogène ne pourra reposer sur l'utilisation des index prébiotiques, basés sur la notion de « bonne » et « mauvaise » flores.

## **5. Conclusion**

Il est impossible de valider des demandes d'allégations relatives à des effets si les éléments de preuve s'écartent trop des lignes directrices présentées. Tout argumentaire reposant alors sur une démarche d'extrapolation de résultats obtenus notamment avec des présentations différentes du produit, des doses différentes, des populations cibles différentes ou des modèles cellulaires ou animaux différents n'est pas recevable.

Les dossiers comportant des allégations basées uniquement sur des modèles *in vitro* ou animaux ne peuvent atteindre le niveau de preuve suffisant pour obtenir une allégation relative à des produits destinés à l'alimentation humaine.

---

<sup>2</sup> Sensation désagréable ressentie par un sujet qui a absorbé une préparation pharmaceutique inerte, dépourvue de tout principe actif, ou contenant un médicament qui ne peut, théoriquement, produire une telle impression. Un facteur psychique joue un rôle essentiel dans cet effet. *In* Dictionnaire des termes de médecine. Garnier & Delamare, édition Maloine, 27<sup>ème</sup> édition.

Les prébiotiques ont été définis comme des « ingrédients alimentaires non digestibles qui stimulent de manière sélective au niveau du côlon la multiplication ou l'activité d'un ou d'un nombre limité de groupes bactériens susceptibles d'améliorer la physiologie de l'hôte »<sup>3</sup>. Les probiotiques sont définis comme des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte »<sup>4</sup>.

La flore intestinale est constituée d'un ensemble de groupes taxonomiques communs aux sujets adultes (*Eubacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*...) mais le profil d'espèces microbiennes colonisant le tube digestif est propre à chaque individu. De ce fait, il n'est pas possible de définir à ce jour un ensemble d'espèces microbiennes marqueur de la flore normale. Dans la mesure où des groupes taxonomiques incluant par ailleurs des espèces pathogènes font communément partie de la microflore fécale dominante de sujets sains, le concept dichotomique opposant « bonnes » et « mauvaises bactéries » n'est pas pertinent. Ainsi, le concept de bon profil de flore n'est pas pertinent. Cependant, préserver, voire renforcer l'homéostasie intestinale, serait bénéfique.

On ne peut extrapoler les effets démontrés pour les produits contenant des microorganismes vivants (probiotiques) à d'autres produits contenant des microorganismes tués. En effet, même si quelques études ont montré que certains effets physiologiques sont dus à l'ADN de probiotiques et aux métabolites issus de préparations bactériennes, d'autres ont montré que les effets n'étaient observés qu'en présence de préparations microbiennes vivantes (ce qui correspond à la stricte définition des probiotiques).

La survie dans le tractus digestif de souches ingérées n'implique pas forcément l'existence d'effets bénéfiques. En outre, la non-survie n'implique pas nécessairement l'absence d'effets bénéfiques. La survie du probiotique, de son ingestion jusqu'au site d'action, semble intéressante pour beaucoup de chercheurs. Elle dépend essentiellement de la dose du produit ingérée mais aussi de la souche, des facteurs liés à l'hôte et de l'aliment vecteur. La très grande majorité des probiotiques ne colonise pas durablement le tube digestif : leur effet est donc transitoire.

Les effets des prébiotiques et probiotiques sont respectivement spécifiques à leur structure et à l'espèce considérée. Ainsi, la justification d'effets communs à deux souches ou deux molécules devra faire l'objet d'une démonstration par des études réalisées avec chaque souche ou molécule étudiées.

L'effet bifidogène d'un prébiotique est actuellement caractérisé par une augmentation du niveau de population de bifidobactéries au sein de la flore colique et/ou fécale. La démonstration de cette croissance doit faire l'objet d'études cliniques basées sur une méthodologie et des méthodes de dénombrement correctes. Plus généralement, l'utilisation d'indices prébiotiques, basés sur le concept de bonnes bactéries, n'est pas acceptable. La démonstration d'un effet bifidogène est insuffisante pour revendiquer un effet sur la santé. Malgré leur intérêt, les études *in vitro* de modulation de l'immunité innée et de l'immunité spécifique par les probiotiques ne permettent pas de refléter la complexité des phénomènes tels qu'ils ont lieu *in vivo* chez l'homme. Une augmentation des IgA anti-pathogènes viraux et bactériens a été rapportée au niveau de la muqueuse intestinale humaine suite à la consommation de probiotiques. La corrélation entre cet effet et la prévention des infections reste controversée. Contrairement à ce qui a été montré chez l'enfant, aucun travail ne permet de démontrer un effet significatif d'un probiotique ou d'un prébiotique sur des

---

<sup>3</sup> (Gibson & Roberfroid, 1995 ; Schrezenmeir & De Vrese, 2001).

<sup>4</sup> Codex alimentarius, 2001.

affections de nature allergique chez l'adulte. Par leurs effets anti-inflammatoires, certains probiotiques pourraient agir sur la prévention d'apparition ou de rechutes de poches. En dehors de ces cas pathologiques, les conséquences cliniques des effets immunomodulateurs sur la santé ne sont pas connues.

Des travaux ont montré que la consommation de certains probiotiques module le transit oro-anal ou le transit colique chez l'homme ; en outre, un effet bénéfique de certaines souches sur la digestion-absorption du lactose a été observé chez l'homme hypolactasique. D'autres études cliniques sont nécessaires pour confirmer le rôle des prébiotiques sur la stimulation de l'absorption du calcium et du magnésium et l'effet modulateur de probiotiques sur certaines activités enzymatiques intestinales ( $\beta$ -glucosidases et  $\beta$ -glucuronidases). Ouvrant un champ d'investigation chez l'homme, les études menées in vitro ou chez l'animal montrent que les probiotiques peuvent exercer un effet modulateur sur la quantité et la répartition des mucines, un effet favorable sur la fonction barrière de l'intestin, un effet anti-apoptotique (domaine de recherche intéressant pour certaines affections comme les maladies inflammatoires du tube digestif).

Les microorganismes génétiquement modifiés (MGM) sont utilisés pour produire des molécules d'intérêt thérapeutique, comme l'insuline ou d'intérêt technologique (enzymes) dans l'industrie agroalimentaire. Bien qu'ils fassent l'objet de nombreuses recherches, aucun MGM n'est actuellement autorisé pour être utilisé en tant que tel dans l'alimentation humaine.

Le rapport insiste sur l'importance des études cliniques (incluant une méthodologie statistique appropriée) pour démontrer les effets des prébiotiques et des probiotiques et fixe des règles à suivre en terme de méthodologie et d'exploitation des résultats des études cliniques.



**Acides gras à chaînes courtes (AGCC)** : Composés regroupant principalement l'acétate, le propionate et le butyrate, produits de la fermentation des glucides par la flore.

**Allergie** : Réponse immunitaire déviée vis à vis d'un antigène alimentaire ou respiratoire (allergène) responsable de la production anormale d'IgE spécifiques et conduisant à une réaction inflammatoire locale ou systémique liée à la dégranulation de mastocytes ayant fixé ces IgE, en réponse à un nouveau contact avec l'allergène.

**Bifidogène** : Se dit d'un produit entraînant une augmentation significative des populations et/ou des fonctions des bifidobactéries. On en reste habituellement en pratique à une augmentation du niveau de population de bifidobactéries au sein de la flore fécale.

**Bifidobactéries, *Bifidobacterium*** : Bactéries appartenant au genre *Bifidobacterium*. Ce sont des bactéries anaérobies présentes dans la flore dominante du nourrisson et inconstamment dans la flore dominante de l'adulte.

**Cytokine** : Du grec kutos, cellule, et kinéo, stimuler, ce mot récent désigne des peptides ou protéines non anticorps sécrétés par les cellules du système immunitaire essentiellement mais aussi par d'autres cellules (épithéliales, endothéliales, mésenchymateuses) qui agissent comme des messagers ou médiateurs intercellulaires et ont une activité modulatrice sur le système immunitaire. Elles agissent généralement localement de manière paracrine ou autocrine plutôt qu'endocrine. Elles interviennent dans l'infection, l'inflammation, l'immunité, la croissance des cellules.

**DLC** : Date Limite de Consommation

**Dominante** (flore dominante) : Se dit des bactéries les plus représentées dans la flore d'un écosystème. Dans le côlon (ou les selles) on retient par définition des concentrations supérieures ou égales à  $10^8 \cdot g^{-1}$  de selles ou supérieures à 1% de la flore totale.

**FOS** (Fructo-oligosaccharides) ou **oligofructosides** : Chaînes de fructose terminées (ou pas systématiquement, dans le cas des oligofructosides dérivés de l'inuline) par une unité glucose. En anglais : Fructo-oligosaccharides et oligofructose.

**Immunité adaptative** : Réponse immunitaire spécifique d'un antigène exogène donné, faisant intervenir les lymphocytes B producteurs d'anticorps, les lymphocytes T qui participent à la différenciation des lymphocytes B et détruisent les cellules abritant des germes à l'aide de molécules solubles. Un avantage déterminant de l'immunité adaptative est l'établissement d'une mémoire immunitaire, permettant de développer des réponses plus intenses et plus précises vis à vis des agresseurs microbiens lorsque les contacts se répètent, réduisant morbidité et mortalité.

**Immunité innée** : Ensemble de réponses très rapides du système immunitaire visant à contrecarrer une infection (bactérie pathogène, virus, parasite). L'immunité innée n'est pas spécifique d'un antigène bactérien ou viral, ne fait pas intervenir d'anticorps, mais la reconnaissance d'éléments membranaires des microorganismes invasifs (LPS, acides lipoteichoïques) conduisent à l'activation des macrophages ou des lymphocytes natural killer (NK).

**Lactobacilles** : genre bactérien comprenant plusieurs espèces telles que *L. acidophilus*, *johnsonii*, *casei*, *rhamnosus*, *bulgaricus*.

**NOS** : oligosaccharides non digestibles (ex : les FOS).

**PBMC** (Peripheral Blood Mononuclear Cell) : cellule mononucléaire du sang périphérique.

**Prébiotique** : Les prébiotiques ont été définis comme des « ingrédients alimentaires non digestibles qui stimulent de manière sélective au niveau du côlon la multiplication ou l'activité d'un ou d'un nombre limité de groupes bactériens susceptibles d'améliorer la physiologie de l'hôte » (Gibson 1995 ; Schrezenmeir 2001).

Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota : introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125, 1401-12 + Schrezenmeir, J., & de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 73 (2 Suppl), 361s-364s.

**Probiotique** : La *Food and Agriculture Organization* des Nations Unies et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ont établi des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotiques » dans les aliments et formulé la définition : « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte » (document CX/NFSDU 02/2, juillet 2002).

Une **souche bactérienne** est l'ensemble des micro-organismes issus d'une seule cellule (isolée). La souche est conservée en collection. Un ensemble des souches considérées comme étant *semblables* définit une espèce bactérienne.

Les critères de *similitude* s'appuient sur des paramètres choisis par l'expérimentateur, ce qui conduit à des redéfinitions occasionnelles lorsque des critères plus pertinents (c'est à dire plus discriminants) sont identifiés. L'accès à une information mesurable sur les génomes a conduit à définir une valeur seuil de *similarité globale entre deux génomes* pour que les souches correspondantes appartiennent à la même espèce. On considère ainsi que des souches dont les génomes ont moins de 70% de similarité appartiennent à des espèces différentes. A cette valeur correspond une similarité de séquences des gènes codant pour les ARN des ribosomes d'environ 98%.

Un genre bactérien correspond à une entité bien définissable, clairement séparée des autres genres. La définition complète des genres est donnée dans le *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Il n'y a cependant pas de consensus total sur cette définition du genre et là encore des redéfinitions sont occasionnellement proposées. Par analogie aux critères génétiques ci-dessus, les espèces d'un même genre ont des génomes dont le degré de similarité va de 30 à 70%. Pour la classification, une espèce type fait référence pour chaque genre bactérien. Par convention, le nom d'espèce s'écrit en minuscules toujours associé au nom de genre correspondant portant une majuscule. Ces noms latins s'écrivent en italiques et le nom de genre peut être abrégé par la majuscule initiale. Ainsi, par exemple, dans l'appellation *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides* est le nom de genre et *fragilis* le nom d'espèce. *B. fragilis* est l'espèce type du genre *Bacteroides*. Des propriétés pathologiques ou au contraire des effets santé sont attribuables à une souche et l'extension à l'espèce doit être considérée comme hasardeuse.

**Symbiotique** : Un symbiotique est défini comme un produit qui contient à la fois un (des) probiotique(s) et un (des) prébiotique(s).

**Tolérance orale** : La tolérance orale est le développement de réponses immunitaires de type "suppressif" ou « anergique », empêchant l'induction, aux niveaux intestinal et systémique, de réponses immunes spécifiques des protéines alimentaires et des bactéries résidentes. Cette importante fonction empêche ainsi le développement des allergies alimentaires, et les réactions inflammatoires du tube digestif vis à vis de la microflore résidente, comme dans la maladie de Crohn.

**Ufc** : Unité formant colonie (unité de mesure des bactéries par culture).

## **Effects of probiotics and prebiotics on flora and immunity in adults**

---

**February 2005**

# Contents

---

<b>Introduction</b> .....	<b>63</b>
<b>I- Is it possible to define a good flora profile?</b> .....	<b>64</b>
1. Introduction.....	64
2. Qualitative assessment of flora by comparative analysis of bacterial gene sequences .....	65
3. Determination of the composition of the flora by testing for molecular signatures .....	67
4. Normal intestinal microflora in healthy humans: myth or reality?.....	67
5. Disease and intestinal microflora imbalances .....	68
5.1 Modifications in the saprophytic microflora in the bowel in the course of infectious diarrhoea.....	68
5.2 Modifications in the endogenous microflora in the bowel in the course of cryptogenic (and chronic) inflammatory bowel diseases .....	69
<b>II- What is the value of products containing live microorganisms in comparison with products containing dead microorganisms?</b> .....	<b>70</b>
1. Introduction.....	70
2. Lactose intolerance and bacteria in live or dead yoghurt .....	70
3. Ecological effects of fermented products no longer containing live bacteria.....	70
4. Immune effects .....	71
<b>III-Survival of dietary probiotics and intestinal transit in humans</b> .....	<b>73</b>
1. Introduction.....	73
2. Bifidobacteria.....	73
3. Lactobacilli.....	73
4. Other bacteria.....	75
4.1 Yoghurt bacteria: <i>Streptococcus thermophilus</i> and <i>Lactobacillus bulgaricus</i> .....	75
4.2 <i>Lactococcus lactis</i> .....	75
4.3 Propionibacteria .....	76
4.4 <i>Enterococcus faecium</i> .....	76
<b>IV- Are the effects of probiotics specific to the strain, species or genus?</b> .....	<b>77</b>
1. Introduction.....	77
2. Evidence of “pharmacological specificities or effects” .....	77
2.1 Between microbial genera and species .....	77
2.2 Between strains within the same species .....	78
<b>V- Are the effects of prebiotics structure-dependent?</b> .....	<b>79</b>
1. Introduction.....	79
2. Biochemical disparity of prebiotics .....	80
3. Biochemical structure of prebiotics and effects on flora .....	80
<b>VI- How can the existence of a bifidogenic effect be demonstrated</b> .....	<b>82</b>
1. Introduction.....	82
2. Experimental models <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .....	82
3. Protocol of studies in humans.....	82
4. Count method and expression of results.....	84
5. Intensity and specificity.....	85
<b>VII- Effect of probiotics on intestinal flora</b> .....	<b>87</b>
1. Introduction.....	87
2. Review and criticism of a few of the most significant studies .....	87
3. Recommendations for the study protocol.....	88

<b>VIII-Effect of pre- and probiotics on the immune system.....</b>	<b>89</b>
1. Introduction.....	89
2. Effect of probiotics on innate immunity .....	89
2.1 Stimulation of innate immunity in humans (or in human cell lines).....	89
2.2 Stimulation of innate immunity in mice, rats or animal macrophage lines.....	91
3. Effect on adaptive immunity .....	91
3.1 Mucosal immunity: secretory IgA.....	91
3.2. Oral tolerance .....	92
3.3 Allergy .....	92
4. Anti-inflammatory effect of lactic bacteria and/or their secretion products.....	93
<b>IX- Effect of pre- and probiotics on intestinal functions.....</b>	<b>95</b>
1. Introduction.....	95
2. Digestion- intestinal absorption.....	95
2.1 Digestion of disaccharides .....	95
2.2 Glucose absorption .....	96
2.3 Fluid and mineral absorption.....	96
2.4. Absorption of proteins and nitrogen.....	97
3. Intestinal motricity and intra-luminal transit .....	97
3.1 Probiotics .....	97
3.2 Prebiotics .....	98
4. Functional epithelial barrier (non-immunological).....	98
4.1. Epithelial cell and "bacteria-epithelium" interactions; intestinal mucus .....	98
4.2 Intestinal permeability, bacterial translocation .....	99
4.3. Apoptosis .....	101
4.4 Trophicity, enzymes, protein synthesis.....	101
<b>X- What are the prospects for future application of genetically-modified probiotics? .....</b>	<b>102</b>
<b>XI- Guidelines for justification/validation of claims relative to the effects of pre- and probiotics.....</b>	<b>104</b>
1. Pre-requisites .....	104
2. Common requirements for the methodology of clinical trials conducted with prebiotics and probiotics.....	104
2.1 Study implementation conditions .....	104
2.2 Study characteristics.....	104
2.3 Analysis of results .....	105
2.4 Essential requirements .....	105
3. Specific requirements for probiotics: how does one demonstrate that a microorganism is a probiotic? .....	105
4. Specific requirements for prebiotics: how does one demonstrate that a microorganism is a prebiotic?.....	105
5. Conclusion.....	105
<b>Synthesis.....</b>	<b>107</b>
<b>Glossary .....</b>	<b>109</b>
<b>Bibliographic references.....</b>	<b>111</b>



## Introduction

---

Dairy products fermented with lactic bacteria, such as Bifidus, sugar fortified with FOS (fructooligosaccharides) or inulin, or food supplements containing bacteria have been emerging on the food market for more than 10 years. Beneficial effects, such as ensuring the correct balance or good working order of the intestinal flora, regulation of the intestinal immune system or reinforcement of the intestinal barrier, are claimed for each of these products.

In this context linking food and health, probiotics -live microorganisms which when consumed in adequate amount confer a health benefit on the host- and prebiotics -a non-digestible food ingredient that beneficially affects the host by selectively stimulating the growth and/or the activity of one or a limited number of bacterial species already resident in the colon, and thus attempt to improve host health- have been the subject of numerous scientific publications, aimed at demonstrating that these compounds have both gastrointestinal and systemic effects. In parallel, the industry is exploiting these results and promoting its products by making claims suggesting that eating these foods will be beneficial to health.

Experts from Afssa's "Human nutrition" specialist expert committee are increasingly being approached to evaluate the veracity of claims relating to foods containing prebiotics or probiotics. To supplement its report published in November 2003, which aimed to propose guidelines for the assessment of infant and follow-on preparations containing prebiotics and/or probiotics designed to modify the intestinal flora, Afssa has set up a new expert group to assess the effects of prebiotics and probiotics on flora and immunity in adults.

Thus, the group is reviewing the composition and evolution of human flora, questioning the validity of the concept of good and bad flora. It is also considering the factors which could affect the properties of bacterial strains, such as their survival during transit through the gut, their live nature or otherwise, and demonstration of strain-dependent effects of probiotics or structure-dependent effects of prebiotics.

The group is studying the results of publications in order to define appropriate methodological criteria for characterising the bifidogenic effect of a microbial strain or a prebiotic. This part is supplemented by a critical analysis of methodological tools and interpretation of the results of a few studies having demonstrated certain effects for probiotics.

The experts also relativise the effects of prebiotics and probiotics on immunity and intestinal functions (digestion, absorption, motricity and barrier effect) of the host in terms of the models used to demonstrate these effects. The current and future applications of GMMs (genetically-modified microorganisms) are also outlined through the scientific and regulatory context of these specific probiotics.

The report ends with draft guidelines that could be used to justify or validate claims relative to the effects of products containing prebiotics and/or probiotics.

# I- Is it possible to define a good flora profile?

---

## 1. Introduction

The purpose of probiotics and prebiotics is sometimes to obtain a “good flora profile in the gut”. The question is therefore whether such a profile can be (easily?) defined or if “poor flora profiles”, possibly associated with diseases, can be recognised.

The gastrointestinal tract, which is sterile *in utero*, is quickly colonised after birth. The various digestive compartments offer a set of ecological niches, each offering a favourable environment for colonisation by bacteria which reach them at birth and in the days that follow. The mature gastrointestinal tract hosts 100,000 billion bacteria. Although it has been observed that the first to arrive are not necessarily the first to colonise, the key factors determining the composition of the intestinal microflora in adults have not been definitively identified. The gastrointestinal tract changes a great deal from a physiological and physicochemical point of view during the first few months of life. Immunity is built progressively to take over from the non-specific protection initially provided by breast milk. It is conceivable that interactions between microorganisms are involved, with the first colonising facultative anaerobes preparing the ecosystem for the strict anaerobes which are subsequently to predominate, for example. Some colonising microorganisms also exert a regulatory effect, by combating colonisation by other microorganisms. The host plays a role and one can imagine a dialogue between the intestinal epithelium and the microflora. Gordon *et al.* recently triggered a resurgence in interest in these interactions between host and flora, emphasising, in the context of a simple animal model, the importance of the genetic cross regulations that may be created. Although this type of dialogue exists, the corresponding molecular signals are still poorly understood at present. Irrespective of the mechanisms governing the formation of the microflora after birth, the result is an endosymbiotic microbial complex which appears to stabilise functionally and structurally at around two years of age (Mackie *et al.*, 1997).

More studies have been conducted on the faecal microflora, and more is known about this than flora from other gastrointestinal niches and compartments. However, this only represents the luminal microflora from the distal parts of the colon and differs from the luminal microflora of the proximal colon (Marteau *et al.*, 2001) along with the microflora associated with the intestinal mucosa (Zoetendal *et al.*, 2002; Lepage personal communication). A few studies based on bacterial cultures have shown that the dominant genera in the faecal microflora which can be cultivated from adults are *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium* and *Bifidobacterium* (Moore *et al.*, 1974, Finegold *et al.*, 1983). However, since 70 to 80% of the faecal microbial biomass cannot be cultivated (Langendijk *et al.*, 1995; Suau *et al.*, 1999), recent data is derived from methods independent of *in vitro* culture (Blaut *et al.*, 2002; Suau *et al.*, 2003).

Some recently acquired knowledge is essential for discussion of the relevance of the concept of normal intestinal microflora in humans. The dominant bacteria are considered to be those representing 1% or more of the total bacteria. Thus, for a total faecal microflora of  $10^{10}$  to  $10^{11}$  bacteria per gram, the dominant flora will represent the bacteria present at population levels of  $10^8$  and over (Ducluzeau *et al.*, 1988). It is these bacteria which play the most significant role in the functions of the intestinal ecosystem. Furthermore, most molecular methods are specific in population ranges corresponding to this dominant flora.



## 2. Qualitative assessment of flora by comparative analysis of bacterial gene sequences

The pioneering work by Wilson *et al.* (1996) and Suau *et al.* (1999) led to the first exhaustive descriptions of dominant microbial species in human faecal microflora on a purely molecular basis. The approach developed in these studies was determination of the composition of the flora by sequence analysis. The molecular marker selected was the cloned 16S ribosomal DNA sequence, this being recognised as an ideal semantide (biopolymer marking evolution) (Woese *et al.*, 1992). These studies underline the complexity of the flora (wide diversity of species which can be extrapolated to around a hundred different bacterial species per human faecal microflora) and the importance of the non-cultivated component, with 75% of species identified not having representatives in current microorganism collections. Using a quick method to compare the diversity of dominant species, Zoetendal *et al.* (1998) and Sutren *et al.* (2000) had observed that the diversity of species in the dominant succession of bacteria present in the gut was specific to the individual. Recent new information obtained based on the composition of the flora by sequence analysis entirely concurs with this, indicating that the number of species common to several individuals is very low or nil: Mangin *et al.* (2004), comparing the flora of 4 healthy subjects, identify only one common species; in a personal communication, Saunier, studying the faecal flora of 10 elderly subjects, identifies only one common species. Furthermore, the diversity of species of dominant faecal microflora appears to be very stable over time for a given individual, lasting for several months or even years (Zoetendal *et al.*, 1998; Seksik *et al.*, 2003; Vanhoutte *et al.*, 2004). This reflects the capacity of the dominant microflora at steady state to resist modifications under the pressure of endogenous or exogenous factors. However, the sub-dominant microflora is much less stable from a qualitative point of view and is subject to a constantly changing succession of species (Vanhoutte *et al.*, 2004, Rochet personal communication). These data, which come from observation of a relatively small number of individuals, are consolidated by a three-month study of the stability of the flora of more than 20 young adults (Saunier et Lay, personal communication). Nevertheless, they do not exclude potential species changes, as has been observed within the *Bacteroides* genus using monoclonal antibodies (Corthier *et al.*, 1996). Very few studies using molecular tools have looked at the capacity of the flora to retain its steady state after a major disruption, triggered by antibiotic treatment for example. One study conducted on mice with human flora revealed a return to the initial composition within a few days following discontinuation of the antibiotic (Barc *et al.*, 2004). In humans, a recent study also indicates a gradual return over two months to a diversity of species very similar to the initial flora in 6 healthy individuals after administration of amoxicillin (de la Cochetière *et al.*, 2004).

Finally, analysis of the flora of elderly subjects revealed an increase in complexity and led to the demonstration of dominant and highly prevalent phylogenetic groups never observed in young adults (Saunier et al. personal communication). Figure 1 illustrates the phylogenetic diversity of the microbial groups encountered in human intestinal flora on the basis of a comparative analysis of 16S rDNA sequences.

### Important points

- By definition, the dominant bacteria represent at least 1% of the total bacteria.
- The following are observed:
  - A flora profile specific to each individual
  - A stability of the dominant flora and a relative instability of the sub-dominant flora
  - An increase in the complexity of the flora with age

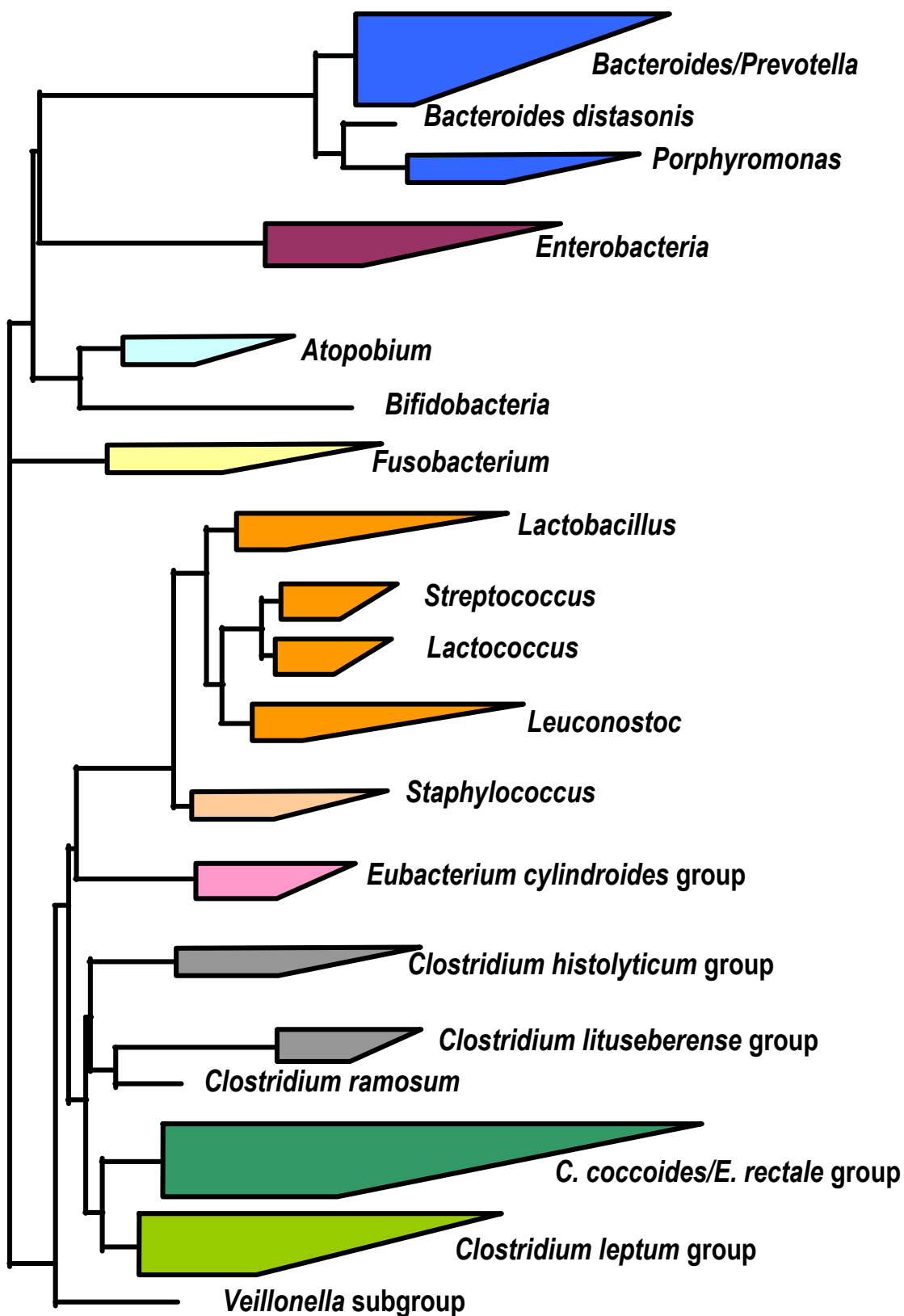


Figure 1: Phylogenetic tree presenting the main bacterial groups represented in the dominant faecal microflora in healthy adults (as per Blaut et al., 2002)

### 3. Determination of the composition of the flora by testing for molecular signatures

The known 16S rDNA sequences contain molecular signatures for the main bacterial groups. This enables the development of molecular tools for direct and quantitative testing for these signatures in the dominant human faecal microflora. It has been shown that the latter is composed of a few main phylogenetic groups. Consequently, three groups contain most of the dominant faecal bacteria. The “*Eubacterium rectale* - *Clostridium coccooides*” group is always represented and often the most abundant [14 to 31% of total bacteria, on average, depending on the studies; Franks *et al.*, 1998; Jansen *et al.*, 1999; Sghir *et al.*, 2000; Rigottier-Gois *et al.*, 2003; Seksik *et al.*, 2003]. It includes bacterial species belonging to the *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio* genera. The “*Clostridium leptum*” group which is phylogenetically similar and in particular includes the *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus albus* and *R. flavefaciens* species is also very often dominant [16 to 22% on average; Sghir *et al.*, 2000, Lay *et al.* personal communication]. *Bacteroides* and related microorganisms (*Bacteroides*, *Prevotella* and *Porphyromonas* genera) are always present and share dominance with the previous groups [9 to 42% of total bacteria on average, depending on the studies]. Less systematically detected as dominant but representing on average a few percent of total bacteria, bifidobacteria [0.7 to 10%] and bacteria from the *Collinsella-Atopobium* group [0.3 to 3.7% on average; Harmsen *et al.*, 2000; Rigottier-Gois *et al.*, 2003] are found. Enterobacteria are more rarely observed in the dominant faecal microflora [on average 0.4 to 1%], along with lactobacilli and streptococci [2% according to Lay *et al.*, personal communication]. Species related to *Clostridium ramosum*, *Eubacterium cylindroides*, *Phascolarctobacterium*, *Verrucomicrobium* or *Sporomusa-Selenomonas-Veillonella* are also found but only in exceptional cases.

