



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE DE LORRAINE**  
**2016**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**T H E S E**

Présentée et soutenue publiquement

le 30 mai 2016 sur un sujet dédié à :

**Le microbiote intestinal, les probiotiques et leur place  
dans les pathologies digestives basses du nourrisson**

pour obtenir

**le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par Noémie BIARD

née le 6 juillet 1990 à Sarreguemines (57)

**Membres du Jury**

Président :	M. Raphaël DUVAL,	Professeur des Universités, Microbiologie clinique
Juges :	Mme Roudayna DIAB,	Maître de Conférences
	M. Gabriel TROCKLE,	Maître de Conférences
	Mme Delphine VALANCE,	Docteur en Pharmacie

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2015-2016**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Béatrice FAIVRE

**Directeur des Etudes**

Virginie PICHON

**Conseil de la Pédagogie**

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

**Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier**

Président, Béatrice DEMORE

**Commission Prospective Facultaire**

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

**Commission de la Recherche**

Président, Raphaël DUVAL

**Responsable de la filière Officine**  
**Responsables de la filière Industrie**

Béatrice FAIVRE  
Isabelle LARTAUD,  
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS  
Béatrice DEMORE  
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS  
Raphaël DUVAL  
Marie-Paule SAUDER  
Béatrice FAIVRE

**Responsable de la filière Hôpital**  
**Responsable Pharma Plus ENSIC**  
**Responsable Pharma Plus ENSAIA**  
**Responsable de la Communication**  
**Responsable de la Cellule de Formation Continue  
et individuelle**  
**Responsable de la Commission d'agrément  
des maîtres de stage**  
**Responsables des échanges internationaux**  
**Responsable ERASMUS**

Béatrice FAIVRE  
  
Bertrand RIHN  
Mihayl VARBANOV

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE  
Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON  
Jean-Claude BLOCK  
Max HENRY  
Gérard SIEST  
Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY  
Pierre DIXNEUF  
Marie-Madeleine GALTEAU  
Thérèse GIRARD  
Michel JACQUE  
Pierre LABRUDE  
Lucien LALLOZ

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Monique ALBERT  
Marianne BEAUD  
Gérald CATAU  
Jean-Claude CHEVIN  
Jocelyne COLLOMB  
Bernard DANGIEN  
Marie-Claude FUZELLIER

Vincent LOPPINET  
 Marcel MIRJOLET  
 Janine SCHWARTZBROD  
 Louis SCHWARTZBROD

Françoise HINZELIN  
 Francine KEDZIEREWICZ  
 Marie-Hélène LIVERTOUX  
 Bernard MIGNOT  
 Jean-Louis MONAL  
 Blandine MOREAU  
 Dominique NOTTER  
 Christine PERDIAKIS  
 Marie-France POCHON  
 Anne ROVEL  
 Maria WELLMAN-ROUSSEAU

#### **ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE  
 Annie PAVIS

#### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>
Nathalie THILLY ☿	81	<i>Santé publique et Epidémiologie</i>

#### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Luc FERRARI	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND	87	<i>Eau, Santé, Environnement</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	32	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

#### **MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>

#### **MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>

Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86	Droit en Santé
Christophe MERLIN	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY ✕	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAILOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

#### **PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

#### **MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE**

Alexandre HARLE ✕	82	Biologie cellulaire oncologique
-------------------	----	---------------------------------

#### **PROFESSEUR AGREGÉ**

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

✕ En attente de nomination

#### **\*Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

# SERMENT DES APOTHICAIRES



**Je** jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

**D'honorer** ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'exercer**, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**De** ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Que** les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Que** je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,  
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES,  
CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME  
PROPRES A LEUR AUTEUR ».

# Remerciements

## **À mon Directeur de Thèse et Président du Jury,**

Monsieur Raphaël DUVAL, Professeur des Universités à la Faculté de Pharmacie de Nancy,  
Laboratoire de Microbiologie clinique,

Pour m'avoir fait l'honneur de diriger et de présider le jury de cette thèse,

Pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, votre aide, vos conseils et vos encouragements qui ont permis son aboutissement,

Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect.

Je vous remercie sincèrement.

## **À mes juges,**

Madame Roudayna DIAB, Maître de Conférences, Monsieur Gabriel TROCKLE, Maître de Conférences, Madame Delphine VALANCE, Docteur en Pharmacie,

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de votre présence et d'accepter de juger ce travail.

Soyez assurés de toute ma gratitude et de mon profond respect.

## **À mes chers parents,**

Pour m'avoir toujours incitée à donner le meilleur de moi-même,

Pour m'avoir portée aussi haut dans mon cursus universitaire et pour votre soutien sans faille,

De tout cœur, merci.

## **À ma sœur, Christel,**

*« Deux scorpions dans le même trou s'accommodent mieux que deux sœurs dans la même maison »* dit un proverbe arabe ... Malgré tout, je sais que nous avons beaucoup en commun, à commencer par le soutien mutuel que nous nous apportons.

Merci pour tes encouragements tout au long de mes années d'études !



**À Pierre,**

Pour ta patience et ton écoute,  
Pour avoir balayé mes préoccupations de ton optimisme sans faille,  
Pour m'avoir épaulée et redonné confiance en moi durant les moments de doute,  
Avec tout mon amour, merci.

**À toute ma famille,**

Pour l'intérêt que vous avez toujours porté à mes études,  
Pour votre soutien et vos encouragements,  
Je vous remercie sincèrement.

**À mes amis de promotion,**

Mes binômes de TP, mes compagnons de révisions (pour ne pas dire « de galère » !), mes acolytes de sorties ...  
Aurélie, Marie, Mélodie, Adeline, Mathilde, Laurent, Marc, Pierre C., Jean-Félix, Laurie ... Et tous ceux que j'aurais pu oublier ...  
Les noms sont nombreux et chacun, à sa manière, trouve une place importante à mes yeux.  
Les années d'études passées en votre compagnie ont filé si vite !  
Merci pour tous ces instants de vie partagés, pour les souvenirs passés et les bons moments qui restent à venir !

**À mes collègues actuels et passés,**

Tout particulièrement à l'équipe de la Pharmacie de Thédning,  
Pour votre sympathie, votre gentillesse et votre bonne humeur,  
Pour les connaissances que vous m'avez transmises et la confiance que vous m'avez accordée tout au long de mon parcours universitaire,  
Je vous remercie sincèrement.

# Table des matières

<b>TABLE DES FIGURES.....</b>	<b>XIV</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XVI</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES.....</b>	<b>XVII</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : LE MICROBIOTE INTESTINAL HUMAIN .....</b>	<b>4</b>
<b>I. MÉTHODES D'ÉTUDE DU MICROBIOTE INTESTINAL .....</b>	<b>5</b>
<b>A. La culture <i>in vitro</i> des micro-organismes digestifs.....</b>	<b>5</b>
1. Les micro-organismes anaérobies stricts .....	5
2. Les bactéries aérobies et aéro-anaérobies facultatives .....	6
<b>B. Les méthodes moléculaires d'étude du microbiote intestinal .....</b>	<b>7</b>
1. Les cibles des méthodes moléculaires.....	7
a. L'acide ribonucléique ribosomal 16S .....	7
b. L'acide désoxyribonucléique ribosomal.....	8
c. Les espaces intergéniques de l'ADNr.....	9
2. L'extraction de l'ADN .....	9
3. L'amplification du matériel génétique .....	10
a. La Polymerase Chain Reaction .....	10
b. Le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés.....	11
4. Les traitements de l'ADN amplifié.....	12
a. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction.....	12
b. Le polymorphisme de conformation des simples brins.....	12
5. La séparation des séquences d'ADN par électrophorèse.....	12
a. Principe général de l'électrophorèse .....	12
b. L'électrophorèse sur gel d'agarose.....	13
c. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	13
d. L'électrophorèse en champ pulsé ou bi-orientée .....	14
e. L'électrophorèse en gradient dénaturant.....	14
6. Les méthodes automatisées de séparation et visualisation de l'ADN .....	15
7. Les techniques d'hybridation.....	16
a. L'hybridation quantitative en dot-blot .....	17
b. L'hybridation in situ en fluorescence .....	17
c. Les puces à ADN .....	18
8. La PCR quantitative .....	19
9. Le séquençage du gène <i>16SrDNA</i> .....	19
a. Technique enzymatique : la méthode de Sanger aux didésoxynucléotides.....	19
b. Le pyroséquençage.....	22
c. Les banques de données nucléotidiques .....	23
<b>II. LE MICROBIOTE INTESTINAL DE LA NAISSANCE À L'ÂGE ADULTE : MISE EN PLACE ET ÉVOLUTION.....</b>	<b>24</b>
<b>A. La naissance.....</b>	<b>24</b>
1. Influence de l'exposition bactérienne <i>in utero</i> .....	24
2. Influence du mode d'accouchement.....	25
3. Influence du terme de naissance .....	25

4. Influence des conditions d'hygiène .....	26
<b>B. Le nourrisson .....</b>	<b>26</b>
1. Influence du mode d'allaitement .....	27
2. Influence de la diversification alimentaire .....	27
3. Influence du lieu géographique et du mode de vie .....	28
4. Influence de l'antibiothérapie .....	29
5. Influence génétique .....	29
<b>C. L'adulte .....</b>	<b>30</b>
1. Variations interindividuelles et éléments constants .....	30
2. Les différents entérotypes .....	31
3. Composition et topographie du microbiote intestinal de l'adulte sain .....	32
a. L'intestin grêle .....	32
b. Le côlon .....	32
c. Les fèces .....	33
<b>III. LES FONCTIONS DU MICROBIOTE INTESTINAL .....</b>	<b>34</b>
<b>A. Des fonctions métaboliques indispensables .....</b>	<b>34</b>
1. Métabolisme des polysaccharides .....	34
2. Métabolisme des protéines .....	36
3. Métabolisme des lipides .....	37
<b>B. L'immunité digestive .....</b>	<b>39</b>
1. Les défenses non spécifiques et l'immunité innée .....	39
a. Moyens de défense physiques et chimiques de la muqueuse digestive .....	39
b. Facteurs de l'immunité innée .....	41
2. Les défenses spécifiques et l'immunité adaptative .....	43
a. Cas de l'individu sain : rappels .....	43
b. Rôle du microbiote intestinal dans l'immunité adaptative .....	47
3. La tolérance orale .....	49
<b>CHAPITRE II : LES PROBIOTIQUES .....</b>	<b>50</b>
<b>I. HISTORIQUE DES PROBIOTIQUES .....</b>	<b>51</b>
<b>A. Les bactéries « bifides » de Tissier .....</b>	<b>51</b>
<b>B. Metchnikoff et le yaourt bulgare .....</b>	<b>51</b>
<b>C. Les prémices de l'industrie « probiotique » au Japon .....</b>	<b>52</b>
<b>D. Les probiotiques, des composés « en faveur de la vie » .....</b>	<b>52</b>
<b>E. Des définitions toujours plus précises .....</b>	<b>52</b>
<b>II. DÉFINITION ACTUELLEMENT RETENUE PAR L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ .....</b>	<b>54</b>
<b>III. DESCRIPTION DES MICROORGANISMES UTILISÉS EN TANT QUE PROBIOTIQUES .....</b>	<b>55</b>
<b>A. Le groupe des bactéries lactiques .....</b>	<b>55</b>
1. Classification .....	56
2. Description .....	57
3. Caractéristique particulière : la production d'acide lactique .....	58
4. Habitats naturels .....	60
<b>B. Les bifidobactéries : le genre <i>Bifidobacterium</i> .....</b>	<b>60</b>
1. Classification .....	60
2. Description .....	61
3. Caractéristique particulière : la production d'acide lactique par la voie « bifide » .....	62
4. Habitats naturels .....	62
<b>C. Le genre <i>Bacillus</i> .....</b>	<b>62</b>
1. Classification .....	62

2. Description.....	64
3. Caractéristique particulière : la sporulation.....	64
4. Habitats naturels .....	66
<b>D. Les levures probiotiques : le genre <i>Saccharomyces</i> .....</b>	<b>66</b>
1. Classification .....	66
2. Description.....	67
3. Habitats naturels (65).....	67
<b>IV. EVALUATION DES PROBIOTIQUES .....</b>	<b>68</b>
<b>A. Identification d'une souche probiotique.....</b>	<b>68</b>
<b>B. Tests <i>in vitro</i> : orientation des mécanismes d'action des probiotiques.....</b>	<b>68</b>
<b>C. Sécurité d'emploi .....</b>	<b>69</b>
1. Infections systémiques .....	69
2. Activités métaboliques délétères.....	72
3. Réactions immunologiques anormales.....	73
4. Résistance aux antibiotiques et transferts de gènes.....	74
5. Autres risques à explorer.....	79
<b>D. Etudes <i>in vivo</i> et essais cliniques.....</b>	<b>79</b>
<b>V. CADRES LÉGISLATIFS ET RÉGLEMENTAIRES DES PROBIOTIQUES.....</b>	<b>80</b>
<b>A. Médicaments avec AMM .....</b>	<b>80</b>
1. Définition du médicament.....	80
2. Demande d'AMM .....	80
<b>B. Compléments alimentaires contenant des probiotiques .....</b>	<b>82</b>
1. Définition du complément alimentaire.....	82
2. Déclaration de première mise sur le marché français.....	83
3. Allégations santé .....	83
4. Etiquetage.....	85
<b>C. Préparations pour nourrissons et préparations de suite .....</b>	<b>86</b>
1. Définitions .....	86
2. Composition .....	86
3. Allégations santé .....	87
4. Commercialisation et étiquetage .....	87
<b>D. Aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales (ADDFMS) .....</b>	<b>88</b>
1. Définition .....	88
2. Classification et composition.....	88
3. Commercialisation et étiquetage .....	89
<b>E. Dispositifs médicaux (DM) contenant des probiotiques .....</b>	<b>90</b>
1. Définition .....	90
2. Classification .....	90
3. Marquage CE et mise sur le marché des DM .....	91
<b>VI. MÉCANISMES D'ACTION DES PROBIOTIQUES : DES EFFETS SOUCHE-DÉPENDANTS .....</b>	<b>92</b>
<b>A. Pharmacocinétique des probiotiques administrés <i>per os</i> .....</b>	<b>92</b>
1. Capacité de survie dans le tube digestif.....	92
a. Acido-résistance .....	92
b. Bilio-résistance et survie fécale .....	94
2. Influence du milieu vecteur et de la galénique sur la survie des probiotiques .....	95
3. Importance de la dose administrée .....	98
4. Colonisation du tube digestif et persistance de la souche après administration .....	98
<b>B. Pharmacologie des probiotiques administrés <i>per os</i> .....</b>	<b>99</b>
1. Effets anti-adhésifs .....	99
a. Adhésion du probiotique à l'épithélium intestinal .....	99
b. Compétition pour les récepteurs de fixation de l'épithélium intestinal.....	100

2.	Effets anti-invasifs .....	101
3.	Production de composés antimicrobiens .....	101
a.	Bactériocines.....	101
b.	Antibiotiques.....	102
c.	Microcines .....	102
4.	Compétition pour les ressources limitantes .....	102
5.	Effets anti-toxiniques.....	102
6.	Immunomodulation .....	103
a.	Modulation de l'immunité innée.....	103
b.	Modulation de l'immunité adaptative .....	106
7.	Bilan.....	109