While the intestinal microflora stabilises relatively early on in life, it is currently accepted, although it has not yet been very clearly demonstrated, that the composition of the flora is modified in the elderly (Mitsuoka, 1992) with:

- 1) a marked reduction in bifidobacteria, which become sub-dominant,
- 2) an increase in enterobacteria and lactic bacteria, which become dominant, along with
- 3) an increase in clostridia. These observations are currently being supplemented by the European CROWNALIFE study, demonstrating that differences exist from one country to another between elderly subjects in France (n=26), Germany (n=37), Italy (n=39) and Sweden (n=39), but especially confirming an evolution with age in comparison with the flora of young adults (n=20 per country), in particular revealing an increase in enterobacteria and lactobacilli for certain countries, but no significant reduction in bifidobacteria. These studies also reveal differences in the relative proportions of highly dominant groups (*Bacteroides* and *C.coccooides* groups higher in Germany, *Bacteroides* and *C.leptum* groups lower in Italy).

### 4. Normal intestinal microflora in healthy humans: myth or reality?

Recently accumulated information has significantly modified our view of the intestinal microbial ecosystem in humans. Thus, compositional analysis leads to the expectation that the “*Eubacterium rectale* - *Clostridium coccooides*” and “*Clostridium leptum*” groups will predominate, along with the “*Bacteroides* and related” group, but in proportions which are highly variable from one individual to another. It is not yet possible to define a set of microbial species as a marker of normal flora. The current view of the human intestinal microflora is completely challenging the dichotomic concept of “good” and “bad” bacteria (cited in Mitsuoka, 1992), at least as far as the strict composition of microflora in healthy subjects is concerned. Thus the first “defendants”, such as *Clostridium*, are commonly part of the dominant faecal microflora (even a toxinogenic *Clostridium difficile* is not pathogenic as long as the balanced autochthonous flora maintains this population at a sub-dominant level), in the same way as enterobacteria are very often present at levels close to the detection limit in adults and strongly dominant in newborns.

Beyond the quest for “normality” in the composition of the dominant intestinal microflora, it is still relevant to question whether a “normal microflora” can be defined functionally.

#### Important points

- The diversity of strains in the dominant microbial succession in the gut is specific to the individual and the number of species common to several individuals is very small (or nil).
- The dominant faecal microflora appears to be very stable over time for a given individual, from a qualitative point of view, for a period of 2 months to 2 years.
- The major taxonomic or phylogenetic groups are the same in adult subjects, although they are represented in proportions which vary from one individual to another.
- It is not possible to define the intestinal microflora of humans by means of a profile of dominant species, but it nonetheless includes a limited set of recurrent phylogenetic groups. More than an “ideal” composition, free of what are readily considered to be “bad” bacteria, or, conversely, rich in “good” bacteria, it appears that the “normal microflora” should be seen more as a consortium adapted to its host and not only naturally stable but also resistant to change. Any factor promoting the maintenance of this balance or its resistance to change in healthy subjects could therefore be considered to be beneficial.

### 5. Disease and intestinal microflora imbalances

Few studies are available concerning intestinal flora in the event of disease. The few that are available have mainly been conducted during the course of infectious diarrhoea or chronic inflammatory bowel diseases. These conditions have also been the subject of interventional studies using probiotics and prebiotics.

#### 5.1 Modifications in the saprophytic microflora in the bowel in the course of infectious diarrhoea

Infections are the leading cause of acute diarrhoea. In France, there is a marked peak in winter and a second less marked one in summer. The causes are usually viral in winter and bacterial in summer. The causes of colitis are often bacterial: *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* and *Klebsiella oxytoca*.

Few studies have looked at changes in the saprophytic microflora in infectious diarrhoea. Usually, instability of the flora is observed, along with an increase in aerobic bacteria and a decrease in anaerobes. For example, in patients suffering from cholera, it has been observed that *Vibrio cholerae* concentrations could reach  $3 \cdot 10^7$  CFU/mL, whereas *Bacteroides* levels fell to  $10^5$  CFU/mL. The rapid re-establishment of a normal microflora has been observed after recovery (Gorbach *et al.*, 1970). Gorbach studied the faecal microflora of 17 Indian adults in the course of diarrhoea and during the recovery period (Gorbach *et al.*, 1971). In the course of diarrhoea, 8 subjects presented a microflora composed of *Escherichia coli*, while the others presented a varied microflora combining: *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter cloacae* and *Alcaligenes faecalis*. In the first group, the *E. coli* concentration during diarrhoea was 100 to 1000 times higher than that of the other aerobic bacteria and anaerobes. This was due to a combination of effects: an increase in aerobic bacteria and a decrease in anaerobic bacteria. During the recovery period, the coliform level fell, several species appeared and the *Bacteroides*, *Lactobacillus* and *Clostridium* levels increased significantly. In the second group, the *E. coli* levels in the stools were not increased during the acute phase, although the *Bacteroides*, *Clostridium* and micro-aerophilic bacteria concentrations were reduced in comparison with the levels observed during the recovery period. Fujita *et al.* (1990) studied the faecal microflora of 14 children in Kenya with acute diarrhoea caused by various pathogens: *Shigella*, *Campylobacter*, enterotoxinogenic *Escherichia coli* and *rotavirus* (in 3 cases, the cause was not identified). The faecal microflora was studied at the time of diarrhoea and during the recovery period. In the diarrhoea phase, if pathogenic bacteria were not considered, the aerobic bacteria levels were the same during both observation periods. The level of

*Bacteroides* and *Bifidobacterium* anaerobic bacteria was significantly lower during the diarrhoea episode than during the recovery period. The same trend was observed for *Lactobacillus* and *Eubacterium*. During diarrhoea, the pH of the stools was higher and volatile fatty acids were reduced in comparison with the recovery phase. These results were observed irrespective of the pathogen responsible for the diarrhoea. Albert *et al.* (1978) studied the composition of the faecal microflora of 49 children with acute infectious diarrhoea and of 29 healthy children. In the children with acute diarrhoea, the anaerobic bacteria were reduced and the anaerobe/aerobe ratio was inverted in comparison with that in healthy subjects.

## 5.2 Modifications in the endogenous microflora in the bowel in the course of cryptogenic (and chronic) inflammatory bowel diseases

The intestinal flora plays a detrimental pro-inflammatory role in the event of inflammatory diseases of the gastrointestinal tract (Marteau & Shanahan, 2003). The presence of flora in the bowel exacerbates all the cases of colitis induced experimentally in animals and several arguments are strongly in favour of this also being the case in humans in the course of cryptogenic inflammatory bowel diseases. The main two cryptogenic inflammatory bowel diseases are haemorrhagic coloproctitis (which can be complicated by pouchitis after surgery) and Crohn's disease. The most convincing clinical arguments are observed in the post-operative pre-anastomotic recurrence of Crohn's disease, which is only observed if the faecal flow is maintained on the anastomosis (Rutgeerts *et al.*, 1991). Some antibiotics (particularly metronidazole and ciprofloxacin) have been established as being effective to treat pouchitis and prevent post-operative recurrence of Crohn's disease (Marteau & Shanahan 2003). Two other facts have recently been learned:

- not all microorganisms have the same pro-inflammatory potential since they are perceived differently by the intestinal or immune cells (by different toll-like receptors) (Marteau *et al.*, 2003; Borruel *et al.*, 2002);
- significant differences exist between the intestinal flora of healthy subjects and that of subjects suffering from cryptogenic inflammatory bowel diseases, even in remission (Marteau *et al.*, 2004).

Numerous studies have demonstrated an increase in *E. coli* group bacteria during cryptogenic inflammatory bowel disease flare-ups, but also, to a lesser degree, during the clinically quiescent period of cryptogenic inflammatory bowel diseases (Seksik *et al.*, 2003). A high frequency of entero-adherent *E. coli* has also been observed in the diseased ileal mucosa in Crohn's disease. The role of certain *Bacteroides* is suspected on the basis of their inconstantly increased concentration and their strong pro-inflammatory capacity on intestinal or immune cells and animal models. The development of an imbalance in the flora is also authenticated by the presence of a large number (30% of the total flora) of usually sub-dominant strains. However, the studies have not revealed a single microorganism which could be held "responsible" for these diseases (both in terms of pathogens and microorganisms present in the usual flora). These observations led to the effects of probiotic microorganisms being studied to see if these can beneficially regulate cryptogenic inflammatory bowel diseases (experimentally-induced or in humans).

Although "average" flora profiles differ slightly between patients and healthy subjects, these differences are neither sufficiently pronounced nor sufficiently systematic to enable a good or bad flora profile to be defined.

### Important points

- It is not possible to define a "good flora profile".
- However, the flora in healthy subjects and certain types of patients, particularly those with bowel diseases, are significantly different, without it yet having been possible to establish whether these modifications occurred before or after development of the disease.

## II- What is the value of products containing live microorganisms in comparison with products containing dead microorganisms?

---

### 1. Introduction

By definition, probiotics are microorganisms ingested live (cf. glossary). The question has nevertheless been posed as to whether non-live microorganisms (microbial bodies destroyed by a process of whatever type) or probiotic metabolism products (culture medium, for example) might have all, some or none of the physiological effects of probiotics.

Here, we have essentially analysed human studies having compared the effects of live probiotic microorganisms or non-live “control” products.

### 2. Lactose intolerance and bacteria in live or dead yoghurt

This effect is the subject of relatively widespread consensus (Salminen *et al.*, 1998; Salminen *et al.* 1997). A number of studies have demonstrated that the lactase from certain lactic bacteria was involved *in situ* in the gut in the hydrolysis of lactose (digestion phase partially defective in a number of adults, who may then suffer from symptoms known as lactose “intolerance”). The digestibility of the lactose in yoghurt can be up to 90% of the load (Marteau *et al.*, 1990 ). The lactase in yoghurt may be protected from gastric acidity and released in the duodenum under the action of biliary acids. Several studies have shown that thermisation of yoghurts led to a significantly reduced digestibility of lactose (Savaiano *et al.*, 1984; Marteau *et al.*, 1990; Varela-Moreiras *et al.*, 1992; Rizkalla *et al.*, 2000). Heat-treatment affects the viability of microorganisms but also neutralises the activity of bacterial lactase. However, this difference in digestibility has no obvious clinical repercussions since studies have not revealed any significant difference in lactose tolerance (clinical symptoms) between yoghurt and thermised yoghurts (Marteau *et al.*, 1997; Savaiano *et al.*, 1984).

### 3. Ecological effects of fermented products no longer containing live bacteria

The literature contains only very few examples of fermented products not containing live bacteria capable of having effects on pathological situations, on pathogenic microorganisms or the flora. A lactoserum fermented with *B. breve* C50 administered to 10 healthy volunteers significantly increased the endogenous bifidobacteria population and reduced *Bacteroides fragilis* and *Clostridium perfringens* populations along with excretion of *Clostridium* spp spores. The nitro-reductase activities were significantly reduced, whereas the  $\beta$ -galactosidase activity was increased. (Romond *et al.*, 1998; Mullie *et al.*, 2002)

One must turn to pharmaceuticals to find examples of products containing effective dead bacteria. The most significant example is without doubt the antidiarrhoeal, Lacteol<sup>®</sup>. This is a lactoserum fermented with the *L. acidophilus* LB strain. This is then deactivated by heat and the entire preparation is freeze-dried. Several studies have shown that this product, which does not contain any live bacteria, is effective in the treatment of infectious diarrhoea. Recently, a double-blind study showed that dead *L. acidophilus* LB was more effective in the treatment of chronic diarrhoea than another strain of lactobacillus administered live. 137 patients divided into two groups received either 2 capsules containing a medium fermented with *L. acidophilus* LB (Lacteol<sup>®</sup> Fort, non-live strain) or a live *L. acidophilus* strain in the form of chewable tablets (5 tablets x 3/day) for a period of 4 weeks. Stool frequency and consistency and abdominal sensations were recorded. The stool frequency was significantly different during the second and fourth weeks of treatment ( $p < 0.05$ ). At the end of treatment, the symptoms and subjective abdominal sensations were less marked in the LB group. However, it is difficult to draw firm conclusions from this type of study insofar as the products compared were of different types with respect to the form administered. In addition, the objective results were significant at certain periods of the study and not at others (Xiao *et al.*,

2003). It appears in this case that the effect is due to the fermentation products of the strain. Indeed, this is further confirmed by other *in vitro* and *in vivo* studies in animals. For example, it has been demonstrated that the fermentation supernatant of this strain was capable of inhibiting the viability of *H. pylori in vitro*. In mice, the culture supernatant inhibited colonisation of the stomach by *H. felis* and the resulting gastritis. This effect may be partially due to an inhibition of the pathogen's urease (Coconnier *et al.*, 1998). The same type of results was obtained in humans in a double-blind study with lactoserum fermented with the *L. johnsonii* La1 strain. Administration of the fermented medium led to a reduction in gastric colonisation by *H. pylori*, measured using the urea *breath test* (Michetti *et al.*, 1999).

Isolauri and her team (1991) demonstrated the superiority of the *L. rhamnosus* GG strain, either in the form of a fermented milk or in the form of a lyophilisate ( $10^{10-11}$  CFU/day) for shortening the duration of diarrhoea in children suffering from gastroenteritis caused by rotavirus (71 subjects; 4-45 months of age) in comparison with a control group which received pasteurised yoghurt. This result demonstrates the superiority of a live strain versus other dead strains (Isolauri *et al.*, 1991) but it must be observed that the control group was not the ideal group since it did not contain the dead GG strain.

A study conducted in patients suffering from pancreatitis demonstrated the superior efficacy of the live *L. plantarum* 299 strain in comparison with the same strain killed by heat. Forty-five patients with clinical and biological signs of pancreatitis were randomised into two groups receiving either the live 299 strain ( $10^9$  CFU) or the same inactivated strain. In both cases, the bacterial strain was administered with oat fibre. The treatment was administered twice daily for 7 days. The authors reported that the 22 patients receiving treatment with the live bacteria had a lower risk of necrotic infection or abscess (4.5% versus 30% in the other group,  $p=0.023$ ) (Kecskes *et al.*, 2003).

#### 4. Immune effects

Few studies have compared the effects of live strains versus dead strains on immune parameters.

Recent studies provide important information about the effect of dead bacteria and, more particularly, their DNA. In an animal model of colitis induced chemically using DSS (Dextran Sulphate Sodium), the authors show that the DNA of a mixture of lactic bacteria (Product VSL#3<sup>®</sup>, containing *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) injected into the stomach or by the subcutaneous route reduced inflammation of the intestinal mucosa. The same result was obtained by intra-gastric administration of the mixture of viable or killed (radiation) probiotics. The authors conclude that the DNA itself has an effect. The mechanism involves the pathway of the TLR-9 receptor (Rachmilewitz *et al.*, 2004).

However, other studies have shown that certain effects were only obtained with probiotics ingested live. Thus, Kaila *et al.* compared the effects of a fermented milk containing the *L. rhamnosus* GG strain ( $10^{10-11}$  CFU/day) with those of a pasteurised yoghurt in children suffering from acute diarrhoea caused by rotavirus. These authors demonstrated a reduction in the duration of the diarrhoea and an improvement in the immune response to rotavirus which was greater in the group receiving the live probiotic. This group had a significantly higher number of lymphocytes producing IgA, IgG, IgM and a significantly higher anti-rotavirus IgA concentration (Kaila *et al.*, 1992). However, it is a shame that the control was not the same fermented product destroyed by heat. The same researchers studied 25 children suffering from diarrhoea caused by rotavirus who received the *L. rhamnosus* GG strain in live or dead form. The results reveal that the subjects in the group treated with the live strain had more lymphocytes producing anti-rotavirus IgA (significant differences in 10 out of 12 children for the first group versus 2 out of 13 for the second) (Kaila *et al.*, 1995).

Schiffrin *et al.* demonstrated that consuming a fermented milk containing probiotic strains ( $10^{9-10}$  CFU/day) could increase the phagocytic capacity of the blood cells. The effect was correlated with an increase in the faecal *Lactobacillus johnsonii* La1 or *Bifidobacterium lactis* Bb12 concentration (depending on the group considered) (Schiffrin *et al.*, 1995). The same authors continued their work by carrying out a study comparing a fresh fermented product with the same product having reached its use-by date, in which the viable probiotic bacterial population had decreased, nonetheless leaving bacterial corpses in the product. The volunteers consumed 150 ml product ( $1.5 \cdot 10^9$ -  $1.5 \cdot 10^8$  CFU/day depending on the group), corresponding either to a control fermented milk or the same fresh fermented milk containing  $10^7$  CFU/g of the *L. johnsonii* La1 strain, or the same fermented milk 21 to 28 days after production, now only containing  $10^6$  CFU/g of strain La1. The results demonstrated the absence of any effect in the control groups and that receiving the low dose of La1 (despite the presence of dead bacteria). However, in the group treated with a high population concentration, the phagocytic capacity was significantly increased (Donnet-Hughes *et al.*, 1999).

### **Important points**

- Few studies have rigorously compared the effects of live bacteria versus dead bacteria. This rigour demands that the only difference between the test group and the control group should be the live nature of the bacteria.
- Certain effects of bacterial preparations may be due to some of their metabolites and/or their DNA; in which case they may also be observed with non-live preparations. However, other effects are only observed with live microorganisms.
- One study suggests a possible loss of effectiveness of the fermented milk studied once it had reached its use-by date (Donnet-Hughes *et al.*, 1999).
- The survival in the gastrointestinal tract of the strains ingested does not necessarily imply the existence of beneficial effects. The non-survival does not necessarily imply the absence of beneficial effects.



### III- Survival of dietary probiotics and intestinal transit in humans

---

#### 1. Introduction

Foods undergo significant changes as it passes through the gastrointestinal tract and a large quantity of the bacteria ingested are destroyed. This has led researchers to assume that the effects of probiotics are influenced by their survival in the gut and to study this survival. Since the targets for the action of probiotics may be located either in the small intestine or in the colon, survival studies have been conducted at both these sites.

#### 2. Bifidobacteria

Bifidobacteria are very predominant in the flora of infants and often become sub-dominant after the weaning period (Mitsuoka *et al.*, 1989). The predominance of bifidobacteria in infants at a time when their immune system is not completely developed, along with the antagonistic effect of the presence of bifidobacteria and enteropathogens, have led to a lot of interest in the potential action of bifidobacteria on health. This has been the basis for the development of a number of “bifidogenic” probiotics and prebiotics.

Berrada *et al.* (1991) demonstrated that, for an acid-resistant strain, 80% of the bacteria consumed in fermented milk ( $10^9$ ) passed through the stomach to the small intestine. A high quantity has also been found in the ileum following the consumption of  $10^{10}$  *Bifidobacterium lactis* Bb12 (Pochart *et al.*, 1992). This study, conducted using the intestinal perfusion technique in 6 volunteers, demonstrated an increase in the flow of bacteria through the ileum of up to  $10^{8.8}$  CFU.h<sup>-1</sup>. Following ingestion of the product, the ileal bifidobacteria concentrations went up from  $10^{2.2}$  to  $10^{6.4}$  CFU.mL<sup>-1</sup> making it possible to calculate a recovery rate of 23.5% of the bifidobacteria ingested. In another study conducted under similar conditions, the strain of *Bifidobacterium* contained in the fermented product Ofilus<sup>®</sup> survived at a level of 37.5%, corresponding to a bifidobacteria concentration of  $10^{6.4}$  CFU.mL<sup>-1</sup> in the ileum (Marteau *et al.*, 1992). These studies did not reveal any durable colonisation of the ileum. The fate of the bifidobacteria ingested as far as the faeces has been evaluated in several studies. Bouhnik *et al.* (1992) studied the fate of the *Bifidobacterium* strain contained in the fermented product Ofilus<sup>®</sup> in 8 volunteers. They reported that daily consumption of  $10^{11.5}$  CFU of these bifidobacteria for 8 days triggered an increase in faecal concentration of between  $10^{8.3}$  and  $10^{9.2}$  CFU.g<sup>-1</sup>. After consumption was stopped, the exogenous bifidobacteria concentration gradually fell in parallel with transit markers, disappearing completely after 8 days. The bifidobacteria recovery rate in the stools was estimated to be 29.7% of the quantity ingested. In another study, an exogenous bifidobacteria (strain not specified) rapidly became the predominant strain (67.2%) amongst bifidobacteria following 8 days of consumption by 6 volunteers with a maximum concentration of  $10^{9.8}$  CFU.g<sup>-1</sup> (Kullen *et al.*, 1997). This studied strain was also eliminated after consumption was stopped. In conclusion, certain bifidobacteria survive intestinal transit well and can be found at a concentration of greater than  $10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup> in the ileum. In the faeces, numerous strains have a good survival capacity and the continuous consumption of products containing these microorganisms significantly increases their concentration in the faeces. Exogenous strains do not have the ecological advantages required to persist within the flora and are replaced by autochthonous strains once consumption has stopped.

#### 3. Lactobacilli

##### ***Lactobacillus rhamnosus***

*Lactobacillus rhamnosus* GG is the most studied probiotic strain (around 200 references). Goldin *et al.* (1992) monitored the GG strain in the faeces, recognising it by the characteristic morphology of its colonies. The bacteria were consumed in the form of frozen extracts (15 subjects), in fermented milk (15 subjects) or in lactoserum (46 subjects). For a daily intake of around  $10^{11}$  CFU, the bacteria were found at respective concentrations of  $10^{6.4}$ ,  $10^{6.0}$  and  $10^{7.7}$  CFU.g<sup>-1</sup> in the stools. In 33% of individuals, the bacteria persisted for 7 days after

consumption was stopped. The persistence of this strain in the faeces and in the colonic mucosa was monitored in another study (Alander *et al.*, 1999). After consumption was stopped, *L. rhamnosus* GG was no longer detectable in the faeces after 14 days but the bacteria persisted in the mucosa after 21 days, disappearing after 28 days. According to the authors, the persistence in the mucosa is a result of probable multiplication of the bacteria. In a dose-response study, Saxelin *et al.* (1995) demonstrated that daily intake of  $10^8$  CFU *L. rhamnosus* GG was inadequate to enable its detection in the faeces whereas a dose of around  $10^{10.1}$  CFU permitted this (mean faecal concentration obtained:  $10^6$  CFU.g<sup>-1</sup>).

The fate of the *L. rhamnosus* DR20 strain was studied in 10 subjects. The daily consumption of this strain at a concentration of  $10^{9.2}$  CFU significantly increased the total number of lactobacilli and enterococci in the faeces. The predominance of the *L. rhamnosus* DR20 strain within the lactobacilli population of the flora was observed in several individuals and depended mainly on endogenous lactobacilli populations. The mean concentration found was  $10^{5.5}$  CFU.g<sup>-1</sup>. The strain disappeared after consumption was stopped (Tannock *et al.*, 2000).

### ***Lactobacillus casei/paracasei***

Two studies have measured the survival of the *L. casei* Shirota strain in the faeces. In the first study, conducted in 10 volunteers, the strain was found at a concentration of  $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup> after daily ingestion of  $10^{11.5}$  CFU (Spanhaak *et al.*, 1998). Yuki *et al.* (1999) found the same concentration in the faeces of 8 volunteers having consumed 10 times fewer bacteria every day, i.e.  $10^{10.1}$  CFU. Bunte *et al.* (2000) monitored the fate of *L. paracasei* LTH 2579 in 3 volunteers. After eating sausage containing *L. paracasei* LTH 2579 ( $10^9$  CFU per day) for 3 days, the strain was found at faecal concentrations which ranged between  $10^{7.1}$  and  $10^{8.2}$  CFU.g<sup>-1</sup>.

### ***Lactobacillus salivarius***

Collins *et al.* (2002) studied the fate of the *L. salivarius* UCC118 strain in the gastrointestinal tract and its impact on the flora and intestinal immune system. *L. salivarius* was detectable in the ileum between 2 and 7 hours after ingestion, with a peak concentration of  $10^{6.3}$  CFU.mL<sup>-1</sup>. The ileal survival in 6 subjects following a single dose of fermented milk containing  $10^{10.2}$  CFU was estimated to be 11.8%. The faecal survival of the bacteria was measured in two groups of 20 volunteers having consumed  $10^{10}$  CFU per day, in fresh or fermented milk, for 21 days. The faecal concentrations ranged between  $10^3$  and  $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup>. They were higher in the group having ingested the probiotic in fresh milk. In 4 subjects, the faecal persistence exceeded 21 days following ingestion and for one, the probiotic bacteria could still be detected in the stools after 6 months. Transit of the probiotic was accompanied by an increase in the total quantity of lactobacilli (11.5 times higher) and enterococci (200 times higher) in the stools.

### ***Lactobacillus plantarum***

The ileal survival of the *L. plantarum* NCIMB 8826 strain was studied following the ingestion of  $10^{10.2}$  CFU (Vesa *et al.*, 2000). The bacteria were detectable in the ileal liquid between 1 and 24 hours after ingestion, with a concentration peak of  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> after 2 hours. It was maintained at  $10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup> for at least 5 hours. The survival rate was estimated to be 7% in the ileum and passage of the bacteria to this level was obtained in parallel with the marker, suggesting passive transit without colonisation. The faecal elimination profile of the strain was comparable with that of spores following consumption of  $10^{10.7}$  CFU daily for 7 days. The faecal concentration was  $10^8$  CFU.g<sup>-1</sup> with a survival rate of  $25 \pm 29\%$ , suggesting possible multiplication of the probiotic in the colon. The faecal survival of the 299v strain, consumed with a fermented drink, was studied in 26 subjects (Johansson *et al.*, 1998). The daily ingestion of  $10^{10.3}$  CFU led to the detection in the stools of around  $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup>. The survival of the bacteria was accompanied by a concomitant increase in bifidobacteria and lactobacilli. In a previous study, the consumption of a mixture of 19 strains of lactobacilli (each at a concentration of  $10^{8.7}$  CFU.g<sup>-1</sup>) increased the lactobacilli concentration (10 times higher) in the jejunal mucosa, for up to 11 hours after ingestion (Johansson *et al.*, 1993). *L. plantarum* 299v and 299, present in the probiotic mixture ingested, were predominant amongst the exogenous strains isolated in the mucosa. This study is one of the few demonstrated cases of persistence of lactic bacteria ingested by humans.

### ***Lactobacillus helveticus***

Shinoda *et al.* (2001) studied its persistence in the faeces and the fate of the CP53 strain by counting in a dish (variant naturally resistant to an antibiotic) and using a molecular approach. The 7 volunteers consumed  $10^{11}$  CFU daily for 5 days. The results were different depending on whether the molecular approach was used ( $10^{8.9}$  CFU.g<sup>-1</sup>) (7/7) or the microbiological method was used ( $10^{6.6}$  CFU.g<sup>-1</sup>) (4/7), suggesting the presence of a majority of dead cells in the faeces. *In vitro* tests demonstrated that the faecal extracts had a bactericidal effect on the CP53 strain but not on the *L. rhamnosus* GG strain.

### ***Lactobacillus acidophilus***

Marteau *et al.*, (1992) observed that after consumption of  $10^{10}$  *L. acidophilus* in the fermented product Ofilus<sup>®</sup>, 1.5% of the bacteria was found in the ileum, i.e. a concentration of  $10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup>. This bacteria was eliminated in parallel with the transit marker. In subjects having undergone an ileostomy, other authors found the same survival rate for another strain (Pettersson *et al.*, 1985). Few recent data are available relative to the faecal survival of this strain. In a dose-response study, Gilliland *et al.*, (1978) demonstrated that the ingestion of *L. acidophilus* at a concentration of  $10^{8.9}$  CFU.mL<sup>-1</sup> led to an increase in total lactobacilli concentration in the faeces of  $10^{4.9}$  to  $10^{7.9}$  CFU.g<sup>-1</sup>. They estimated the recovery rate for the strain to be between 2 and 5%.

### ***Lactobacillus fermentum***

Vesa T *et al.*, (2000) studied the ileal survival of *L. fermentum* KLD. This strain demonstrated poor resistance to intestinal transit and was detected at a maximum concentration of  $10^{4.5}$  CFU.mL<sup>-1</sup> over a period of 4 hours. Only 0.5% of the cells ingested were recovered at this level.

## **4. Other bacteria**

### **4.1 Yoghurt bacteria: *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus***

Studies reporting the fate of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* demonstrate that their survival in the upper part of the gastrointestinal tract is low (Marteau *et al.*, 1993).

Pochart *et al.* (1989) observed, by taking samples of intestinal liquid by intubation, that in subjects having eaten yoghurt containing around  $10^{11}$  CFU, only 1% of the bacteria, i.e.  $10^9$  CFU, reached the duodenum. The transit of the bacteria was accompanied by marked lactase activity in the duodenum. Another two studies, conducted in subjects having undergone ileostomy, provide additional information on the intestinal fate of the symbiosis. Lindwall *et al.* (1984) reported that after consumption of a yoghurt containing  $10^9$  CFU.g<sup>-1</sup> *L. bulgaricus*, the ileal concentration of the bacteria was  $10^5$  in 3 subjects and  $10^6$  in the fourth. Pettersson *et al.* (1985) reported that following the intake of 500 mL yoghurt, the lactic bacteria only reached the ileum in a quarter of subjects. The low survival rate of these bacteria in the upper parts of the gastrointestinal tract has led to few studies being conducted relative to their downstream fate. However, Brigidi *et al.* (2003) found a *S. thermophilus* strain in the faeces at concentrations of  $10^{5.6}$  or  $10^{6.7}$  CFU.g<sup>-1</sup> depending on whether the bacteria had been ingested with yoghurt ( $10^6$ - $10^9$  CFU.g<sup>-1</sup>) or the commercial probiotic mixture VSL#3<sup>®</sup> ( $10^{11.3}$  CFU.g<sup>-1</sup>).

### **4.2 *Lactococcus lactis***

*Lc. lactis* is widely used as a model bacteria for delivering substances of therapeutic value to the gastrointestinal tract (Mercenier *et al.*, 2000; Bermudez-Humaran *et al.*, 2002; Drouault *et al.*, 2002). Vesa *et al.* (2000) studied the fate of the MG 1363 strain in the ileum following a single intake of fermented milk containing around  $10^{10.2}$  CFU. The bacteria appeared between 1 and 3 hours after ingestion, with a maximum concentration of  $10^{5.2}$  CFU.mL<sup>-1</sup>. The total quantity of cells recovered corresponded to 1% of the bacteria ingested. The *Lc. lactis* concentration in transit fell much more rapidly than that of the marker, suggesting a bactericidal effect of the ileal environment on the lactic strain. The faecal survival of *Lc. lactis* was studied for another strain derived from MG 1363 (Klijn *et al.*, 1995). After consumption for 4 days by 4 volunteers of  $10^{11}$  CFU in fresh milk, 1% of the bacteria ingested was recovered in the faeces. The faecal elimination of lactococci was more rapid than that of

transit-marker spores, demonstrating the mortality of the bacteria in the intestine. A faecal concentration of  $10^4$  CFU.g<sup>-1</sup> was detected. The qualitative molecular approach used in this study (amplification by PCR of the gene encoding nisin) always yielded positive signals, whereas no cells were detected in the dish, suggesting a longer persistence of non-viable cells or naked DNA in the gastrointestinal tract.