## CHAPITRE III : ETAT DES LIEUX CONCERNANT L'USAGE DES PROBIOTIQUES DANS LES PATHOLOGIES INTESTINALES DU NOURRISSON ..... 110

### I. L'ENTÉROCOLITE ULCÉRO-NÉCROSANTE (ECUN)..... 111

A.	Généralités .....	111
B.	Physiopathologie et principaux facteurs de risque.....	111
1.	Dysfonctions de la motilité intestinale et de la digestion.....	111
2.	Dysfonctions de la circulation sanguine mésentérique.....	112
3.	Immaturité de la fonction barrière intestinale .....	112
4.	Immaturité du système immunitaire digestif.....	113
5.	Anomalies de colonisation du tube digestif .....	114
6.	Rôles délétères de l'alimentation .....	115
C.	Clinique.....	115
D.	Les probiotiques utilisés dans les entérocolites ulcéro-nécrosantes : mise à jour des connaissances par la revue d'intervention Cochrane de 2014 .....	117
1.	Description de la revue d'intervention .....	117
2.	Résultats des interventions .....	117
a.	Effets généraux .....	117
b.	Comparaison des espèces probiotiques .....	118
c.	Comparaison des moments d'initiation du traitement .....	118
d.	Comparaison des durées de traitement.....	119
3.	Bilan.....	119

### II. LES GASTRO-ENTÉRITES AIGÜES ..... 120

A.	Généralités .....	120
B.	Les diarrhées aiguës virales : cas du <i>Rotavirus</i> .....	120
1.	Généralités .....	120
2.	Clinique.....	121
C.	Les diarrhées aiguës bactériennes .....	122
1.	Les syndromes « cholériformes » .....	122
2.	Les syndromes « dysentériques ».....	122
3.	Les syndromes mixtes dus à <i>Salmonella spp</i> .....	123
D.	Les probiotiques utilisés dans le traitement des gastro-entérites aiguës pédiatriques : recommandations de l'European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) publiées en 2014 .....	123
1.	Description du travail mené par l'ESPGHAN .....	124
2.	Résultats et recommandations établies .....	124
a.	Probiotiques disposant d'une recommandation positive .....	125
b.	Probiotiques disposant d'une recommandation négative .....	126
c.	Probiotiques dont le niveau de preuve est insuffisant pour établir une recommandation .....	126

3. Bilan.....	128
<b>III. LES DIARRHÉES POST-ANTIBIOTIQUES ET COLITES PSEUDO-MEMBRANEUSES À CLOSTRIDIUM DIFFICILE.....</b>	<b>129</b>
A. Généralités.....	129
B. Clinique.....	129
C. Les probiotiques utilisés en prévention des diarrhées post-antibiotiques : mise à jour des connaissances par la revue d'intervention Cochrane de 2011.....	130
1. Description de la revue d'intervention.....	130
2. Résultats des interventions.....	130
D. Les probiotiques utilisés en prévention des infections et diarrhées associées à <i>Clostridium difficile</i> : mise à jour des connaissances par la revue d'intervention Cochrane de 2013.....	131
1. Description de la revue d'intervention.....	131
2. Résultats des interventions.....	131
<b>IV. LES COLIQUES DU NOURRISSON.....</b>	<b>133</b>
A. Généralités.....	133
B. Épidémiologie.....	133
C. Origine des coliques.....	134
D. Clinique.....	134
E. Les probiotiques utilisés dans les coliques du nourrisson : effets démontrés de <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938.....	134
1. Description des études considérées.....	135
2. Résultats des études.....	135
3. Bilan.....	135
<b>V. LA CONSTIPATION FONCTIONNELLE CHEZ LE NOURRISSON.....</b>	<b>136</b>
A. Généralités.....	136
B. Épidémiologie.....	136
C. Origines et facteurs de risque.....	137
D. Les probiotiques utilisés dans la constipation fonctionnelle chez le nourrisson : des données encore insuffisantes.....	137
1. <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17398 augmenterait le nombre de défécations hebdomadaires chez des nourrissons constipés.....	137
2. Effets de souches probiotiques sur la constipation d'adultes et d'enfants de plus de deux ans.....	138
<b>VI. LES PROBIOTIQUES POUR NOURRISSONS À L'OFFICINE.....</b>	<b>139</b>
A. Médicaments probiotiques pédiatriques.....	139
B. Compléments alimentaires probiotiques pour nourrissons à l'officine.....	139
1. Complément alimentaire n°1 : association de vitamine D et de cinq souches « microbiotiques ».....	140
2. Complément alimentaire n°2 : association de vitamine D3 et de trois bactéries lactiques.....	141
3. Complément alimentaire n°3 : <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938.....	143
4. Complément alimentaire n°4 : association de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG et de vitamine D3.....	144
5. Complément alimentaire n°5 : association de quatre ferments lactiques, d'inuline de chicorée et de zinc.....	145
C. Préparations pour nourrissons et préparations de suite contenant des probiotiques à visée digestive.....	146
1. Préparations pour nourrissons et de suite enrichies en <i>Lactobacillus fermentum</i> CECT5716.....	147

2. Préparations pour nourrissons et de suite enrichies en <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12 .....	147
3. Préparations pour nourrissons et de suite enrichies en <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM17938 .....	147
4. Préparations pour nourrissons et de suite enrichies en « ferments lactiques » .....	148
<b>D. Aliment diététique destiné à des fins médicales spéciales (ADDFMS) .....</b>	<b>148</b>
1. SRO enrichi en <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 et zinc .....	148
<b>E. Dispositif médical (DM) .....</b>	<b>149</b>
1. Dispositif médical associant siméticone et spores de <i>Bacillus coagulans</i> .....	149
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>151</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>154</b>

# Table des figures

Figure 1 : Culture en anaérobiose stricte par la technique des <i>roll tubes</i> .....	6
Figure 2 : Structure de la molécule d'ARNr 16S .....	8
Figure 3 : Etapes de la réaction de polymérisation en chaîne .....	10
Figure 4 : Schéma de la technique du polymorphisme de longueur des fragments amplifiés ...	11
Figure 5 : Principe de l'électrophorèse des fragments d'ADN .....	13
Figure 6 : Principe du polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux .....	16
Figure 7 : Principe de l'hybridation <i>in situ</i> en fluorescence .....	18
Figure 8 : Principe de la méthode de Sanger .....	21
Figure 9 : Principe de la méthode de pyroséquençage, exemple du dTTP .....	22
Figure 10 : Bilan des facteurs influençant le développement du microbiote intestinal du fœtus au nourrisson .....	30
Figure 11 : Les trois différents entérotypes de l'Homme adulte .....	31
Figure 12 : Représentation schématique de la flore fécale cultivable .....	33
Figure 13 : Métabolisme protéique du microbiote intestinal chez l'Homme .....	36
Figure 14 : Voies directe et indirecte de réduction du cholestérol en coprostanol et coprostanone par le microbiote intestinal chez l'Homme .....	38
Figure 15 : Sécrétions des cellules de Paneth dans la lumière intestinale .....	40
Figure 16 : Coupe histologique de l'épithélium du jéjunum humain montrant deux cellules caliciformes produisant du mucus. Microscope optique, coloration hématoxyline/éosine, x 360 ...	40
Figure 17 : Les récepteurs <i>Toll-like</i> et leurs ligands .....	42
Figure 18 : Coupes histologiques montrant des structures lymphoïdes organisées intestinales. ....	43
Figure 19 : Représentation schématique d'une plaque de Peyer et des cellules M .....	44
Figure 20 : Activation des LT CD4 <sup>+</sup> naïfs en LTh1, LTh2, LTh17 et LTreg et profils de sécrétion cytokinique respectifs .....	46
Figure 21 : Activation des lymphocytes B par fixation de l'antigène et le lymphocyte Th2 .....	47
Figure 22 : Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'Ordre des <i>Lactobacillales</i> .....	56
Figure 23 : Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques au sein de l'Ordre des <i>Lactobacillales</i> , basé sur les séquences des ARNr 16S .....	57
Figure 24 : Système de transport perméase ATP-dépendant .....	58
Figure 25 : Système de transport PTS .....	58
Figure 26 : Voies homofermentaire, hétérofermentaire et bifide de la dégradation du glucose .	59
Figure 27 : Dendrogramme représentant les relations phylogénétiques entre les espèces de la famille des <i>Bifidobacteriaceæ</i> , basé sur l'analyse des ARNr 16S .....	61



Figure 28 : Deux cellules de <i>Saccharomyces boulardii</i> observées au microscope électronique à balayage .....	67
Figure 29 : Des facteurs de risques de la translocation aux défaillances multiviscérales .....	70
Figure 30 : Mécanisme d'action de la vancomycine et résistance chez les bactéries à Gram positif.....	74
Figure 31 : Mécanisme d'action d'un macrolide .....	75
Figure 32 : Structure de deux éléments transposables : une séquence d'insertion (a) et un transposon composite (b) .....	76
Figure 33 : Deux cellules d' <i>Escherichia coli</i> à un stade précoce de conjugaison, observées au microscope électronique.....	77
Figure 34 : Exemple de conjugaison bactérienne avec transfert du plasmide bactérien F .....	78
Figure 35 : Encapsulation des microorganismes par les techniques d'extrusion et d'émulsification.....	96
Figure 36 : Composition de la paroi des bactéries à Gram positif (a) et structure générale d'un acide teichoïque (b).....	105
Figure 37 : Immaturité de la fonction barrière intestinale .....	113
Figure 38 : Représentation schématique de la structure du <i>Rotavirus</i> .....	121

# Table des tableaux

Tableau I : Besoins énergétiques moyens des nourrissons de 1 à 23 mois .....	28
Tableau II : Composition globale et non exhaustive des trois phyla majeurs de la flore intestinale dominante de l'Homme adulte .....	31
Tableau III : Hydrolyse des polysaccharides exogènes par les principaux genres bactériens du microbiote intestinal humain .....	34
Tableau IV : Principaux genres bactériens produisant les acides gras à courte chaîne carbonée .....	35
Tableau V : Classification en onze groupes des espèces "types" de <i>Bacillus</i> .....	63
Tableau VI : Etapes de la sporulation des espèces de <i>Bacillus</i> .....	65
Tableau VII : Exemples de polymères naturels pouvant être utilisés dans les procédés d'encapsulation .....	97
Tableau VIII : Classification de Bell des cas d'ECUN.....	116
Tableau IX : Probiotiques recommandés pour le traitement des gastro-entérites aiguës des jeunes enfants.....	126
Tableau X : Probiotiques dont le niveau de preuve est insuffisant pour établir une recommandation.....	126
Tableau XI : Composition qualitative et quantitative du complément alimentaire n°1.....	140
Tableau XII : Composition qualitative et quantitative du complément alimentaire n°2.....	142
Tableau XIII : Composition qualitative et quantitative du complément alimentaire n°4.....	144
Tableau XIV : Composition qualitative et quantitative du complément alimentaire n°5 .....	145
Tableau XV : Composition qualitative et quantitative du SRO enrichi en <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 et zinc .....	149

# Liste des abréviations et acronymes

<b>A</b>	Adénine (base nucléique)
<b>ADDFMS</b>	Aliments Diététiques Destinés à des Fins Médicales Spéciales
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>ADN pol</b>	Acide Désoxyribonucléique polymérase
<b>ADNr / rDNA</b>	Acide Désoxyribonucléique ribosomal
<b>AFLP</b>	Amplified Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés)
<b>AGCC</b>	Acide Gras à Chaîne Courte
<b>AJR</b>	Apports Journaliers Recommandés
<b>AMM</b>	Autorisation de Mise sur le Marché
<b>ANSES</b>	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
<b>ANSM</b>	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
<b>APLV</b>	Allergie aux Protéines de Lait de Vache
<b>ARDRA</b>	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (Analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomique amplifié)
<b>Arg</b>	Arginine
<b>ARISA</b>	Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (Analyse automatisée de l'espace intergénique de l'ARN ribosomal)
<b>ARNdb / dsRNA</b>	Acide Ribonucléique double brin
<b>ARNr / rRNA</b>	Acide Ribonucléique ribosomique
<b>ARNsb / ssRNA</b>	Acide Ribonucléique simple brin
<b>ARNt</b>	Acide Ribonucléique de transfert
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATP</b>	Adénosine Triphosphate
<b>ATR</b>	Acid Tolerance Response (Réponse à la tolérance acide)
<b>BCR</b>	B-cell Receptor (Récepteur des cellules B)
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>BLSE</b>	Bêta-Lactamase à Spectre Étendu
<b>C</b>	Cytosine (base nucléique)

<b>CCD</b>	Charge-Coupled Device (Dispositif à transfert de charge)
<b>CD</b>	Cluster de Différenciation
<b>CE (Marquage)</b>	Conforme aux Exigences
<b>CIVD</b>	Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée
<b>CPA</b>	Cellule Présentatrice d'Antigène
<b>CpG</b>	Dinucléotide Cytosine-Guanine
<b>CSF</b>	Competence and Sporulation Factor (Facteur de compétence et de sporulation)
<b>D-Ala</b>	D-Alanine
<b>dATP</b>	Désoxyadénosine Triphosphate
<b>dCTP</b>	Désoxycytidine Triphosphate
<b>ddATP</b>	Didésoxyadénosine Triphosphate
<b>ddCTP</b>	Didésoxycytidine Triphosphate
<b>ddGTP</b>	Didésoxyguanosine Triphosphate
<b>ddNTP</b>	Didésoxyribonucléotide
<b>ddTTP</b>	Didésoxythymidine Triphosphate
<b>DGCCRF</b>	Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes
<b>DGGE</b>	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Electrophorèse en gradient dénaturant)
<b>dGTP</b>	Désoxyguanosine Triphosphate
<b>DM</b>	Dispositif Médical
<b>dNTP</b>	Désoxyribonucléotide
<b>DR</b>	Direct Repeat (Séquence répétée directe)
<b>dTTP</b>	Désoxythymidine Triphosphate
<b>EcN</b>	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
<b>ECUN</b>	Entérocolite Ulcéro-Nécrosante
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority (Autorité européenne de sécurité des aliments)
<b>EHEC</b>	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragique
<b>EIEC</b>	<i>Escherichia coli</i> entéroinvasif
<b>EMA</b>	European Medicines Agency (Agence Européenne du Médicament)

<b>EMBL</b>	European Molecular Biology Laboratory (Laboratoire européen de biologie moléculaire)
<b>EPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> entéropathogène
<b>ESPGHAN</b>	European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (Société Européenne de Gastroentérologie, d'Hépatologie et de Nutrition Pédiatrique)
<b>ETEC</b>	<i>Escherichia coli</i> entérotoxinogène
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)
<b>FDA</b>	U.S. Food and Drug Administration (Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux)
<b>FISH</b>	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization (Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence)
<b>F-Met</b>	N-formylméthionine
<b>FOS</b>	Fructooligosaccharide
<b>G</b>	Guanine (base nucléique)
<b>GALT</b>	Gut Associated Lymphoid Tissue Tissu lymphoïde associé à l'intestin
<b>GOS</b>	Galactooligosaccharide
<b>GRADE</b>	Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation
<b>GRAS</b>	Generally Recognized As Safe (Généralement reconnu sans danger)
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interféron gamma
<b>IgA</b>	Immunoglobuline A
<b>IgG</b>	Immunoglobuline G
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IR</b>	Inverted Repeat (Séquence répétée inverse)
<b>ITS</b>	Internal Transcribed Spacer (Espaceur interne transcrit)
<b>LB</b>	Lymphocyte B
<b>LT</b>	Lymphocyte T
<b>LTA</b>	Acides lipoteichoïques
<b>LTc</b>	Lymphocyte T cytotoxique
<b>LTh</b>	Lymphocyte T helper (auxiliaire)
<b>LTreg</b>	Lymphocyte T régulateur
<b>MALT</b>	Mucosa Associated Lymphoid Tissue (Tissu lymphoïde associé aux muqueuses)

<b>MetaHit</b>	Metagenomics of the Humain ltestinal Tract
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote ou oxyde nitrique
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid Gel Electrophoresis Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
<b>PAMP</b>	Pathogen-Associated Molecular Pattern (Motif moléculaire associé aux pathogènes)
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
<b>PFGE</b>	Pulsed-Field Gel Electrophoresis (Electrophorèse en champ pulsé)
<b>PKC</b>	Protéine Kinase C
<b>PPI</b>	Pyrophosphate
<b>PRR</b>	Pattern Recognition Receptor (Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires)
<b>PTS</b>	Système phosphotranférase phosphoénolpyruvate dépendant
<b>PUI</b>	Pharmacie à Usage Intérieur
<b>Q-PCR</b>	Quantitative Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne quantitative)
<b>RCP</b>	Résumé des Caractéristiques du Produit
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment lenght Polymorphism (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction)
<b>SI</b>	Séquences d'Insertion
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism (Polymorphisme nucléotidique)
<b>sp.</b>	Du latin <i>species</i> : espèce
<b>spp.</b>	Du latin <i>species pluralis</i> : plusieurs espèces d'un genre
<b>SRO</b>	Soluté de Réhydratation Orale
<b>SSCP</b>	Single Strand Conformation Polymorphisme (Polymorphisme de conformation des simples brins)
<b>T</b>	Thymine (base nucléique)
<b>TA</b>	Acides teichoïques
<b>TGFβ</b>	Tumor Growth factor bêta (Facteur de croissance tumorale bêta)
<b>TIAC</b>	Toxi-Infections Alimentaires Collectives
<b>TLR</b>	Toll-Like Receptor (Récepteurs de type Toll)

<b>Tm</b>	Melting Temperature (Température de fusion)
<b>TMA</b>	Triméthylamine
<b>TMAO</b>	Triméthylamine Oxyde
<b>TNBS</b>	Acide 2,4,6-trinitrobenzène-sulfonique
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis factor alpha (Facteur de nécrose tumorale alpha)
<b>TNF<math>\beta</math></b>	Tumor Necrosis factor bêta (Facteur de nécrose tumorale bêta)
<b>UFC</b>	Unité Formant Colonie
<b>ZO</b>	Zonula Occludens

# **Introduction**



$10^{14}$  : c'est le nombre de micro-organismes qu'héberge l'intestin humain. Quand on sait que le corps humain est constitué de dix fois moins de cellules, on comprend aisément que cet ensemble appelé « microbiote intestinal » joue un rôle fondamental dans l'homéostasie de l'organisme. Véritable armée de l'ombre, il constitue un allié précieux et même vital pour chacun d'entre nous. Confortablement installées dans notre cavité abdominale, nourries et protégées par notre tube digestif, les bactéries intestinales nous offrent en échange leur arsenal de qualités métaboliques, nutritives et immunitaires.

Les rouages bien huilés du microbiote peuvent toutefois se voir déréglés par de nombreux facteurs : alimentation inadaptée ou déséquilibrée, infections, traitements médicamenteux, stress, etc. De même la période d'installation progressive du microbiote intestinal chez l'enfant constitue une étape de fragilité. Les niches écologiques intestinales non encore colonisées laissent un intestin immature à la merci de toutes sortes de toxiques et de pathogènes. Les bactéries perturbées ou trop peu nombreuses n'assurent plus leurs pleines fonctions. L'intestin souffre alors de dysbiose, à l'origine de pathologies à la fois intestinales et extra-intestinales ! Maladies inflammatoires, maladies auto-immunes, allergies, pathologies infectieuses et troubles du transit sont des exemples de manifestations du phénomène.

Depuis le début des années 2000, un nombre sans cesse croissant d'études s'intéressant au microbiote et à son potentiel sont publiées. Les découvertes progressives ouvrent de nouvelles pistes thérapeutiques : les micro-organismes pourraient devenir une alternative « écologique » aux traitements conventionnels dans de nombreuses pathologies. C'est ici qu'interviennent ces bactéries vivantes apportées par voie orale, que l'on appelle probiotiques. Portant un intérêt tout particulier à la population pédiatrique, notamment aux nourrissons, j'ai choisi d'étudier l'intérêt de ces probiotiques dans diverses pathologies digestives basses, liées d'une manière ou d'une autre à un état de dysbiose intestinale, chez l'enfant de la naissance à deux ans.

Les marchés pharmaceutiques et agroalimentaires regorgent aujourd'hui de multiples spécialités enrichies en probiotiques. Les industriels vantent leurs mérites, leur attribuant divers effets bénéfiques : prévention ou traitement des pathologies intestinales infectieuses, amélioration du confort digestif, renforcement des défenses immunitaires ... Face à ces offres pléthoriques, le pharmacien d'officine doit pouvoir orienter le patient vers les probiotiques les mieux adaptés à son cas. Dans ma thèse je propose donc de réaliser un tour d'horizon des connaissances dont nous disposons actuellement sur les probiotiques et plus particulièrement sur leur usage dans les pathologies intestinales des nourrissons.

Dans une première partie, nous rappellerons quelques notions importantes sur le microbiote intestinal. Nous verrons d'abord les méthodes qui permettent d'étudier sa composition. Ensuite, nous aborderons les étapes de la mise en place du microbiote intestinale et son évolution naturelle de la naissance à l'âge adulte. Nous résumerons enfin les différentes fonctions qui lui sont attribuées.

Une seconde partie portera sur les probiotiques en général. Un bref historique amènera à la définition actuelle des probiotiques. Nous décrirons également les différents genres microbiens utilisés comme probiotiques, avant d'aborder les étapes de leur évaluation en termes de sécurité et d'effets cliniques. Les différents cadres réglementaires et législatifs dont dépendent les probiotiques seront ensuite explicités. Nous terminerons cette partie en réalisant un bilan des mécanismes d'action des probiotiques au niveau digestif.

Pour finir, nous verrons dans une troisième partie différentes pathologies intestinales du nourrisson ainsi que leur prise en charge par les probiotiques. Les recommandations actuelles de l'*European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition* (ESPGHAN) concernant l'usage des probiotiques seront évoquées de même que les résultats de revues systématiques récentes. Afin d'orienter le choix des professionnels de santé parmi les probiotiques disponibles sur le marché, nous étudierons finalement la composition de diverses spécialités, en regard des conclusions précédemment tirées.

Je vous souhaite une bonne lecture.

# **Chapitre I : Le microbiote intestinal humain**

Des méthodes d'études toujours plus performantes ont permis d'identifier précisément les populations bactériennes intestinales et d'analyser leur évolution au cours de la vie. De mieux en mieux connues, les fonctions de ces micro-organismes sont nombreuses et ne se limitent pas à la sphère digestive.

### **I. MÉTHODES D'ÉTUDE DU MICROBIOTE INTESTINAL**

Depuis la première description complète de *Bacterium coli communior* (aujourd'hui *Escherichia coli*) par Escherich en 1885, les méthodes d'étude des micro-organismes ont beaucoup évolué. La culture *in vitro* s'est développée, offrant la possibilité de créer des milieux propices à la croissance de nombreux types de bactéries. Beaucoup d'entre elles restent néanmoins impossibles à cultiver et c'est grâce aux méthodes moléculaires qu'il est aujourd'hui possible de les étudier.

#### **A. La culture *in vitro* des micro-organismes digestifs**

##### **1. Les micro-organismes anaérobies stricts**

Les bactéries anaérobies strictes nécessitent que leur milieu soit exempt d'oxygène pour se développer. À la fin des années 1960, les travaux de Hungate amènent une avancée majeure dans le domaine de la culture en anaérobiose. Il met au point le système des *roll tubes* qui utilise des tubes stériles contenant un milieu de culture mimant les conditions physico-chimiques du tractus digestif en matière de pH, température, potentiel redox et composition nutritive (1).

Les tubes remplis sont placés sous un flux continu de CO<sub>2</sub>. Ceux-ci sont ensuite stérilisés à l'autoclave durant 20 minutes à 120 °C, puis chauffés au bain-marie à 48°C pour que la gélose conserve son état de surfusion. Ils sont alorsensemencés avec l'échantillon choisi puis placés dans un appareil appelé « *roller* » qui fait rouler les tubes sur eux-mêmes. Un courant d'eau froide passe sur les tubes et permet de figer uniformément le milieuensemencé sur les parois. Commence alors l'incubation, qui permet le développement des différentes colonies microbiennes (**Figure 1**) (1).

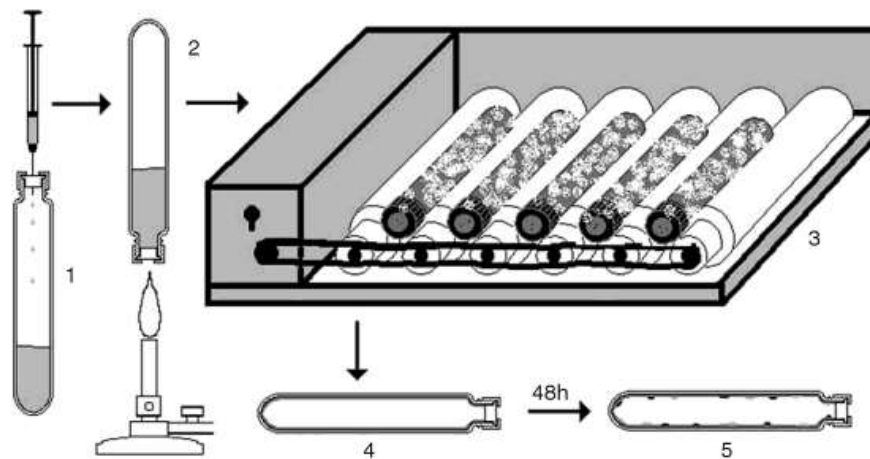
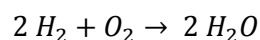


Figure 1 : Culture en anaérobiose stricte par la technique des *roll tubes* (1)

- ① Le tube à essais contenant le milieu de culture stérile est ensemencé.
- ② Il est scellé pour maintenir l'anaérobiose.
- ③ Le tube est placé dans le « *roller* » qui le fait tourner sur lui-même. Un courant d'eau froide fige le milieu de culture ensemencé sur les parois du tube.
- ④ Le tube est mis à incuber dans les conditions adéquates.
- ⑤ Au bout de 48h, des colonies se sont développées sur les parois du tube.

À la même période, Freter invente une chambre à atmosphère contrôlée dans laquelle il est possible de manipuler des cultures à l'abri de l'oxygène. Un grand nombre de bactéries anaérobies issues de la flore fécale dominante devient alors facilement cultivable sur des boîtes de Petri. Une atmosphère réductrice est en permanence maintenue dans l'enceinte et les éventuelles traces d'oxygène y sont éliminées grâce au chlorure de palladium qui sert de catalyseur à la réaction chimique suivante (1) :



Un gel de silice placé dans la chambre adsorbe l'eau formée (1).

## 2. Les bactéries aérobies et aéro-anaérobies facultatives

Pour dénombrer la flore fécale aérobie ou anaérobie facultative « totale », on utilise des milieux de culture non sélectifs solides ou liquides, de composition variable. *A contrario*, les milieux sélectifs permettent d'isoler des germes spécifiques, issus des flores sous-dominante ou de passage. Par exemple, on utilisera une gélose au désoxycholate pour cultiver des Entérobactéries et un milieu de Mann, Sharpe et Rogosa pour sélectionner les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (1).

Les limites de la culture restent cependant nombreuses et handicapantes. Seules les populations pour lesquelles les conditions optimales de croissance sont reproductibles *in vitro* peuvent être étudiées. En cas d'exigences nutritionnelles complexes ou d'interactions nécessaires avec d'autres cellules, les bactéries ne peuvent malheureusement pas être cultivées. Cela a d'ailleurs régulièrement conduit à sous-estimer les populations bactériennes du microbiote intestinal. En effet, dans les années 1970, la fraction cultivable du microbiote intestinal était estimée à plus de 90 % de la flore totale. Quarante ans plus tard, ce pourcentage est largement revu à la baisse, puisqu'il est estimé à moins de 30 % (2).

La communauté scientifique a progressivement admis l'existence d'une portion importante de bactéries non cultivables au sein du tube digestif de l'Homme. La culture *in vitro* a ainsi posé les bases des études du microbiote intestinal et ouvert la voie aux analyses moléculaires.

### **B. Les méthodes moléculaires d'étude du microbiote intestinal**

Les différents micro-organismes présents dans un échantillon peuvent être identifiés grâce à des méthodes moléculaires dites qualitatives. Celles-ci sont couramment associées à des techniques quantitatives, dont l'objectif est de déterminer les proportions absolues et relatives des bactéries détectées. De manière générale, après extraction et amplification, le matériel génétique subit un ou plusieurs traitements visant à faciliter sa visualisation et son exploitation. Les méthodes moléculaires sont nombreuses et en perpétuelle évolution.

#### **1. Les cibles des méthodes moléculaires**

##### ***a. L'acide ribonucléique ribosomal 16S***

À la fin des années 1970, Carl Woese propose l'utilisation des acides ribonucléiques ribosomaux 16S (ARNr 16S) pour étudier la phylogénie du monde vivant. Pour rappel, chez les procaryotes, les ribosomes sont constitués de deux portions (**Figure 2**) (1) :

- la grande sous-unité (50S), qui est obtenue par assemblage de trente-cinq protéines et des ARNr 23S et 5S ;
- la petite sous-unité (30S), qui découle de l'assemblage de 21 autres protéines et de l'ARNr 16S.

Les études phylogénétiques qui se sont développées à partir des années 1990 sont pour la plupart basées sur l'étude des ARNr 16S : ils servent de véritables « chronomètres moléculaires ». Ces composants de petite taille sont retrouvés dans toutes les cellules vivantes,

procaryotes et eucaryotes. Leur structure primaire présente des régions très conservées et d'autres variables, qui permettent d'établir les relations phylogénétiques entre les différents organismes. Monocaténaires, ils se replient par endroits pour former des boucles avec appariement de bases complémentaires (**Figure 2**) (1).