#### 4.3 Propionibacteria

In an *in vivo* study, 7 volunteers consumed *Propionibacterium freudenreichii* (Propiofidus® SI41 strain) according to 3 different methods: (i) in “conventional” capsules at a low dose of  $10^{9.6}$  CFU per day, (ii) in capsules at a higher dose of  $10^{10.6}$  CFU per day, or (iii) in acid-resistant capsules at a low dose of  $10^{9.6}$  CFU per day. In the first case, the propionibacteria were found at a concentration of more than  $10^5$  CFU.g<sup>-1</sup> in 8 faecal samples out of 14 (Jan *et al.*, 2002). In the other two cases, they were detected in all the samples at a concentration of between  $10^5$  and  $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup>. This study highlights the importance of the dose ingested and of gastro-protection. The acid-resistant capsules improved the viability and maintained it at the same level as that obtained with a dose ten times higher in conventional capsules.

#### 4.4 *Enterococcus faecium*

The fate after ingestion of a strain of *Enterococcus faecium* used in a probiotic product (Gaio®) was studied by Lund *et al.*, (2002). These authors showed, in 8 out of 10 volunteers having consumed approximately  $10^9$  CFU daily for 10 days, that the bacteria was recovered at rates of between  $10^{3.1}$  and  $10^{6.6}$  CFU.g<sup>-1</sup>. For 3 volunteers, the exogenous strain was predominant amongst the *E. faecium* population. The authors also demonstrated that the concomitant administration of antibiotics did not lead to detection of the strain *in vivo*. The presence of the strain was transient and did not persist after consumption was stopped.

#### Important points

- The quantity of probiotics passing live through the gut depends on the strain, the dose ingested, factors related to the host and the vector food.
- The resistance of probiotics to acidity and bile salts and their survival in the gastrointestinal environment are very variable, depending on the strain. A number of strains of bifidobacteria and lactobacilli survive well during intestinal transit and reach the faeces in large quantities. Strains of *Lc. lactis* have low resistance to transit and few bacteria are recovered (1% in the ileum and the same quantity in the faeces) after ingestion. The majority of the strains used in yoghurt die in the upper compartments of the gastrointestinal tract and a survival rate of only 1% in the ileum is observed.
- With very few exceptions (Johansson *et al.*, 1993; Alander *et al.*, 1999), the bacteria ingested persist throughout the consumption period and are then eliminated within a few days with no lasting colonisation.
- Gastric acidity and biliary and pancreatic secretion are the main endogenous mechanisms inactivating ingested bacteria. Protection against gastric acidity can be achieved by ensuring rapid transit through the stomach or by protecting the bacteria by means of the buffer capacity of the vector food or using protective delivery systems, such as micro-encapsulation.
- The dose of probiotics ingested is an important factor to obtain high concentrations in the various compartments of the gastrointestinal tract. For example, Saxelin *et al.* (1995) demonstrated that a quantity of  $10^{10}$  CFU had to be consumed to detect *L. rhamnosus* GG in the faeces.
- It is often said that probiotic concentrations must be greater than or equal to  $10^6$  CFU/mL in the small intestine (ileum) and  $10^8$  CFU/g in the colon, but the scientific basis for these statements is relatively weak. The concentrations in the small intestine have been proposed because these concentrations are associated with clinical effects (diarrhoea) in subjects with chronic bacterial colonisation of the small intestine (Ducluzeau *et al.*, 1989). The concentrations in the colon have been proposed because they correspond to less than 1/1000 of the autochthonous flora present (which it could be reasonably expected has more chance of being active than flora present at even lower levels).

## IV- Are the effects of probiotics specific to the strain, species or genus?

---

### 1. Introduction

Probiotic microorganisms can differ greatly from one another. In the absence of any reliable data relative to which of their active substances are involved in each effect, it is prudent to assume that these differ too, even between similar strains. The intrinsic differences between probiotics concern their genome, the composition of their wall, enzymes, technological properties, resistance to various stresses encountered in the gastrointestinal tract (acid, bile, etc.), capacity to adhere to cultured epithelial cells or to mucus, capacity to produce antimicrobial substances. They are undeniable and sometimes very marked. In addition to these characteristics intrinsic to individual strains, the conditions in which a probiotic is ingested can probably affect its properties in the intestines. The food “matrix” has a buffer effect, which may be more or less pronounced, in the stomach, protecting the probiotic from acid. Some producers are designing encapsulation processes to protect probiotics from gastric acidity.

### 2. Evidence of “pharmacological specificities or effects”

#### 2.1 Between microbial genera and species

A number of studies, including clinical ones, have demonstrated differences in intrinsic properties between species (and, even more, between genera).

For example, survival in the small intestine and/or entire human gastrointestinal tract differs between *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. johnsonii* (Marteau *et al.*, 2003). Wendakoon reported that probiotic strains belonging to, among others, species of *Lactobacillus casei*, *delbrueckii*, *helveticus* and *acidophilus* differed in terms of their antagonism properties vis-à-vis *Helicobacter pylori* (Wendakoon *et al.*, 1998). Within the same species, sometimes only certain strains are capable of synthesising bacteriocins (Linaje *et al.*, 2004). These differences in properties are generally exploited by producers to select the most promising strains. For example, *L. rhamnosus* GG was selected for its acid and bile resisting properties and subsequently demonstrated specific *in vivo* properties relative to other lactobacilli (Gorbach *et al.*, 2002). It also differs due to its properties of adhering to cultured intestinal cell lines and its competitive exclusion of pathogens (Lee *et al.*, 2003). *L. salivarius* UCC118, was also selected from 1500 strains taken from the healthy human ileum (Collins *et al.*, 2002; Dunne *et al.*, 2001).

In animals, a relatively high number of studies have demonstrated differences in probiotic effects between microorganisms of different genera or species (Osman *et al.*, 2004; Dunne *et al.*, 2001). In humans, clinical studies have shown that the addition of probiotic strains added properties to a “base” of pasteurised product or one containing live bacteria, in particular those of yoghurt. One of the relatively numerous examples that we could cite is that of *L. rhamnosus* GG, which leads to a significantly greater reduction in the duration of diarrhoea during gastroenteritis than pasteurised yoghurt (Kaila *et al.*, 1995). The addition of the *Bifidobacterium animalis* DN 173 010 strain to yoghurt bacteria (BIO<sup>®</sup>) was responsible for significant effects on colonic motricity (Marteau *et al.*, 2002). The addition of the *Lactobacillus casei* DN 114 001 strain to yoghurt bacteria (Actimel) was more effective in the prevention of gastroenteritis than yoghurt alone (Pedonne *et al.*, 2001). However, our literature search has not revealed any comparative studies on two probiotic genera or species under the same conditions.

## 2.2 Between strains within the same species

Numerous studies have demonstrated intrinsic differences in physiological properties between strains belonging to the same species. The reader must be cautious since although a number of articles mention comparisons between strains (which is not inaccurate), the microorganisms compared often also belong to different species. Numerous studies have reported differences in antimicrobial properties between various strains of bifidobacteria (Bevilacqua *et al.*, 2003; Gagnon *et al.*, 2004). This has also been observed among lactobacilli (Santos *et al.*, 2003), or among strains of *Bacillus* (le Duc *et al.*, 2004). Other studies have reported differences between strains belonging to the same species in terms of their adherence to epithelial cells, such as Caco-2 (Tumuola *et al.*, 1998), or to mucus (Ouwehand *et al.*, 2001).

Few studies in animals and none in humans (to our knowledge) have investigated differences in probiotic effects between strains belonging to the same species. In certain cases, it is highly likely that certain strains have identical properties. Thus, for example, several studies (but not conducted in the same subjects) have shown that different yoghurts (and hence very probably containing different strains of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*) improved the digestion of lactose in lactase-deficient humans (Marteau *et al.*, 2003 ; Martini *et al.*, 1987). However, no studies have compared these strains with one another using a rigorous protocol. In other cases, different strains had different clinical effects in animals. For example, Paubert-Braquet *et al.* (1995) reported that strains of *L. casei* (LAB-1, LAB-2 and Yakult®) differed in their capacity to stimulate phagocytosis by peritoneal macrophages in mice and in their capacity to protect mice against lethal infection with *Salmonella typhimurium*. We have not found any examples of studies in humans having compared the clinical effects of two probiotic strains of the same species. However, it has been observed that two strains of *L. crispatus* (wild and non-adherent mutant) differed in their *in vitro* capacity to adhere to Caco-2 cells and their *in vivo* capacity to survive in the colon or to persist on the colonic mucosa (results obtained from biopsies) (Cesena *et al.*, 2001).

### Important points

- The differences in properties between strains do not indicate with certainty that all their effects on the host would be different; however, this possibility must be considered, at least until proved otherwise. It is not impossible that the presence of a well identified active substance in a probiotic may be shown to be sufficient to permit a reliable prediction that an effect will be obtained. However, this is unlikely in the near future and will require solid verification.
- It is therefore generally accepted that the effects of one strain cannot be extrapolated to another. In other words, clinical studies on the strain itself are required before any claim can be made.
- Producers can use this characteristic to protect the specificities of their products. Advertising or claims referring to similar strains must not be used in scientific or promotional dossiers or brochures, neither in their evaluations).

## V- Are the effects of prebiotics structure-dependent?

### 1. Introduction

The definition of prebiotics requires “non-digestible” and “fermentable” characters but does not impose any chemical characteristic. The prebiotics recognised to date are all carbohydrates and most possess a low polymerisation degree, with the exception of resistant starches (cf. table below).

The question of the influence of the chemical structure on the functionality of prebiotics assumes its full significance when one considers that the prebiotic products available do not, for the most part, correspond to clearly defined biochemical substances but more to families of substances. Membership of the same family (e.g.: fructans) is governed by the similarity of the chemical nature of the component monomers and the disparity within the family results from differences in the polymerisation degrees and/or types of monosaccharide linkages (Crittenden & Payne, 1996; Grizard & Barthelemy, 1999; Frank *et al.*, 2002). The only exceptions are lactulose (little used in foods) and tagatose.

**Table of various known and presumed prebiotics (as per Kennedy & White, 1983; Pavis *et al.*, 2001; Roberfroid & Delzenne, 1998; Gibson & Fuller, 2000; Frank, 2002)**

Substance	Composition	Polymerisation degree	Production process
Fructans <ul style="list-style-type: none"> <li>• Linear:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>Inulin</b></li> <li>○ <b>FOS</b></li> <li>○ Levans</li> </ul> </li> <li>• Branched (graminans)</li> </ul>	Glucose, fructose <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\beta</math>-2,1 linkages</li> <li>• <math>\beta</math>-2,1 linkages</li> <li>• <math>\beta</math>-2,6 linkages</li> <li>• <math>\beta</math>-2,6 &amp; <math>\beta</math>-2,1 linkages</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 to 60</li> <li>• 2 to 9</li> <li>• 20-30 (when of plant origin)†</li> <li>• unknown</li> </ul>	Extraction Enzymatic hydrolysis Enzymatic biosynthesis
<i>Lactulose</i>	Galactose, fructose, beta-1,4 linkages	2	Chemical synthesis
<i>Oligo(trans)galactosides (TOS)</i>	Glucose, galactose, beta-1,6 linkages	2 to 5	Enzymatic biosynthesis
<i>Oligoxylosides (XOS)</i>	Xylose, beta-1,4 linkages	2 to 9	Enzymatic hydrolysis
<i>Soybean oligosaccharides (Raffinose &amp; Stachyose)</i>	Galactose, glucose, fructose alpha 1,6 and 1,2 linkages	3 to 4	Extraction
<i>Isomaltooligosaccharides</i>	Glucose, alpha-1,6 linkages	2 to 5	Enzymatic hydrolysis Enzymatic bioconversion
<i>Laminaran oligosaccharides (beta-glucans)</i>	Glucose, ( $\pm$ Mannitol) beta-1,3 and 1,6 linkages	5 to 25	Enzymatic hydrolysis
<i>D-tagatose</i>	Tagatose	1	Extraction
<i>Resistant starches</i>	Glucose, alpha-1,4 and 1,6 linkages	> 1000	Extraction

In **bold**: known prebiotics; in italics: presumed prebiotics

†: the levans produced by microorganisms generally present molecular weights of more than  $10^6$ .

## 2. Biochemical disparity of prebiotics

The biochemical disparity of prebiotics is a result of natural diversity, the coexistence of natural compounds and synthetic compounds and “post-production” technological processes. For example, the fructan family includes compounds obtained by extraction, partial enzymatic hydrolysis or enzymatic biosynthesis. It is composed of 3 sub-groups [“inulin”-type fructans, “levan”-type fructans and branched fructans, sometimes called “graminarans” (Pavis *et al.*, 2001)]. Linear fructans are naturally present in numerous plants (young cereals, fruits, vegetables). Chicory and squash (Jerusalem artichoke) are the two sources used industrially to produce linear fructans. Illustrating the natural diversity, the average polymerisation degree of extracted inulin differs depending on the natural source (10-20 for chicory, 6 for squash). Furthermore, inulin extracted from chicory is composed of both polymers containing fructose only (FFn) and polymers containing glucose (GFn) (Grizard & Barthelemy, 1999; Flamm *et al.*, 2001). Fructooligosaccharides (FOS) are produced either by partial enzymatic hydrolysis of inulin (e.g.: Raftilose<sup>®</sup>), or by enzymatic biosynthesis from a mixture of sucrose, glucose and fructose (ex: Actilight<sup>®</sup>). The coexistence of these natural and synthetic compounds increases the diversity of the chemical structures encountered under the same name. Indeed, the compounds produced by each of these technological processes are not identical: FOS obtained by hydrolysis contain a mixture of GFn and FFn structure ( $2 < n < 7$ ) whereas only GFn structures ( $2 < n < 4$ ) are present in synthetic FOS (Frank *et al.*, 2002). Finally, the application or otherwise of post-production technological processes further complicates the diversity of the chemical nature of fructans. Thus, while native inulin groups together polymerisation degrees of between 2 and 60, inulin presenting an average polymerisation degree of 25 can be obtained by elimination, after physical separation, of inulin fractions with a low polymerisation degree (e.g. Raftiline<sup>®</sup> HP) (Frank *et al.*, 2002). In the same way, application or otherwise of a purification process to a FOS considerably influences the real GFn or FFn-type oligomer content in marketed products. According to Grizard & Barthelemy (1999), these contents may be only 55% in synthetic FOS due to the persistence of synthesis precursors (sucrose, glucose and fructose). A content in the same region (60%) is reported for Raftilose<sup>®</sup> L60, produced by partial hydrolysis and which contains 30% sucrose and 10% glucose + fructose (Menne *et al.*, 2000).

The example of fructans illustrates the heterogeneity of chemical structures grouped together under the same name. Although less well documented in the case of other prebiotics, this heterogeneity can be at least partially transposed to these (Grizard & Barthelemy, 1999; Frank *et al.*, 2002). This heterogeneity represents an obstacle to the comparability of studies intended to demonstrate the physiological effects of prebiotics and could be a source of controversy with respect to the real prebiotic nature of certain substances, such as starches (Bird *et al.*, 2000, Topping *et al.*, 2003) or laminaran oligosaccharides (Michel *et al.*, 1999). In addition, in the event that monosaccharide dimers or monomers coexist in the commercial product and they are not eliminated before testing, the validity of the results is subject to caution due to the potential digestibility of these compounds (reduction in the real prebiotic dose, energy contribution *in vivo*, non-relevant contribution to fermentations *in vitro*, etc.).

## 3. Biochemical structure of prebiotics and effects on flora

The chemical structure of fructans affects their use by pure bacterial strains. Thus, the acidification of culture media containing FOS is greater than that of media containing inulin. (Roberfroid *et al.*, 1998), GF4 are more rapidly fermented with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus GG* than GF3 and GF2 (Kaplan et Hutkins, 2000), FOS are more rapidly fermented than inulin by *Lactobacillus paracasei* (Kaplan & Hutkins, 2003), branched and linear oligofructoses enable more marked growth of *Bifidobacterium catenulatum* than inulin does (Gibson & wang, 1994a), Raftilose<sup>®</sup> P95 and Raftiline<sup>®</sup> synergy1 (a mixture of FOS and inulin) enable growth of *Bifidobacterium animalis* and *B lactis* in contrast with Raftiline<sup>®</sup> HP



(Van der Meulen *et al.*, 2004; Janer *et al.*, 2004), the production of lactate by pure strains of *Bifidobacterium* sp. appears to be inversely proportional to the polymerisation degree of the fructans provided (Perrin *et al.*, 2002) and the degree of hydrolysis of inulin by the beta-fructofuranosidase of *B. lactis* is markedly lower (10 to 37%) than that of Raftilose® or Actilight® (80 to 100%) (Erhmann *et al.*, 2003; Janer *et al.*, 2004). An influence of the chemical structure is also observed for pectins, the use of which by pure bacterial strains is affected by the polymerisation and methylation degrees (Olano-Martin *et al.*, 2002).

The chemical structure of fructans also seems to affect the speed with which they are fermented by the total intestinal flora (Roberfroid *et al.*, 1998; Smiricky *et al.*, 2003) but does not appear to alter the intensity of the resulting short-chain fatty acid production (Wang & Gibson, 1993; Campbell *et al.*, 1997; Rycroft *et al.*, 2001; Kleessen *et al.*, 2001; Vickers *et al.*, 2001; Smiricky *et al.*, 2003). Conversely, in the case of oligoxylosides, the present and nature of ramifications appears to affect both the fermentation speed and the total quantity of short-chain fatty acids produced (Kabel *et al.*, 2002).

The intensity of the bifidogenic effect of fructans seems to be relatively independent on their chemical structure (Gibson *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1997; Rycroft *et al.*, 2001; Palframan *et al.*, 2002), although initially a greater bifidogenic effect was attributed to FOS than to inulin (Gibson *et al.*, 1994b). Inversely, the bifidogenic character of oligodextrans is presented as being dependent on their polymerisation degree (Olano-Martin *et al.*, 2000).

The incidence of various fructans on the other bacterial populations in the intestinal flora is less well documented and appears to be structure-dependent. Indeed, Raftilose® P95 and Raftiline® LS do not have exactly the same effects *in vitro* (Rycroft *et al.*, 2001) and the effects of Raftilose® and Raftiline® HP differ *in vivo* (Kleessen *et al.*, 2001).

The chemical structure of fructans interacts with their capacity to stimulate the absorption of calcium. Thus, inulin appears to be more effective than FOS or a mixture of FOS + inulin to stimulate the absorption of calcium by the bones in rats (Kruger *et al.*, 2003). Similarly, a mixture of inulin + FOS more effectively stimulates calcium absorption in adolescents than FOS alone (Griffin *et al.*, 2002). Finally, a mixture of FOS + inulin is more effective than FOS alone to increase the intestinal absorption of calcium in rats (Coudray *et al.*, 2003). However, the most effective chemical structure is still to be established since in the latter study, the FOS-inulin mixture was shown to be more effective than inulin alone. The chemical structure of fructans also appears to interact with their capacity to prevent the development of foci of aberrant crypts and tumours in carcinogenesis models in animals (chemical induction or genetic models). Inulin induces a smaller number of foci of aberrant crypts (Reddy *et al.*, 1997). This has been confirmed in a second study (Verghese *et al.*, 2002) which also demonstrated that the maximum protective effect was exerted by a FOS + inulin mixture.

#### **Important points**

- The chemical structure of fructans often interferes with their functional properties. The little information available suggests that this is true for other prebiotics.
- The chemical characteristics of the prebiotics used must be accurately communicated in the dossiers since the same name (“prebiotic family”) often conceals an extreme variability in chemical structures.
- Considering the differences in physiological effect observed between prebiotics from the same family, the demonstration of an effect for one compound cannot be extrapolated to another compound, even if the latter belongs to the same prebiotic family.
- *In vitro* studies aimed at simulating an *in vivo* situation must take into account the potential absorption in the small intestine of a proportion of the products tested. In other words, if a food product contains absorbable nutrients and a prebiotic, only the latter must be used in *in vitro* simulations of the effects on flora.

## VI- How can the existence of a bifidogenic effect be demonstrated?

---

### 1. Introduction

A bifidogenic effect is defined independently of any effect on health. Its definition could be an increase in the total bifidobacteria population and/or activity.

In practice, it is usually defined as an increase in the bifidobacteria population within the faecal flora. Indeed, quantification of the specific functions of bifidobacteria is not used at present, despite the fact that a characteristic metabolic pathway for this bacterial genus (fructose-6-phosphokinase activity) makes it a theoretical possibility. Similarly, the prevalence of dominant bifidobacteria carrying (more than  $10^8 \cdot \text{g}^{-1}$  stools) could also be considered as an indicator of a bifidogenic effect in the future.

A bifidogenic effect can be induced by a prebiotic or by a probiotic. The prerequisites necessary for validation of the effect are identical in both cases. According to some experts, an increase in total bifidobacteria explained solely by the intake of exogenous bifidobacteria is not, strictly speaking, a bifidogenic effect. They believe that in the case of a probiotic containing a strain of *Bifidobacterium* sp., specific quantification of this strain should be conducted in parallel with quantification of autochthonous bifidobacteria in order to identify their respective contributions to the increase in total bifidobacteria. New molecular biology techniques make this possible, with, for example, the development of oligonucleotide primers specific to a strain which can be applied in PCR (Brigidi *et al.*, 2000).

The parameters to be considered for assessment of the validity of a bifidogenic effect are related to the choice of experimental model, the study protocol, the method for counting bifidobacteria and the intensity and specificity of the effect observed (Rycroft *et al.*, 1999; Gibson & Fuller, 2000).

### 2. Experimental models *in vitro* and *in vivo*

Most studies have been conducted *in vitro*. These consist of cultures of faecal flora placed in contact with a substrate tested in closed, semi-continuous or continuous systems (see, for example: Gibson & Wang, 1994; Michel *et al.*, 1998; Rycroft *et al.*, 2001; Palframan *et al.*, 2002; Bello *et al.*, 2001). Fewer tests have been conducted in conventional animal models (rodents, pigs, etc.) (Campbell *et al.*, 1997; Smiricky-Tjardes *et al.*, 2003) or heterozenic models (in which a human flora was inoculated) (Kleessen *et al.*, 2001). The validity of these studies in terms of prediction of an effect in humans is not known. *In vitro* models do not reproduce the phenomena of adhesion of bacteria to the mucosa nor the exchanges (absorption/secretion) (Rycroft *et al.*, 1999). Furthermore, the intestinal flora of animals differs both qualitatively and quantitatively from that of humans and the colonic physiology of heterozenic animals remains different from that in man (Rycroft *et al.*, 1999; Gibson & Fuller, 2000). Consequently, despite their value for identifying a potential and/or comparing several substances, these models do not provide sufficient evidence of a bifidogenic effect that may be expressed in humans. The definitive demonstration of a bifidogenic effect therefore requires the implementation of studies in humans.

### 3. Protocol of studies in humans

Around twenty studies specifically devoted to characterisation of the incidence of prebiotics on the composition of the faecal flora have been conducted *in vivo* in healthy humans: Alander *et al.*, 2001; Alles *et al.*, 1999; Bouhnik *et al.*, 1996; 1997; 1999; 2004; Brighenti *et al.*, 1999; Buddington *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 1997; Cherbut *et al.*, 2003; Gibson *et al.*, 1995; Hidaka *et al.*, 1986; 1991; Ito *et al.*, 1990; 1993a; 1993b; Kleessen *et al.*, 1997; Kruse *et al.*, 1999; Le Blay *et al.*, 1999; Matteuzi *et al.*, 2004; Menne *et al.*, 2000; Ohkusa *et al.*, 1995; Rao, 2001; Tuohy *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 1994.

These studies demonstrate a high level of variability, primarily as regards the nutritional intervention protocol but also with respect to the stool treatment method.

#### Study protocol:

**Nature of the prebiotic** (cf. chapter 5): most of these studies are dedicated to fructans, followed, in decreasing order of frequency, by galactosides and lactulose, then certain specific substrates that have only been studied once (wheatgerm, lactosucrose, acacia gum). The pioneering studies generally omitted to specifically indicate the exact nature of the prebiotic used (ex.: Hidaka *et al.*, 1991). More recent studies do not generally present this drawback and indicate the trade name of the product (ex.: Kruse *et al.*, 1999), or even the actual oligosaccharide composition of the commercial product (ex.: Alles *et al.*, 1999).

**Quantity of prebiotic:** the daily dose of prebiotic administered is generally between 2.5 and 15 g, which appears realistic. Higher doses (34 and 40 g.d<sup>-1</sup>) have only been studied in the case of fructans (Kruse *et al.*, 1999, Kleessen *et al.*, 1997, respectively). It should be noted that dose effects have only been considered in exceptional cases (Bouhnik *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 1990; Cherbut *et al.*, 2003).

**Duration of supplementation:** Supplementation durations of more than one month have only been considered in exceptional cases (Ohkusa *et al.*, 1995; Kruse *et al.*, 1999; Bouhnik *et al.*, 2004). It is regrettable that the real long-term effects (>6 months) have only been considered in humans in the study conducted by Hidaka *et al.* (1991), which can otherwise be much criticised, whereas results obtained in rats suggest that the bifidogenic effect is only transient (Le Blay *et al.*, 1999).

**Number of volunteers:** This must be sufficient to respond to the question asked (Cf. question 11). With the exception of the study by Matteuzi *et al.* (2004) which included 32 volunteers, the nutritional intervention studies commented on here generally concerned less than around ten individuals.

**Volunteer characteristics:** With the exception of the studies conducted by Hidaka *et al.* (1986 and 1991) and Kleessen *et al.* (1997), the subjects involved are generally presented as healthy volunteers. Verification of the absence of medication (particularly antibiotic treatments) prior to inclusion is practically systematic but the duration concerned by this verification is extremely variable: from 2 weeks (Ito *et al.*, 1990 and 1993a) to 12 months (Alles *et al.*, 1999). It is a pity that the lactase-deficient nature of the volunteers was only verified in exceptional cases (Alles *et al.*, 1999; Cherbut *et al.*, 2003), the absence of this test when lactose is used as a placebo being particularly regrettable (e.g.: Kleessen *et al.*, 1997). The mean age of the volunteers is generally indicated. It is usually in the region of 30-45 years but a high level of disparity is frequently encountered (18-75: Alles *et al.*, 1999; 20-55: Tuohy *et al.*, 2001; 20-50: Menne *et al.*, 2000). This disparity may have an influence on the effects observed since diversification of flora is seen with age (cf. question 1).

**Type of protocol:** The use of a double-blind protocol is specified only in exceptional cases (Kleessen *et al.*, 1997; Tuohy *et al.*, 2001; Tuohy *et al.*, 2002; Bouhnik *et al.*, 2004; Matteuzi *et al.*, 2004). Some studies, particularly those conducted by Bouhnik (Bouhnik *et al.*, 1996; 1997; 1999; 2004; Campbell *et al.*, 1997; Alander *et al.*, 2001; Tuohy *et al.*, 2002), involve 2 groups of individuals (a "control" group and a "test" group) but in most cases, the subjects are used as their own controls, without this pairing being clearly indicated in the statistical analysis (paired test reported only by Gibson *et al.*, 1995; Tuohy *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 1993a; Bouhnik *et al.*, 1996). Half of the studies do not include a placebo and the composition of the flora observed following intake of the test product is then compared to that observed before the nutritional test. Consequently, only the study by Ito *et al.* (1990) indicates the use of a random distribution mode for the diets.

**Diet:** The diet of the subjects during the nutritional test is rarely strictly controlled (Gibson *et al.*, 1995; Buddington *et al.*, 1996; Kleessen *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 1997; Alles *et al.*, 1999; Cherbut *et al.*, 2003) but very frequently restricted: the prohibited foods are usually sources of fructans (salsifies, onions, asparagus, leeks, squash, banana, etc.) and fermented products (fermented milks mainly). In some cases, foods thought to cause symptoms of gastric discomfort are also eliminated from the diet (Bouhnik *et al.*, 1996). The study by Menne *et al.* (2000) was original in that it assessed the bifidogenic effect of Raftilose L60 in volunteers successively subjected to a controlled diet and then a non-controlled diet: under both conditions, a stimulation in bifidobacteria was detected in comparison with the control and no difference was detected between the two diets.

**Placebo:** The use of a placebo is only reported in 14 of the studies analysed. This placebo is usually sucrose (Gibson *et al.*, 1995; Bouhnik *et al.*, 1996; Bouhnik *et al.*, 1997; Rao, 2001; Bouhnik *et al.*, 2004; Cherbut *et al.*, 2003) and indigestible in exceptional cases (Brighenti *et al.*, 1999). This digestible nature makes it difficult to establish the specificity of the bifidogenic effect reported (in comparison with other indigestible substances). Insofar as no indigestible carbohydrate has to date been recognised as being devoid of any bifidogenic effect, the working group is not in a position to recommend the use of any particular placebo.

#### **Important point**

The group considers the best protocol to be a randomised, double-blind study on a sufficient number of individuals including control of diet and a suitable placebo.

#### **4. Count method and expression of results**

In the first studies, the bifidobacteria population was measured by culturing freshly collected stools on selective medium (Ito *et al.*, 1990; Hidaka *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1994; Ohkusa *et al.*, 1995; Gibson *et al.*, 1995; Buddington *et al.*, 1996; Bouhnik *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 1997; Bouhnik *et al.*, 1997; Kleessen *et al.*, 1997; Alles *et al.*, 1999; Bouhnik *et al.*, 1999; Menne *et al.*, 2000; Alander *et al.*, 2001; Cherbut *et al.*, 2003; Bouhnik & Bornet, 1998). This technique must be applied to freshly collected stools stored (= 1 hour) in anaerobic conditions in order to be valid, and frozen stool cultures (Campbell *et al.*, 1997; Kleessen *et al.*, 1997) are not recommended.

Although several media have been proposed for a selective count of bifidobacteria, none possesses satisfactory selectivity (Hartemink & Rombouts, 1999; Roy *et al.*, 2001; Mikkelsen *et al.*, 2003). Verification of the identity (as concerns the genus) of the colonies counted must therefore be carried out. Various processes (identification ranges, testing for fructose-6-phosphatekinase activity, examination under a microscope following Gram staining, identification of fermentary metabolites, genus-specific PCR) can be used for these purposes. This phase is not systematically applied (Ito *et al.*, 1990; 1993a; 1993b; Bouhnik *et al.*, 1996; 1997; 1999; 2004; Campbell *et al.*; 1997; Alander *et al.*, 2001), which limits the reliability of the counts made.

The culture results are then expressed in CFU (colony-forming units) per gram of stools (fresh weight or dry weight) or in Log10 of this value. Expression as a percentage of total cultivable bacteria is sometimes encountered (Ito *et al.*, 1990; Hidaka *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 1993a; Buddington *et al.*, 1996; Bouhnik *et al.*, 1996; Roberfroid *et al.*, 1998) but this is very dubious and we believe that it should be rejected given the proportion of non-cultivable bacteria present in the intestinal flora.

For the last ten or so years, it has also been possible to determine the bifidobacteria population using more specific molecular tools (but nonetheless less sensitive) than conventional culture methods. These methods can be applied to frozen stools, after a preliminary fixing treatment or otherwise (fixed with paraformaldehyde immediately after collection of the stools, faecal bacterial suspensions are stored at -80°C and can be analysed

for 8 to 10 months, Rochet *et al.*, 2004). Apart from a few exceptions (e.g. Requena *et al.*, 2002), the methods target DNA encoding ribosomal RNA. Some are quantitative, absolute (in *situ* hybridization using “ISH”-labelled oligonucleotide probes; quantitative PCR) or relative (hybridization on a membrane or “Dot Blot”). Purely qualitative methods must be prohibited; thus, extrapolation of the sequencing results of a few bands obtained by DGGE to conclude that there is a bifidogenic effect is not valid (Bello *et al.*, 2001).

*In situ* hybridization is the most widely used method (Kruse *et al.*, 1999; Tuohy *et al.*, 2001a; Tuohy *et al.*, 2001b; Matteuzzi *et al.*, 2004). However, early studies refer to the use of quantitative PCR (Vitali *et al.*, 2003; Matsuki *et al.*, 2004; Gueimonde *et al.*, 2004). The validity of these techniques depends on the specificity of the oligonucleotide sequences used as probes or primers. In the case of quantitative PCR targeting the *Bifidobacterium* genus, the other limitations are the heterogeneity of the efficacy of primers with respect to various species and the variability within the genus in the number of DNA copies encoding ribosomal RNA. These reservations are no longer relevant when the primers are specific to a species or a strain.

The results of independent culture methods can be expressed in CFU (colony-forming units) per gram of stool or in genome equivalents or in Log10 of these values. Expression as a percentage may also be accepted on condition that a total flora count has also been conducted using a method independent of culturing (generally using a universal “eubacteria” probe: Kruse *et al.*, 1999; DAPI: Tuohy *et al.*, 2001a; Bactlight kit: Matteuzzi *et al.*, 2004).

## 5. Intensity and specificity

To compare the intensity of the prebiotic effect exerted by various products, certain authors have proposed defining “prebiotic indices” (Olano-Martin *et al.*, 2002; Palframan *et al.*, 2003; Vulevic *et al.*, 2004; Roberfroid *et al.*, 2004). The first 3 proposals are based on increasingly exhaustive analysis of the main bacterial genera present in the flora and on calculation of the sum of modifications observed (increases and decreases expressed relatively or otherwise in relation to total bacteria).

$$\text{PI Olano-Martin} = \text{PI Palframan} =$$

$$(? \text{Bifidobacterium} / ? \text{total}) + (? \text{Lactobacillus} / ? \text{total}) - (? \text{Bacteroides} / ? \text{total}) -$$

$$(? \text{Clostridium} / ? \text{total})$$

$$\text{PIm Vulevic} = \mu_{\max} \text{Bifidobacterium} + \mu_{\max} \text{Lactobacillus} + \mu_{\max} \text{Eubacterium} -$$

$$\mu_{\max} \text{Bacteroides} - \mu_{\max} \text{Clostridium} - \mu_{\max} \text{E.coli} - \mu_{\max} \text{sulphate-reducing bacteria}$$

The working group does not retain these prebiotic index suggestions since they are based on the concept of “good versus bad bacteria”, rejected in chapter 1. The last proposition consists in calculating the ratio between the variation in the bifidobacteria concentration observed and the quantity of prebiotic consumed:

$$\text{PI Roberfroid} = ? \text{Bifidobacteria} / \text{quantity of prebiotic substance ingested}$$

This index, which takes into account the dose effect, could make it possible to hierarchise the various prebiotics. However, the diversity of methodologies employed probably makes the transposability of this index from one study to another debatable.

Irrespective of the methodology used, statistical significance is mandatory to confirm the stimulation of microbial populations and this gives rise to several comments. Bifidobacteria are not systematically a component of the dominant faecal flora and therefore the distribution of populations observed using tools only giving access to dominance is usually non-Gaussian. This factor must be taken into account when selecting statistical tests.

Some studies divide the populations studied into “responders and non-responders”, based on the hypothesis that the bifidogenic effect is inversely proportional to the baseline

bifidobacteria population (Rao *et al.*, 2001; Tuohy *et al.*, 2001a; Cherbut *et al.*, 2003). A non-significant effect on the general population could therefore mask a real heterogeneity between individuals; thus the typology and dispersion of responses warrant a certain degree of attention. However, a separate analysis of “responders/non-responders” means discussing a non-systematic effect and can only have any relevance if, *a priori*, the effect sought concerns a specific target population. Above all, the right statistical comparison in this specific case must be versus a control group with the same characteristics (randomised) and not receiving the product but, rather, a control (controlled randomised study in the sub-group of “target” subjects).

It is difficult to assess the specificity of the bifidogenic effect, in terms of stimulated bacterial populations, solely on the basis of non-evolution in the total bacterial population due to the numerical disproportion existing between these two bacterial populations. In future, a broad analysis of the various dominant groups should be conducted.

#### **Important points**

- At present, the “practical” definition of a bifidogenic effect is considered to be an increase in bifidobacteria population within the colonic and/or faecal flora. Other criteria could also be used, such as the prevalence of these bacteria or the stimulation of one or more functions specific to them.
- The demonstration of a bifidogenic effect cannot be based on the use of *in vitro* models alone, but requires one or more controlled studies in humans (randomised studies, ideally conducted under double-blind conditions on a sufficient number of individuals including control of diet and a suitable “placebo”). The working group is not in a position to recommend the use of a specific placebo valid whatever the study.
- The method used to count bifidobacteria can be either culturing, *in situ* hybridization using specific oligonucleotide probes or quantitative PCR in the presence of specific primers, on condition that they are correctly applied (fresh stools stored for less than an hour under anaerobic conditions and verification that the colonies counted belong to the *Bifidobacterium* sp. genus in the case of culturing, validation of the specificity of the probes and primers in the case of molecular biology techniques, specification with respect to the efficacy of the primers in the event of quantitative PCR) and suitable expression of results (expression as a percentage reserved for molecular biology techniques).
- The use of prebiotic indices based on the concept of “good versus bad bacteria” is not acceptable.
- The recognition of a bifidogenic effect must, in all cases, be based on valid statistical analysis. Demonstration of a bifidogenic effect is insufficient to claim any effect on health.

## VII- Effect of probiotics on intestinal flora

---

### 1. Introduction

Few studies have specifically studied the incidence of fermented milk and probiotic supplements on the composition of the intestinal microflora in adult humans. We have analysed and commented on the most interesting ones hereafter.

### 2. Review and criticism of a few of the most significant studies

In the controlled randomised study by Collins *et al.* (2002), 80 volunteers received a fermented milk containing  $10^{10}$  CFU *L. salivarius* UCC118/day (n=20) for 21 days in comparison with fresh milk (n=20) or the corresponding controls (n=20, each group). UCC118 supplementation led to a significant increase in faecal lactobacilli and enterococci counts. Bifida, *Bacteroides* and enterobacteria were not significantly modified. A concomitant increase in salivary IgA and phagocyte activity of granulocytes was observed with the probiotic. The classic bacteriological methods used in this study are suitable since they concern microorganisms which are not extremely oxygen-sensitive.

In the study by Fujiwara *et al.* (2001), 7 healthy volunteers received  $10^{11}$  CFU lyophilised *B. longum* orally in 200 mL milk every day for 7 days. With the exception of enterobacteriaceae and lecithinase-negative clostridia (not *C. perfringens*), which were significantly reduced by around 1 logarithmic unit, none of the numerous populations analysed were significantly affected by the transit of bifida at a concentration of  $10^7$ - $10^8$  (total anaerobic microorganisms, bifida, *Eubacterium*, bacteroidaceae, peptococcaceae, *Veillonella*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*). A significant reduction in beta-glucuronidase and beta glucosidase activities in the stools was observed in parallel. The anaerobic bacteriology methodologies used in this study are appropriate for anaerobic microorganisms, even extremely oxygen-sensitive ones.

In the randomised, placebo-controlled study conducted by Spanhaak *et al.* (1998), 20 healthy volunteers orally received either  $10^{11}$  CFU *L. casei* Shirota per day in 3 x 100 mL fermented milk or 3 x 100 mL non-fermented milk per day, for 28 days. In comparison with the control group, in which the faecal flora remained unchanged throughout the entire study, the administration of *L. casei* Shirota was accompanied by faecal excretion of the probiotic at a concentration of  $10^7$ .g<sup>-1</sup> stools and a significant but transient increase in bifidobacteria. A number of other microbial groups tested (total anaerobic microorganisms, *Bacteroidaceae*, enterococci, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, etc.) remained unchanged, as in the controls. The functional parameters monitored (enzymatic activities of stools or immunological parameters) were not conclusively modified.

The study by Tannock *et al.* (2000) conducted on 10 healthy volunteers included a 15-month follow-up period during which all the volunteers received a fermented milk product from months 6 to 12 containing  $1.6 \times 10^9$  *Lactobacillus rhamnosus* DR20 per day. The various classic and molecular methods used for monthly analysis of faecal flora led to the following observations:

- *L. rhamnosus* DR20 transited at variable levels depending on the volunteer and this parameter appeared to be influenced by the diversity of autochthonous lactobacilli.
- The consumption of the fermented milk product containing *L. rhamnosus* DR20 was accompanied by a transient significant elevation in total lactobacilli counts ( $4.8 > 5.1 \log_{10}$ .g<sup>-1</sup> stools) and enterococci ( $3.5 > 5.2 \log_{10}$ .g<sup>-1</sup> stools). It was also accompanied by a transient increase in the frequency of lactobacilli detection (from 76 to 100%).
- The few differences observed for other groups and for certain subjects only, did not lead to a significant change for the population studied.

- The consumption of the fermented dairy product containing *L. rhamnosus* DR20 was not accompanied by significant modifications in biochemical parameters such as SCFA and beta-glucuronidase or azoreductase activities.

The anaerobic bacteriological methodologies used in this study are appropriate. The stools were processed within an hour following their emission.

### 3. Recommendations for the study protocol

- **Which microbial groups should be analysed?** It is important to try to characterise as exhaustively as possible the dominant components of the flora, such as *Bacteroides* (and related microorganisms), the *Eubacterium rectale-Clostridium coccoides* group and the *Clostridium leptum* group, along with bifidobacteria. Lactobacilli, streptococci and enterococci and enterobacteria are sub-dominant populations, monitoring of which may be decided upon, depending on the microbial genus to which the probiotic belongs. Classic bacteriological approaches do not enable monitoring of these groups and molecular approaches should therefore be favoured. In the absence of these, it remains important to characterise the dominant flora as exhaustively as possible using the selective media available and the strictest possible anaerobic techniques.
- **Which analysis methods should be used?** Fluorescent in situ hybridization (ISH) appears to be well suited to these requirements and when it has been possible to compare these for bifida and *Bacteroides* for example, culturing and ISH were not significantly different (Langendijk *et al.*, 1995, Tannock *et al.*, 2000). Quantitative PCR seems to represent an entirely suitable alternative for analysis of faecal samples, offering a quantification threshold of  $4 \log_{10} \cdot g^{-1}$ , but the necessary systems have not yet been validated.
- **Which measurement units should be used?** Absolute measurement in  $CFU \cdot g^{-1}$  is the reference for cultures. Quantitative PCR makes it possible to approach this, giving access to a measurement in genome equivalents  $\cdot g^{-1}$  stools; or even in  $CFU \cdot g^{-1}$  for a given strain. The use of ISH has more rarely led to absolute quantification, with relative quantification as a % of total bacteria radiolabelled using a general probe being preferred for the purposes of experimental rigour.



## VIII- Effect of pre- and probiotics on the immune system

---

### 1. Introduction

The intestinal homeostasis is a result of a number of mutually dependent parameters. Establishing a balance depends on the capacity of the intestinal mucosa to absorb nutrients, fluid-electrolyte exchanges and maintenance of the epithelial barrier with respect to dietary pathogens and antigens. This balance involves numerous interactions between epithelial, endocrine, stromal and immune cells and the microflora. Any dysfunction can lead to chronic local inflammation, causing an imbalance in absorption mechanisms (nutrients, ions) and secretion mechanisms (ions, mucus, IgA). The bacterial microflora plays a major role in maturation of the epithelial integrity and also in modulation of immune responses to luminal antigens. Like the resident flora, probiotics can interfere with the immune system of the host. They pass through the intestinal lumen and, in particular, are separated from the local immune system by the epithelial barrier. They can communicate with the cells of the *lamina propria*, either indirectly by sending signals (cytokines) via the enterocytes, or directly by contact, in the event of translocation to the *lamina propria* and the mesenteric lymph nodes. This translocation phenomenon is minimal in normal conditions. Probiotics can also release compounds in the intestinal lumen, which are liable to be absorbed by the intestinal epithelium and to act on the immune cells.

### 2. Effect of probiotics on innate immunity

The innate immunity mainly uses mechanisms intended to rapidly and non-specifically eliminate pathogenic microorganisms by the phagocytes or to eliminate foreign molecules by stimulating the activity of NK (natural killer) lymphocytes. These mechanisms involve phagocytosis of pathogenic bacteria by the macrophages via recognition of highly conserved bacterial patterns known as “PAMPS”, which stands for “Pathogen Associated Molecular Patterns”, by the immune cells. The receptors involved in recognition of these patterns are TLRs (Toll-like receptors), and their activation triggers a cascade of intracellular signals leading to nuclear translocation of the NF $\kappa$ B transcription factor and release of pro-inflammatory cytokines or chemokines, such as TNF $\alpha$  or IL8. TLR4 is a receptor for lipopolysaccharide (LPS), which is a major component in the walls of gram (-) bacteria, TLR2 recognises the peptidoglycan of gram (+) bacteria, TLR3 double-stranded DNA, TLR5 flagellin and TLR9 bacterial DNA (non-methylated CpG patterns).

Innate immunity is generally evaluated by release of cytokines, phagocytosis or NK activation under the stimulant effect of bacteria (walls).

#### 2.1 Stimulation of innate immunity in humans (or in human cell lines)

A distinction must be made between clinical studies and studies conducted *in vitro* in which mononuclear blood cells are placed in direct contact with probiotics.

##### 2.1.1 Non-controlled clinical trials

The ingestion of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* for 3 weeks in healthy volunteers did not lead to modifications in the distribution of lymphocyte sub-types, but triggered an increase in phagocytosis (Schiffrin *et al.*, 1995). In healthy volunteers receiving 150 mL/day milk fermented with *Lactobacillus johnsonii*, phagocyte activity was increased with  $10^7$  CFU/ml but not with  $10^6$  CFU/ml (Donnet-Hughes *et al.*, 1999). The administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG for 5 weeks led to an increase in CD4<sup>+</sup> T activation by the faecal flora. However, the secretion of TNF $\alpha$ , IL6 and IFN $\gamma$  cytokines was less marked in the presence of *Lactobacillus rhamnosus* GG, whereas IL10 and IL4 secretions were increased (suggesting the involvement of regulatory T cells). This indicates a reduction in the secretion of pro-inflammatory cytokines and an increase in suppressive cytokines by *Lactobacillus rhamnosus* GG (Schultz *et al.*, 2003). Another study

reported a reduction in the depression of NK activity observed in top-level athletes (Pujol *et al.*, 2000) following the consumption of milk fermented with *Lactobacillus casei* DN-114001, *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*.

### 2.1.2 Double-blind controlled clinical trials

In healthy subjects, *Lactobacillus rhamnosus* GG had an immunostimulant effect (increase in phagocytosis receptors CR1 and CR3 and IgG and IgA receptors) whereas, conversely, in subjects presenting hypersensitivity to milk, a reduction in the high expression of these receptors was observed (Pelto *et al.*, 1998). A double-blind, placebo-controlled clinical trial including 25 subjects (60-83 years) having consumed milk supplemented or otherwise with *Bifidobacterium lactis*,  $1.5 \times 10^{11}$  CFU/day for 6 weeks demonstrated an elevated secretion of IFN $\alpha$  (peripheral blood), an increase in phagocytosis by polymorphonuclear cells (PMN) and an increased bacterial activity, 3, 6 and 12 weeks after the end of the intervention (Arunachalam *et al.*, 2000). In 52 healthy volunteers (63 years old) receiving *Lactobacillus rhamnosus* ( $5 \times 10^{10}$  CFU/day) in 3 phases (wash in, trial, wash out), the phagocytic activity of PMN increased by 15% and the NK tumoricidal activity by 70 to 150%, with these values slowly returning to baseline after treatment was stopped (Sheih *et al.*, 2001). The same results were obtained in a trial using the *Bifidobacterium lactis* HN019 strain (Chiang *et al.*, 2000). Also, in 30 healthy volunteers aged between 64 and 84 years consuming, for 3 periods of 3 weeks, skimmed milk, skimmed milk + *Bifidobacterium lactis* at a high dose ( $5 \times 10^{10}$  /day) or at a low dose ( $5 \times 10^9$  /day), then skimmed milk again, it was observed that, irrespective of the dose, *Bifidobacterium lactis* induced an increase in the proportion of activated T cells (CD4+ CD25+) and NK cells. Furthermore, an increase in phagocytosis and NK activity was also observed (Gill *et al.*, 2001). However, the NK stimulant activity is not found for all probiotic strains (Spanhaak *et al.* 1998). Although most of these studies are suggestive of a potential strengthening of the innate immunity acting as the first line of defence in the event of infections, very few studies have analysed the impact of probiotic supplementation on the incidence of episodes of infection. However, Turchet *et al.* (Turchet *et al.*, 2003) studied 360 elderly subjects, divided into 2 groups receiving or not receiving supplementation with a fermented milk (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus* and *L. casei* DN-114001) for 3 weeks, and demonstrated that the supplemented group had the same winter infection rate as the control group but that the duration of the infections was shorter (7 days vs 8.7 days) in the supplemented individuals.

### 2.1.3. *In vitro* studies of the cytokine responses of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated by probiotics

The walls of gram (+) bacteria stimulate monocytes/macrophages *via* TLR-2. In fact, there is an increase in macrophage response in the presence of lipoteichoic acids, which is a component of the membranes of gram (+) bacteria. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), stimulated by *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *bifidobacterium* sp or *Lactobacillus helveticus* secrete IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  (Solis Pereyra B & Lemonnier, 1993). This non-specific secretion of cytokines (TNF $\alpha$ , IL6, IL10) appears to be more important in the presence of live bacteria than in the presence of dead bacteria (Miettinen *et al.*, 1996). Various strains of *Streptococcus thermophilus* also stimulate the secretion of TNF $\alpha$  and IL6 cytokines, with the intensity of the response being strain and dose-dependent, and often in a more intense manner than *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium adolescentis* or *Bifidobacterium Bifidum* (Marin *et al.*, 1998).

The secretion of interleukins may differ according to whether it is stimulated by gram (+) bacteria (IL12) or gram (-) bacteria (IL10) (Hessle *et al.*, 1999). This phenomenon has been confirmed in a more recent study in which *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus sakei* increased the secretion of IFN $\gamma$  and IL12 (Th1) whereas *E.coli* stimulated the secretion of IL10 (Th2) instead, with both bacterial strains also stimulating NK activation (increase in CD69 and CD25) and cell proliferation (Haller *et al.*, 2000).

Finally, with respect to secretion of IL8 chemokine, a chemotactic factor of polynuclear neutrophils, the lactobacilli, bifidobacteria and streptococci contained in probiotic mixture VSL#3 along with *Lactobacillus rhamnosus* GG (all gram +) did not induce any secretion of IL8 by the enterocytes (human intestinal cell line HT29) whereas *E.coli* Nissle1917 (gram -) induced secretion (Lammers *et al.*, 2002).

## 2.2 Stimulation of innate immunity in mice, rats or animal macrophage lines

A number of studies demonstrate *stimulation of macrophages* (migration, secretion of cytokines, phagocytosis) in animals (Hidemura *et al.*, 2003; He *et al.*, 2002; Gill & Rutherford, 2001; Gill *et al.*, 2000; Hatcher & Lambrecht, 1993). Similar stimulation results have been obtained on immune cells isolated from Peyer patches (Yasui & Ohwaki, 1991).

### Important points

- *In vitro* studies indicate that probiotics can lead to stimulation of Th1 cytokine secretion, usually IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , by the immune cells, with strain-dependent effects.
- However, these studies involve direct contact between the bacteria and the immune cell, which is probably not representative of the intestinal physiology.
- *In vitro* studies do not take into account the cytokine environment and interactions with other cell types involved *in vivo*, which poses the question of the relevance of the responses obtained in this simplified context.
- The secretion of cytokines studied on circulating immune cells (and not on local intestinal cells) is probably not a reflection of local phenomena. For example, it is known that the tone suppressor (TGF $\beta$ ?IL10) present in the intestinal mucosa negatively regulates the expression of LPS receptors (CD14) on the local macrophages and that these cells isolated from the *lamina propria* respond little or not at all to LPS (Zareie *et al.*, 2001), in contrast with circulating cells. No claims can thus be supported for these tests *in vitro*.
- All the clinical studies conducted in humans converge to suggest modulation of innate immunity (activation of phagocytosis and NK lymphocytes) by oral administration of various strains of lactobacilli and bifidobacteria. However, very little is known about the real consequences with respect to improved efficiency of the immune response in the event of bacterial or viral infections and on the repercussions of this infection (speed of recovery, influence of antibody levels, incidence of infection rates in a given age group, etc.).

## 3. Effect on adaptive immunity

Adaptive immunity is specific to an antigen and slower to develop than innate immunity. After contact with an antigen or a microorganism, the immune system responds by producing protective antibodies (IgG, IgA) and by activating CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells. This specific immunity may be local for protection of the mucosa (IgA), or peripheral (IgG) for a more general response of the body.

### 3.1 Mucosal immunity: secretory IgA

When infectious antigens (bacterial or viral antigens) penetrate by the oral route, a secretory IgA response is triggered, aimed at stopping pathogens from entering the mucosa. When an intestinal flora is administered to axenic mice, the rapid appearance of plasmocytes containing IgA is observed in the intestinal *lamina propria* (Moreau *et al.*, 1982). It has therefore been suggested that the oral administration of probiotics could be used to activate secretory immunity.

#### In humans

Most studies have concerned children: in diarrhoea caused by rotavirus, *Lactobacillus rhamnosus* GG induced a greater increase in anti-rotavirus IgA secretion (Kaila *et al.*, 1992) when the bacteria were live (Kaila *et al.*, 1995). Again in children, following oral vaccination

against rotavirus, *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation led to a higher anti-rotavirus IgM response than in non-supplemented controls (Isolauri *et al.*, 1995). Two double-blind, placebo-controlled clinical studies conducted in children have reported contradictory results on the preventive effect of probiotics in the prevention of nosocomial rotavirus infections. Saavedra reported that the addition of *B. bifidum* and *S. thermophilus* to an infant milk formula protected the infants against diarrhoea caused by rotavirus (Saavedra *et al.*, 1994) while a recent double-blind clinical study demonstrated the absence of any effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on nosocomial infection with rotavirus in a hospital context (Mastretta *et al.*, 2002).

In a study conducted in healthy children, the administration of a fermented product containing bifidobacteria led to a significant increase in total faecal IgA levels and anti-poliovirus IgA levels while the product was being taken (Fukushima *et al.*, 1998).

In healthy adult volunteers (non-controlled study), the ingestion of milk fermented with *Lactobacillus johnsonii* LA1 and bifidobacteria for 28 days, along with an infectious stimulus (attenuated *Salmonella typhi*) led to an increase in the concentration in *Salmonella*-specific IgA levels, which were 4 times higher than those observed in subjects not receiving fermented milk (Link Amster *et al.*, 1994). However, a 28-day treatment with *Lactobacillus johnsonii* LA1 only induced a slight increase in total serum IgA levels and no modification in other Ig levels (Marteau *et al.*, 1997).

#### In animals

In mice receiving lactoserum proteins in their food, total and  $\beta$ -lactoglobulin-specific IgA levels measured in the gut were higher in the animals receiving *B. longum* (Takahashi *et al.*, 1998). In rats mono-colonised with pathogenic *E.coli* (type I fimbriae) or *E.coli* + *Lactobacillus plantarum*, the IgA response directed against *E.coli* was greater and T activation (CD25<sup>+</sup>) in the lamina propria was higher in rats having received lactobacilli (Herias *et al.*, 1999).

#### Important point

These results indicate a potential reinforcement of IgA secretory immunity against viral or bacterial pathogens in the intestinal mucosa under the effect of certain probiotics. However, the number of studies conducted is still low, particularly in adults. Furthermore, a correlation between higher secretory IgA levels and the prevention of infection is still a subject of debate.

### 3.2. Oral tolerance

Only studies in mice are available. The study of oral tolerance (cellular and humoral) to  $\beta$ -lactoglobulin in mice demonstrated that its development was better in conventional mice than in axenic or monoxenic mice colonised by *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii* or *Bifidobacterium lactis* Bb12 (Prioult *et al.*, 2003). In addition, *Lactobacillus paracasei* was a better tolerance inducer than the other two strains of probiotics (Prioult *et al.*, 2003).

### 3.3 Allergy

The idea of using probiotics in the treatment of allergic disorders is based on the fact that this condition could be associated with a disturbance in regulation of Th1/Th2 lymphocyte responses to exogenous antigens. Several theories including the hypothesis of hygiene have suggested that sterile modern lifestyles could be the source of the rise in allergic diseases. In developed countries, the immune system is less often called upon to respond to infections stimulating a Th1 response (pro-inflammatory cytokines, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ). In theory, a Th1 response can protect against the development of allergic diseases since Th1 and Th2 responses are considered to be mutually inhibitory. In the absence of infectious stimuli, the anti-parasitic defence system involving Th2 cytokines (IL4) and the secretion of IgE could be redirected against dietary antigens. However, other immune-regulatory mechanisms involving regulatory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes have been revealed. In fact, regulatory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (T<sub>H3</sub>, T<sub>R1</sub>, T<sub>R</sub>, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) can inhibit and control specific immune responses, either by direct cellular contact or by release of suppressive cytokines (IL10, TGF $\beta$ ).

Very few studies are available in adults and they are relatively contradictory. In a double-blind, placebo-controlled clinical study, the ingestion for 5 months of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 had no effect in 18 patients suffering from allergy to birch-pollen and apple food (Helin *et al.*, 2002). Some studies, mainly those conducted by the Erika Isolauri group in Finland, have suggested that *Lactobacillus rhamnosus* GG could help to reduce the symptoms of atopic dermatitis in children allergic to cow milk proteins fed by milk protein hydrolysates supplemented with *Lactobacillus rhamnosus* GG or *Bifidobacterium lactis* Bb12 (Majamaa & Isolauri, 1997; Isolauri *et al.*, 2000). A randomised, double-blind, placebo-controlled study also demonstrated that *Lactobacillus rhamnosus* GG given to atopic mothers before the birth of their child and to the child for 6 months after birth led to a marked reduction in atopic dermatitis, since this developed in 23% of the treated mother/child pairs and 46% of the untreated pairs (Kalliomaki *et al.*, 2001). This beneficial effect was found to persist in the same children at the age of 4 years (Kalliomaki *et al.*, 2003). In children suffering from allergic rhinitis, the ingestion of milk fermented with *Lactobacillus paracasei*-33 led to an improvement in symptoms and quality of life. However, these results were based only on answers to a questionnaire, making the study very incomplete (Wang *et al.*, 2004). Finally, in a double-blind controlled study, the daily ingestion of 200 g live yoghurt (but not thermised) for 1 year led to a reduction in total IgE levels in young adults (n=20) and, to a lesser degree, in elderly subjects (n=20), although serum levels of IgE specific to individual allergens were not modified (Van de Water *et al.*, 1999). In this study, only a subjective evaluation of the allergic symptoms was conducted, making it impossible to reach any firm conclusion with respect to a clinical benefit.

Some studies in mice show that *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus plantarum* can inhibit the production of antigen-specific IgE (Matsuzaki *et al.*, 1998; Shida *et al.*, 1998; Murosaki *et al.*, 1998). However, in a milk protein allergy model in guinea pigs, the oral administration of milk or milk fermented with *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium breve* led to the same allergic sensitisation in both groups, suggesting that fermented milk has the same sensitising capacities as milk (Terpend *et al.*, 1998). Finally, the administration of recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing a dust mite peptide (der p 1) by the nasal route in mice resulted in inhibition of IFN $\gamma$  and IL5 (eosinophil activator) production in animals sensitised to der p 1, suggesting an anti-allergic effect of the recombinant bacteria expressing the allergen (Kruisselbrink *et al.*, 2001).

All these results suggest that the Th1 response triggered by lactic bacteria could induce Th2 suppression. However, this interpretation is probably very simplistic since it cannot be reconciled with the fact that certain lactic bacteria are capable of alleviating inflammatory colitis (type Th1) in mice and having a positive action in certain inflammatory gastrointestinal diseases (see chapter on anti-inflammatory effect).

#### Important points

- No studies are available demonstrating a significant effect of a probiotic or a prebiotic on allergic conditions in adults.
- Only one group (E. Isolauri) has been able to show that the administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG or *Bifidobacterium lactis* Bb12 in mothers and children during the neonatal period reduces, firstly, the development of allergy (atopic dermatitis) and, secondly, symptoms in the allergic infants treated (preventive action and beneficial action in the event of treatment with extensively hydrolysed milk formulas). The few studies conducted in respiratory allergies (rhinitis, asthma) with two strains of lactobacilli (*rhamnosus* and *paracasei*) are contradictory and therefore leave the question open.

#### 4. Anti-inflammatory effect of lactic bacteria and/or their secretion products

A beneficial effect of lactic bacteria (and more specifically probiotic mixture VSL#3<sup>®</sup> containing lactobacilli, bifidobacteria and a streptococcus) has been observed in the

prevention of the recurrence or onset of pouchitis (Gionchetti *et al.*, 2000; Gionchetti *et al.*, 2003; Mimura *et al.*, 2004). Pouchitis is an inflammatory disease of the ileal reservoir created after ileo-anal anastomosis in the event of haemorrhagic coloproctitis. Only very little is known about the mechanisms involved in the therapeutic effect. These may involve secretion of immunomodulator substances triggering anti-inflammatory signals. In fact, a study of the interaction of commensal bacteria (non-pathogenic *Salmonella*) with epithelial cells shows that by inhibiting ubiquitination of I $\kappa$ B the bacteria reduces nuclear translocation of NF $\kappa$ B and the release of pro-inflammatory cytokines (Neish *et al.*, 2000). Other studies indicate an anti-inflammatory capacity of certain probiotics, lactobacilli, bifidobacteria, VSL#3 mixture in intestinal inflammatory models in animals (Madsen *et al.*, 2001; Madsen *et al.*, 1999; Caplan *et al.*, 1999) and in cryptogenic inflammatory diseases of the gut in humans (Gupta *et al.*, 2000; Borruel *et al.*, 2002). However, a controlled clinical study has shown that *Lactobacillus GG* was not effective in the prevention of recurrence following intestinal resection in Crohn's disease (Prantera *et al.*, 2002).