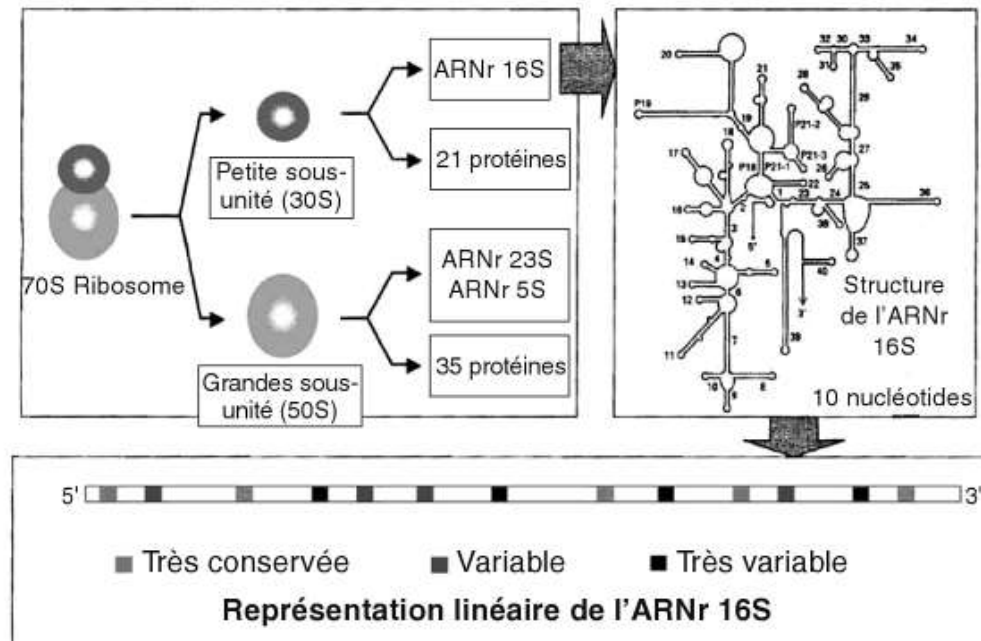


Figure 2 : Structure de la molécule d'ARNr 16S (1)

### ***b. L'acide désoxyribonucléique ribosomal***

Les gènes codant les différents ARNr sont portés par le même opéron chez toutes les bactéries : l'ADN ribosomal (ADNr). L'ARNr 16S est codé par le gène *16SrDNA*, l'ARNr 23S par le gène *23SrDNA* et l'ARNr 5S par le gène *5SrDNA*. Les trois gènes possèdent des régions hypervariables et d'autres très conservées au cours de l'évolution. Ils sont séparés par des zones non codantes de longueur variable en fonction des espèces bactériennes, appelées *Internally Transcribed Spacers* (ITS) (3).

Au-delà des études taxonomiques, l'ADNr constitue un solide support aux analyses qualitatives de divers microbiotes, dont le microbiote intestinal. Le gène codant l'ARNr 16S est le plus utilisé, notamment en raison de sa petite taille : pour la même quantité d'informations, il présente 1500 paires de bases contre environ 3000 pour le gène codant l'ARNr 23S. De plus, des banques de données internationales regroupent d'innombrables séquences nucléotidiques correspondant à ce gène. Ainsi, lorsque l'on se trouve en présence de bactéries dont on ne

connaît pas la nature, le séquençage du gène *16SrDNA* constitue une étape cruciale dans leur identification. En effet, les séquences nucléotidiques obtenues pour le gène peuvent être comparées à celles issues des banques, afin d'identifier les micro-organismes (3).

Toutefois, le pouvoir discriminant de ce gène peut être insuffisant pour différencier certaines espèces. L'ADNr n'est pas non plus utilisable dans le cadre d'études quantitatives, car il dispose d'un nombre de copies variable entre les espèces. Il faudra alors faire appel à d'autres gènes ubiquitaires ou spécifiques, si possible monocopies, pour mener à bien ces analyses (3).

### *c. Les espaces intergéniques de l'ADNr*

Les ITS de l'opéron ribosomal sont hautement polymorphes. De la même manière que les ADNr, plusieurs exemplaires des ITS peuvent être retrouvés dans le génome (3).

L'ITS le plus étudié est situé entre l'extrémité 3' du gène *16SrDNA* et l'extrémité 5' du gène *23SrDNA* car il est de petite taille et encadré par des zones très conservées des gènes. Il est donc facilement repérable et exploitable. L'analyse de cet ITS fournit peu d'informations sur le micro-organisme étudié, mais offre surtout de mettre en évidence des différences entre des espèces génétiquement proches. Il est également employé pour évaluer la dynamique et la diversité d'une population microbienne (3).

## **2. L'extraction de l'ADN**

Pour les études moléculaires des bactéries, il est nécessaire d'accéder aux informations génétiques, dont celles qui codent les ARNr 16S. L'extraction de l'ADN permet d'isoler les gènes du reste des composants cellulaires. Différents protocoles, manuels ou automatisés, ont été mis au point et permettent d'obtenir l'ADN en quantité et qualité variables. Il existe des kits commerciaux utilisant des réactifs prêts à l'emploi pour extraire rapidement l'ADN (3).

De manière générale, trois étapes successives sont réalisées :

- lyse des cellules par des détergents, des cycles de congélation ou broyage ;
- dénaturation des protéines liées à l'ADN par une protéase ;
- précipitation des acides nucléiques, qui sont ensuite élués avec une solution appropriée (3).



### 3. L'amplification du matériel génétique

#### a. La Polymerase Chain Reaction

##### (1) Principe général de la PCR

Pour qu'un ADN extrait puisse être convenablement exploité, il est préférable qu'il soit amplifié. Pour ce faire, on utilise la réaction de polymérisation en chaîne, ou PCR. Elle permet d'obtenir *in vitro* un grand nombre de copies ciblées de l'ADN (3).

Un mélange réactionnel est constitué avec l'ADN extrait, des oligonucléotides qui serviront d'amorces à la synthèse de nouveaux brins d'ADN, une ADN polymérase thermostable telle que la *Taq* polymérase et les quatre différents désoxyribonucléotiques triphosphates (dNTP) : désoxyadénosine triphosphate (dATP), désoxycytidine triphosphate (dCTP), désoxyguanosine triphosphate (dGTP) et désoxythymidine triphosphate (dTTP) (3).

Le mélange est introduit dans un thermocycleur qui reproduit précisément les cycles de PCR, divisés en trois étapes successives (**Figure 3**). La première étape du cycle consiste en la dénaturation thermique de l'ADN double brin. La température est ensuite abaissée pour que les amorces s'apparient à l'ADN, à chaque extrémité de la séquence que l'on cherche à amplifier : c'est l'étape d'hybridation. Finalement, la *Taq* polymérase prolonge les amorces d'oligonucléotides grâce aux dNTP disponibles dans le milieu. N cycles sont nécessaires pour aboutir à un nombre maximal théorique de  $2^N$  copies de la séquence d'ADN (3).

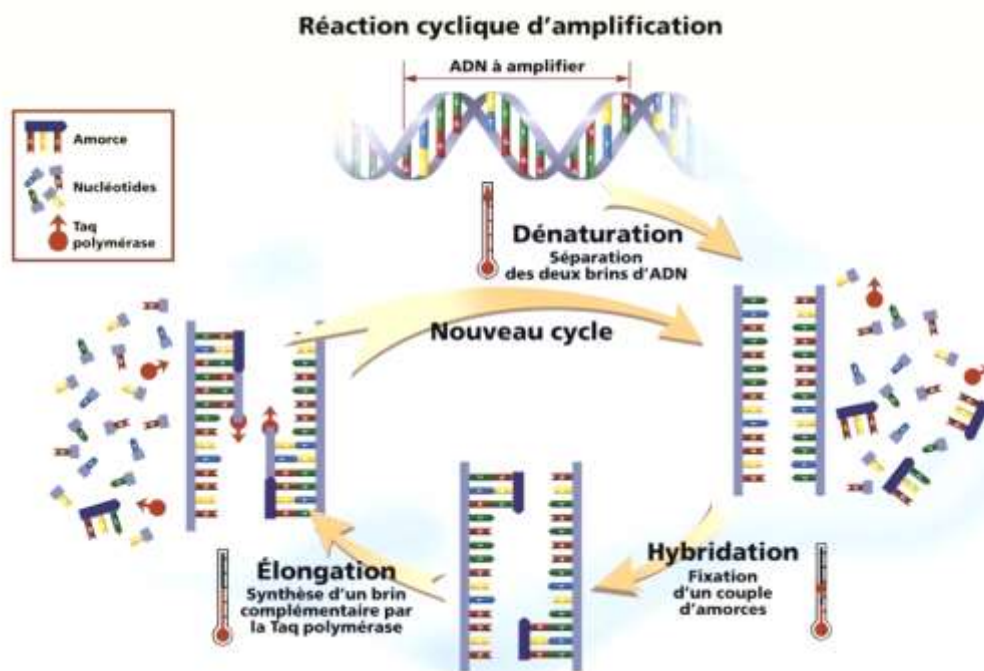


Figure 3 : Etapes de la réaction de polymérisation en chaîne (4)

## (2) La PCR ciblant les ARNr 16S

Le gène 16SrDNA possède des régions très conservées qui autorisent l'utilisation d'amorces universelles ou spécifiques de genres pour les réactions de PCR. La polymérase réalise ensuite l'élongation de ces amorces et permet d'obtenir les brins complémentaires des ADNr. Les nouvelles séquences amplifiées sont ainsi analysables par les techniques que nous expliquons ci-après (3).

**b. Le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés**

Le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés, ou *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), est une technique d'amplification sélective. Elle consiste à mettre les portions d'ADN à étudier en présence de deux enzymes de restriction qui coupent l'ADN au niveau de sites spécifiques. Les fragments obtenus sont délimités par des demi-sites de restriction auxquels sont ajoutés des adaptateurs, permettant la fixation des amorces. Les cycles de PCR peuvent ensuite débiter pour amplifier les séquences (**Figure 4**). Les copies des fragments sont finalement séparées par électrophorèse (3).

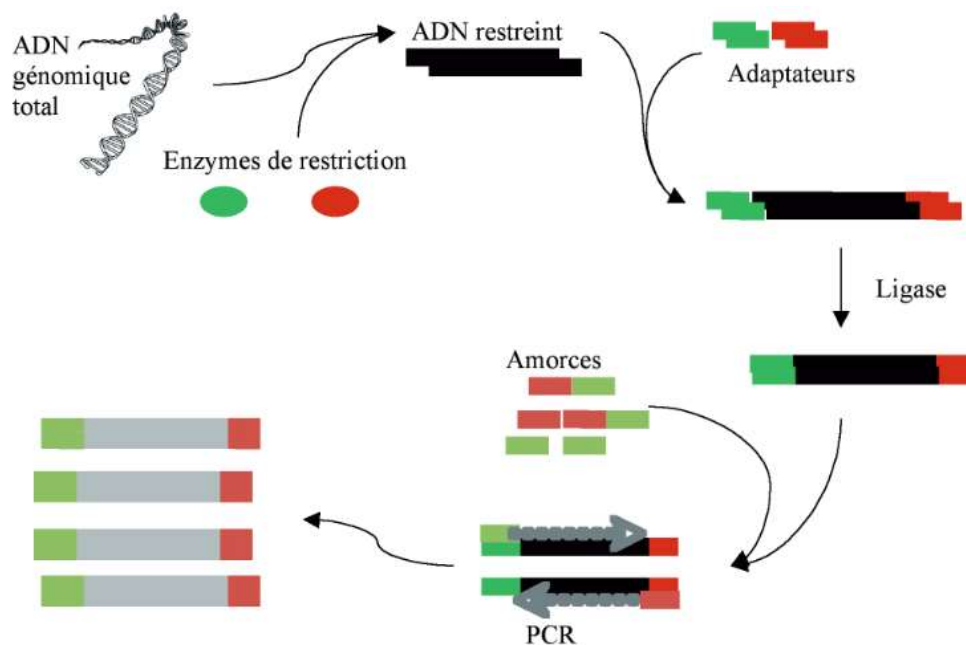


Figure 4 : Schéma de la technique du polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (3)

#### 4. Les traitements de l'ADN amplifié

##### *a. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction*

Une fois l'ADN extrait et amplifié par PCR, il peut être nécessaire de le traiter par des enzymes de restriction afin de faciliter la différenciation des molécules obtenues. Dans la technique du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP), les clones sont digérés par une ou plusieurs enzymes qui clivent la séquence nucléotidique en des points précis. Des fragments de longueurs différentes sont ainsi formés puis séparés par électrophorèse (3).

Dans le cas des ADN<sub>r</sub>, on utilise la technique spécifique ARDRA (*amplified rDNA restriction analysis*), dérivée de la RFLP. Elle permet d'obtenir différents types de profils électrophorétiques en fonction des ADN<sub>r</sub> clonés. La diversité des profils dépend de la diversité microbienne de l'échantillon étudié (3).

##### *b. Le polymorphisme de conformation des simples brins*

Dans la méthode du polymorphisme de conformation des simples brins (*single strand conformation polymorphism*), ou SSCP, l'ADN double brin est dénaturé par un agent dénaturant de type formamide, urée, ou encore hydroxyde de sodium. Les simples brins ainsi obtenus adoptent une nouvelle conformation tridimensionnelle, à l'encombrement stérique spécifique et peuvent être séparés par des techniques appropriées d'électrophorèse (3).

Cette méthode permet de mettre en évidence des populations faiblement représentées au sein d'un échantillon plurimicrobien complexe comme les selles (moins de 1,5 % de la population totale) (3).

#### 5. La séparation des séquences d'ADN par électrophorèse

##### *a. Principe général de l'électrophorèse*

Quel que soit le support employé, la séparation des particules se fait selon les mêmes principes pour toutes les techniques d'électrophorèse : les molécules sont séparées selon leur encombrement stérique et leur charge électrique, lors de leur passage à travers un réseau solide. Plus les fragments sont petits, plus ils se déplacent loin de leur point de dépôt. Il est nécessaire d'adapter la densité du maillage du réseau pour assurer la meilleure discrimination possible des molécules de petite taille. Pour l'ADN, chargé négativement, le déplacement s'effectue de la cathode vers l'anode (**Figure 5**).

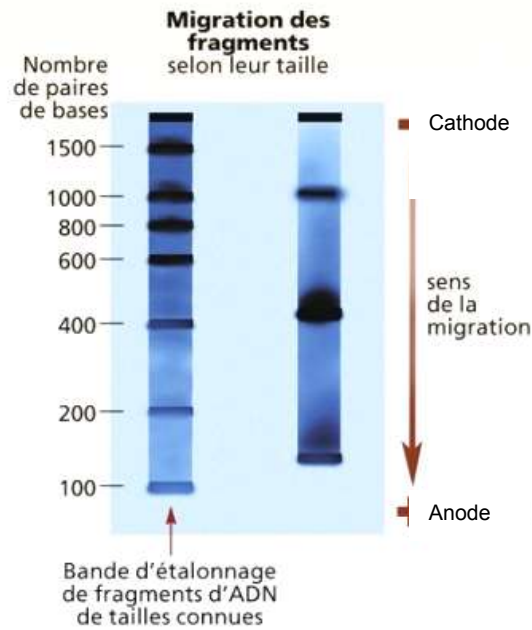


Figure 5 : Principe de l'électrophorèse des fragments d'ADN (5)

### ***b. L'électrophorèse sur gel d'agarose***

L'agarose est obtenu par polymérisation d'agar-agar extrait d'algues rouges. Il est ajouté à une solution tampon dans des proportions variables pour obtenir un gel d'agarose plus ou moins dense. En règle générale, la concentration en agarose varie de 0,5 % m/V (0,5 g d'agarose pour 100 mL de volume final) à 1,5 % m/V (3).

Les fragments d'ADN déposés à la cathode sont soumis à un courant électrique qui entraîne leur migration dans le gel d'agarose, en direction de l'anode. Plus la concentration en agarose est importante, mieux les fragments sont séparés. Ce support peut être employé pour analyser l'ADN suite à son amplification par PCR ou pour étudier des polymorphismes de longueur de fragments de restriction. Elle n'est cependant pas adaptée à l'examen des fragments de très petite taille comme ceux issus des ADNr, pour lesquels on préférera utiliser un gel de polyacrylamide (3).

### ***c. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide***

La polyacrylamide est issue de la polymérisation d'acrylamide et de bisacrylamide. Comme pour les gels d'agarose, plus le niveau de polymérisation est élevé, plus le gel formé est dense et la séparation des très petits fragments nette (3).

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (*polyacrylamid gel electrophoresis*), ou PAGE, repose sur le même principe que celle sur gel d'agarose : les fragments d'ADN déposés à la cathode se déplacent progressivement vers l'anode sous l'influence d'un courant électrique. Cette technique est à la fois utilisée pour analyser l'ADN suite à son amplification par PCR, pour étudier des polymorphismes de longueur de fragments de restriction et pour séparer les simples brins issus de SSCP. C'est également la technique de séparation traditionnellement associée à la méthode de séquençage de Sanger, expliquée plus loin (*Page 19 - Chapitre I :B.9.a*). Elle est bien adaptée aux analyses menées sur de petits fragments d'ADN, notamment sur les ADNr 16S (3).

### *d. L'électrophorèse en champ pulsé ou bi-orientée*

Contrairement aux techniques simples sur gels d'agarose ou de polyacrylamide, l'électrophorèse en champ pulsé (*pulsed field gel electrophoresis*), ou PFGE, fait appel à un courant électrique dont le sens est périodiquement modifié. Les molécules d'ADN doivent de ce fait constamment se réorienter sur le gel. La vitesse de déplacement des fragments étant directement proportionnelle à leur encombrement stérique, les plus grands mettront plus de temps à se réorienter que les petits et leur distance de migration totale sera donc moindre (3).

La PFGE permet ainsi de séparer de très grands fragments d'ADN, jusqu'à 1 Mb, alors que les autres méthodes ne parviennent qu'à effectuer une séparation pour des fragments n'excédant pas 50 kb. En conséquence, on l'utilise essentiellement lors de digestions de l'ADN total par des enzymes de restriction à faible taux de coupure, pour étudier la diversité microbienne au sein d'un isolat, ou pour déterminer la taille de génomes bactériens (3).

### *e. L'électrophorèse en gradient dénaturant*

L'électrophorèse en gradient dénaturant (*denaturing gradient gel electrophoresis*), ou DGGE, associe dans le même temps le traitement de l'ADN et la séparation des fragments sur le support. À mesure que les molécules progressent dans le gel, elles sont progressivement dénaturées grâce à agent dénaturant inséré dans le gel à des concentrations croissantes. Le gradient dénaturant peut aussi être un gradient de température ; à ce moment les fragments d'ADN sont dénaturés en fonction de leur température de fusion ( $T_m$ ) (3).

Les simples brins prennent une conformation tridimensionnelle encombrante qui stoppe leur migration à des positions spécifiques, dépendantes de leur concentration en bases azotées : guanine (G)-cystosine (C) et adénine (A)-thymine (T) (3).

Cette technique permet donc de séparer des fragments de même taille, en fonction de leur composition nucléotidique. Elle est bien adaptée à l'étude des régions hypervariables de l'ADNr 16S et aux analyses comparatives de différents microbiotes. Malheureusement, elle ne permet pas de mettre en évidence les populations minoritaires d'échantillons plurimicrobiens (3).

### 6. Les méthodes automatisées de séparation et visualisation de l'ADN

Plus performantes que les profils électrophorétiques sur gels, les méthodes automatisées de séparation et visualisation de l'ADN font appel à un marquage fluorescent des fragments d'ADN amplifiés par PCR. Ceux-ci sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire en fonction de leur taille. Un fluorimètre fixe détecte leur fluorescence lorsqu'ils passent dans la fenêtre de lecture et enregistre les pics correspondants (1) (3).

Parmi ces techniques automatisées, on peut citer le polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (*terminal restriction fragment length polymorphism*), dérivée du RFLP. Ici ce sont les fragments restreints qui sont marqués puis amplifiés par PCR et séparés (**Figure 6**). Les pics de fluorescence enregistrés forment un profil particulier à l'espèce qui peut être consigné dans des bases de données internationales. Le but est alors de faciliter l'identification de bactéries et d'éviter le recours au séquençage. Cette technique emploie largement le gène *16SrDNA* dans le cadre de recherches qualitatives. Elle permet également de quantifier les espèces bactériennes grâce à la mesure de la hauteur des pics de fluorescence : leur taille est proportionnelle au nombre de copies du gène mises en évidence (1) (3).

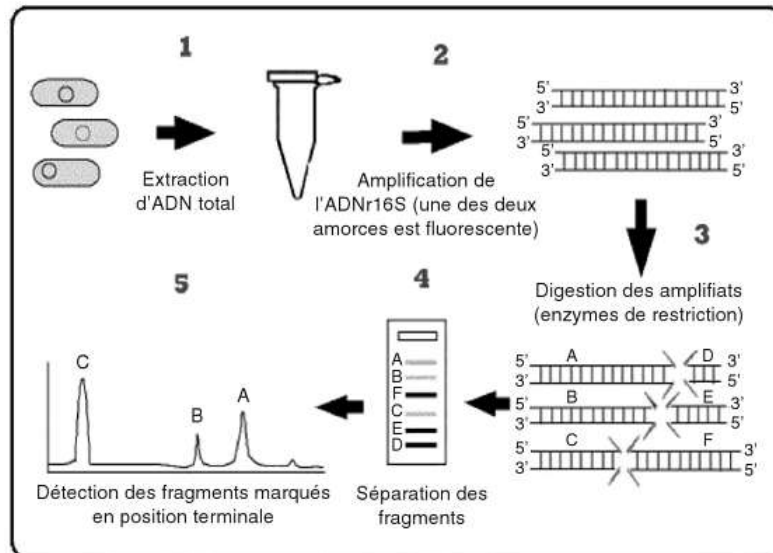


Figure 6 : Principe du polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (1)

- ① L'ADN total est extrait et purifié.
- ② L'ADN est amplifié par PCR, grâce à une amorce marquée par un fluorochrome.
- ③ Des enzymes de restriction digèrent l'ADN amplifié.
- ④ Les fragments sont séparés par électrophorèse capillaire automatisée.
- ⑤ Les fragments marqués en position terminale par le fluorochrome sont détectés par un fluorimètre. Les pics de fluorescence enregistrés permettent d'identifier les populations bactériennes (1).

Il existe aussi une méthode d'analyse automatisée des espaces intergéniques de l'ADNr, (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* ou ARISA). Les ITS sont amplifiés et marqués par le fluorochrome dans le même temps, puis séparés et visualisés par le fluorimètre qui enregistre les pics de fluorescence. Cette technique est fréquemment employée pour étudier la dynamique des populations bactériennes, notamment l'évolution du microbiote intestinal au cours du temps (3).

## 7. Les techniques d'hybridation

L'hybridation a un objectif double de détection et quantification de micro-organismes déjà connus, grâce à leur ARNr 16S. Des sondes oligonucléotidiques marquées sont ajoutées à un extrait d'ARN total et s'hybrident spécifiquement avec une portion de l'ARNr 16S. Le marquage permet alors de détecter les ARNr 16S recherchés puis de les quantifier, y compris dans un échantillon complexe tel que des selles.

### **a. L'hybridation quantitative en dot-blot**

L'hybridation en *dot-blot* est une méthode quantitative nécessitant de dénaturer l'ARN total extrait et purifié, avant de le transférer sur une membrane nylon de charge négative. Un marqueur radioactif est couplé à la sonde oligonucléotidique qui vient s'hybrider à la portion complémentaire d'ARNr 16S recherchée. En parallèle, une autre membrane portant les mêmes dépôts d'ARN total est mise en contact avec une sonde universelle. De cette manière il est possible de déterminer la proportion d'ARNr 16S présentant la séquence d'intérêt par rapport à la quantité totale d'ARN, donc de quantifier précisément une espèce ou un genre bactérien dans un échantillon plurimicrobien (1).

Le principal inconvénient de cette méthode est l'utilisation de marqueurs radioactifs, nécessitant de grandes précautions de manipulation (1).

### **b. L'hybridation in situ en fluorescence**

L'hybridation *in situ* en fluorescence, ou FISH (*fluorescence in situ hybridization*), fait intervenir des sondes marquées par un fluorochrome. Les cellules microbiennes perméabilisées sont directement mises en contact les sondes oligonucléotidiques fluorescentes, qui pénètrent dans le cytoplasme et s'hybrident à la séquence cible de l'ARNr 16S. Les micro-organismes contenant la sonde sont ensuite repérés et dénombrés par microscopie à épifluorescence ou comptabilisés par cytométrie en flux (**Figure 7**) (1).



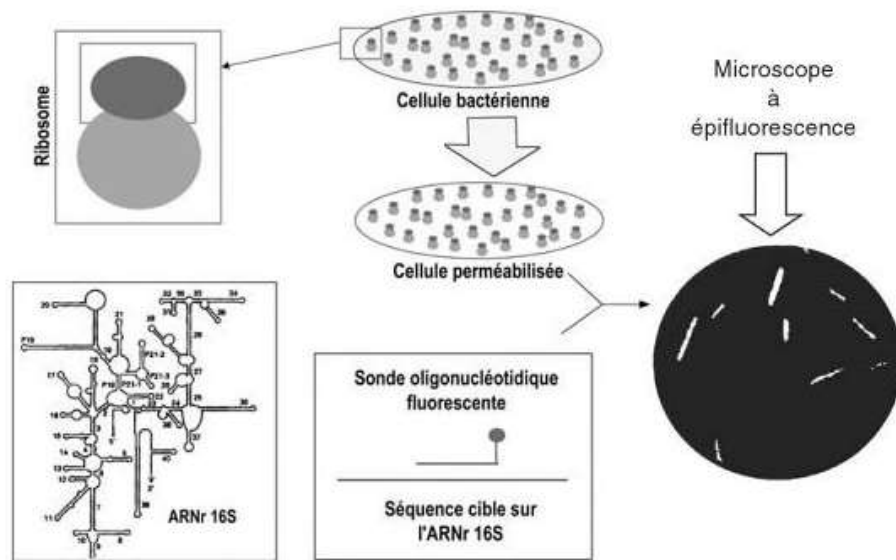


Figure 7 : Principe de l'hybridation *in situ* en fluorescence (1)

### c. Les puces à ADN

Les puces à ADN ou *microarrays* sont constituées par des supports neutres d'environ un centimètre carré, sur lesquels un robot dispose des milliers de sondes oligonucléotidiques ciblant chacune une séquence d'ADN donnée. Leur précision permet de détecter des SNP (*single nucleotide polymorphism*). Les fragments d'ADN à identifier sont marqués par un fluorochrome puis mis au contact des puces qui les fixent spécifiquement. Les fragments non hybridés sont éliminés par une solution de lavage avant lecture de la puce par un scanner à très haute résolution. L'image est analysée par un logiciel adapté (1).

Pour améliorer les connaissances des micro-organismes, deux types de puces sont utilisables :

- les puces dites « phylogénétiques », dont les sondes sont des fragments d'ARNr 16S spécifique d'un taxon, permettent de détecter un groupe de micro-organisme donné, afin d'avoir un aperçu rapide et complet de la diversité phylogénétique de l'échantillon ;
- les puces dites « métaboliques », dont les sondes correspondent à une portion d'un gène de fonction, donnent la possibilité d'analyser des voies métaboliques spécifiques et leurs variations face aux changements environnementaux (1).

## 8. La PCR quantitative

La PCR quantitative (Q-PCR), également appelée PCR en temps réel, permet de coupler amplification génique et détection des copies, dans le but de réaliser des mesures quantitatives. En effet, les amorces sont associées à des sondes marquées par un fluorochrome dont l'activité est mesurée par un fluorimètre au fur et à mesure de l'avancement des cycles de PCR. Il est donc possible de quantifier précisément le nombre de copies d'un gène ciblé et, par extension, de connaître l'abondance relative des espèces possédant ce gène dans l'échantillon analysé (3).

Cependant la fiabilité de cette détection est souvent limitée par la quantité des fragments. Des fragments peu présents seront sur-estimés par un minimum de cycles. À l'inverse, des fragments sur-représentés seront sous-estimés par un effet plateau (3).

## 9. Le séquençage du gène *16SrDNA*

Le séquençage consiste à déterminer l'enchaînement nucléotidique de fragments amplifiés d'ADN. Actuellement, les procédés sont automatisés, mais restent chronophages car les séquences obtenues nécessitent d'être comparées à celles stockées dans les banques de données nucléotidiques.

### *a. Technique enzymatique : la méthode de Sanger aux didésoxynucléotides*

Dans la méthode de Sanger, le fragment d'ADN à séquencer sert de matrice à une réaction de polymérisation particulière (**Figure 8**). On utilise quatre tubes différents dans lesquels se trouvent les acteurs de la synthèse d'ADN :

- la matrice ;
- une amorce complémentaire d'une partie du fragment à séquencer ;
- les quatre dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) ;
- l'ADN polymérase.

Dans chacun des tubes, on ajoute alors une petite quantité de l'un des quatre didésoxyribonucléotides triphosphates (ddNTP) marqués par un fluorochrome :

- didésoxyadénosine triphosphate (ddATP) ;
- didésoxycytidine triphosphate (ddCTP) ;
- didésoxyguanosine triphosphate (ddGTP) ;
- didésoxythymidine triphosphate (ddTTP).

Ces ddNTP sont dépourvus de groupement hydroxyle à leur extrémité 3' et sont donc dans l'incapacité de se lier à un nouveau nucléotide lors de la réaction de polymérisation. Par conséquent, la réaction est stoppée dès lors qu'un ddNTP est inséré dans la chaîne (6).

L'incorporation des ddNTP se fait au hasard et à toutes les positions possibles, ce qui permet d'obtenir un mélange de fragments de longueurs différentes. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse couplée à une mesure de la fluorescence émise par chacun des quatre ddNTP. Ces derniers se retrouvent à la place normalement occupée par les dNTP correspondants et il devient possible de connaître la base complémentaire sur le brin matrice (6).