*In vitro*, the secretion products of *Lactobacillus rhamnosus GG* have an inhibitory effect on the production of TNF $\alpha$  in the presence of LPS by macrophages *in vitro* (Pena & Versalovic, 2003). Furthermore, an inhibitory effect on TNF $\alpha$  secretion by PBMC, induced by LPS in the presence of *B.breve* and *S.thermophilus* culture supernatants is also observed, with the inhibitory activity being capable of crossing the epithelial barrier (Menard *et al.*, 2004). Other recent studies show that the NO secreted by *Lactobacillus farciminis* has a marked anti-inflammatory capacity in TNBS-induced colitis in rats (Lamine *et al.*, 2004). The butyrate secreted by certain strains of bacteria is also considered to be anti-inflammatory since it inhibits NF $\kappa$ B and degradation of I $\kappa$ B (Segain *et al.*, 2000).

Finally, bacterial DNA and its CpG patterns could play a role in the suppression of inflammatory responses. In a study on peripheral blood mononuclear cells from healthy volunteers incubated with bacterial DNA from eight probiotic strains or with the resident flora before and after administration of probiotics, the DNA of the probiotics induced secretion of IL10 by the PBMC. The DNA extracted from the flora after probiotic treatment reduced the secretion of IL1 $\beta$  and increased that of IL10, suggesting a tolerogenic and anti-inflammatory effect of these probiotics (Lammers *et al.*, 2003). Finally, in a model of experimental colitis in mice, the anti-inflammatory effect of VSL#3 was linked to their DNA and to the DNA/TLR-9 interaction (Rachmilewitz *et al.*, 2004).

### Important points

Certain double-blind clinical trials have demonstrated the beneficial effect of a mixture of probiotics on the prevention of the onset or recurrence of pouchitis. Although the mechanisms for inhibition of TNF $\alpha$  secretion by the supernatants or DNA of probiotics are relatively well documented, the clinical results are more dubious and warrant confirmation in humans suffering from Crohn's disease or haemorrhagic coloproctitis.

### GENERAL CONCLUSION

- Ingesting microorganisms with a probiotic activity is not neutral for the immune system: under physiological conditions (healthy humans) and for a number of strains, most studies, going from the isolated cell to clinical trials, demonstrate an immunomodulatory effect (innate immunity and specific immunity, particularly Th1). The consequences of this immunomodulatory effect on health are not known. In certain pathological conditions (only demonstrated for pouchitis), some probiotics exert an anti-inflammatory effect, the mechanism of which is still to be elucidated.
- In the current state of our knowledge, we cannot draw up a positive list of universal markers for the influence of pre- and probiotics on the immune system. The relationship between a biological effect on immunity, irrespective of the type of effect, and an effect on health has still to be demonstrated, both in healthy subjects and under pathological conditions.

# IX- Effect of pre- and probiotics on intestinal functions

---

## 1. Introduction

Dietary prebiotics and probiotics generally make functional claims and are included in the broad group of “functional foods”. Demonstration of an effect on intestinal function is not a synonym for an action on health: the relationship between a physiological effect and health must be carefully analysed and documented, along with any variations in the results between one population and another. In terms of confirming the effects of prebiotics or probiotics on intestinal functions, a clear distinction must be made between effects described on the basis of physiological studies (i.e. on the normal human and/or animal gut, *in vivo* and/or *in vitro*) and those derived from pathophysiological studies (human and/or animal - *in vivo* and/or *in vitro*).

## 2. Digestion- intestinal absorption

### 2.1 Digestion of disaccharides

#### 2.1.1 Lactose

A stimulant effect of several probiotic strains on the digestion of lactose has been demonstrated by pathophysiological studies conducted *in vivo* in hypolactasic adults or those with short intestine syndrome:

- yoghurt (*i.e.* *Lactobacilli delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains) increases the digestion of lactose in the small intestine in comparison with standard milk [*hypolactasia*: (Kolars *et al.*, 1984; Savaiano *et al.*, 1984; Marteau *et al.*, 1990; Adolfsson *et al.*, 2004); *short intestine* (Arrigoni *et al.*, 1994)], or thermised milk (Piaia *et al.*, 2003). Yoghurt also improves clinical tolerance to lactose, without this being strictly correlated with the degree of disaccharide malabsorption (de Vrese *et al.*, 2001);
- numerous other probiotics also have a favourable effect, although this is generally quantitatively less pronounced. Thus, the following fermented milks improve the absorption of lactose [in decreasing order of intensity in the respiratory hydrogen excretion test (de Vrese *et al.*, 2001)]: milks containing *L. Bulgaricus* (Martini *et al.*, 1987), *S. thermophilus* (Martini *et al.*, 1987), *L. acidophilus* (Martini *et al.*, 1987; Lin, 1995), particularly after sonication (McDonough *et al.*, 1987; Martini *et al.*, 1987). In healthy volunteers, *S. boulardii* (250 mg x 4/d of a lyophilisate containing 10<sup>9</sup>/100 mg) increases the lactase activity of the jejunum (Buts *et al.*, 1986) or duodenum (Jahn *et al.*, 1996);
- quantitatively, the probiotic strains in yoghurt reduce maldigestion of a load of lactose (in comparison with the maldigested percentage with a thermised or standard fermented milk) by 6% to 33% in hypolactasic subjects (Kolars *et al.*, 1984; Savaiano *et al.*, 1984; McDonough *et al.*, 1987; Marteau *et al.*, 1990), and by 26% in short intestine syndrome (Arrigoni *et al.*, 1994). There is no clearly reported dose-response; for the yoghurt, the doses usually studied correspond to commercial doses;
- the mechanisms of the favourable effect of probiotics on the digestion of lactose are: (a) mainly, the intra-luminal addition of lactase of bacterial origin [lactase probably resistant to intraluminal enzymatic hydrolysis (Marteau *et al.*, 1990)] released by cellular lysis, particularly under the effect of gastric acidity and bile salts in the proximal intestine [P. Marteau: comments *In*: (Midtvedt, 2003)], and/or produced by live bacterial bodies and in transit [effect demonstrated for *S. thermophilus* in gnotoxenic mice (Drouault *et al.*, 2002a)]; (b) the activity of bacterial permease (of the probiotic), allowing lactose to enter the probiotic cell and undergo lactase hydrolysis, implying the at least partial preservation of bacterial integrity (Adolfsson *et al.*, 2004); (c) perhaps, and in a complementary manner for yoghurt, a slow-down in its oral-caecal transport and/or its gastric emptying (de Vrese *et al.*, 2001);
- preliminary data suggest that that the intra-luminal addition of other digestive enzymes [sucrase: (Harms *et al.*, 1987); lipase: (Drouault *et al.*, 2002b)] could be provided by natural or genetically-modified probiotic vectors.

### 2.1.2. Sucrose

Experimentally, *Saccharomyces boulardii* (lyophilisate containing  $10^9/100$  mg for 7 days) increases the activity of sucrase (but not that of maltase) in the residual ileum of enterectomised rats, returning it to the same level as in non-resected rats (Buts *et al.*, 1999). In humans, *S. cerevisiae*, a yeast in sucrase, helps (at a dose of 0.3 g of lyophilisate administered acutely with a load of 2 g/kg sucrose) the digestion of sucrose and eliminates clinical signs of intolerance in congenital sucrase-isomaltase deficiency, an exceptionally rare clinical situation observed mainly in children (Harms *et al.*, 1987).

## 2.2 Glucose absorption

In the residual intestine (ileum) of enterectomised rats receiving 1 mg/kg of a lyophilisate of *S. boulardii* at a concentration of  $10^9/100$  mg for 7 days, the yeast strongly stimulates the sodium-dependent absorption of D-glucose by the brush border *in vitro* and doubles the expression of sodium-glucose cotransporter 1 (Buts *et al.*, 1999).

## 2.3 Fluid and mineral absorption

### 2.3.1. Water and sodium

In addition to their specific effect – and that of the metabolites produced by their fermentation – on colonic motricity, probiotics (*Cf.* chapter 2) can have a stimulant effect on the colonic reabsorption of water and sodium, via short-chain fatty acids (SCFA), particularly butyrate (Topping & Clifton, 2001). Quantitatively, the value for healthy humans of this physiological effect is not clearly understood: definitely more marked with non-digestible oligosaccharides (NDO) which are the most fermentable at low or moderate doses, it disappears with large quantities of NDO and the relative reduction in their fermentation, following their laxative effect.

Pathophysiological models have shown that certain probiotics could inhibit or prevent enterocytic secretion of chlorine of bacterial or toxic origin leading to infectious diarrhoea. In human intestinal lines HT29/cl.19A and Caco-2, *S. thermophilus* ATCC19258 and *L. acidophilus* ATCC4356 have no effect on the baseline secretion of chlorine but block that induced by enteropathogenic *Escherichia coli* (Resta-Lenert & Barrett, 2003). Experimentally, the antisecretory effect of *S. boulardii* against choleric toxins and *E. coli* has been documented in several models (Marteau *et al.*, 1990). On rat intestine *in vitro*, *S. boulardii* strongly stimulates sodium-glucose cotransporter 1 (Buts *et al.*, 1999).

### 2.3.2. Calcium and magnesium

Numerous experimental studies on animal models, particularly in rats, have suggested that probiotics stimulate the colonic absorption of calcium and magnesium, along with that of iron and zinc (Scholz-Ahrens *et al.*, 2001; Scholz-Ahrens & Schrezenmeir, 2002). In one study, the oligofructose + inulin mixture was more effective than each taken separately (Coudray *et al.*, 2003). In humans, the results are divergent but interesting (Van Loo *et al.*, 1999): prebiotics, particularly inulin and FOS, are thought to stimulate the colonic absorption of calcium, promoting a reduction in colonic pH and an increase of solubilisation, perhaps via SCFA, which may induce calcium absorption all the way to the distal colon (Trinidad *et al.*, 1996). This stimulant effect, which was not found by certain studies (Tahiri *et al.*, 2003), may be positively correlated with calcium requirements (adolescence, post-menopause) (van den Heuvel *et al.*, 1999) and the FOS dose ingested (Scholz-Ahrens *et al.*, 2001). A mixture of inulin + oligofructose significantly stimulates the absorption of calcium in adolescents in comparison with oligofructose alone (Griffin *et al.*, 2002). Lactose thus stimulates colonic absorption of calcium, especially in hypolactasic adults, thanks to its colonic fermentation (Griessen *et al.*, 1989): quantitatively, the physiological role of this effect has not been established. *In vivo* in healthy volunteers, a fermented milk (yoghurt) increases the duodenal calcium absorption rate by 23% in comparison with a non-fermented milk (67% versus 44%) (Mahe *et al.*, 1994). The increase of magnesium absorption by the FOS has been showed on



animal models (Remesy *et al.*, 2002) and on humans during the administration of FOS during 5 weeks on post-menopausal women, among which the increase of 11 % of relative absorption of magnesium was offset by an increase of its urinary excretion (Tahiry *et al.*, 2001).

## 2.4. Absorption of proteins and nitrogen

In pigs *in vivo*, probiotic strains of yoghurt optimise the absorption of nitrogen N<sup>15</sup> (assessed using portal blood samples) in comparison with a thermised fermented milk or a standard milk, spreading it over 4 hours -vs 2 hours– after eating (Mpassi *et al.*, 2001; Rychen *et al.*, 2002). One possible mechanism is a slow-down in gastric emptying and/or its oro-caecal transit induced by the yoghurt (Gaudichon *et al.*, 1994). In healthy volunteers a fermented milk (yoghurt) slows down gastric emptying of nitrogen in comparison with a non-fermented milk (Mahe *et al.*, 1994; Gaudichon *et al.*, 1995), without modifying the high level of protein hydrolysis nor the N<sup>15</sup> absorption level nor endogenous intestinal nitrogen secretion (Gaudichon *et al.*, 1995).

### Important points

- A stimulant effect of several probiotic strains on the digestion and absorption of lactose has been demonstrated *in vivo* in hypolactasic adults and in short intestine syndrome. There is no clear dose-response effect, with the doses usually studied corresponding, for yoghurt, to commercial doses.
- No favourable effect of probiotics on the absorption of other carbohydrates or proteins has been demonstrated in humans.
- The effect of probiotics and prebiotics on fluid and mineral absorption has mainly been studied in animals and on human intestinal lines *in vitro*.
- A stimulant effect of prebiotics, particularly inulin and FOS, on the colonic absorption of calcium and magnesium thanks to a reduction in colonic pH and a production of SCFA is possible but its value has not been formally demonstrated in humans.

## 3. Intestinal motricity and intra-luminal transit

### 3.1 Probiotics

The only variable studied was the total and/or segmentary oro-anal or colonic intraluminal transit time. One strain of propionibacteria ( $5.10^{10}$  CFU/d, x 14 d) accelerates left colonic transit in healthy adults (non-controlled study) (Bougle *et al.*, 1999). A milk fermented with *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 ( $10^8$  CFU/g, x 14 d) and with lactic bacteria ( $10^8$  CFU/g, x 14 d) significantly accelerates oro-anal transit in healthy volunteers aged between 60 and 75 years, and the slower the initial transit time, the more marked this effect (randomised study) (Meance *et al.*, 2001). This effect was confirmed in another randomised controlled study (*B. animalis* strain DN-173 010 - $10^8$  CFU/g- plus yoghurt strains - $10^7$  CFU/g-, x 14 d) in healthy volunteers aged between 50 and 75 years: the effect was deemed to be dose-dependent and prolonged for up to 6 weeks after discontinuation of the probiotic (Meance *et al.*, 2003). The same DN-173 010 strain of *B. animalis* administered in fermented milk ( $10^8$  CFU/g, x 21 d) accelerates total colonic transit in healthy male or female volunteers aged between 20 and 40 years, the effect in women being more pronounced than that in men and also concerning sigmoid segmentary transit (double-blind controlled study) (Bouvier *et al.*, 2001). This effect of *B. animalis* on total and sigmoid colonic transit time was confirmed in healthy female volunteers aged between 18 and 45 years in a double-blind crossover study ( $10^8$  CFU/g, x 10 d): weight, pH, bacterial mass and bile acid concentrations of the stools not being modified (Marteau *et al.*, 2002). Probiotic mixture VSL#3<sup>®</sup> has no effect on gastrointestinal transit time in irritable bowel syndrome, whilst it alleviates certain clinical signs, such as abdominal meteorism (Kim *et al.*, 2003). The mechanism(s) of the effect of probiotics on intraluminal transit time has/have not been established.

### 3.2 Prebiotics

In adults, NDO increase stool weight (Gibson *et al.*, 1995; Cummings *et al.*, 2001; Cummings & Macfarlane, 2002; Marteau & Boutron-Ruault, 2002), a variable which is positively correlated with transit speed (Spiller *et al.*, 1986; Cummings *et al.*, 1992). This effect, for which the intensity – capable of leading to a laxative effect – depends especially on the dose ingested and the polymerisation degree of the oligosaccharide, is a result of several mechanisms (Cummings *et al.*, 2001; Marteau *et al.*, 2004): osmotic capacity (limited, at low doses, by the fermentation of NDO), increase in bacterial biomass (notably expressed by the increase in the faecal excretion of nitrogen) (Gibson *et al.*, 1995; Cummings & Macfarlane, 2002), stimulation of colonic motricity by the final products of NDO fermentation, such as SCFA [which stimulate colonic motricity at low concentrations and inhibit it at high concentrations (Cherbut *et al.*, 1997)] although the latter also increase the proximal colonic absorption of water and sodium. The increase in stool weight induced by NDO is used therapeutically with lactulose or lactitol (particularly *via* the osmotic effect of these when they are administered at sufficient doses).

Prebiotics increase the production of intestinal gases, produced by fermentation (H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>) and, consequently, can cause generally moderate clinical discomfort (abdominal bloating, eructation, abdominal pain) (Cummings *et al.*, 2001; Cummings & Macfarlane, 2002). There is a dose-response effect for the production of H<sub>2</sub>; in addition, the latter is thought to be reduced with NDO with the longest chains and therefore with the slowest colonic fermentation (Livesey *et al.*, 1993; Cummings *et al.*, 2001). The gasogenic effect has been suggested as being a possible factor triggering the acceleration of transit that can be induced by prebiotics.

#### Important points

- In humans, prebiotics have a gasogenic effect, increasing stool weight, and can induce diarrhoea at high doses.
- Some prebiotics accelerate oro-anal intraluminal transit or total and/or segmentary – notably sigmoid - colonic transit; the clinical impact of this accelerating effect is still to be specified in healthy humans. Demonstration of an acceleration in transit in healthy subjects does not guarantee a significant clinical effect in subjects complaining of constipation.

## 4. Functional epithelial barrier (non-immunological)

### 4.1. Epithelial cell and "bacteria-epithelium" interactions; intestinal mucus

#### 4.1.1. Probiotics

##### *On the epithelial cell*

In young mice, colonisation of the gut with conventional flora is necessary for complete fucosylation of glycoproteins of the enterocyte membrane (Bry *et al.*, 1996). *L. rhamnosus* GG, *L. acidophilus* and *B. bifidum* are not thought to degrade the glycoproteins of the intestinal mucus, which is believed to be a gauge of their safety of use (Ruseler-van Embden *et al.*, 1995). *In vitro*, *L. casei* DN-114 001 (soluble factors -modulins- in the culture supernatant) modifies, in HT-29 MTX human epithelial cell lines, surface cellular galactosylation (by increasing the expression of galactose and sialic acid and by reducing that of N-acetyl-galactosamine) (Freitas *et al.*, 2001), whereas *L. acidophilus* gives a very different glycosylation profile (increase in fucose and N-acetyl-glucosamine) (Freitas *et al.*, 2003a). However, epithelial receptors for pathogenic microorganisms depend largely on their glycosylation status (Freitas & Cayuela C., 2000), *L. casei* DN-114 001 has been shown to strongly inhibit infection of HT-29 MTX cells by rotavirus, as does *Bacteroides thetaiotaomicron*, an important dominant commensal bacteria in the gut which modifies (increases) galactosylation (Freitas *et al.*, 2001) of the surface of the epithelial cell in a similar manner to *L. casei* DN-114 001 (Freitas *et al.*, 2003b).

## On the mucus

*L. plantarum* 299v increases the expression of MUC2 and MUC3 genes –predominant mucins in the ileum and colon- in HT-29 lines; this effect probably explains the inhibition by various probiotics, such as *L. plantarum* 299v, of epithelial adherence of pathogenic bacteria, particularly entero-invasive *E. coli* (Mack *et al.*, 1999). The increased RNA expression of MUC3 is well correlated with extra-cellular secretion of this mucin (Mack *et al.*, 2003). *L. rhamnosus* GG also increases the expression of MUC2 in the Caco-2 intestinal cell line (Mattar *et al.*, 2002). In human epithelial lines T84 and HT-29, VSL#3<sup>®</sup> also increases the expression of mucins (Otte & Podolsky, 2004).

### 4.1.2. Prebiotics

In axenic rats, inulin increases the quantity of mucins in the mucosa and caecal lumen (neutral and/or acidic mucins) and the colonic lumen (sulphated mucins) (Fontaine *et al.*, 1996). In rats with human flora (in which the colonic mucins have a different mucosa-lumen distribution from that in axenic animals), FOS (50 g/kg/d) and inulin also have a different effect from that produced in axenic animals: they increase the overall thickness of the mucus layer and the number of mucus-containing cells in the distal colon (Kleessen *et al.*, 2003), reduce acidic mucins in the caecal and colonic mucosa (and/or the lumen), increase sulphomucins in the caecal mucosa, and sulphomucins and neutral mucins in the colonic lumen (Fontaine *et al.*, 1996). Another prebiotic (transgalacto-oligosaccharide, 40 g/kg/d) also modifies the distribution of mucus-containing cells in the colon (but not the caecum) in axenic rats, reduces their number (acidic mucins) by half in the caecum in rats with a conventional flora, but has no effect in animals with a human flora (Meslin *et al.*, 1993). In rats with a conventional flora, certain predominantly soluble fibres (ispaghula), in contrast with others (pectins) and with predominantly insoluble fibres (cellulose), also increase the thickness of the gel and total colonic mucus secretion (Brownlee *et al.*, 2003). In mice, a diet supplemented with FOS stimulates secretion of the colonic mucus (increase in gel thickness and number of mucus-containing cells) without modifying the distribution between cells containing neutral, acidic and sulphated acids (Hoebler *et al.*, 2002). The effect of fructans on mucus production could be mediated, at least partially, by the production of butyrate, since this increases the expression of certain mucin genes (MUC3) in human colonic line HT29-C116E (Gaudier *et al.*, 2004).

#### Important points

- *In vitro* on human intestinal lines, certain probiotics increase mucin expression and modify apical glycosylation of cells; this effect could be related to the inhibition, also observed with certain probiotics, of the intestinal apical adherence of various microorganisms.
- In animals, certain prebiotics modify the quantity and distribution of mucins in the colon.
- The impact of these data on human physiology has not been established.

## 4.2 Intestinal permeability, bacterial translocation

### 4.2.1 Permeability

Experimentally, the commensal flora and various probiotics act on intestinal barrier function and permeability (Heyman & Ménard, 2002, Fioramonti *et al.*, 2003). In axenic mice, there is an increase in mucosal electrical resistance and a reduction in the transport of macromolecules (Heyman *et al.*, 1986). Probiotic mixture VSL#3<sup>®</sup> restores the barrier function of animals invalidated for the IL-10 gene (Madsen *et al.*, 2001). In rats, *L. brevis*, a commensal microorganism of the gut, reduces the hyperpermeability to small molecules induced by other microorganisms (Garcia-Lafuente *et al.*, 2001), and *L. GG* does the same on that induced by viral agents (Isolauri *et al.*, 1993a, 1993b). In guinea pigs, a milk fermented with *S. thermophilus* and *B. breve* increases baseline transepithelial electrical resistance, therefore increasing the

mucosal barrier and reducing the permeability ( $\beta$ -lactoglobulin transport) of the jejunal mucosa mounted in an Ussing chamber (Terpend *et al.*, 1999).

Data relative to the human gastrointestinal mucosa are still limited. *In vitro*, in intestinal lines HT29/cl.19A and Caco-2, *S. thermophilus* ATCC19258 and *L. acidophilus* ATCC4356 increase transepithelial electrical resistance and block the secretion of chlorine induced by enteropathogenic *E. coli* (Resta-Lenert & Barrett, 2003). VSL#3<sup>®</sup> increases (*via* a hypothetical protein-type soluble factor secreted by this mixture of probiotics) electrical resistance and reduces the permeability of T84 epithelial monolayers (Madsen *et al.*, 2001). On these same T84 lines, *S. boulardii* maintains the transepithelial electrical resistance and structural integrity (judged on distribution, by immunochemistry and confocal microscopy analysis, of the ZO1 protein associated with *zonula occludens*) of the tight intercellular junctions and prevents the modifications induced by enteropathogenic *E. coli* (Czerucka *et al.*, 2000); in T84 cells *S. boulardii* also eliminates phosphorylation of the light chains of myosin induced by enterohaemorrhagic *E. coli* (Dahan *et al.*, 2003). *In vivo* in healthy volunteers, *L.GG* significantly reduces hyperpermeability of the gastric mucosa (but not that of the intestinal mucosa) to disaccharides, induced by indomethacin (Gotteland *et al.*, 2001). In patients undergoing major abdominal surgery, *L. plantarum* 299V (500mL/d of a product containing 10<sup>7</sup> CFU/ml, for a short median period of 9 days before surgery and 5 days after surgery) does not modify the clinical indices deemed to be representative of the “barrier” function of the digestive tract (bacterial translocation in the mesenteric lymph nodes, gastric bacterial colonisation, incidence of post-operative septic complications), (McNaught *et al.*, 2002). In intensive-care patients, a synbiotic combining *L. acidophilus* La5, *B. lactis* Bb12, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* (10<sup>9</sup> CFU per capsule, x 3/24h) with an oligofructose (7.5 g x 2 /24h) and administered orally or by means of a nasogastric tube for a short median period of 10 d, significantly reduces the frequency of contamination of the gastric fluid by pathogens but has no significant effect on intestinal permeability (lactulose/rhamnose test) nor on the incidence of septic complications or mortality (Jain *et al.*, 2004).

Finally, the effect of probiotics on the non-immune mucosal barrier seems to be a combination of (a) direct effects on the expression of mucins, on the maintenance (structure, location, phosphorylation) of proteins of the cytoskeleton and the tight intercellular junctions, hence on electrical resistance, permeability and trans-epithelial fluid and electrolyte flows; and (b) the probable interface between these effects and the immune component of the mucosal barrier (bacterial adhesion and interference with pathogens, translocation, non-specific and humoral immune response, interference with inflammation and cytokine response) (Heyman & Ménard, 2002; Ménard & Heyman, 2005).

#### 4.2.2. Bacterial translocation

Apart from its immunological and bacteriological aspects proper, this consists in at least partial expression of the “barrier” function of the intestinal mucosa.

*In vivo* in humans, the absence of a protective effect of a probiotic (*L. plantarum* 299V) on bacterial translocation [assessed peroperatively in the mesenteric lymph nodes (McNaught *et al.*, 2002)] has been confirmed by the same team and using the same methodology for a synbiotic combining *L. acidophilus* lactis Bb12, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* (10<sup>9</sup> CFU per capsule, x 3/24h) with an oligofructose (16g x 2 /24h) (Anderson *et al.*, 2004): in both these studies the median administration period was short: respectively 9 to 12 days before surgery and 5 to 4 days after surgery (McNaught *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2004).

In experimental models in mice and rats, several studies have shown that certain probiotics [*B. longum* (Suzuki *et al.*, 1997); *Propionibacterium acnes* (Suzuki *et al.*, 1997; Berg, 1999); *S. boulardii* (Berg *et al.*, 1993); fibres (Spaeth *et al.*, 1990)] reduced the translocation of pathogenic bacteria. Conversely, some prebiotics can increase it; thus, a very recent study has demonstrated *in vivo* in rats that inulin and FOS increased the hepato-splenic translocation of salmonella, perhaps thanks to changes in the mucosal barrier induced in the distal intestine by organic acids produced by fermentation of FOS; calcium phosphate prevented this effect, perhaps by combating excessive acidification of the intestinal lumen

(Ten Bruggencate *et al.*, 2004). Conversely, previous studies had demonstrated that prebiotics (galacto-oligosaccharides) combined with bifidobacteria increased the resistance of mice to translocation of salmonella (Asahara *et al.*, 2001).

#### 4.3. Apoptosis

*L. rhamnosus* GG has an anti-apoptotic effect, both on murine colonic cell lines and in human colonic line HT-29: it activates the anti-apoptotic kinase B Akt protein and inhibits the activation of pro-apoptotic MAP-kinase p38 by various pro-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) (Yan & Polk, 2002). In human colonic line T84, *S. boulardii* delays apoptosis induced by enteropathogenic *E. coli* (Czerucka *et al.*, 2000). These data are potentially interesting, particularly with respect to the treatment of chronic inflammatory bowel diseases in which a deficiency in the mucosal barrier primarily implies increased production of pro-inflammatory cytokines and a marked increase in apoptosis of intestinal cells.

#### 4.4 Trophicity, enzymes, protein synthesis

Experimentally, *S. boulardii* (100 mg/d lyophilisate) strongly stimulates sucrase and maltase activities in the jejunum of rats, a trophic effect assumed to be induced by the endoluminal release of spermine and spermidine by this yeast (Buts *et al.*, 1994). This probiotic also stimulates jejunal and ileal aminopeptidase activity in rats (Buts *et al.*, 2002) and *L. casei* DN-114 001 has a similar effect on this protease and on epithelial proliferation in mice (Thoreux *et al.*, 1998). In the residual ileum of enterectomised rats receiving 1 mg/kg of a lyophilisate of *S. boulardii* at a concentration of 10<sup>9</sup>/100 mg, the yeast doubles the expression of sodium-glucose cotransporter 1 (Buts *et al.*, 1999). *L. casei* (10<sup>7</sup> CFU/d) or *Clostridium butyricum* (10<sup>7</sup> CFU/d) stimulates cryptic epithelial proliferation in the jejunum and ileum and, especially, in the proximal and distal colon in rats, an effect which is primarily attributed to the production of SCFA (Ichikawa *et al.*, 1999). Similarly, *L. reuteri* R2LC and *L. plantarum* DSM 9843 increase intestinal mass in enterocolitis in rats induced by methotrexate (Mao *et al.*, 1996).

In healthy volunteers, *S. boulardii* (250 mg x 4/d of a lyophilisate containing 10<sup>9</sup>/100 mg) increases saccharase, lactase and maltase activities in the jejunum without modifying the protein content (Buts *et al.*, 1986). In another study in healthy volunteers, this same probiotic stimulates lactase, glucosidase and alkaline phosphatase activity in the duodenal mucosa (Jahn *et al.*, 1996).

#### Important points

- Several probiotics have a favourable effect in animals, like the commensal flora, on the barrier function of the gut, increasing transepithelial resistance and reducing permeability, particularly to macromolecules. Comparable effects have been observed *in vitro* on human intestinal cell lines; no extrapolation of the situation *in vivo* is currently possible.
- Certain probiotics reduce intestinal translocation of pathogenic bacteria in animals. No positive data of this type is available in humans: several studies in the preoperative period have not revealed any protective effect of probiotics tested on clinical and bacteriological indices for translocation.
- A few probiotics express an anti-apoptotic effect *in vitro* in animal and human cell lines. No data of this type is available physiologically or clinically in humans, but it is an interesting field for investigation, particularly in conditions (such as chronic inflammatory bowel diseases) associated with a marked increase in intestinal cell apoptosis.
- Various probiotics express an intestinal enzyme activity inducing effect in animals. A few comparable data exist in humans for a small number of probiotics, but these require confirmation.

## **X- What are the prospects for future application of genetically-modified probiotics?**

---

Advances made in the field of genetics have recently made it possible to insert interesting genes into probiotics, particularly lactic bacteria. The possible applications may include improving the technological properties and/or physiological effects of strains. In this event, probiotics could be used to carry new biological effects to the gut (or even ensure synthesis and regular release there). This is attracting the interest of research scientists but it is still not certain whether the public and the authorities will accept such products in the future.

Since the 1980s, genetically-modified microorganisms (GMMs) cultivated under controlled confinement conditions, have been used as organisms producing substances of therapeutic interest in the field of medicine, such as hormones (e.g. insulin, human growth hormone) or vaccines (the hepatitis B vaccine made using the *Saccharomyces cerevisiae* strain) and also in the context of production of enzymes, flavourings and processing aids in human or animal foods. GMMs are thus used as metabolic micro-factories, then the substances produced are purified and marketed. This is the case of chymosin, for example, an enzyme used in the cheese industry, which can be produced using genetically-modified strains of *Escherichia coli*, *Aspergillus Niger* and *Kluyveromyces lactis*, or of *Bacillus* sp. amylases used in bread-making or the brewing industry. In the future, GMMs could also be incorporated directly during the production of certain foods. Indeed, in the last 10 years, a series of studies have significantly increased the number of tools available to obtain genetic constructions in GMMs.

### **Important points**

- No GMMs are currently authorised for marketing for use in unchanged state in human food.
- Various GMMs are currently considered, by those who have created them at least, to be ready for use in food technology.

Among the most advanced projects, those concerning the lactic bacteria *Lactococcus lactis*, certain strains of which have been genetically manipulated to enable acceleration of the cheese ripening process or improved resistance to certain viruses specific to it, are particularly worthy of mention (Forde & Fitzgerald, 1999). Other projects concern the construction of genetically-modified yeasts to optimise wine or bread production.

A new application for GMMs also seems to be emerging: live GMMs which could replace the active substance (medicine, enzyme, other probiotic effect) and would be consumed by humans via food preparations. This new approach would potentially make it possible to use a GMM to deliver a medicine to the lower parts of the gastrointestinal tract without using more sophisticated forms of drug delivery.