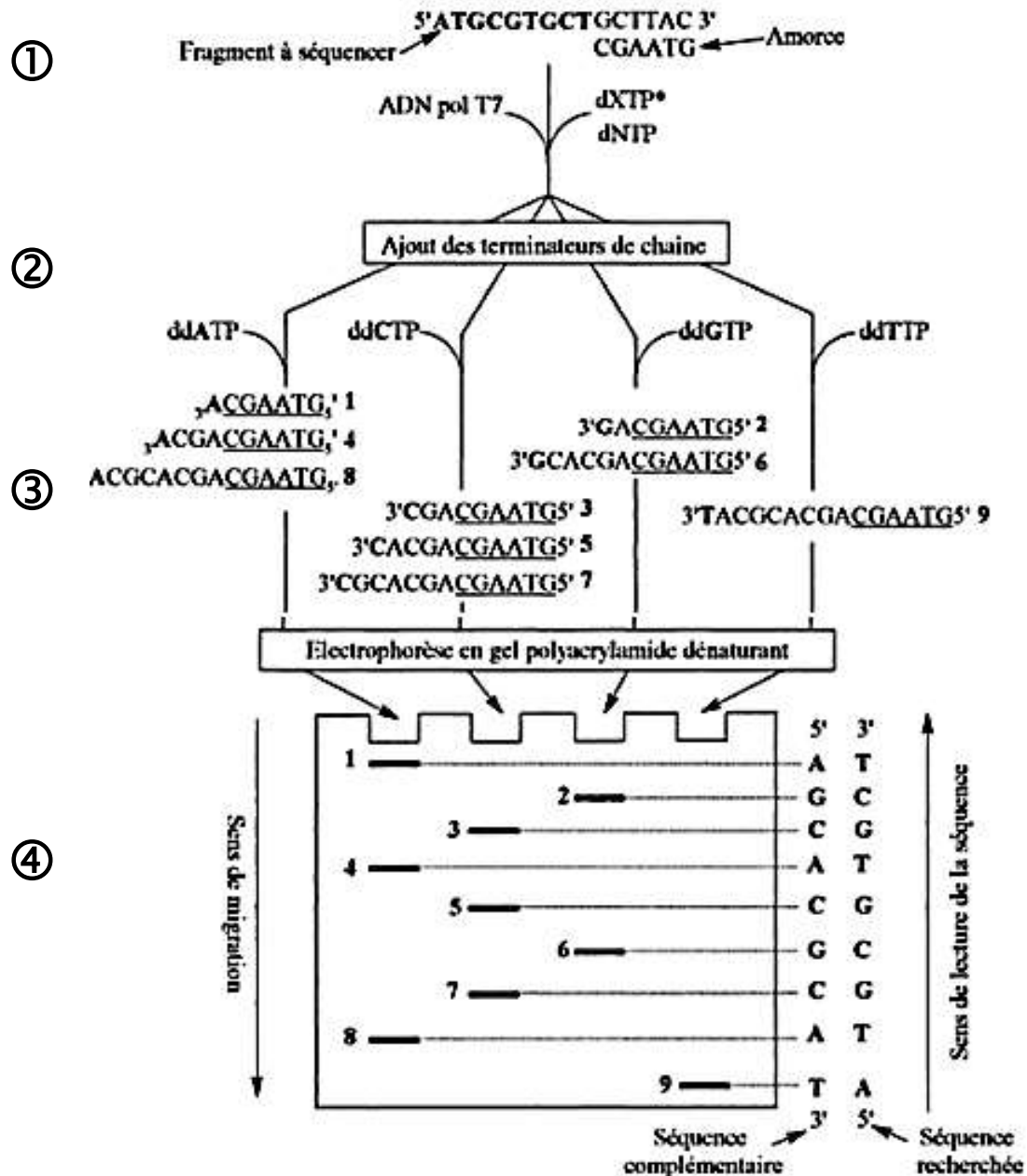


Figure 8 : Principe de la méthode de Sanger (7)

- ① Dans quatre tubes à essais différents, le fragment à séquencer est mis en présence de l'amorce, de l'ADN polymérase (ADN pol T7) et des dNTP.
- ② Dans chaque tube, on ajoute l'un des ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP et ddTTP). Lorsqu'un ddNTP est intégré dans la séquence, la synthèse s'interrompt.
- ③ De nombreux brins de longueur variable sont obtenus, tous terminés par un ddNTP fluorescent.
- ④ Les brins sont séparés par électrophorèse couplée à une mesure de la fluorescence (7).

### b. Le pyroséquençage

Dans cette méthode de séquençage, les dNTP sont incorporés un à un dans le milieu réactionnel. Si le nucléotide apporté est complémentaire de celui situé sur le brin matrice, la polymérase l'ajoute au brin en cours d'élongation et libère un pyrophosphate dans le milieu. Celui-ci est pris en charge par une enzyme, l'adénosine triphosphatase sulfurylase, qui le couple à une adénosine monophosphate (AMP) pour former une molécule d'ATP. L'ATP formé sert alors de source d'énergie pour une luciférase qui convertit de la luciférine en oxyluciférine, avec émission d'un signal lumineux (3).

Un capteur spécifique *charge-coupled device* (CCD) lit les signaux lumineux et les traduit sous forme de pics sur un graphique appelé pyrogramme. La hauteur des pics est directement proportionnelle à l'intensité lumineuse captée, elle-même dépendante du nombre de dNTP incorporés lors d'une même étape. La séquence est alors déduite des différents pics obtenus. Une autre enzyme, l'apyrase, dégrade les dNTP et l'ATP non utilisés (**Figure 9**) (3).

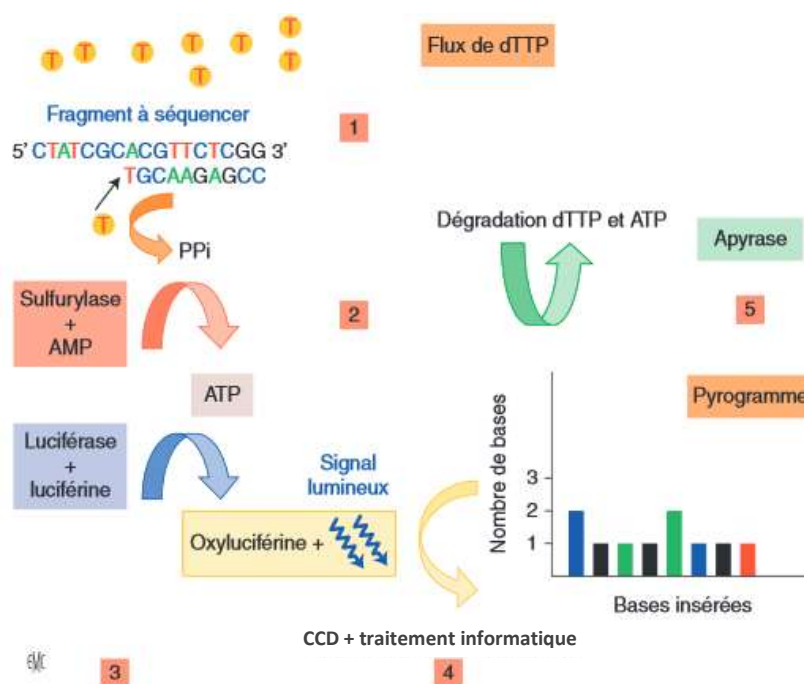


Figure 9 : Principe de la méthode de pyroséquençage, exemple du dTTP (6)

- ① La dTTP apportée est complémentaire du brin matrice : la polymérase l'intègre dans la séquence en cours de synthèse et libère un pyrophosphate (PPi).
- ② La sulfurylase couple le PPi à l'AMP pour former de l'ATP.
- ③ L'ATP permet à la luciférase de convertir la luciférine en oxyluciférine, qui émet un signal lumineux.
- ④ Le capteur *charge-coupled device* (CCD) lit les signaux qui sont traduits par un pyrogramme.
- ⑤ L'apyrase dégrade les dTTP et l'ATP (6).

### *c. Les banques de données nucléotidiques*

Grâce à des logiciels de bioinformatique tels que BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), il est possible de comparer la séquence obtenue à celles consignées dans les banques de données nucléotidiques internationales, comme GenBank pour le continent américain ou encore EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) pour l'Europe. Les différentes bases de données échangent les informations dont elles disposent pour une harmonisation mondiale.

De janvier 2008 à juin 2012, le programme de recherche européen MetaHIT (*Metagenomics of the Human Intestinal Tract*) a séquencé le génome intestinal humain, mettant ainsi à jour plus de 3,3 millions de gènes bactériens (8). Une large part de ces gènes est aujourd'hui étudiée de manière approfondie, dans le but de démontrer leur implication dans différentes pathologies aiguës ou chroniques de l'Homme. En conséquence, de belles perspectives de prévention et traitement de maladies s'ouvrent. De nouvelles lettres de noblesse sont ainsi apportées au côlon et à son microbiote, qui ont longtemps été laissés pour compte par la communauté scientifique et les professionnels de la santé.

## II. LE MICROBIOTE INTESTINAL DE LA NAISSANCE À L'ÂGE ADULTE : MISE EN PLACE ET ÉVOLUTION

### A. La naissance

Avant la naissance et dans le cas d'une grossesse normale, l'utérus maternel protège le fœtus des micro-organismes environnementaux. Son intestin, au même titre que ses surfaces cutané-muqueuses et les cavités de son organisme, est encore stérile. C'est la rupture des membranes fœtales, lors de l'accouchement, qui signe le début de la colonisation du nourrisson par tout un ensemble de bactéries. Nous nous intéresserons ici uniquement à la colonisation intestinale.

La mise en place du microbiote intestinal est progressive et variable d'un individu à l'autre. Le déroulement de la grossesse, le mode d'accouchement, le terme de naissance, ainsi que les conditions d'hygiène entourant le nourrisson et sa mère lors de l'accouchement sont autant de paramètres influençant la colonisation du tube digestif du nouveau-né.

#### 1. Influence de l'exposition bactérienne *in utero*

Dans certains cas, le liquide amniotique peut être colonisé par des bactéries, pathogènes ou non. Les espèces *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum* peuvent être retrouvées au niveau vaginal et utérin et provoquer une inflammation intra-amniotique potentiellement dangereuse pour la mère et l'enfant. Elles sont à l'origine d'accouchements prématurés et exposent l'enfant à une importante immaturité digestive, avec retard de colonisation bactérienne et risque d'entérocolite ulcéro-nécrosante (ECUN) (9). Cette maladie inflammatoire touche l'intestin des nouveau-nés, principalement prématurés. Nous reviendrons ultérieurement sur les détails de cette pathologie néonatale. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), un enfant est prématuré lorsqu'il naît vivant avant 37 semaines révolues de gestation, sachant qu'une grossesse dure théoriquement 40 semaines. Elle distingue trois sous-catégories de prématurité :

- À moins de 28 semaines de grossesse, on parle de prématurité extrême ;
- Entre 28 et 32 semaines, il s'agit de grande prématurité ;
- Entre 32 et 37 semaines, on parle de prématurité moyenne ou tardive (10).

Certaines études ont montré qu'il existerait une flore bactérienne propre au placenta et au liquide amniotique, qui commenceraient à coloniser le tube digestif du fœtus avant l'accouchement (9) (11). Sa provenance et sa composition restent cependant peu étudiées et incertaines.

### 2. Influence du mode d'accouchement

Lors d'un accouchement par voie basse, les populations microbiennes maternelles vaginales, fécales et cutanées sont les premières rencontrées par le nouveau-né. Une partie en est ingérée et les bactéries aptes à coloniser le tube digestif commencent à s'implanter. On retrouve alors une population aéro-anaérobie facultative composée essentiellement de staphylocoques, d'entérocoques et d'entérobactéries fécaux de la mère. Les lactobacilles vaginaux étant moins adaptés aux conditions du tube digestif, ils ne survivent que marginalement à l'ingestion. De complexité réduite dans les premières heures de vie, cette population évolue ensuite rapidement en termes de quantité et diversité (12).

Lorsque le nouveau-né est extrait par césarienne, il n'entre pas directement en contact avec les populations microbiennes vaginales et fécales maternelles, d'où une acquisition retardée des groupes bactériens précédemment cités. L'enfant rencontre tout d'abord les bactéries de l'environnement tels que les micro-organismes aéro- et manuportés par le personnel soignant et l'entourage : *Staphylococcus* à coagulase négative (*Staphylococcus epidermidis*, *haemolyticus*, ou *hominis*), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*. La colonisation par *Clostridium difficile* est également amplifiée (12).

La différence de composition du microbiote observée à la naissance persiste durant plusieurs mois. Une équipe de chercheurs a étudié la colonisation intestinale durant les deux premières années de vie dans deux groupes d'enfants, nés soit par voie vaginale, soit par césarienne. Pour les nourrissons nés par césarienne, il a été montré que les espèces présentes étaient moins variées que dans l'intestin des nourrissons nés par voie basse. Le phylum *Bacteroidetes* était aussi moins représenté (13).

### 3. Influence du terme de naissance

Chez l'enfant né prématurément, on observe un retard de la colonisation intestinale et un nombre d'espèces réduit. Ce retard est d'autant plus important que l'âge gestationnel est faible. Dans de nombreux cas, le prématuré est extrait par césarienne, puis séparé de sa mère pour être placé en environnement hospitalier aseptisé, en unité de néonatalogie. Le contact avec les



différentes flores maternelles et environnementales est de fait retardé. De plus, des traitements antibiotiques à large spectre lui sont fréquemment administrés et limitent le développement de la flore digestive (12).

Si les facteurs « césarienne » et « antibiothérapie » sont écartés, les micro-organismes qui colonisent le côlon du nouveau-né prématuré diffèrent tout de même de ceux retrouvés chez le nouveau-né à terme. En effet, chez le prématuré les bifidobactéries sont moins nombreuses et les entérobactéries sont plus largement représentées que chez le nouveau-né à terme (14).

#### 4. Influence des conditions d'hygiène

Dans les pays industrialisés, la plupart des naissances ont lieu en milieu hospitalier. Les conditions d'hygiène y sont bien définies, dans le but de limiter les infections maternelles ou néonatales. En contrepartie, la colonisation intestinale par des bactéries telles que *Escherichia coli* ou les entérocoques est plus tardive, supplantée par une colonisation transitoire de micro-organismes cutanés de type *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Corynebacterium*. Des conditions d'hygiène pauvres sont au contraire associées à une primo-colonisation plus intense par les micro-organismes fécaux, dont les entérobactéries et les entérocoques (12).

### B. Le nourrisson

La flore aérobie et aéro-anaérobie facultative primo-installée consomme l'oxygène présent au niveau digestif. Le potentiel redox du milieu diminue progressivement et des espèces anaérobies strictes prennent alors place. Dans la première semaine de vie, il y a colonisation de l'intestin par des souches de *Bifidobacterium*, *Bacteroides* ou encore *Clostridium*, aux dépens de la flore aérobie initialement présente. Ces espèces sont issues des différents microbiotes maternels (buccal, intestinal, cutané ...) et environnementaux.

Ici encore la colonisation intestinale varie entre les individus par l'intervention de différents facteurs. L'alimentation du nourrisson, le lieu et le mode de vie de la famille, les éventuels traitements antibiotiques administrés à l'enfant ainsi que certains facteurs génétiques semblent orienter la mise en place du microbiote intestinal.

### 1. Influence du mode d'allaitement

L'allaitement joue un rôle prépondérant dans l'établissement et la diversification du microbiote intestinal au cours des premiers mois de vie. En cas d'allaitement au sein exclusif, on observe une prédominance des espèces de *Bifidobacterium* avec une implantation retardée et moins importante des espèces de *Clostridium* et *Bacteroides* (12).

Lors de la mise au sein, la flore cutanée maternelle est inévitablement mise au contact des muqueuses digestives du nourrisson. Le lait maternel renferme également une flore bactérienne qui lui est propre. Elle compte près de sept cent espèces différentes, dont de nombreux staphylocoques, que l'on retrouve parmi les premières espèces qui colonisent l'intestin. De récentes études ont mis en exergue un lien entre la flore digestive maternelle et la flore digestive du nourrisson : il semblerait qu'un transfert bactérien s'opère de l'intestin de la mère vers les glandes mammaires puis le lait, qui est ensuite ingéré par l'enfant allaité. Il existerait donc un transfert vertical mère-enfant de la flore bactérienne intestinale (15).

Les oligosaccharides du lait maternel sont un autre élément important dans le développement d'un microbiote adapté. En effet, ces glucides non digestibles rejoignent le côlon sous une forme inchangée où ils sont métabolisés par des bactéries qui les utilisent pour leur croissance. Les oligosaccharides sont présents à une concentration proche de 1 g pour 100 mL dans le lait maternel et promeuvent massivement le développement des bifidobactéries dans la lumière colique (16).

Lors d'un allaitement artificiel, faisant appel aux formules destinées à l'alimentation des nourrissons, le microbiote est d'emblée plus diversifié, avec une prédominance de *Lactobacillus*. Les différences tendent cependant à s'estomper, car les formules infantiles sont actuellement enrichies en oligosaccharides bifidogènes de type fructo-oligosaccharides (FOS) et galacto-oligosaccharides (GOS) (16).

### 2. Influence de la diversification alimentaire

Après l'âge de six mois, l'OMS recommande que l'allaitement maternel soit complété par une alimentation adaptée à l'âge du nourrisson, semi-solide puis solide, dans le but de couvrir l'ensemble de ses besoins nutritionnels. Pour les enfants de six à huit mois, les besoins énergétiques sont de 615 kcal/jour, puis évoluent jusqu'à atteindre 900 kcal/jour pour les enfants de vingt-quatre mois (**Tableau I**). Dans les pays en voie de développement et dans les pays industrialisés, les apports moyens du lait maternel varient et il faudra donc introduire des aliments complémentaires en quantités plus ou moins importantes (17).

**Tableau I : Besoins énergétiques moyens des nourrissons de 1 à 23 mois (17)**

<b>Âge du nourrisson (mois)</b>	<b>Besoins énergétiques moyens (kcal/j)</b>
6-8	615
9-11	686
12-23	894

Les microorganismes du tube digestif disposent d'un équipement enzymatique distinct de celui des cellules humaines. Ils sont donc capables de dégrader certains substrats que l'organisme ne peut prendre en charge. Les molécules alimentaires qui arrivent progressivement dans le côlon induisent des changements dans les populations bactériennes initialement installées. En effet, une sélection s'opère en faveur des souches capables de les métaboliser. C'est ainsi que les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* diminuent tout au long du sevrage, au même titre que les diverses entérobactéries, laissant une place plus importante aux espèces de *Bacteroides* et à certains représentants des genres *Clostridium* et *Ruminococcus* (9).

### **3. Influence du lieu géographique et du mode de vie**

L'alimentation et le mode de vie sont étroitement liés à l'emplacement géographique. Les régimes alimentaires adoptés par les familles diffèrent d'un pays à l'autre, en fonction notamment des coutumes, des croyances et de la disponibilité des ressources. Les habitudes d'hygiène varient également entre les différents groupes de population. Comme nous l'avons vu, une différence de colonisation s'opère entre pays en développement et pays industrialisés.

Des variations sont également observables sur un même continent. C'est ainsi que Fallani et ses collaborateurs ont montré qu'il existait un gradient Nord-Sud dans la composition du microbiote intestinal de nourrissons d'Europe occidentale âgés de six semaines. D'après l'étude, les bifidobactéries sont largement représentées dans la population pédiatrique d'Europe du Nord, tandis qu'au Sud, le microbiote est plus précocement diversifié, avec une abondance particulière de *Bacteroides* (18).

### 4. Influence de l'antibiothérapie

Les antibiotiques sont largement employés chez les nourrissons et les jeunes enfants des pays industrialisés. Ils ont pour objectif de prévenir et/ou traiter nombre de maladies infectieuses. Le premier pendant négatif de cette pratique reste l'émergence de résistances bactériennes chez les enfants en bas âge. On observe également une altération de la mise en place des populations microbiennes, avec une diversité d'espèces réduite et une quantité de microorganismes moindre.

Plus l'exposition aux antibiotiques est précoce et longue, plus le microbiote sera altéré et le système digestif fragilisé. En effet, les niches écologiques initialement occupées par les microorganismes commensaux se vident et la fonction barrière qu'ils assuraient n'est plus optimale. Des bactéries pathogènes telles que *Clostridium difficile* peuvent alors s'installer (9).

### 5. Influence génétique

D'après l'étude de Stewart, les jumeaux monozygotes en bas âge possèdent des microbiotes intestinaux de composition plus proche que des jumeaux dizygotes du même âge, ou que d'autres frères et sœurs non jumeaux (19).

Lorsque les jumeaux grandissent, cette différence observée entre monozygotes et dizygotes tend à s'estomper. Il reste cependant vrai que les individus de la même famille présentent des microbiotes intestinaux plus proches que des individus non parents (20).

Le rôle exact de la génétique est encore mal connu et discuté. Pour les membres d'une même famille, les habitudes alimentaires et le cadre de vie sont souvent identiques. De ce fait, les microorganismes rencontrés lors de la mise en place du microbiote intestinal sont sensiblement les mêmes. Il est donc difficile de savoir si la composition du microbiote a été génétiquement orientée, ou si seuls les facteurs environnementaux ont joué un rôle.

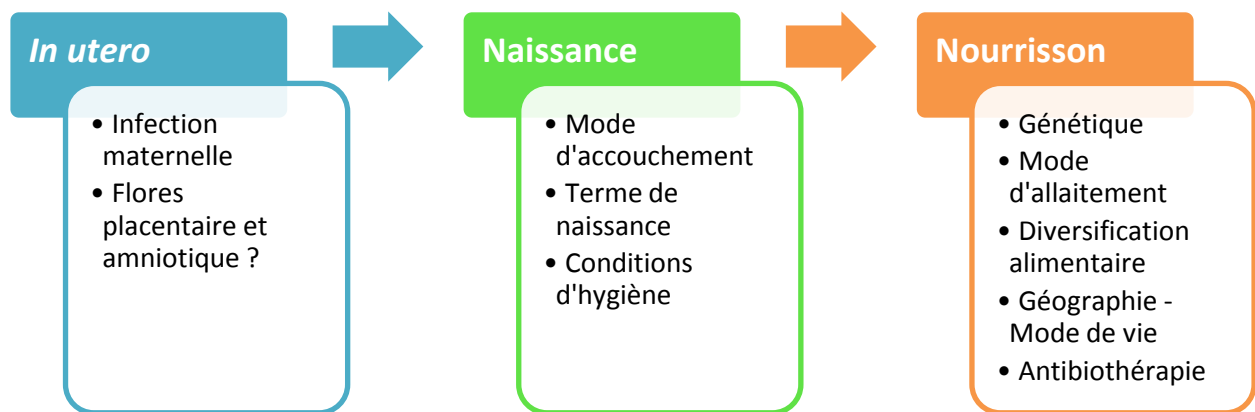


Figure 10 : Bilan des facteurs influençant le développement du microbiote intestinal du fœtus au nourrisson (14)

Les deux premières années de vie représentent donc une période critique dans le développement du microbiote intestinal (*Figure 10*). Toute intervention extérieure, par modification de l'environnement, du régime alimentaire ou adjonction de traitements antibiotiques, peuvent amener des modifications importantes dans la dynamique de colonisation par les micro-organismes et la structuration du microbiote.

## C. L'adulte

À mesure que de nouveaux aliments sont introduits dans le régime du jeune enfant et qu'il rencontre les microorganismes de son environnement, la flore intestinale évolue pour se rapprocher quantitativement et qualitativement de celle de l'Homme adulte. À l'âge de deux ans, le microbiote intestinal atteint une composition relativement stable pour un individu donné. Bien qu'il existe des éléments constants dans la composition du microbiote, on retrouve de nombreuses variations entre les personnes au sein de la population adulte.

### 1. Variations interindividuelles et éléments constants

La diversité des espèces bactériennes coliques et fécales est immense. La littérature met en évidence une différence de composition notable dans la flore dominante de l'Homme, avec près de 80 % d'espèces spécifiques à chacun (21). Une « empreinte fécale » pourrait ainsi être dressée pour chaque individu et permettrait de l'identifier, au même titre que son empreinte digitale.

De manière générale, les micro-organismes intestinaux dominants appartiennent à trois phyla distincts. Les Firmicutes et les Bacteroidetes sont les deux phyla les plus représentés. Les Actinobacteria sont les moins représentés (21). Le tableau ci-dessous récapitule la composition en genres de chaque phylum (*Tableau II*).

Tableau II : Composition globale et non exhaustive des trois phyla majeurs de la flore intestinale dominante de l'Homme adulte (21)

Phylum	Firmicutes	Bacteroidetes	Actinobacteria
Genres	<i>Eubacterium</i> <i>Clostridium</i> <i>Ruminococcus</i> <i>Butyribibrio</i> <i>Fæcalibacterium</i>	<i>Bacteroides</i> <i>Prevotella</i> <i>Porphyromonas</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>Collinsella</i> <i>Atopobium</i>

## 2. Les différents entérotypes

En sus du séquençage complet du génome du microbiote intestinal, le consortium européen MetaHIT a mis en évidence l'existence d'entérotypes chez l'Homme adulte. Un entérotype correspond à une composition microbienne intestinale particulière dominée par un groupe bactérien donné. Trois entérotypes distincts ont été déterminés (8) :

- L'entérotype a est caractérisé par une prédominance du genre *Bacteroides* ;
- L'entérotype b est dominé par le genre *Prevotella* ;
- L'entérotype c est marqué par une prédominance du genre *Ruminococcus*.

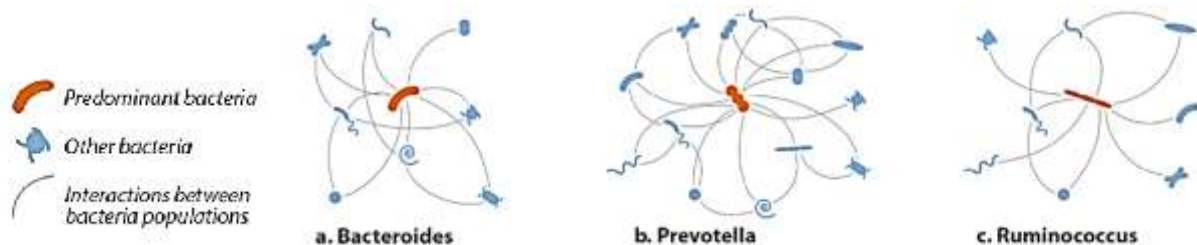


Figure 11 : Les trois différents entérotypes de l'Homme adulte (8)

### 3. Composition et topographie du microbiote intestinal de l'adulte sain

Tout au long du tractus intestinal, le microbiote évolue en termes de quantité et de qualité. Le nombre de bactéries augmente ainsi selon un gradient croissant de sens oral-aboral. On compte  $10^4$ - $10^6$  UFC (Unités Formant des Colonies) par gramme de contenu intraluminal au niveau du duodénum et  $10^9$ - $10^{11}$  UFC par gramme de contenu intraluminal dans le côlon. Les facteurs responsables de cette augmentation sont notamment la motricité digestive, qui diminue de l'intestin grêle au côlon, et le pH, qui est progressivement neutralisé à la sortie de l'estomac (12).

#### a. L'intestin grêle

Dans le duodénum et le jéjunum, la flore aéro-anaérobie facultative qui a survécu au passage gastrique va croître et constituer une flore dite de passage, non implantée. Les micro-organismes sont peu nombreux et appartiennent aux genres *Streptococcus*, *Lactobacillus*, ainsi qu'à la famille des *Enterobacteriaceae*. Dans l'iléon, l'oxygène se raréfie et la flore retrouvée est plutôt de type anaérobie facultative ou anaérobie stricte, avec une prédominance des espèces appartenant au genre *Bacteroides* (12).

#### b. Le côlon

Au niveau colique, la stase des matières organiques et le manque d'oxygène engendrent une croissance importante des bactéries anaérobies. On a ici une flore résidente, *id est* présente en permanence dans l'écosystème, que l'on peut classer en deux catégories (12) :

- La flore dominante : sa quantité est impérativement supérieure à  $10^9$  UFC par gramme de contenu. Elle est exclusivement anaérobie et rassemble des bacilles à Gram négatif tels que *Bacteroides*, des bacilles à Gram positif tels que *Eubacterium*, *Bifidobacterium* ou *Clostridium*, et des coques à Gram positif comme *Peptostreptococcus* ou *Ruminococcus* (12);
- La flore sous-dominante : ses proportions vont de  $10^6$  à  $10^8$  UFC par gramme de contenu. Elle est constituée de germes aéro-anaérobies facultatifs appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, dont *Escherichia coli*, et aux genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Desulfovibrio*, ou *Methanobrevibacter*. Lorsque ces populations sous-dominantes se développent de manière excessive, des pathologies digestives peuvent apparaître (12).

Une flore de passage est également observée dans le côlon. Polymorphe, elle ne dépasse pas  $10^6$  UFC par gramme de contenu. Elle est constituée d'un ensemble d'entérobactéries, de représentants des genres *Pseudomonas* et *Staphylococcus*, ainsi que de levures du genre *Candida*. Ces bactéries ne s'implantent pas dans l'intestin car elles sont réprimées par la flore résidente. Par ailleurs, leur surdéveloppement engendre un état pathologique (12).

### c. Les fèces

Les micro-organismes représentent environ 40 % du poids des fèces. Il existe donc une flore fécale, facilement accessible et analysable. Elle compte un ensemble hétérogène de bactéries et levures mortes ou vivantes, issues des flores résidente et de passage (**Figure 12**). Elle est souvent considérée comme reflet approximatif du microbiote intestinal. L'analyse de la flore fécale permet en outre de déceler la présence de pathogènes ou un déséquilibre des populations coliques à l'origine de troubles digestifs (12).

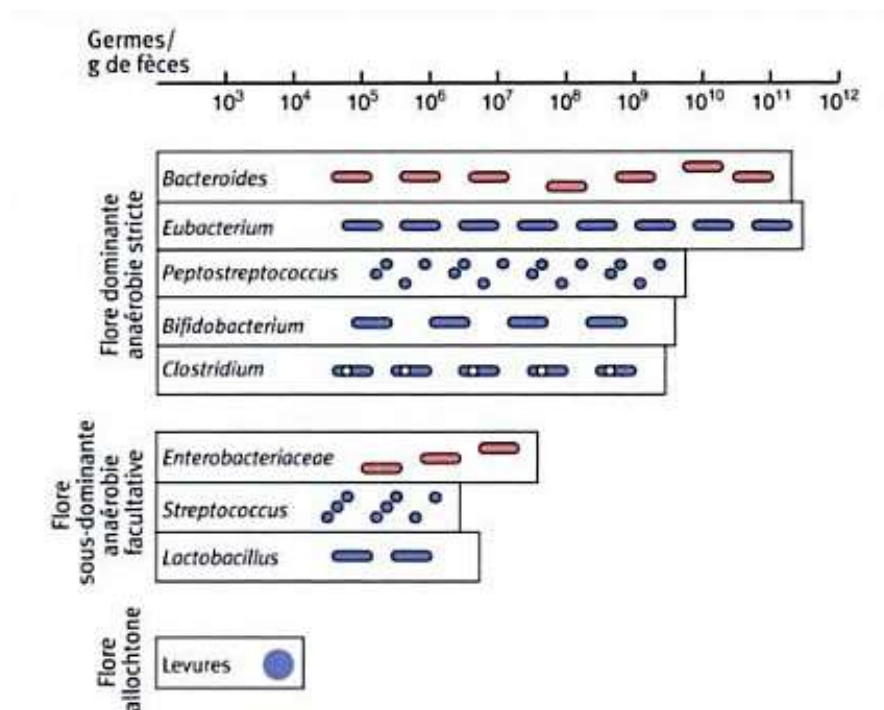


Figure 12 : Représentation schématique de la flore fécale cultivable (12)



### III. LES FONCTIONS DU MICROBIOTE INTESTINAL

#### A. Des fonctions métaboliques indispensables

##### 1. Métabolisme des polysaccharides

Dix à quarante grammes de polysaccharides parviennent chaque jour dans le côlon humain. Ces glucides non digérés dans la partie initiale du tube digestif sont pris en charge au niveau intestinal par un ensemble synergique de microorganismes. Les groupes bactériens dégradent les molécules pour former des acides gras à courte chaîne carbonée (AGCC) et un ensemble de gaz (21).