It is important to note that the designers of these new strains of microorganisms make a distinction between transgenic GMMs, i.e. those carrying one or more genes or genetic structures produced by a different organism to the one that is modified, and non-transgenic GMMs, constructed by autocloning (SAGE: “Sans Addition de Gène Extérieur” – without the addition of an external gene) and hence not subject to the same regulations. However, this distinction is only relevant if the GMM is used in a confined medium: indeed directive 90/219/EEC excludes autocloned microorganisms from its scope. However, when the GMM is designed to be disseminated (direct ingestion by the consumer, for example), it is covered by the same community provisions irrespective of whether it is autocloned or transgenic insofar as directive 2001/18/EC or regulation 1829/2003 for food applications do not exclude autocloning.

A first application concerns oral, parenteral or nasal vaccination. The expression of viral or tumoural antigens, neutralising antibodies or the concomitant production of various interleukins and antigens appears to regulate immune function in an interesting manner. In

the case of food allergies, oral desensitisation using a GMM producing a modified allergen could be envisaged.

A second potential application concerns secretion in the digestive tract, by the GMM ingested, of enzymes or mediators that could have a beneficial role (preventive or curative) on human health. The most striking example to date is that provided by Steidler's team (2000) concerning the production of interleukin 10 by *Lactococcus lactis* in the digestive tract. Using this process, it was possible to reduce an experimentally-induced gastrointestinal inflammation. Supported by encouraging results in animals and after having developed a confinement method for the strain, Steidler started a clinical trial of this recombinant strain in subjects suffering from Crohn's disease in the Netherlands (personal communication). Other probiotics carrying other immunoregulating substances, such as trefoil peptides or superoxide dismutase are also under development (for the time being in animals) (Steidler *et al.*, 2003; Vandenbroucke *et al.*, 2004). He also demonstrated, in an animal model, that the release of a lipase by *L. lactis* could improve the digestibility of lipids in animals having undergone ligation of the pancreatic duct to mimic a lipase deficiency (Drouault *et al.*, 2002). All these approaches require the consumption of live bacteria, some expressing eukaryote proteins. Risk/benefit ratio studies are necessary.

These new prospects related to considerable technical advances will inevitably give rise to debate between the various stakeholders to evaluate the appropriateness, if necessary, of adapting the regulations. In their current state, there are two very separate applications: medicines and food. Community regulation No. 1829/2003 of 22 September 2003 concerning foodstuffs and animal feeds stipulates conditions governing the assessment and the decision to market foods or food ingredients produced using genetically-modified organisms for animals, and containing or consisting of such organisms. Furthermore, a draft community regulation is intended to supplement the regulatory provisions concerning nutritional claims relative to health.

# **XI- Guidelines for justification/validation of claims relative to the effects of pre- and probiotics**

---

## **1. Pre-requisites**

As far as possible, it is important to assess not only the efficacy but also the tolerance of products in clinical trials.

## **2. Common requirements for the methodology of clinical trials conducted with prebiotics and probiotics**

### 2.1 Study implementation conditions

- The study must be conducted with a product for which a claim is being made in order to take into consideration both the strain or structure-dependent effect and the effect of the dietary matrix.

*Numerous studies cited in our analysis of the literature show that the effects of probiotics are often (although perhaps not necessarily) dependent on the strains, and therefore it is impossible to extrapolate the result for one strain to another. At least some of the effects of prebiotics are dependent on their chemical structure and, for example, but not exclusively, their polymerisation degree.*

- The doses of product administered must be identical or similar to recommended intakes and as close as possible to the usual conditions for consumption.

*The effects of certain pro- or prebiotics at least being dependent on their dose, it is impossible to extrapolate the results obtained with different doses from those used in the final products.*

- The groups tested must be identical to the population targeted by the product.

*The ideal situation is to have human clinical studies on the population ultimately destined to receive and/or consume the product.*

### 2.2 Study characteristics

- The groups tested must be defined in advance

*Statistical tests must be conducted on a population defined in advance at the start of the trial and not afterwards at the end of trial.*

*Example: This applies, for example, to the demonstration of bifidogenic effects, only for sub-groups of patients in whom bifidobacteria levels in the colon are initially low. This type of statement is acceptable if a group of subjects with low bifidobacteria levels in the colon is randomly divided into two groups to receive either a prebiotic or a placebo and if it is then demonstrated that the prebiotic leads to a greater increase in bifidobacteria than the placebo. However, this statement would not be acceptable if an increase in these bacteria was only demonstrated in a retrospectively defined group of subjects with low bifidobacteria levels after ingestion of a prebiotic. This is a general methodological comment, which is valid for all studies, whether they are on medicines or foods.*

- Randomised trials (randomisation of subjects included in the study)

- Double-blind

- Relevance of control groups

- Relevance of placebos chosen

*In no case should this be a nocebo.*



### 2.3 Analysis of results

- The results must be statistically significant
- Interpretation of the results must be rigorous and not excessive (no extrapolation of an effect on a function to a health effect)

### 2.4 Essential requirements

- The claimant must submit at least one clinical study conducted and interpreted according to methods which are the subject of scientific consensus.

*It is obvious that at least one well-conducted and indisputable study is necessary. Studies conducted on smaller populations in non-randomised conditions or conducted in animals or using in vitro methods can provide additional information. The relevance of each of these models, which cannot be discussed here, must be analysed in detail before the study is conducted.*

- If several studies have been conducted on products, all these studies and their results must be presented by the claimant.

### **3. Specific requirements for probiotics: how does one demonstrate that a microorganism is a probiotic?**

A microorganism can only be termed a probiotic after a beneficial effect on the host's physiology (functions) or health has been demonstrated. The microorganism must be live in the product, according to the definition of probiotics and because it is therefore possible to guarantee its actual presence and its stability when the product reaches its use-by date. This comment does not exclude the possibility that certain dead microorganisms may have positive effects (Cf. chapter 2). The viability of the probiotic at the end of gastrointestinal transit is an interesting criterion but is not essential.

### **4. Specific requirements for prebiotics: how does one demonstrate that a microorganism is a prebiotic?**

The demonstration of a bifidogenic effect demands valid measurement of bifidobacteria and an appropriate statistical test (Cf. chapter 6).

Many prebiotic products consist of mixtures of different chemical substances, and hence it is impossible to extrapolate the results of clinical studies conducted with a prebiotic to another in order to make claims. Demonstration of a bifidogenic effect cannot rely on the use of prebiotic indices based on the notion of "good" and "bad" flora.

### **5. Conclusion**

*It is impossible to validate requests for claims relative to effects if the supportive evidence deviates too far from the guidelines presented. Any argument based on an approach of extrapolation of results obtained, particularly with different forms of the product, different doses, different target populations or different cell or animal models is not acceptable.*

*Dossiers requesting claims based only on in vitro or animal models cannot obtain a sufficient level of evidence to obtain a claim in humans.*



A prebiotic has been defined as “a non-digestible food ingredient that beneficially affects the host by selectively stimulating the growth and/or the activity of one or a limited number of bacteria in the colon, and thus attempt to improve host health”<sup>5</sup>. Probiotics have been defined as “live microorganisms which when administered in adequate amount confer a health benefit on the host”<sup>6</sup>.

The intestinal flora is made up of a set of taxonomic groups common to all adults (*Eubacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, etc.) but the profile of microbial species colonising the gastrointestinal tract is specific to each individual. Consequently, it is not currently possible to define a set of microbial species acting as a marker for normal flora. Insofar as taxonomic groups which also contain pathogenic flora frequently form part of the dominant faecal flora in healthy subjects, the dichotomic concept of “good” and “bad” bacteria is not appropriate. However, preserving – or even reinforcing – the homeostasis of the gut may be beneficial.

The effects demonstrated for products containing live microorganisms (probiotics) cannot be extrapolated to other products containing dead microorganisms. Indeed, although a few studies have shown that certain physiological effects are due to the DNA of probiotics and to metabolites produced by bacterial preparations, other have shown that the effects were only observed in the presence of live microbial preparations (corresponding to the strict definition of probiotics).

The survival in the gastrointestinal tract of the strains ingested does not necessarily imply the existence of beneficial effects. Furthermore, non-survival does not necessarily imply the absence of any beneficial effects. A number of researchers are interested in looking at the survival of the probiotic, from ingestion to its site of action. This survival is mainly dependent on the dose of product ingested, but also on the strain and factors related to the host and the vector food. The very great majority of probiotics do not durably colonise the gastrointestinal tract and hence their effect is transient.

The effects of prebiotics and probiotics are specific to their structure and the species considered, respectively. Thus, justification of effects common to two strains or two substances needs to be demonstrated by studies conducted with each strain or substance in question.

The bifidogenic effect of a prebiotic is currently characterised by an increase in the bifidobacteria population within the colonic and/or faecal flora. Demonstration of such an increase must be the subject of clinical studies based on a suitable methodology and appropriate counting methods. More generally, the use of prebiotic indices, based on the concept of good bacteria, is not acceptable. Demonstrating a bifidogenic effect is not enough to be able to claim any effect on health.

Despite their interest, *in vitro* studies on the modulation of innate immunity and specific immunity by probiotics do not reflect the complexity of the phenomena involved *in vivo* in humans. An increase in viral and bacterial anti-pathogenic IgA has been reported in the human intestinal mucosa following the consumption of probiotics. The correlation between this effect and the prevention of infections is still the subject of debate. In contrast with what has been shown in children, no studies have demonstrated a significant effect for a probiotic or a prebiotic on allergic conditions in adults. Due to their anti-inflammatory effects, some probiotics may act to prevent the development or recurrence of pouchitis. Apart from these pathological cases, the clinical consequences of immunomodulating effects on health are not known.

---

<sup>5</sup> (Gibson & Roberfroid, 1995 ; Schrezenmeir & De Vrese, 2001).

<sup>6</sup> Codex alimentarius, 2001.

Studies have shown that the consumption of certain probiotics modulates oral-anal transit or colonic transit in humans; in addition, a beneficial effect of certain strains on the digestion and absorption of lactose has been observed in hypolactasic humans. Further clinical studies are required to confirm the role of prebiotics on the stimulation of calcium and magnesium absorption and the modulator role of probiotics on certain intestinal enzyme activities ( $\beta$ -glucosidases and  $\beta$ -glucuronidases). Opening the way for investigations in humans, studies conducted *in vitro* or in animals show that probiotics can exert a modulating effect on the quantity and distribution of mucins, a favourable effect on the gut's barrier function, an anti-apoptotic effect (interesting field of research for certain conditions, such as inflammatory bowel diseases).

Genetically-modified microorganisms (GMMs) are used to produce substances of therapeutic value, such as insulin, or technological value (enzymes) in the food industry. Although they are the subject of much research, no GMMs are currently authorised for use in unchanged state in human food.

The report stresses the importance of clinical studies (including a suitable statistical methodology) to demonstrate the effects of prebiotics and probiotics and sets a number of rules to be followed in terms of methodology and analysis of results in clinical studies.

## Glossary

---

**Allergy:** Immune response directed against a dietary or respiratory antigen (allergen) responsible for the abnormal production of specific IgE and leading to a local or systemic inflammatory reaction related to degranulation of mastocytes having bound to these IgE, in response to further contact with the allergen.

A **bacterial strain** is the set of microorganisms produced by the same cell (isolated). The strain is conserved in a collection. A set of strains considered to be *similar* defines a bacterial species.

The *similarity* criteria are based on parameters selected by the investigator, which leads to occasional redefinitions when more relevant criteria (more discriminant) are identified. Access to measurable information on genomes has led to definition of a threshold value for *global similarity between two genomes* for the corresponding strains to belong to the same species. Strains in which the genomes have less than 70% similarity are thus deemed to belong to different species. This value corresponds to a similarity of gene sequences encoding ribosomal RNA of around 98%.

A bacterial genus corresponds to a clearly definable entity, clearly distinct from other genera. The complete definition of currently identified genera is given in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. However, there is no total consensus with respect to this definition of genus and once again redefinitions are occasionally proposed. By analogy with the genetic criteria above, species belonging to the same genus have genomes for which the degree of similarity ranges from 30 to 70%. For the classification, a standard species acts as a reference for each bacterial genus. By convention, the name of the species is always written in lower case, along with the name of the corresponding genus which begins with a capital letter. These Latin names are written in italics and the name of the genus can be abbreviated using the first capital letter. For example, in the name *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides* is the name of the genus and *fragilis* is the name of the species. *B. fragilis* is the standard species of the *Bacteroides* genus. Pathological properties or, conversely, health effects are attributable to a strain and extension to a species must be considered to be risky.

**Bifidogenic:** Said of a product leading to a significant increase in bifidobacteria populations and/or functions. In practice, this usually means an increase in the bifidobacteria population within the faecal flora.

**Bifidobacteria, *Bifidobacterium*:** Bacteria belonging to the *Bifidobacterium* genus. These are anaerobic bacteria, present in the dominant flora of infants and inconstantly in the dominant flora of adults.

**CFU:** Colony-forming unit (measurement unit for bacteria by culturing).

**Cytokine:** From the Greek *kutos*, meaning cell, and *kineo*, meaning stimulate, this recent word signifies non-antibody peptides or proteins secreted by the cells of the immune system mainly but also by other cells (epithelial, endothelial, mesenchymatous) which act as intercellular messengers or mediators and have a regulatory activity on the immune system. They generally act locally in a paracrine or autocrine manner rather than an endocrine one. They are involved in infection, inflammation, immunity and cell growth.

**Dominant** (dominant flora) said of the most representative bacteria in the flora of an ecosystem. In the colon (or the stools), it is defined as concentrations greater than or equal to  $10^8$ .g-1 or greater than 1% of the total flora.

**FOS** (Fructooligosaccharides): Sugars formed of chains of varying lengths of fructose, with or without another sugar at the end.

**Immunity (Adaptive ~):** Specific immune response of a given exogenous antigen, involving antibody-producing B lymphocytes, T lymphocytes which are involved in the differentiation of B lymphocytes and destroy the cells containing the microorganisms using soluble substances. A key benefit of adaptive immunity is the establishment of an immune memory, enabling the development of more intense and more accurate responses to microbial aggressors when contact is repeated, reducing morbidity and mortality.

**Immunity (Innate ~):** Set of very rapid responses of the immune system designed to combat an infection (pathogenic bacteria, virus, parasite); it is not specific to a bacterial or viral antigen and does not involve antibodies but, rather, the recognition of membrane elements of invading microorganisms (LPS, lipoteichoic acids) leading to activation of macrophages or NK (natural killer) lymphocytes.

**Lactobacilli:** genus of bacteria containing several species, such as *L. acidophilus*, *johnsonii*, *casei*, *rhamnosus*, *bulgaricus*, etc.

**NDO:** non-digestible oligosaccharides

**Oral tolerance:** Oral tolerance is the development of “suppressive” or “anergic”-type immune responses, preventing the induction of specific immune responses of food proteins and resident bacteria, both in the gut and in the body as a whole. This important function thus prevents the development of food allergies and inflammatory reactions of the gastrointestinal tract in response to the resident microflora, as in Crohn’s disease.

**PBMC:** Peripheral Blood Mononuclear Cell.

**Prebiotic:** a prebiotic has been defined as “a non-digestible food ingredient that beneficially affects the host by selectively stimulating the growth and/or the activity of one or a limited number of bacterial species already resident in the colon, and thus attempt to improve host health” (Gibson 1995; Schrezenmeir 2001). Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125:1401-12 - Schrezenmeir J, de Vrese M Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition *Am J Clin Nutr* 2001;73 (2 Suppl): 361s-364s.

**Probiotic:** In 2002, the *Food and Agriculture Organisation* of the United Nations and the World Health Organisation (WHO) drew up guidelines for the use of the term “probiotics” in foods and formulated the definition: “live microorganisms which when consumed in adequate amount confer a health benefit on the host” (document CX/NFSDU 02/2, July 2002).

**Short-chain fatty acids (SCFA):** principally acetate, propionate and butyrate, products of fermentation of carbohydrates by the flora.

**Symbiotic:** A symbiotic is defined as a product containing both prebiotic(s) and probiotic(s).

## Bibliographie/References

### Chapitre I : Peut-on définir un bon profil de flore humaine? / Is it possible to define a good flora profile ?

- Albert, M. J., Bhat, P., Rajan, D., Maiya, P. P., Pereira, S. M., and Baker, S. J. (1978). Faecal flora of South Indian infants and young children in health and with acute gastroenteritis. *J Med Microbiol* 11, 137-143.
- Barc, M. C., Bourlioux, F., Rigottier-Gois, L., Charrin-Sarnel, C., Janoir, C., Boureau, H., Dore, J., and Collignon, A. (2004). Effect of amoxicillin-clavulanic acid on human fecal flora in a gnotobiotic mouse model assessed with fluorescence hybridization using group-specific 16S rRNA probes in combination with flow cytometry. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1365-1368.
- Benno, Y., Endo, K., Mizutani, T., Namba, Y., Komori, T., and Mitsuoka, T. (1989). Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan. *Appl Environ Microbiol* 55, 1100-1105.
- Blaut, M., Collins, M. D., Welling, G. W., Dore, J., van Loo, J., and de Vos, W. (2002). Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. *Br J Nutr* 87 Suppl 2, S203-S211.
- Borrueel, N., Carol, M., Casellas, F., Antolin, M., de Lara, F., Espin, E., Naval, J., Guarner, F., and Malagelada, J. R. (2002). Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut* 51, 659-664.
- Corthier, G., Muller, M. C., and L'Haridon, R. (1996). Selective enumeration of *Bacteroides vulgatus* and *B. distasonis* organisms in the predominant human fecal flora by using monoclonal antibodies. *Appl Environ Microbiol* 62, 735-738.
- Ducluzeau, R. (1988). Role of experimental microbial ecology in gastroenterology. In *Microbial ecology and intestinal infection*. E Bergogne-Berezin. Proceedings of the Symposium, Springer-Verlag. France. pp. 7-26.
- Franks, A. H., Harmsen, H. J., Raangs, G. C., Jansen, G. J., Schut, F., and Welling, G. W. (1998). Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 64, 3336-3345.
- Fujita, K., Kaku, M., Yanagase, Y., Ezaki, T., Furuse, K., Ozawa, A., Saidi, S. M., Sang, W. K., and Waiyaki, P. G. (1990). Physicochemical characteristics and flora of diarrhoeal and recovery faeces in children with acute gastro-enteritis in Kenya. *Ann Trop Paediatr* 10, 339-345.
- Gorbach, S. L., Banwell, J. G., Chatterjee, B. D., Jacobs, B., and Sack, R. B. (1971). Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics. I. Alterations in intestinal microflora. *J Clin Invest* 50, 881-889.
- Gorbach, S. L., Banwell, J. G., Jacobs, B., Chatterjee, B. D., Mitra, R., Brigham, K. L., and Neogy, K. N. (1970). Intestinal microflora in Asiatic cholera. I. "Rice-water" stool. *J Infect Dis* 121, 32-37.
- Harmsen, H. J., Raangs, G. C., He, T., Degener, J. E., and Welling, G. W. (2002). Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 68, 2982-2990.
- Harmsen, H. J., Wildeboer-Veloo, A. C., Grijpstra, J., Knol, J., Degener, J. E., and Welling, G. W. (2000). Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human feces from volunteers of different age groups. *Appl Environ Microbiol* 66, 4523-4527.
- Jansen, G. J., Wildeboer-Veloo, A. C., Tonk, R. H., Franks, A. H., and Welling, G. W. (1999). Development and validation of an automated, microscopy-based method for enumeration of groups of intestinal bacteria. *J Microbiol Methods* 37, 215-221.
- Langendijk, P. S., Schut, F., Jansen, G. J., Raangs, G. C., Kamphuis, G. R., Wilkinson, M. H., and Welling, G. W. (1995). Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 61, 3069-3075.
- Mackie, R. I., Sghir, A., and Gaskins, H. R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 69, 1035S-1045S.
- Mangin, I., Bonnet, R., Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Sutren, M., Bouhnik, Y., Neut, C., Collins, M. D., Colombel, J.-F., Marteau, P., and Dore, J. (2004). Molecular inventory of faecal microflora in patients with Crohn's disease. *FEMS Microbiology Ecology* 50, 25-36.
- Marteau, P., Lepage, P., Mangin, I., Suau, A., Dore, J., Pochart, P., and Seksik, P. (2004). Gut flora and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 20 Suppl 4, 18-23.
- Marteau, P., Pochart, P., Dore, J., Bera-Maillet, C., Bernalier, A., and Corthier, G. (2001). Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 67, 4939-4942.
- Marteau, P., Seksik, P., and Shanahan, F. (2002). Manipulation of the bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17, 47-61.
- Marteau, P., and Shanahan, F. (2003). Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17, 725-740.
- Mitsuoka, T. (1992). Intestinal flora and aging. *Nutr Rev* 50, 438-446.
- Moore, W. E., and Holdeman, L. V. (1974). Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol* 27, 961-979.

- Rigottier-Gois, L., Le Bourhis, A.-G., Gramet, G., Rochet, V., and Dore, J. (2003). Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 237-245.
- Rutgeerts, P., Goboos, K., Peeters, M., Hiele, M., Penninckx, F., Aerts, R., Kerremans, R., and Vantrappen, G. (1991). Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet* 338, 771-774.
- Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., and Dore, J. (2003). Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 52, 237-242.
- Sghir, A., Gramet, G., Suau, A., Rochet, V., Pochart, P., and Dore, J. (2000). Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol* 66, 2263-2266.
- Suau, A. (2003). Molecular tools to investigate intestinal bacterial communities. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 37, 222-224.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J. J., Gibson, G. R., Collins, M. D., and Dore, J. (1999). Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 65, 4799-4807.
- Tannock, G. W., Munro, K., Harmsen, H. J., Welling, G. W., Smart, J., and Gopal, P. K. (2000). Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol* 66, 2578-2588.
- Vanhoutte, T., Huys, G., De Brandt, E., and Swings, J. (2004). Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. *FEMS Microbiol Ecol* 48, 437-446.
- Wilson, K. (1991). The gastrointestinal microflora. In *Textbook of Gastroenterology* (Philadelphia), pp. 532-543.
- Wilson, K. H., and Blitchington, R. B. (1996). Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 62, 2273-2278.
- Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 4576-4579.
- Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D., and De Vos, W. M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* 64, 3854-3859.
- Zoetendal, E. G., von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A. D., and de Vos, W. M. (2002). Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol* 68, 3401-3407.

## **Chapitre II : Quel est l'intérêt des produits contenant des micro-organismes vivants par rapport aux produits contenant des micro-organismes tués ? / What is the value of products containing live microorganisms in comparison with products containing dead microorganisms ?**

- Coconnier, M. H., Lievin, V., Hemery, E., and Servin, A. L. (1998). Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl Environ Microbiol* 64, 4573-4580.
- Donnet-Hughes, A., Rochat, F., Serrant, P., Aeschlimann, J. M., and Schiffrin, E. J. (1999). Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *J Dairy Sci* 82, 863-869.
- FAO/OMS Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba, Argentina, 1-4 October 2001. ([ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio\\_report\\_en.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf))
- Felley, C. P., Corthesy-Theulaz, I., Rivero, J. L., Sipponen, P., Kaufmann, M., Bauerfeind, P., Wiesel, P. H., Brassart, D., Pfeifer, A., Blum, A. L., and Michetti, P. (2001). Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on *Helicobacter pylori* gastritis in man. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13, 25-29.
- Isolauri, E., Juntunen, M., Rautanen, T., Sillanaukee, P., and Koivula, T. (1991). A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 88, 90-97.
- Kaila, M., Isolauri, E., Saxelin, M., Arvilommi, H., and Vesikari, T. (1995). Viable versus inactivated *Lactobacillus* strain GG in acute rotavirus diarrhoea. *Arch Dis Child* 72, 51-53.
- Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virtanen, E., Laine, S., and Arvilommi, H. (1992). Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res* 32, 141-144.
- Marteau, P., Flourié, B., Pochart, P., Chastang, C., Desjeux, J. F., and Rambaud, J. C. (1990). Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. *Br J Nutr* 64, 71-79.
- Marteau, P., Lepage, P., Mangin, I., Suau, A., Doré, J., Pochart, P., and Seksik, P. (2004). Review article: gut flora and inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol Ther.* 20 Suppl 4, 18-23.



- Marteau, P., Vesa, T., Rambaud, J.-C. (1997). Lactose maldigestion In : Probiotics 2, application and practical aspects. Fuller Ed. Chapman and Hall. London. pp 65-88
- Martini, M. C., Smith, D. E., and Savaiano, D. A. (1987). Lactose digestion from flavored and frozen yogurts, ice milk, and ice cream by lactase-deficient persons. *Am J Clin Nutr* 46, 636-640.
- Michetti, P., Dorta, G., Wiesel, P. H., Brassart, D., Verdu, E., Herranz, M., Felley, C., Porta, N., Rouvet, M., Blum, A. L., and Corthesy-Theulaz, I. (1999). Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus (johnsonii)* La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion* 60, 203-209.
- Mullie, C., Yazourh, A., Singer, E., Lecroix, F., Blareau, J. P., Romond, M. B., and Romond, C. (2002). Partial characterization of *Bifidobacterium breve* C50 cell-free whey compounds inducing modifications to the intestinal microflora. *J Dairy Sci* 85, 1383-1389.
- Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K., and Raz, E. (2004). Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126, 520-528.
- Rizkalla, S. W., Luo, J., Kabir, M., Chevalier, A., Pacher, N., and Slama, G. (2000). Chronic consumption of fresh but not heated yogurt improves breath-hydrogen status and short-chain fatty acid profiles: a controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion. *Am J Clin Nutr* 72, 1474-1479.
- Romond, M. B., Ais, A., Guillemot, F., Bounouader, R., Cortot, A., and Romond, C. (1998). Cell-free whey from milk fermented with *Bifidobacterium breve* C50 used to modify the colonic microflora of healthy subjects. *J Dairy Sci* 81, 1229-1235.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M. C., Roberfroid, M., and Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 80 Suppl 1, S147-171.
- Salminen, S., Ouwehand, A. C., Isolauri, E. (1997). Clinical application of probiotics. *Int Dairy J* 8, 563-572.
- Savaiano, D. A., AbouElAnouar, A., Smith, D. E., and Levitt, M. D. (1984). Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. *Am J Clin Nutr* 40, 1219-1223.
- Schiffrin, E. J., Rochat, F., Link-Amster, H., Aeschlimann, J. M., and Donnet-Hughes, A. (1995). Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 78, 491-497.
- Varela-Moreiras, G., Antoine, J. M., Ruiz-Roso, B., and Varela, G. (1992). Effects of yogurt and fermented-then-pasteurized milk on lactose absorption in an institutionalized elderly group. *J Am Coll Nutr* 11, 168-171.
- Xiao, S. D., Zhang de, Z., Lu, H., Jiang, S. H., Liu, H. Y., Wang, G. S., Xu, G. M., Zhang, Z. B., Lin, G. J., and Wang, G. L. (2003). Multicenter, randomized, controlled trial of heat-killed *Lactobacillus acidophilus* LB in patients with chronic diarrhea. *Adv Ther* 20, 253-260.

### **Chapitre III : Survie des probiotiques en transit dans l'intestin de l'homme / Survival of dietary probiotics and intestinal transit in humans**

- Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M., Vilponen-Salmela, T., Mattila-Sandholm, T., and von Wright, A. (1999). Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl Environ Microbiol* 65, 351-354.
- Bermudez-Humaran, L. G., Langella, P., Cortes-Perez, N. G., Gruss, A., Tamez-Guerra, R. S., Oliveira, S. C., Saucedo-Cardenas, O., Montes de Oca-Luna, R., and Le Loir, Y. (2003). Intranasal immunization with recombinant *Lactococcus lactis* secreting murine interleukin-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production. *Infect Immun* 71, 1887-1896.
- Bermudez-Humaran, L. G., Langella, P., Miyoshi, A., Gruss, A., Guerra, R. T., Montes de Oca-Luna, R., and Le Loir, Y. (2002). Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 68, 917-922.
- Berrada, N., Lemeland, J. F., Laroche, G., Thouvenot, P., and Piaia, M. (1991). *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *J Dairy Sci* 74, 409-413.
- Bouhnik, Y., Pochart, P., Marteau, P., Arlet, G., Goderel, I., and Rambaud, J. C. (1992). Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium sp* ingested in fermented milk. *Gastroenterology* 102, 875-878.
- Brigidi, P., Swennen, E., Vitali, B., Rossi, M., and Matteuzzi, D. (2003). PCR detection of *Bifidobacterium* strains and *Streptococcus thermophilus* in feces of human subjects after oral bacteriotherapy and yogurt consumption. *Int J Food Microbiol* 81, 203-209.
- Bunte, C., Hertei, C., and Hammes, W. P. (2000). Monitoring and survival of *Lactobacillus paracasei* LTH 2579 in food and the human intestinal tract. *Syst Appl Microbiol* 23, 260-266.
- Collins, J., Dunne, C., Murphy, L., Morrissey, D., O'Mahony, L., O'Sullivan, E., Fitzgerald, G., Kiely, B., O'Sullivan, G., Daly, C., Marteau, P., Shanahan, F. (2002). A randomised controlled trial of a probiotic *Lactobacillus* strain in healthy adults: assessment of its delivery, transit and influence on microbial flora and enteric immunity. *Microbial Ecol Health Dis* 14, 81-89.
- Drouault, S., Juste, C., Marteau, P., Renault, P., and Corthier, G. (2002). Oral treatment with *Lactococcus lactis* expressing *Staphylococcus hyicus* lipase enhances lipid digestion in pigs with induced pancreatic insufficiency. *Appl Environ Microbiol* 68, 3166-3168.

- Ducluzeau, R. (1988). Role of experimental microbial ecology in gastroenterology. In Microbial ecology and intestinal infection. E Bergogne-Berezin. Proceedings of the Symposium, Springer-Verlag. France. pp. 7-26.
- Fujiiwara, S., Seto, Y., Kimura, A., and Hashiba, H. (2001). Intestinal transit of an orally administered streptomycin-rifampicin-resistant variant of *Bifidobacterium longum* SBT2928: its long-term survival and effect on the intestinal microflora and metabolism. *J Appl Microbiol* 90, 43-52.
- Gilliland, S. E., Speck, M. L., Nauyok, G. F., and F.G., G. (1978). Influence of consuming non fermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* on fecal flora of healthy males. *J Dairy Sci* 61, 1-10.
- Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., and Salminen, S. (1992). Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 37, 121-128.
- Jan, G., Leverrier, P., Proudly, I., and Roland, N. (2002). Survival and beneficial effects of *Propionibacteria* in the human gut: in vivo and in vitro investigations. *Lait* 82, 131-144.
- Johansson, M. L., Molin, G., Jeppsson, B., Nobaek, S., Ahrne, S., and Bengmark, S. (1993). Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Appl Environ Microbiol* 59, 15-20.
- Johansson, M. L., Nobaek, S., Berggren, A., Nyman, M., Bjorck, I., Ahrne, S., Jeppsson, B., and Molin, G. (1998). Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. *Int J Food Microbiol* 42, 29-38.
- Jones, R. N., Marshall, S. A., Pfaller, M. A., Wilke, W. W., Hollis, R. J., Erwin, M. E., Edmond, M. B., and Wenzel, R. P. (1997). Nosocomial enterococcal blood stream infections in the SCOPE Program: antimicrobial resistance, species occurrence, molecular testing results, and laboratory testing accuracy. *SCOPE Hospital Study Group. Diagn Microbiol Infect Dis* 29, 95-102.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S. A., Sandbrink, H. M., Fiers, M. W., et al. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1990-1995.
- Klijn, N., Weerkamp, A. H., and de Vos, W. M. (1995). Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 61, 2771-2774.
- Kullen, M. J., Amann, M. M., O'Shaughnessy, M. J., O'Sullivan, D. J., Busta, F. F., and Brady, L. J. (1997). Differentiation of ingested and endogenous *Bifidobacteria* by DNA fingerprinting demonstrates the survival of an unmodified strain in the gastrointestinal tract of humans. *J Nutr* 127, 89-94.
- Lindwall, S., and Fonden, R. (1984). Passage and survival of *L. acidophilus* in the human gastrointestinal tract. *Int Dairy Fed Bull* 21, 179.
- Lund, B., Adamsson, I., and Edlund, C. (2002). Gastrointestinal transit survival of an *Enterococcus faecium* probiotic strain administered with or without vancomycin. *Int J Food Microbiol* 77, 109-115.
- Mahe, S., Marteau, P., Huneau, J. F., Thuillier, F., and Tomé, D. (1994). Intestinal nitrogen and electrolyte movements following fermented milk ingestion in man. *Br J Nutr* 71, 169-180.
- Mantere-Alhonen, S. (1995). *Propionibacteria* used as probiotics - A review. *Lait* 75, 447-452.
- Marteau, P., Pochart, P., Bouhnik, Y., and Rambaud, J. C. (1993). The fate and effects of transiting, nonpathogenic microorganisms in the human intestine. *World Rev Nutr Diet* 74, 1-21.
- Marteau, P., Pochart, P., Bouhnik, Y., Zidi, S., Goderel, I., and Rambaud, J. C. (1992). [Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium sp.* in the small intestine following ingestion in fermented milk. A rational basis for the use of probiotics in man]. *Gastroentérol Clin Biol* 16, 25-28.
- Mercenier, A., Muller-Alouf, H., and Grangette, C. (2000). Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr Issues Mol Biol* 2, 17-25.
- Mitsuoka, T. (1989). Taxonomy and ecology of the indigenous intestinal bacteria. In: Hatton T, ed *Recent Advances in Microbial Ecology* Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 493-498.
- Moore, W. E., and Holdeman, L. V. (1974). Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol* 27, 961-979.
- Pedrosa, M. C., Golner, B. B., Goldin, B. R., Barakat, S., Dallal, G. E., and Russell, R. M. (1995). Survival of yogurt-containing organisms and *Lactobacillus gasseri* (ADH) and their effect on bacterial enzyme activity in the gastrointestinal tract of healthy and hypochlorhydric elderly subjects. *Am J Clin Nutr* 61, 353-359.
- Petterson, L., Graf, W., and Sevelin, V. (1985). Survival of *Lactobacillus acidophilus* NCDO 1748 in the human gastro-intestinal tract. 2. Ability to pass the stomach and intestine in vivo. *Nutrition and Intestinal flora* (Hallgren, B, Ed), 127-130. Symp. Swed. Nutr. Found. XV. Almqvist and Wiksell, Uppsala.
- Pochart, P., Dewit, O., Desjeux, J. F., and Bourlioux, P. (1989). Viable starter culture, beta-galactosidase activity, and lactose in duodenum after yogurt ingestion in lactase-deficient humans. *Am J Clin Nutr* 49, 828-831.
- Pochart, P., Marteau, P., Bouhnik, Y., Goderel, I., Bourlioux, P., and Rambaud, J. C. (1992). Survival of *Bifidobacteria* ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. *Am J Clin Nutr* 55, 78-80.
- Saxelin, M., Pessi, T., and Salminen, S. (1995). Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. *Int J Food Microbiol* 25, 199-203.

- Sen, S., Mullan, M. M., Parker, T. J., Woolner, J. T., Tarry, S. A., and Hunter, J. O. (2002). Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on colonic fermentation and symptoms of irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 47, 2615-2620.
- Shinoda, T., Kusuda, D., Ishida, Y., Ikeda, N., Kaneko, K., Masuda, O., and Yamamoto, N. (2001). Survival of *Lactobacillus helveticus* strain CP53 in the human gastrointestinal tract. *Lett Appl Microbiol* 32, 108-113.
- Spanhaak, S., Havenaar, R., and Schaafsma, G. (1998). The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain *Shirota* on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Clin Nutr* 52, 899-907.
- Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neiryck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W., and Remaut, E. (2000). Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 289, 1352-1355.
- Tannock, G. W., Munro, K., Harmsen, H. J., Welling, G. W., Smart, J., and Gopal, P. K. (2000). Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol* 66, 2578-2588.
- Vesa, T., Pochart, P., and Marteau, P. (2000). Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* 14, 823-828.
- Wullt, M., Hagslatt, M. L., and Odenholt, I. (2003). *Lactobacillus plantarum* 299v for the treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a double-blind, placebo-controlled trial. *Scand J Infect Dis* 35, 365-367.
- Yuki, N., Watanabe, K., Mike, A., Tagami, Y., Tanaka, R., Ohwaki, M., and Morotomi, M. (1999). Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain *Shirota*, in the gastrointestinal tract: selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. *Int J Food Microbiol* 48, 51-57.

#### **Chapitre IV : Les effets des probiotiques sont-ils spécifiques à la souche, à l'espèce, au genre ? / Are the effects of probiotics specific to the strain, species or genus ?**

- Bevilacqua, L., Ovidi, M., Di Mattia, E., Trovatelli, L. D., and Cangarella, F. (2003). Screening of *Bifidobacterium* strains isolated from human faeces for antagonistic activities against potentially bacterial pathogens. *Microbiol Res* 158, 179-85.
- Cesena, C., Morelli, L., Alander, M., Siljander, T., Tuomola, E., Salminen, S., Mattila-Sandholm, T., Vilpponen-Salmela, T., and von Wright, A. (2001). *Lactobacillus crispatus* and its nonaggregating mutant in human colonization trials. *J Dairy Sci* 84, 1001-10.
- Collins, J. K., Dunne, C., Murphy, L., Morrissey, D., O'Mahony, L., O'Sullivan, E., Fitzgerald, G., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Daly, C., Marteau, P., and Shanahan, F. (2002). A randomised controlled trial of a probiotic *Lactobacillus* strain in healthy adults : assessment of its delivery, transit and influence on microbial flora and enteric immunity. *Microbiol Ecol Health Dis* 14, 81-89.
- Duc le, H., Hong, H. A., Barbosa, T. M., Henriques, A. O., and Cutting, S. M. (2004). Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl Environ Microbiol* 70, 2161-2171.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., *et al.* (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr* 73, 386S-392S.
- Gagnon, M., Kheadr, E. E., Le Blay, G., and Fliss, I. (2004). In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *Int J Food Microbiol* 92, 69-78.
- Gorbach, S. L. (2002). Probiotics in the third millennium. *Dig Liver Dis* 34 *Suppl* 2, S2-7.
- Kaila, M., Isolauri, E., Saxelin, M., Arvilommi, H., and Vesikari, T. (1995). Viable versus inactivated *Lactobacillus* strain GG in acute rotavirus diarrhoea. *Arch Dis Child* 72, 51-53.
- Lee, Y. K., Puong, K. Y., Ouwehand, A. C., and Salminen, S. (2003). Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J Med Microbiol* 52, 925-930.
- Linaje, R., Coloma, M. D., Perez-Martinez, G., and Zuniga, M. (2004). Characterization of faecal *Enterococci* from rabbits for the selection of probiotic strains. *J Appl Microbiol* 96, 761-771.
- Marteau, P., Cuillerier, E., Meance, S., Gerhardt, M. F., Myara, A., Bouvier, M., Bouley, C., Tondu, F., Bommelaer, G., and Grimaud, J. C. (2002). *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 16, 587-593.
- Marteau, P., and Shanahan, F. (2003). Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17, 725-740.
- Martini, M. C., Smith, D. E., and Savaiano, D. A. (1987). Lactose digestion from flavored and frozen yogurts, ice milk, and ice cream by lactase-deficient persons. *Am J Clin Nutr* 46, 636-640.
- Osman, N., Adawi, D., Ahrne, S., Jeppsson, B., and Molin, G. (2004). Modulation of the effect of dextran sulfate sodium-induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Dig Dis Sci* 49, 320-327.
- Ouwehand, A. C., Tuomola, E. M., Tolkko, S., and Salminen, S. (2001). Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *Int J Food Microbiol* 64, 119-126.

Paubert-Braquet, M., Gan, X. H., Gaudichon, C., Hedef, N., Serikoff, A., Bouley, C., Bonavida, B., and Braquet, P. (1995). Enhancement of host resistance against *Salmonella typhimurium* in mice fed a diet supplemented with yogurt or milks fermented with various *Lactobacillus casei* strains. *Int J Immunother* 21, 153-61.

Pedone, C. A., Arnaud, C. C., Postaire, E. R., Bouley, C. F., and Reinert, P. (2000). Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea. *Int J Clin Pract* 54, 568-571.

Santos, A., San Mauro, M., Sanchez, A., Torres, J. M., and Marquina, D. (2003). The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus spp.* isolated from kefir. *Syst Appl Microbiol* 26, 434-437.

Tuomola, E. M. & Salminen, S. J. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 45-53.

Vesa, T. H., Marteau, P., Korpela, R. (2000). Lactose intolerance. *J Am Coll Nutr* 19 (2 Suppl), 165S-175S.

Wendakoon, C. N., Fedio, W., Macloed, A., Ozi- mek, L. (1998). *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* by dairy starter cultures. *Milchwissenschaft* 53, 499-502.

## **Chapitre V : Les effets des prébiotiques sont-ils structure-dépendants ? / Are the effects of prebiotics structure-dependant ?**

Bird, A. R., Brown, I. L., and Topping, D. L. (2000). Starches, resistant starches, the gut microflora and human health. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 1, 25-37.

Campbell, J. M., Fahey, G. C., Lichtensteiger, C. A., Demichele, S. J., and Garleb, K. A. (1997). An enteral formula containing fish oil, indigestible oligosaccharides, gum arabic and antioxidants affects plasma and colonic phospholipid fatty acid and prostaglandin profiles in pigs. *J Nutr* 127, 137-145.

Coudray, C., Tressol, J., Gueux, E., and Rayssiguier, Y. (2003). Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats. *Eur J Nutr* 42, 91-98.

Crittenden, R. G., and Playne, M. J. (1996). Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology* 7, 353-361.

Ehrmann, M. A., Korakli, M., and Vogel, R. F. (2003). Identification of the gene for  $\beta$ -fructofuranosidase of *Bifidobacterium lactis* DSM10140T and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Current Microbiology* 46, 391 - 397.

Flamm, G., Glinsmann, W., Kritchevsky, D., Prosky, L., and Roberfroid, M. (2001). Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr* 41, 353-362.

Frank, A. (2002). Prébiotiques. In *Aliments fonctionnels*, Roberfroid M (coordonnateur) Editions Tec& Doc, Collection Sciences & Techniques Agroalimentaires, Lavoisier, Paris, 105-123.

Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X., and Cummings, J. H. (1995). Selective stimulation of *Bifidobacteria* in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 108, 975-982.

Gibson, G. R., and Fuller, R. (2000). Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J Nutr* 130, 391S-395S.

Gibson, G. R., and Wang, X. (1994a). Bifidogenic properties of different types of fructo-oligosaccharides. *Food Microbiol* 11, 491-498.

Gibson, G. R., and Wang, X. (1994b). Enrichment of *Bifidobacteria* from human gut contents by oligofructose using continuous culture. *FEMS Microbiology Letters* 118, 121-128.

Griffin, I., Davila, P. M., and Abrams, S. A. (2002). Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes. *Br J Nutr* 87, S187-S191.

Grizard, D., and Barthelemy, C. (1999). Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Reproduction, Nutrition et Développement* 9, 563-588.

Janer, C., Rohr, L., Pelaez, C., Laloi, M., Cleusix, V., Requena, T., and Meile, L. (2004). Hydrolysis of oligofructoses by the recombinant  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium lactis*. *Syst Appl Microbiol* 27, 279-285.

Kabel, M. A., Kortenoeven, L., Schols, H. A., and Voragen, A. G. (2002). In vitro fermentability of differently substituted xylo-oligosaccharides. *J Agric Food Chem* 50, 6205-6210.

Kaplan, H., and Hutkins, R. (2003). Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl Environ Microbiol* 69, 2217-2222.

Kaplan, H., and Hutkins, R. W. (2000). Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and *bifidobacteria*. *Applied Environ Microbiol* 66, 2682-2684.

Kennedy, J. F., and White, C. A. (1983). (eds) *Bioactive carbohydrates in chemistry, biochemistry and biology*. Ellis Horwood publishers 331pp.

- Kleessen, B., Hartmann, L., and Blaut, M. (2001). Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *Br J Nutr* 86, 291-300.
- Kruger, M., Brown, K., Collett, G., Layton, L., and Schollum, L. (2003). The effect of fructooligosaccharides with various degrees of polymerization on calcium bioavailability in the growing rat. *Exp Biol Med (Maywood)* 228, 683-688.
- Menne, E., Guggenbuhl, N., and Roberfroid, M. (2000). Fn-type chicory inulin hydrolysate has a prebiotic effect in humans. *J Nutr* 130, 1197-1199.
- Michel, C., Bénard, C., Lahaye, M., Formaglio, D., Kaeffer, B., Quemener, B., Bérot, S., Yvin, J.-C., Blottière, H. M., and Cherbut, C. (1999). Les oligosides algaux comme aliments fonctionnels : étude *in vitro* de leurs effets cellulaires et fermentaires. *Science des aliments* 19, 311-332.
- Olano-Martin, E., Gibson, G. R., and Rastall, R. A. (2002). Comparison of the *in vitro* bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *J Appl Microbiol* 93, 505-511.
- Olano-Martin, E., Mountzouris, K. C., Gibson, G. R., and Rastall, R. A. (2000). *In vitro* fermentability of dextran, oligodextran, and maltodextrin by human gut bacteria. *Br J Nutr* 83, 247-255.
- Palframan, R. J., Gibson, G. R., and Rastall, R. A. (2002). Effect of pH and dose on the growth of gut bacteria on prebiotic carbohydrates *in vitro*. *Anaerobe* 8, 287-292.
- Pavis, N., Chatterton, N. J., Harrison, P. A., Baumgartner, S., Praznik, W., Boucaud, J., and Prud'homme, M. P. (2001). Structure of fructans in roots and leaf tissues of *Lolium perenne*. *New Phytologist* 150, 83-95.
- Perrin, S., Fougnyes, C., Grill, J., Jacobs, H., and Schneider, F. (2002). Fermentation of chicory fructo-oligosaccharides in mixtures of different degrees of polymerization by three strains of *bifidobacteria*. *Can J Microbiol* 48, 759-763.
- Reddy, B. S., Hamid, R., and Rao, C. V. (1997). Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. *Carcinogenesis* 18, 1371-1374.
- Roberfroid, M. B., and Delzenne, N. M. (1998). Dietary fructans. *Annu Rev Nutr* 18, 117-143.
- Roberfroid, M. B., Van Loo, J. A., and Gibson, G. R. (1998). The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J Nutr* 128, 11-19.
- Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R., and Rastall, R. A. (2001). A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J Microbiol* 91, 878-887.
- Smiricky-Tjardes, M. R., Flickinger, E. A., Grieshop, C. M., Bauer, L. L., Murphy, M. R., and Fahey, G. C. (2003). *In vitro* fermentation characteristics of selected oligosaccharides by swine fecal microflora. *J Anim Sci* 81, 2505-2514.
- Topping, D., Fukushima, M., and Bird, A. (2003). Resistant starch as a prebiotic and synbiotic: state of the art. *Proc Nutr Soc* 62, 171-176.
- Van der Meulen, R., Avonts, L., and De Vuyst, L. (2004). Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. *Appl Environ Microbiol* 70, 1923-1930.
- Verghese, M., Rao, D., Chawan, C., Williams, L., and Shackelford, L. (2002). Dietary inulin suppresses azoxymethane-induced aberrant crypt foci and colon tumors at the promotion stage in young Fisher 344 rats. *J Nutr* 132, 2809-2813.
- Vickers, R., Sunvold, G., Kelley, R., and Reinhart, G. (2001). Comparison of fermentation of selected fructooligosaccharides and other fiber substrates by canine colonic microflora. *Am J Vet Res* 62, 609-615.
- Wang, X., and Gibson, G. R. (1993). Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the large intestine. *J Appl Bacteriol* 75, 373-380.

## **Chapitre VI : Comment peut-on démontrer l'existence d'un effet bifidogène ? / How can the existence of a bifidogenic effect be demonstrated ?**

- Alander, M., Mättö, J., Kneifel, W., Johansson, M., Kögler, B., Crittenden, R., Mattila-Sandholm, T., and Saarel, M. (2001). Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract. *Int Dairy J* 11, 817-825.
- Alles, M. S., Hartemink, R., Meyboom, S., Harryvan, J. L., Van Laere, K. M., Nagengast, F. M., and Hautvast, J. G. (1999). Effect of transgalactooligosaccharides on the composition of the human intestinal microflora and on putative risk markers for colon cancer. *Am J Clin Nutrition* 69, 980-991.
- Bello, F. D., Walter, J., Hertel, C., and Hammes, W. P. (2001). *In vitro* study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from *Lactobacilli* and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Syst Appl Microbiol* 24, 232-237.
- Bouhnik, Y., Attar, A., Joly, F. A., Riottot, M., Dyard, F., and Flourie, B. (2004). Lactulose ingestion increases faecal bifidobacterial counts: a randomised double-blind study in healthy humans. *Eur J Clin Nutr* 58, 462-466.
- Bouhnik, Y., and Bornet, F. (1998). Effects of an enteral nutritional formula (ENF) administration containing or not containing supplemental fructooligosaccharides (FOS) in healthy human adults. *Food Chem Toxicol* 36, 1031-1032.

- Bouhnik, Y., Flourié, B., Riottot, M., Bisetti, N., Gailing, M. F., Guibert, A., Bornet, F., and Rambaud, J. C. (1996). Effects of fructo-oligosaccharides ingestion on fecal *bifidobacteria* and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans. *Nutrition and Cancer* 26, 21-29.
- Bouhnik, Y., Flourié, B. D. A.-A., L., Pochart, P. G., G., Durand, M., and Rambaud, J. C. (1997). Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal *bifidobacteria* and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. *J Nutr* 127, 444-448.
- Bouhnik, Y., Vahedi, K., Achour, L., Attar, A., Salfati, J., Pochart, P., Marteau, P., Flourié, B., Bornet, F., and Rambaud, J.-C. (1999). Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. *J Nutr* 129, 113-116.
- Brighenti, F., Testolin, G., Canzi, E., Ferrari, A., Wolever, M. S., Ciappellano, S., Pomini, M., and Simonetti, P. (1989). Influence of long-term feeding of different purified dietary fibers on the volatile fatty acid (VFA) profile, pH and fiber-degrading activity of the cecal contents in rats. *Nut Res* 9, 761-772.
- Brigidi, P., Vitali, B., Swennen, E., Altomare, L., Rossi, M., and Matteuzzi, D. (2000). Specific detection of bifidobacterium strains in a pharmaceutical probiotic product and in human feces by polymerase chain reaction. *Syst Appl Microbiol* 23, 391-399.
- Buddington, R. K., Williams, C. H., Chen, S. C., and Witherly, S. A. (1996). Dietary supplement of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects. *Am J Clin Nutr* 63, 709-716.
- Campbell, J. M., Fahey, G. C., Demichele, S. J., and Garleb, K. A. (1997). Metabolic characteristics of healthy adult males as affected by ingestion of a liquid nutritional formula containing fish oil, oligosaccharides, gum arabic and antioxidant vitamins. *Food Chem Toxicol* 35, 1165-1176.
- Campbell, J. M., Fahey, G. C., Lichtensteiger, C. A., Demichele, S. J., and Garleb, K. A. (1997). An enteral formula containing fish oil, indigestible oligosaccharides, gum arabic and antioxidants affects plasma and colonic phospholipid fatty acid and prostaglandin profiles in pigs. *J Nutr* 127, 137-145.
- Cherbut, C., Michel, C., and Lecannu, G. (2003). The prebiotic characteristics of fructooligosaccharides are necessary for reduction of TNBS-induced colitis in rats. *J Nutr* 133, 21-27.
- Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X., and Cummings, J. H. (1995). Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 108, 975-982.
- Gibson, G. R., and Fuller, R. (2000). Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J Nutr* 130, 391S-395S.
- Gibson, G. R., and Wang, X. (1994b). Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture. *FEMS Microbiology Letters* 118, 121-128.
- Gueimonde, M., Tolko, S., Korpimäki, T., and Salminen, S. (2004). New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 70, 4165-4169.
- Hartemink, R., and Rombouts, F. M. (1999). Comparison of media for the detection of *bifidobacteria*, *lactobacilli* and total anaerobes from faecal samples. *J Microbiol Methods* 36, 181-182.
- Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T., and Tashiro, Y. (1986). Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora* 5, 37-50.
- Hidaka, H., Tashiro, Y., and Eida, T. (1991). Proliferation of bifidobacteria by oligosaccharides and their useful effect on human health. *Bifidobacteria Microflora* 10, 65-69.
- Ito, M., Deguchi, Y., Miyamori, K., Matsumoto, K., Kikuchi, H., Matsumoto, K., Kobayashi, Y., Yajima, T., and Kan, T. (1990). Effects of administration of galactooligosaccharides on the human faecal microflora, stool weight and abdominal sensation. *Microbial Ecol Health Disease* 3, 285-292.
- Ito, M., Kimura, M., Deguchi, Y., Miyamori-Watabe, A., Yajima, T., and Kan, T. (1993). Effects of transgalactosylated disaccharides on the human intestinal microflora and their metabolism. *J Nutr Sci Vitaminol* 39, 279-288.
- Kleessen, B., Sykura, B., Zunft, H. J., and Blaut, M. (1997). Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. *Am J Clin Nutr* 65, 1397-1402.
- Kruse, H.-P., Kleessen, B., and Blaut, M. (1999). Effects of inulin on faecal *bifidobacteria* in human subjects. *Br J Nutr* 82, 375-382.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Kado, Y., Takada, T., Matsumoto, K., and Tanaka, R. (2004). Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal *bifidobacteria*. *Appl Environ Microbiol* 70, 167-173.
- Matteuzzi, D., Swennen, E., Rossi, M., Hartman, T., and Lebet, V. (2004). Prebiotic effects of a wheat germ preparation in human healthy subjects. *Food Microbiol* 21, 119-124.
- Menne, E., Guggenbuhl, N., and Roberfroid, M. (2000). Fn-type chicory inulin hydrolysate has a prebiotic effect in humans. *J Nutr* 130, 1197-1199.
- Michel, C., Kravtchenko, T., David, A., Gueneau, S., Kozłowski, F., and Cherbut, C. (1998). In vitro-prebiotic effects of Acacia gums onto the human intestinal microbiota depends on both botanical origin and environmental pH. *Anaerobe* 4, 257-266.
- Mikkelsen, L. L., Bendixen, C., Jakobsen, M., and Jensen, B. B. (2003). Enumeration of bifidobacteria in gastrointestinal samples from piglets. *Appl Environ Microbiol* 69, 654-658.

- Ohkusa, T., Ozaki, Y., Sato, C., Mikuni, K., and Ikeda, H. (1995). Long-term ingestion of lactosucrose increases *Bifidobacterium* sp. in human fecal flora. *Digestion* 56, 415-420.
- Olano-Martin, E., Gibson, G. R., and Rastall, R. A. (2002). Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *J Appl Microbiol* 93, 505-511.
- Palframan, R. J., Gibson, G. R., and Rastall, R. A. (2002). Effect of pH and dose on the growth of gut bacteria on prebiotic carbohydrates *in vitro*. *Anaerobe* 8, 287-292.
- Palframan, R., Gibson, G., and Rastall, R. (2003). Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Lett Appl Microbiol* 37, 281-284.
- Rao, V. A. (2001). The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels. *Nutr Res* 21, 843-848.
- Requena, T., Burton, J., Matsuki, T., Munro, K., Simon, M., Tanaka, R., Watanabe, K., and Tannock, G. (2002). Identification, detection, and enumeration of human *bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene. *Appl Environ Microbiol* 68, 2420-2427.
- Roberfroid, M., *et al.* (2004). ORAFI Newsletter 10, 4.
- Rochet, V., Rigottier-Gois, L., Rabot, S., Dore, J. (2004). Validation of fluorescent in situ hybridization combined with flow cytometry for assessing interindividual variation in the composition of human fecal microflora during long-term storage of samples. *J Microbiol Methods* 59, 263-70.
- Roy, D. (2001). Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Int J Food Microbiol* 69, 167-182.
- Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R., and Rastall, R. A. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J Appl Microbiol* 91, 878-887.
- Rycroft, C., Fooks, L., and Gibson, G. (1999). Methods for assessing the potential of prebiotics and probiotics. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2, 481-484.
- Smiricky-Tjardes, M. R., Flickinger, E. A., Grieshop, C. M., Bauer, L. L., Murphy, M. R., and Fahey, G. C. (2003). In vitro fermentation characteristics of selected oligosaccharides by swine fecal microflora. *J Anim Sci* 81, 2505-2514.
- Tuohy, K., Kolida, S., Lustenberger, A., and Gibson, G. (2001a). The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructo-oligosaccharides—a human volunteer study. *Br J Nutr* 86, 341-348.
- Tuohy, K. M., Finlay, R. K., Wynne, A. G., and Gibson, G. R. (2001b). A human volunteer study on the prebiotic effects of HP-Inulin—faecal bacteria enumerated using fluorescent *in situ* hybridisation (FISH). *Anaerobe* 7, 113-118.
- Tuohy, K. M., Ziemer, C. J., Klinder, A., Knöbel, Y., Pool-Zobel, B., and Gibson, G. R. (2002). A human volunteer study to determine the prebiotic effects of lactulose powder on human colonic microbiota. *Microbial Ecol Health Dis* 14, 165-173.
- Van Loo, J., Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Franck, A., Hopkins, M., Kok, N., Macfarlane, G., Newton, D., Quigley, M., Roberfroid, M., van Vliet, T., van den Heuvel, E. (1999). Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *Br J Nutr* 81, 121-132.
- Vitali, B., Candela, M., Matteuzzi, D., and Brigidi, P. (2003). Quantitative detection of probiotic *Bifidobacterium* strains in bacterial mixtures by using real-time PCR. *Syst Appl Microbiol* 26, 269-276.
- Vulevic, J., Rastall, R., and Gibson, G. (2004). Developing a quantitative approach for determining the in vitro prebiotic potential of dietary oligosaccharides. *FEMS Microbiol Lett* 236, 153-159.
- Williams, C. H., Witherly, S. A., and Buddington, R. K. (1994). Influence of dietary neosugar on selected bacterial groups of the human faecal microbiota. *Microbial Ecol Health Dis* 7, 91-97.

## **Chapitre VII : Effet des probiotiques sur la flore intestinale / Effect of probiotics on intestinal flora**

- Collins, J. K., Dunne, C., Murphy, L., Morrissey, D., O'Mahony, L., O'Sullivan, E., Fitzgerald, G., Kiely, B., O'Sullivan, G., Daly, C., Marteau, P., and Shanahan, F. (2002). A randomized controlled trial of a probiotic *Lactobacillus* strain in healthy adults: assessment of its delivery, transit and influence on microbial flora and enteric immunity. *Microbial Ecol Health Dis* 14, 81-89.
- Fujiwara, S., Seto, Y., Kimura, A., and Hashiba, H. (2001). Intestinal transit of an orally administered streptomycin-rifampicin-resistant variant of *Bifidobacterium longum* SBT2928: its long-term survival and effect on the intestinal microflora and metabolism. *J Appl Microbiol* 90, 43-52.
- Langendijk, P. S., Schut, F., Jansen, G. J., Raangs, G. C., Kamphuis, G. R., Wilkinson, M. H., and Welling, G. W. (1995). Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 61, 3069-3075.
- Spanhaak, S., Havenaar, R., and Schaafsma, G. (1998). The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Clin Nutr* 52, 899-907.
- Tannock, G. W., Munro, K., Harmsen, H. J., Welling, G. W., Smart, J., and Gopal, P. K. (2000). Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol* 66, 2578-2588.

## Chapitre VIII : Effet des pré- et probiotiques sur le système immunitaire / *Effects of pre- and probiotics on the immune system*

- Arunachalam, K., Gill, H. S., and Chandra, R. K. (2000). Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur J Clin Nutr* 54, 263-267.
- Borruel, N., Carol, M., Casellas, F., Antolin, M., de Lara, F., Espin, E., Naval, J., Guarner, F., and Malagelada, J. R. (2002). Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut* 51, 659-664.
- Caplan, M. S., Miller-Catchpole, R., Kaup, S., Russell, T., Lickerman, M., Amer, M., Xiao, Y., and Thomson, R., Jr. (1999). Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology* 117, 577-583.
- Chiang, B. L., Sheih, Y. H., Wang, L. H., Liao, C. K., and Gill, H. S. (2000). Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. *Eur J Clin Nutr* 54, 849-855.
- Donnet-Hughes, A., Rochat, F., Serrant, P., Aeschlimann, J. M., and Schiffrin, E. J. (1999). Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *J. Dairy Sci* 82, 863-869.
- Fukushima, Y., Kawata, Y., Hara, H., Terada, A., and Mitsuoka, T. (1998). Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int J Food Microbiol* 42, 39-44.
- Gill, H. S. and Rutherford, K. J. (2001). Immune enhancement conferred by oral delivery of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in different milk-based substrates. *J Dairy Res* 68, 611-616.
- Gill, H. S., Rutherford, K. J., Cross, M. L., and Gopal, P. K. (2001). Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am J Clin Nutr* 74, 833-839.
- Gill, H. S., Rutherford, K. J., Prasad, J., and Gopal, P. K. (2000). Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br J Nutr* 83, 167-176.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Helwig, U., Venturi, A., Lammers, K. M., Brigidi, P., Vitali, B., Poggioli, G., Miglioli, M., and Campieri, M. (2003). Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 124, 1202-1209.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Brigidi, P., Matteuzzi, D., Bazzocchi, G., Poggioli, G., Miglioli, M., and Campieri, M. (2000). Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 119, 305-309.
- Gupta, P., Andrew, H., Kirschner, B. S., and Guandalini, S. (2000). Is lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr* 31, 453-457.
- Haller, D., Bode, C., Hammes, W. P., Pfeifer, A. M., Schiffrin, E. J., and Blum, S. (2000). Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 47, 79-87.
- Hatcher, G. E. and Lambrecht, R. S. (1993). Augmentation of macrophage phagocytic activity by cell-free extracts of selected lactic acid-producing bacteria. *J Dairy Sci* 76, 2485-2492.
- He, F., Morita, H., Ouwehand, A. C., Hosoda, M., Hiramatsu, M., Kurisaki, J., Isolauri, E., Benno, Y., and Salminen, S. (2002). Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by *Bifidobacterium* strains. *Microbiol Immunol* 46, 781-785.
- Helin, T., Haahtela, S., and Haahtela, T. (2002). No effect of oral treatment with an intestinal bacterial strain, *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103), on birch-pollen allergy: a placebo-controlled double-blind study. *Allergy* 57, 243-246.
- Herias, M. V., Hessle, C., Telemo, E., Midtvedt, T., Hanson, L. A., and Wold, A. E. (1999). Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats. *Clin Exp Immunol* 116, 283-290.
- Hessle, C., Hanson, L. A., and Wold, A. E. (1999). Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clin Exp Immunol* 116, 276-282.
- Hidemura, A., Saito, H., Fukatsu, K., Matsuda, T., Kitayama, J., Ikeda, S., Kang, W., and Nagawa, H. (2003). Oral administration of *Bifidobacterium longum* culture condensate in a diet-restricted murine peritonitis model enhances polymorphonuclear neutrophil recruitment into the local inflammatory site. *Nutrition* 19, 270-274.
- Isolauri, E., Arvola, T., Sutas, Y., Moilanen, E., and Salminen, S. (2000). Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 30, 1604-1610.
- Isolauri, E., Joensuu, J., Suomalainen, H., Luomala, M., and Vesikari, T. (1995). Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* 13, 310-312.
- Kaila, M., Isolauri, E., Saxelin, M., Arvilommi, H., and Vesikari, T. (1995). Viable versus inactivated lactobacillus strain GG in acute rotavirus diarrhoea. *Arch Dis Child* 72, 51-53.
- Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virtanen, E., Laine, S., and Arvilommi, H. (1992). Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res* 32, 141-144.
- Kalliomaki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., and Isolauri, E. (2001). Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357, 1076-1079.
- Kalliomaki, M., Salminen, S., Poussa, T., Arvilommi, H., and Isolauri, E. (2003). Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361, 1869-1871.
- Kruisselbrink, A., Heijne Den Bak-Glashouwer, M. J., Havenith, C. E., Thole, J. E., and Janssen, R. (2001). Recombinant *Lactobacillus plantarum* inhibits house dust mite-specific T- cell responses. *Clin Exp Immunol* 126, 2-8.



- Lamine, F., Fioramonti, J., Bueno, L., Nepveu, F., Cauquil, E., Lobysheva, I., Eutamene, H., and Theodorou, V. (2004). Nitric oxide released by *Lactobacillus farciminis* improves TNBS-induced colitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 39, 37-45.
- Lammers, K. M., Brigidi, P., Vitali, B., Gionchetti, P., Rizzello, F., Caramelli, E., Matteuzzi, D., and Campieri, M. (2003). Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 38, 165-172.
- Lammers, K. M., Helwig, U., Swennen, E., Rizzello, F., Venturi, A., Caramelli, E., Kamm, M. A., Brigidi, P., Gionchetti, P., and Campieri, M. (2002). Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. *Am J Gastroenterol* 97, 1182-1186.
- Link Amster, H., Rochat, F., Saudan, K. Y., Mignot, O., and Aeschlimann, J. M. (1994). Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol Med Microbiol* 10, 55-63.
- Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., Doyle, J., Jewell, L., and De Simone, C. (2001). Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 121, 580-591.
- Madsen, K. L., Doyle, J. S., Jewell, L. D., Tavernini, M. M., and Fedorak, R. N. (1999). *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 116, 1107-1114.
- Majamaa, H. and Isolauri, E. (1997). Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 99, 179-185.
- Marin, M. L., Tejada-Simon, M. V., Lee, J. H., Murtha, J., Ustunol, Z., and Pestka, J. J. (1998). Stimulation of cytokine production in clonal macrophage and T-cell models by *Streptococcus thermophilus*: comparison with *Bifidobacterium sp.* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J Food Prot* 61, 859-864.
- Marteau, P., Vaerman, J. P., Dehennin, J. P., Bord, S., Brassart, D., Pochart, P., Desjeux, J. F., and Rambaud, J. C. (1997). Effects of intrajejunal perfusion and chronic ingestion of *Lactobacillus johnsonii* strain La1 on serum concentrations and jejunal secretions of immunoglobulins and serum proteins in healthy humans. *Gastroentérol Clin Biol* 21, 293-298.
- Mastretta, E., Longo, P., Laccisaglia, A., Balbo, L., Russo, R., Mazzaccara, A., and Gianino, P. (2002). Effect of *Lactobacillus* GG and breast-feeding in the prevention of rotavirus nosocomial infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35, 527-531.
- Matsuzaki, T., Yamazaki, R., Hashimoto, S., and Yokokura, T. (1998). The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *J Dairy Sci* 81, 48-53.
- Ménard, S., Candalh, C., Bambou, J. C., Terpend, K., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2004). Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut* 53, 821-828.
- Miettinen, M., Vuopio Varkila, J., and Varkila, K. (1996). Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect Immun* 64, 5403-5405.
- Mimura, T., Rizzello, F., Helwig, U., Poggioli, G., Schreiber, S., Talbot, I. C., Nicholls, R. J., Gionchetti, P., Campieri, M., and Kamm, M. A. (2004). Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 53, 108-114.
- Moreau, M. C., Raibaud, P., and Muller, M. C. (1982). Relationship between the development of the intestinal IgA immune system and the establishment of microbial flora in the digestive tract of young holoxenic mice [in French]. *Ann Immunol (Paris)* 133D, 29-39.
- Murosaki, S., Yamamoto, Y., Ito, K., Inokuchi, T., Kusaka, H., Ikeda, H., and Yoshikai, Y. (1998). Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of IL-12 production in mice. *J Allergy Clin Immunol* 102, 57-64.
- Neish, A. S., Gewirtz, A. T., Zeng, H., Young, A. N., Hobert, M. E., Karmali, V., Rao, A. S., and Madara, J. L. (2000). Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I $\kappa$ B- $\alpha$  ubiquitination. *Science* 289, 1560-1563.
- Pelto, L., Isolauri, E., Lilius, E. M., Nuutila, J., and Salminen, S. (1998). Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin Exp Allergy* 28, 1474-1479.
- Pena, J. A. and Versalovic, J. (2003). *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF- $\alpha$  production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell Microbiol* 5, 277-285.
- Prantera, C., Scribano, M. L., Falasco, G., Andreoli, A., and Luzi, C. (2002). Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus* GG. *Gut* 51, 405-409.
- Prioult, G., Fliss, I., and Pecquet, S. (2003). Effect of probiotic bacteria on induction and maintenance of oral tolerance to beta-lactoglobulin in gnotobiotic mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 787-792.
- Pujol, P., Huguet, J., Drobnic, F., Banquells, M., Ruiz, O., Galilea, P., Segarra, N., Aguilera, S., Burnat, A., Mateos, J. A., and Postaire, E. (2000). The effect of a fermented milk containing *Lactobacillus casei* on the immune response to exercise. *Sports Med, Training and Rehab* 9, 209-223.
- Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinius, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K., and Raz, E. (2004). Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126, 520-528.
- Saavedra, J. M., Bauman, N. A., Oung, I., Perman, J. A., and Yolken, R. H. (1994). Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 344, 1046-1049.
- Schiffrin, E. J., Rochat, F., Link-Amster, H., Aeschlimann, J. M., and Donnet-Hughes, A. (1995). Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 78, 491-7.
- Schultz, M., Linde, H. J., Lehn, N., Zimmermann, K., Grossmann, J., Falk, W., and Scholmerich, J. (2003). Immunomodulatory consequences of oral administration of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in healthy volunteers. *J Dairy Res* 70, 165-173.
- Segain, J. P., Raingeard, d. I. B., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottiere, H. M., and Galmiche, J. P. (2000). Butyrate inhibits inflammatory responses through NF $\kappa$ B inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 47, 397-403.

- Sheih, Y. H., Chiang, B. L., Wang, L. H., Liao, C. K., and Gill, H. S. (2001). Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *J Am Coll Nutr* 20, 149-156.
- Shida, K., Makino, K., Morishita, A., Takamizawa, K., Hachimura, S., Ametani, A., Sato, T., Kumagai, Y., Habu, S., and Kaminogawa, S. (1998). *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int Arch Allergy Immunol* 115, 278-287.
- Solis Pereyra B and Lemonnier, D. (1993). Induction of human cytokines by bacteria used in dairy foods. *Nutr Res* 13, 1127-1140.
- Spanhaak, S., Havenaar, R., and Schaafsma, G. (1998). The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Clin Nutr* 52, 899-907.
- Takahashi, T., Nakagawa, E., Nara, T., Yajima, T., and Kuwata, T. (1998). Effects of orally ingested *Bifidobacterium longum* on the mucosal IgA response of mice to dietary antigens. *Biosci Biotechnol Biochem* 62, 10-15.
- Terpend, K., Blaton, MA., Candalh, C., Wal, JM., Pochart, P., and Heyman, M. (1998). Intestinal barrier function and cow's milk sensitization in guinea-pigs fed milk or fermented milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 28, 191-198.
- Turchet, P., Laurenzano, M., Auboiron, S., and Antoine, J. M. (2003). Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot study. *J Nutr Health Aging* 7, 75-77.
- Van de Water. J., Keen, C. L., and Gershwin, M. E. (1999). The influence of chronic yogurt consumption on immunity. *J Nutr* 129, 1492S-1495S.
- Wang, M. F., Lin, H. C., Wang, Y. Y., and Hsu, C. H. (2004). Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatr Allergy Immunol* 15, 152-158.
- Yasui, H. and Ohwaki, M. (1991). Enhancement of immune response in Peyer's patch cells cultured with *Bifidobacterium breve*. *J Dairy Sci* 74, 1187-1195.
- Zareie, M., Singh, P. K., Irvine, E. J., Sherman, P. M., McKay, D. M., and Perdue, M. H. (2001). Monocyte/macrophage activation by normal bacteria and bacterial products: implications for altered epithelial function in Crohn's disease. *Am J Pathol* 158, 1101-1109.

## **Chapitre IX : Effet des pré- et probiotiques sur les fonctions intestinales / Effects of pre- and probiotics on intestinal functions**

- Adolfsson, O., Meydani, S.N., and Russell, R.M. (2004). Yogurt and gut function. *Am. J Clin Nutr* 80, 245-256.
- Anderson, A. D., McNaught, C. E., Jain, P. K., and MacFie, J. (2004). Randomised clinical trial of synbiotic therapy in elective surgical patients. *Gut* 53, 241-245.
- Arrigoni, E., Marteau, P., Briet, F., Pochart, P., Rambaud, J. C., and Messing, B. (1994). Tolerance and absorption of lactose from milk and yogurt during short-bowel syndrome in humans. *Am J Clin Nutr* 60, 926-929.
- Asahara, T., Nomoto, K., Shimizu, K., Watanaki, M., and Tanaka, R. (2001). Increased resistance of mice to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection by synbiotic administration of Bifidobacteria and transgalactosylated oligosaccharides. *J Appl Microbiol* 91, 985-996.
- Berg, R., Bernasconi, P., Fowler, D., and Gautreaux, M. (1993). Inhibition of *Candida albicans* translocation from the gastrointestinal tract of mice by oral administration of *Saccharomyces boulardii*. *J Infect.Dis* 168, 1314-1318.
- Berg, R. D. (1999). Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 473, 11-30.
- Bouglé, D., Roland, N., Lebeurrer, F., and Arhan, P. (1999). Effect of *Propionibacteria* supplementation on fecal *Bifidobacteria* and segmental colonic transit time in healthy human subjects. *Scand.J Gastroenterol.* 34, 144-148.
- Bouvier, M., Meance, S., Bouley, C., Berta, J. L., Grimaud, C. (2001). Effects of consumption of a milk fermented by the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 on colonic transit times in healthy humans. *Bioscience Microflora* 20, 43-48.
- Brownlee, I. A., Havler, M. E., Dettmar, P. W., Allen, A., and Pearson, J. P. (2003). Colonic mucus: secretion and turnover in relation to dietary fibre intake. *Proc Nutr Soc* 62, 245-249.
- Bry, L., Falk, P. G., Midtvedt, T., and Gordon, J. I. (1996). A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science* 273, 1380-1383.
- Buts, J. P., Bernasconi, P., Van Craynest, M. P., Maldague, P., and De Meyer, R. (1986). Response of human and rat small intestinal mucosa to oral administration of *Saccharomyces boulardii*. *Pediatr.Res.* 20, 192-196.
- Buts, J. P., De Keyser, N., and De Raedemaeker, L. (1994). *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. *Pediatr Res* 36, 522-527.
- Buts, J. P., De Keyser, N., Marandi, S., Hermans, D., Sokal, E. M., Chae, Y. H., Lambotte, L., Chanteux, H., and Tulkens, P. M. (1999). *Saccharomyces boulardii* upgrades cellular adaptation after proximal enterectomy in rats. *Gut* 45, 89-96.
- Buts, J. P., De Keyser, N., Stilmant, C., Sokal, E., and Marandi, S. (2002). *Saccharomyces boulardii* enhances N-terminal peptide hydrolysis in suckling rat small intestine by endoluminal release of a zinc-binding metalloprotease. *Pediatr Res* 51, 528-534.

- Cherbut, C., Aube, A. C., Blottiere, H. M., and Galmiche, J. P. (1997). Effects of short-chain fatty acids on gastrointestinal motility. *Scand J Gastroenterol* 222 (Suppl), 58-61.
- Coudray, C., Tressol, J. C., Gueux, E., and Rayssiguier, Y. (2003). Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats. *Eur J Nutr* 42, 91-98.
- Cummings, J. H., Bingham, S. A., Heaton, K. W., and Eastwood, M. A. (1992). Fecal weight, colon cancer risk, and dietary intake of nonstarch polysaccharides (dietary fiber). *Gastroenterology* 103, 1783-1789.
- Cummings, J. H. and Macfarlane, G. T. (2002). Gastrointestinal effects of prebiotics. *Br J Nutr* 87 Suppl 2, S145-S151.
- Cummings, J. H., Macfarlane, G. T., and Englyst, H. N. (2001). Prebiotic digestion and fermentation. *Am.J Clin Nutr* 73, 415S-420S.
- Czerucka, D., Dahan, S., Mograbi, B., Rossi, B., and Rampal, P. (2000). *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Infect Immun* 68, 5998-6004.
- Dahan, S., Dalmaso, G., Imbert, V., Peyron, J. F., Rampal, P., and Czerucka, D. (2003). *Saccharomyces boulardii* interferes with enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced signaling pathways in T84 cells. *Infect.Immun.* 71, 766-773.
- de Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., and Schrezenmeir, J. (2001). Probiotics--compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* 73, 421S-429S.
- Drouault, S., Anba, J., and Corthier, G. (2002a). *Streptococcus thermophilus* is able to produce a beta-galactosidase active during its transit in the digestive tract of germ-free mice. *Appl Environ Microbiol.* 68, 938-941.
- Drouault, S., Juste, C., Marteau, P., Renault, P., and Corthier, G. (2002b). Oral treatment with *Lactococcus lactis* expressing *Staphylococcus hyicus* lipase enhances lipid digestion in pigs with induced pancreatic insufficiency. *Appl Environ Microbiol* 68, 3166-3168.
- Fontaine, N., Meslin, J. C., Lory, S., and Andrieux, C. (1996). Intestinal mucin distribution in the germ-free rat and in the heteroxenic rat harbouring a human bacterial flora: effect of inulin in the diet. *Br J Nutr* 75, 881-892.
- Fioramonti, J., Theodorou, V., and Bueno, L. (2003). Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17, 711-724.
- Freitas, M. and Cayuela C. Microbial modulation of host intestinal glycosylation patterns. *Microbiol Ecol Health Dis* 12 (suppl. 2), 165-178.
- Freitas, M., Cayuela, C., Antoine, J. M., Piller, F., Sapin, C., and Trugnan, G. (2001). A heat labile soluble factor from *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 specifically increases the galactosylation pattern of HT29-MTX cells. *Cell Microbiol* 3, 289-300.
- Freitas, M., Tavan, E., Cayuela, C., Diop, L., Sapin, C., and Trugnan, G. (2003a). Host-pathogens cross-talk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game. *Biol Cell* 95, 503-506.
- Freitas, M., Tavan, E., Thoreux, K., Cayuela, C., Sapin, C., and Trugnan, G. (2003b). *Lactobacillus casei* DN-114 001 and *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 inhibit rotavirus infection by modulating apical glycosylation pattern of cultured human intestinal HT29-MTX cells. *Gastroenterology* 124 (Suppl 1), A-475-A-476.
- Garcia-Lafuente, A., Antolin, M., Guarner, F., Crespo, E., and Malagelada, J. R. (2001). Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. *Gut* 48, 503-507.
- Gaudichon, C., Mahe, S., Roos, N., Benamouzig, R., Luengo, C., Huneau, J. F., Sick, H., Bouley, C., Rautureau, J., and Tomé, D. (1995). Exogenous and endogenous nitrogen flow rates and level of protein hydrolysis in the human jejunum after [15N]milk and [15N]yoghurt ingestion. *Br J Nutr* 74, 251-260.
- Gaudichon, C., Roos, N., Mahe, S., Sick, H., Bouley, C., and Tomé, D. (1994). Gastric emptying regulates the kinetics of nitrogen absorption from 15N-labeled milk and 15N-labeled yogurt in miniature pigs. *J Nutr* 124, 1970-1977.
- Gaudier, E., Jarry, A., Blottiere, H. M., de Coppet, P., Buisine, M.P., Aubert, J.P., Labosse, C., Cherbut, C., and Hoebler, C. (2004). Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G1168-G1174
- Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X., and Cummings, J. H. (1995). Selective stimulation of *bifidobacteria* in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 108, 975-982.
- Gotteland, M., Cruchet, S., and Verbeke, S. (2001). Effect of *Lactobacillus* ingestion on the gastrointestinal mucosal barrier alterations induced by indometacin in humans. *Aliment PharmacolTher* 15, 11-17.
- Griessen, M., Cochet, B., Infante, F., Jung, A., Bartholdi, P., Donath, A., Loizeau, E., and Courvoisier, B. (1989). Calcium absorption from milk in lactase-deficient subjects. *Am.J Clin Nutr* 49, 377-384.
- Griffin, I. J., Davila, P. M., and Abrams, S. A. (2002). Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes. *Br J Nutr* 87 Suppl 2, S187-S191.
- Harms, H. K., Bertele-Harms, R. M., and Bruer-Kleis, D. (1987). Enzyme-substitution therapy with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in congenital sucrase-isomaltase deficiency. *N Engl J Med* 316, 1306-1309.

- Heyman, M., Crain-Denoyelle, A. M., Corthier, G., Morgat, J. L., and Desjeux, J. F. (1986). Postnatal development of protein absorption in conventional and germ-free mice. *Am J Physiol* 251, G326-G331.
- Heyman, M. and Ménard, S. (2002). Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *Cell.Mol.Life Sci.* 59, 1151-1165.
- Hoebler, C., Michel, C., Meslin, J. C., Vabre, S., Gaudier, E., and Cherbut, C. (2002). Effet de la fermentation des fructo-oligosides sur la distribution des mucines et l'épaisseur du gel de mucus. *Nutr Clin Metab* 16 (Suppl 1), 19S.
- Ichikawa, H., Kuroiwa, T., Inagaki, A., Shineha, R., Nishihira, T., Satomi, S., and Sakata, T. (1999). Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat. *Dig Dis Sci* 44, 2119-2123.
- Isolauri, E., Kaila, M., Arvola, T., Majamaa, H., Rantala, I., Virtanen, E., and Arvilommi, H. (1993a). Diet during rotavirus enteritis affects jejunal permeability to macromolecules in suckling rats. *Pediatr Res* 33, 548-553.
- Isolauri, E., Majamaa, H., Arvola, T., Rantala, I., Virtanen, E., and Arvilommi, H. (1993b). *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology* 105, 1643-1650.
- Jahn, H. U., Ullrich, R., Schneider, T., Liehr, R. M., Schieferdecker, H. L., Holst, H., and Zeitz, M. (1996). Immunological and trophical effects of *Saccharomyces boulardii* on the small intestine in healthy human volunteers. *Digestion* 57, 95-104.
- Jain, P.K., McNaught, C.E., Anderson, A.D., MacFie, J., and Mitchell, C.J. (2004). Influence of synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomised controlled trial. *Clin Nutr* 23, 467-475.
- Kim, H. J., Camilleri, M., McKinzie, S., Lempke, M. B., Burton, D. D., Thomforde, G. M., and Zinsmeister, A. R. (2003). A randomized controlled trial of a probiotic, VSL#3, on gut transit and symptoms in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 17, 895-904.
- Kleessen, B., Hartmann, L., and Blaut, M. (2003). Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated *bifidobacteria* in gnotobiotic rats. *Br J Nutr* 89, 597-606.
- Kolars, J. C., Levitt, M. D., Aouji, M., and Savaiano, D. A. (1984). Yogurt—an autodigesting source of lactose. *N Engl J Med* 310, 1-3.
- Lin, M. Y. (1995). In vivo lactose digestion by *Lactobacillus acidophilus*. *J Chin Nutr Soc* 20, 147-156.
- Livesey, G., Johnson, I. T., Gee, J. M., Smith, T., Lee, W. E., Hillan, K. A., Meyer, J., and Turner, S. C. (1993). 'Determination' of sugar alcohol and Polydextrose absorption in humans by the breath hydrogen (H<sub>2</sub>) technique: the stoichiometry of hydrogen production and the interaction between carbohydrates assessed in vivo and in vitro. *Eur J Clin Nutr* 47, 419-430.
- Mack, D. R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., and Hollingsworth, M. A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 52, 827-833.
- Mack, D. R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., and Hollingsworth, M. A. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol* 276, G941-G950.
- Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., Doyle, J., Jewell, L., and De Simone, C. (2001). Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 121, 580-591.
- Mahe, S., Marteau, P., Huneau, J. F., Thuillier, F., and Tomé, D. (1994). Intestinal nitrogen and electrolyte movements following fermented milk ingestion in man. *Br J Nutr* 71, 169-180.
- Mao, Y., Nobaek, S., Kasravi, B., Adawi, D., Stenram, U., Molin, G., and Jeppsson, B. (1996). The effects of *Lactobacillus* strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology* 111, 334-344.
- Marteau, P. and Boutron-Ruault, M. C. (2002). Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. *Br J Nutr* 87 Suppl 2, S153-S157.
- Marteau, P., Cuillerier, E., Meance, S., Gerhardt, M. F., Myara, A., Bouvier, M., Bouley, C., Tondou, F., Bommelaer, G., and Grimaud, J. C. (2002). *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 16, 587-593.
- Marteau, P., Flourié, B., Pochart, P., Chastang, C., Desjeux, J. F., and Rambaud, J. C. (1990). Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. *Br J Nutr* 64, 71-79.
- Marteau, P., Seksik, P., Lepage, P., and Doré, J. (2004). Cellular and physiological effects of probiotics and prebiotics. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry* 4, 889-896.
- Martini, M. C., Smith, D. E., and Savaiano, D. A. (1987). Lactose digestion from flavored and frozen yogurts, ice milk, and ice cream by lactase-deficient persons. *Am J Clin Nutr* 46, 636-640.
- Mattar, A. F., Teitelbaum, D. H., Drongowski, R. A., Yongyi, F., Harmon, C. M., and Coran, A. G. (2002). Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatr Surg Int* 18, 586-590.
- McDonough, F. E., Hitchins, A. D., Wong, N. P., Wells, P., and Bodwell, C. E. (1987). Modification of sweet acidophilus milk to improve utilization by lactose-intolerant persons. *Am J Clin Nutr* 45, 570-574.
- McNaught, C. E., Woodcock, N. P., MacFie, J., and Mitchell, C. J. (2002). A prospective randomised study of the probiotic *Lactobacillus plantarum* 299V on indices of gut barrier function in elective surgical patients. *Gut* 51, 827-831.

- Meance, S., Cayuela, C., Turchet, P., Raimondi, A., Lucas, C., and Antoine, J. M. (2001). A fermented milk with a *Bifidobacterium* probiotic strain DN-173 010 shortened oro-fecal gut transit time in elderly. *Microbial Ecol Health Dis* 13, 217-222.
- Meance, S., Cayuela, C., Turchet, P., Raimondi, A., Lucas, C., and Antoine, J. M. (2003). Recent advances in the use of functional foods: effects of the commercial fermented milk with *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 and yogurt strains on gut transit time in the elderly. *Microbial Ecol Health Dis* 15, 15-22.
- Ménard, S., and Heyman, M. (2005). Modulation of epithelial cell function and local immune system by probiotics : mechanisms involved. *In Probiotics in food safety and human health*. Editor: Ipek Gokpete, Marcel Dekker Inc. N.Y. 2005.
- Meslin, J. C., Andrieux, C., Sakata, T., Beaumatin, P., Bensaada, M., Popot, F., Szylit, O., and Durand, M. (1993). Effects of galactooligosaccharide and bacterial status on mucin distribution in mucosa and on large intestine fermentation in rats. *Br J Nutr* 69, 903-912.
- Midtvedt, M. (2003). Yogurt -dead or alive ? *Microb Ecol Health Dis* 15, 88-93.
- Mpassi, D., Rychen, G., Feidt, C., Mertes, M., Laurent, F., Lenoir-Wijnkoop, I., and Antoine, J. M. (2001). Portal absorption of 15N and amino nitrogen in the growing pig after ingestion of labelled milk, yogurt or heat-treated yogurt. *Reprod Nutr Dev* 41, 153-162.
- Otte, J. M. and Podolsky, D. K. (2004). Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286, G613-G626.
- Piaia, M., Antoine, J. M., Mateos-Guardia, J. A., Leplingard, A., and Lenoir-Wijnkoop, I. (2003). Assessment of the benefits of live yogurt : methods and markers for in vivo studies of the physiological effects of yogurt cultures. *Microbial Ecol Health Dis* 15, 79-87.
- Rémésy, C., Lopez, H., Levrat-Verny, M.A., Demigné, C., Rayssiguier, Y. (2002). Influence des produits végétaux et de divers glucides fermentescibles sur la biodisponibilité des minéraux. In: *Aliments fonctionnels*, M. Roberfroid (coordonnateur), Lavoisier, TEC & DOC éd., chap. 3, pp. 73-84.
- Resta-Lenert, S. and Barrett, K. E. (2003). Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 52, 988-997.
- Ruseler-van Embden, J. G., van Lieshout, L. M., Gosselink, M. J., and Marteau, P. (1995). Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *L. acidophilus*, and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. *Scand J Gastroenterol* 30, 675-680.
- Rychen, G., Mpassi, D., Jurjanz, S., Mertes, M., Lenoir-Wijnkoop, I., Antoine, J. M., and Laurent, F. (2002). 15N as a marker to assess portal absorption of nitrogen from milk, yogurt and heat-treated yogurt in the growing pig. *J Dairy Res* 69, 95-101.
- Savaiano, D. A., AbouElAnouar, A., Smith, D. E., and Levitt, M. D. (1984). Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. *Am J Clin Nutr* 40, 1219-1223.
- Scholz-Ahrens, K. E., Schaafsma, G., van den Heuvel, E. G., and Schrezenmeir, J. (2001). Effects of prebiotics on mineral metabolism. *Am J Clin Nutr* 73 (Suppl), 459S-463S.
- Sholz-Ahrens, K. E. and Schrezenmeir, J. (2002). Inulin, oligofructose and mineral metabolism - experimental data and mechanism. *Br J Nutr* 87 (Suppl 2), S179-S186.
- Spaeth, G., Berg, R. D., Specian, R. D., and Deitch, E. A. (1990). Food without fiber promotes bacterial translocation from the gut. *Surgery* 108, 240-246.
- Spiller, G. A., Story, J. A., Wong, L. G., Nunes, J. D., Alton, M., Petro, M. S., Furumoto, E. J., Whittam, J. H., and Scala, J. (1986). Effect of increasing levels of hard wheat fiber on fecal weight, minerals and steroids and gastrointestinal transit time in healthy young women. *J Nutr* 116, 778-785.
- Suzuki, T., Itoh, K., Kaneko, T., and Suzuki, H. (1997). Inhibition of bacterial translocation from the gastrointestinal tract of mice by oral administration of a culture condensate of *Bifidobacterium longum*. *J Vet Med Sci* 59, 665-669.
- Tahiri, M., Tressol, J. C., Arnaud, J., Bornet, F. R., Bouteloup-Demange, C., Feillet-Coudray, C., Brandolini, M., Ducros, V., Pepin, D., Brouns, F., Roussel, A. M., Rayssiguier, Y., and Coudray, C. (2003). Effect of short-chain fructooligosaccharides on intestinal calcium absorption and calcium status in postmenopausal women: a stable-isotope study. *Am J Clin Nutr* 77, 449-457.
- Tahiri, M., Tressol, J.C., Arnaud, J., Bornet, F., Bouteloup-Demange, C., Feillet-Coudray, C., Ducros, V., Pépin, D., Brouns, F., Rayssiguier, Y., Coudray C. (2001). Five-week intake of short-chain fructo-oligosaccharides increases intestinal absorption and status of magnesium in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 16, 2152-60.
- Ten Bruggencate, S. J., Bovee-Oudenhoven, I. M., Lettink-Wissink, M. L., Katan, M. B., and Van Der, M. R. (2004). Dietary fructooligosaccharides and inulin decrease resistance of rats to salmonella: protective role of calcium. *Gut* 53, 530-535.
- Terpend, K., Blaton, M. A., Candalh, C., Wal, J. M., Pochart, P., and Heyman, M. (1999). Intestinal barrier function and cow's milk sensitization in guinea pigs fed milk or fermented milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 28, 191-198.
- Thoreux, K., Balas, D., Bouley, C., and Senegas-Balas, F. (1998). Diet supplemented with yoghurt or milk fermented by *Lactobacillus casei* DN-114 001 stimulates growth and brush-border enzyme activities in mouse small intestine. *Digestion* 59, 349-359.
- Topping, D. L. and Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 81, 1031-1064.

Trinidad, T. P., Wolever, T. M., and Thompson, L. U. (1996). Effect of acetate and propionate on calcium absorption from the rectum and distal colon of humans. *Am.J Clin Nutr* 63, 574-578.

van den Heuvel, E. G., Muys, T., van Dokkum, W., and Schaafsma, G. (1999). Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. *Am.J Clin Nutr* 69, 544-548.

Van Loo, J., Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Franck, A., Hopkins, M., Kok, N., Macfarlane, G., Newton, D., Quigley, M., Roberfroid, M., van Vliet, T., and van den Heuvel, E. (1999). Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *Br J Nutr* 81, 121-132.

Yan, F. and Polk, D. B. (2002). Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 277, 50959-50965.

### **Chapitre X : Quelles perspectives d'application des futurs probiotiques génétiquement modifiés ? / What are the prospects for future application of genetically-modified probiotics ?**

Forde, A., and Fitzgerald, G. (1999). Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 76, 89-113.

Drouault, S., Juste, C., Marteau, P., Renault, P., and Corthier, G. (2002). Oral treatment with *Lactococcus lactis* expressing *Staphylococcus hyicus* lipase enhances lipid digestion in pigs with induced pancreatic insufficiency. *Appl Environ Microbiol* 68, 3166-3168.

Steidler, L. (2003). Genetically engineered probiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. Oct;17(5), 861-76.

Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neiryck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W., Remaut, E. (2000). Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 289,1352-5.

Vandenbroucke, K., Hans, W., Van Huysse, J., Neiryck, S., Demetter, P., Remaut, E., Rottiers, P., and Steidler, L. (2004). Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. *Gastroenterology* 127, 502-13.



Imprimerie Bialec - Nancy  
Dépôt légal février 2005 -

ISBN 2-11-095439-6