Les bactéries hydrolytiques fragmentent les polysaccharides grâce au matériel enzymatique spécifique dont elles disposent. Le tableau ci-après (*Tableau III*) fait le bilan des divers substrats pris en charge par le matériel enzymatique des principaux genres bactériens du microbiote intestinal humain (21).

Tableau III : Hydrolyse des polysaccharides exogènes par les principaux genres bactériens du microbiote intestinal humain (21)

Substrats polysaccharidiques exogènes	Matériel enzymatique	Genres bactériens
<b>Amidon</b>	Amylase, glycosidase	<i>Bacteroides, Bifidobacterium, Eubacterium, Clostridium, Fusobacterium, Roseburia</i>
<b>Arabinogalactane</b>	Arabinogalactanase, arabinofuranosidase, galactosidase	<i>Bacteroides, Bifidobacterium</i>
<b>Cellulose</b>	Cellulase, glycosidase	<i>Bacteroides, Ruminococcus, Clostridium, Enterococcus</i>
<b>Fructo-oligosaccharides</b>	Fructo-oligosaccharidase, $\beta$ -fructosidase	<i>Bifidobacterium, Eubacterium, Clostridium</i>
<b>Galacto-oligosaccharides</b>	$\beta$ -galactosidase	<i>Bifidobacterium, Lactobacillus, Bacteroides</i>
<b>Gomme arabique</b>	Arabinogalactanase, pullulanase, galactosidase, glucuronidase	<i>Bifidobacterium</i>
<b>Gomme guar</b>	Galactomannanase, mannosidase, galactosidase	<i>Bacteroides, Ruminococcus</i>

<b>Laminarane</b>	$\beta$ -fructosidase, $\beta$ -glucosidase	<i>Bacteroides</i> , <i>Peptostreptococcus</i>
<b>Pectine</b>	Pectinase, exopectase lyase, glucuronidase, arabinofuranosidase	<i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Lachnospira</i>
<b>Xylane</b>	Xylanase, araboinofuranosidase, xylosidase	<i>Bacteroides</i> , <i>Roseburia</i> , <i>Bifidobacterium</i>

Les activités hydrolytiques ici exposées sont nécessairement complémentaires et permettent de libérer des hexoses, qui sont pris en charge par la glycolyse, et des pentoses, qui suivent la voie des pentoses phosphates (21).

La glycolyse, ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas, est majoritairement employée par le microbiote et a pour finalité l'obtention de pyruvate. Celui-ci est ensuite réutilisé par diverses voies de fermentation pour former du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), du dihydrogène (H<sub>2</sub>), du lactate, de l'acrylate, du succinate ou de l'éthanol. Ces métabolites intermédiaires ne s'accumulent pas dans le tube digestif de l'individu sain, mais sont à leur tour pris en charge par des groupes bactériens qui les convertissent en métabolites dits « principaux ». Ce sont les produits finaux de fermentation : les AGCC (acétate, propionate et butyrate) (**Tableau IV**) (21).

Les AGCC sont ensuite absorbés par l'épithélium intestinal et conduits vers différents organes où ils sont utilisés comme substrats énergétiques (cerveau, muscles, foie ...). Les gaz sont pour la plus grande part réutilisés par les microorganismes hydrogénotrophes *in situ* et éliminés, notamment sous forme de méthane (CH<sub>4</sub>) ou de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) (21).

Tableau IV : Principaux genres bactériens produisant les acides gras à courte chaîne carbonée (21)

<b>Métabolites finaux</b>	<b>Principaux genres bactériens producteurs</b>
<b>Acétate</b>	<i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Butyrivibrio</i> ...
<b>Propionate</b>	<i>Bacteroides</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Veillonella</i>
<b>Butyrate</b>	<i>Clostridium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Butyrivibrio</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Roseburia</i> , <i>Anaerostipes</i>

## 2. Métabolisme des protéines

Les protéines alimentaires parviennent en faible quantité au niveau colique. Les substrats azotés reçus par les bactéries à ce niveau de l'intestin sont en majorité générés par l'hôte lui-même : sécrétions pancréatiques et biliaires, particules issus de la desquamation de l'épithélium digestif, etc. Ces protéines sont hydrolysées par les protéases de bactéries qui récupèrent l'azote et le carbone pour leur propre croissance. Les acides aminés et peptides non utilisés sont rendus disponibles pour les espèces qui ne peuvent pas dégrader elles-mêmes les protéines (22).

L'activité protéolytique du microbiote croît du côlon proximal vers le côlon distal, notamment à cause de l'évolution du pH intraluminal. En effet, les protéases bactériennes ont une activité optimale pour un pH proche de la neutralité, atteint dans le côlon distal. D'autres facteurs participent également à la régulation de la protéolyse, mais leurs mécanismes d'action ne sont à ce jour pas clairement élucidés (22).

Certaines espèces de *Veillonella*, *Eubacterium* ou *Clostridium* utilisent les acides aminés comme principale source d'énergie car leur phénotype enzymatique ne leur permet pas de dégrader les glucides. La fermentation des acides aminés implique tout un panel de réactions. Lors de leur désamination, ils forment des composés utiles à l'hôte tels que l'acétate, le propionate et le butyrate. Ils donnent également des acides gras ramifiés et des composés potentiellement toxiques comme les phénols, les indoles ou l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) (**Figure 13**) (22).

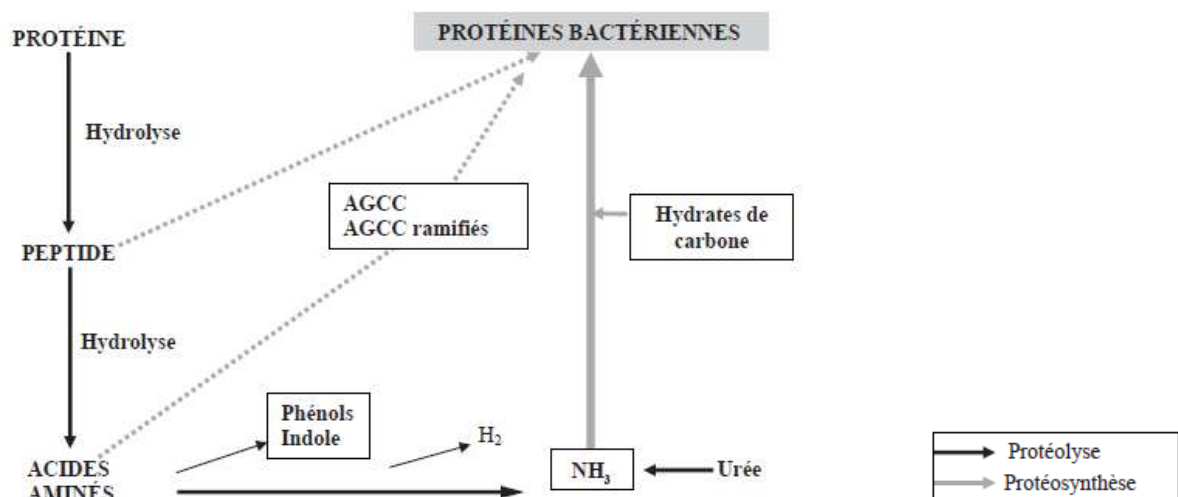


Figure 13 : Métabolisme protéique du microbiote intestinal chez l'Homme (22)

AGCC : acides gras à chaîne courte

Les substances toxiques sont soit absorbées et transportées vers le foie où elles sont détoxifiées, soit réutilisées par certaines populations bactériennes pour la néosynthèse protéique. L'ammoniac constitue ainsi la principale source d'azote pour une large variété de bactéries. Des aminotransférases leur permettent de synthétiser de nouveaux acides aminés en transférant ce groupement sur des structures carbonées telles que celles des glucides (**Figure 13**). Les métabolismes protéique et glucidique sont par conséquent très étroitement liés, puisque le catabolisme des hydrates de carbone stimule l'anabolisme protéique des bactéries coliques. Une autre partie de l'ammoniac est convertie par le foie en urée qui est éliminée *via* les urines (22).

### 3. Métabolisme des lipides

Chez l'Homme, en l'absence de pathologie, il est admis qu'une quantité de cinq à huit grammes de lipides totaux parvient au côlon en l'espace d'une journée. Le matériel enzymatique des bactéries intestinales participe à leur dégradation et à leur transformation. Des lipases permettent le découpage de triglycérides à longues chaînes carbonées. Des réductases et hydroxylases apportent des modifications sur des acides gras. Les constituants lipidiques cellulaires comme les phospholipides ou les sphingomyélines sont remaniés et donnent un ensemble de messagers intracellulaires intervenant dans diverses voies de signalisation de l'organisme (diglycérides, inositol triphosphate ...) (23).

Les phospholipides issus des œufs, du lait et de la viande ingérés par l'hôte sont une source de choline dans l'intestin. Ce nutriment est en partie absorbé puis utilisé comme précurseur de l'acétylcholine et de certains lipides membranaires. Au niveau colique, la choline est convertie en triméthylamine (TMA) qui est absorbée par la muqueuse puis transportée vers le foie où elle est oxydée en triméthylamine oxyde (TMAO). Il semblerait que ce composé participe à l'augmentation le risque cardiovasculaire chez les mammifères (23).

Une partie du cholestérol alimentaire parvient également au côlon, où il s'ajoute au cholestérol endogène issu des acides biliaires et des particules desquamant de la muqueuse digestive. Il est dégradé en coprostanone et coprostanol par deux voies distinctes illustrées sur le schéma page suivante (**Figure 14**) (23) :

- La voie directe permet la conversion du cholestérol en coprostanol sans formation de composé intermédiaire ;
- La voie indirecte mène du cholestérol au coprostanol en quatre étapes successives. Il y a d'abord formation de 5-cholestèn-3-one, puis de 4-cholestèn-3-one et enfin obtention de coprostanone. Elle peut être convertie en coprostanol ou éliminée telle quelle (23).

Le coprostanol et la coprostanone formés sont évacués dans les selles (23).

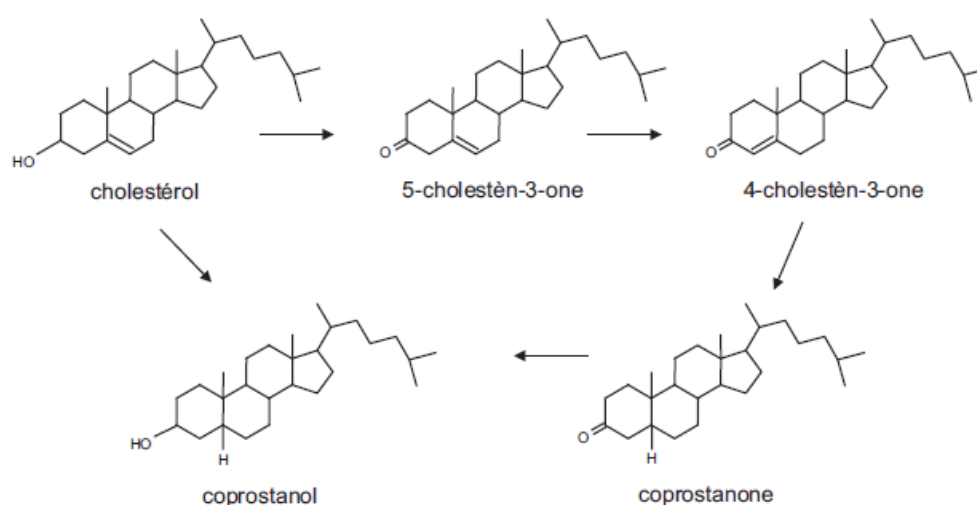


Figure 14 : Voies directe et indirecte de réduction du cholestérol en coprostanol et coprostanone par le microbiote intestinal chez l'Homme (23)

Les bactéries responsables de cette réduction du cholestérol restent mal connues. Il semblerait que des souches des genres *Eubacterium* et *Bacteroides* aient montré une activité non négligeable dans ce cadre (23).

Les acides biliaires primaires, acides cholique et chénodésoxycholique, subissent pour la grande majorité le cycle entérohépatique. Ils sont synthétisés dans le foie, conjugués à la glycine ou à la choline puis excrétés dans la bile au niveau du duodénum. Ils sont ensuite réabsorbés dans l'iléon terminal et à nouveau transportés vers le foie. Ils participent ainsi à l'absorption des lipides alimentaires (23).

Une faible proportion des acides biliaires échappe cependant à ce cycle et aboutit dans la lumière colique où le microbiote les transforme en acides biliaires secondaires. Une large variété de modifications est possible et dépend des bactéries présentes. On pourra observer la déconjugaison, la 7-déshydroxylation ou encore l'oxydation et l'épimérisation de groupements hydroxyles des acides biliaires primaires. La déconjugaison est associée aux genres

*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*. L'activité de 7-déshydroxylation a uniquement été identifiée chez des bactéries du genre *Clostridium*. Elle permet d'obtenir les deux acides biliaires secondaires majoritaires chez l'Homme : l'acide désoxycholique et l'acide lithocholique (23).

### **B. L'immunité digestive**

Le microbiote intestinal fait partie intégrante des facteurs de défense immunitaire non spécifiques et apporte son soutien à l'immunité innée au niveau digestif. Il est également important de souligner que les récentes études ont mis en évidence l'absolue nécessité d'un microbiote sain dans le développement de l'immunité adaptative (24) (25) et de la tolérance orale chez l'enfant (26).

#### **1. Les défenses non spécifiques et l'immunité innée**

Au niveau digestif, on retrouve des moyens de défense non spécifiques, génétiquement programmés. Ensemble, ils constituent la barrière intestinale et protègent le système digestif et l'organisme tout entier des agressions exogènes ou endogènes.

##### ***a. Moyens de défense physiques et chimiques de la muqueuse digestive***

En premier lieu, le péristaltisme intestinal contrôle les populations bactériennes en évitant la stagnation du chyme et la pullulation des différentes espèces. Les jonctions serrées intercellulaires évitent le passage des microorganismes entre les cellules épithéliales qui tapissent le tube digestif. Elles sont constituées à partir de la dixième semaine de gestation chez le fœtus, afin d'être opérationnelles dès les premiers moments de vie (27).

Les sécrétions stomacales empêchent l'implantation de microorganismes dans l'estomac en maintenant un pH acide. Au niveau de l'intestin grêle, les sécrétions pancréatiques et intestinales contiennent des composants anti-infectieux : le lysozyme qui agit sur les peptidoglycanes bactériens et la lactoferrine qui capte le fer nécessaire à la croissance bactérienne. La croissance et le développement bactérien sont ainsi freinés. De plus, les cellules de Paneth, que l'on retrouve dans la partie basale des cryptes intestinales, relarguent des peptides antimicrobiens et pro-inflammatoires. Ce sont principalement les défensines  $\alpha$  et  $\beta$  et les cathélicidines : elles contribuent à réguler les populations microbiennes digestives (**Figure 15**) (27).

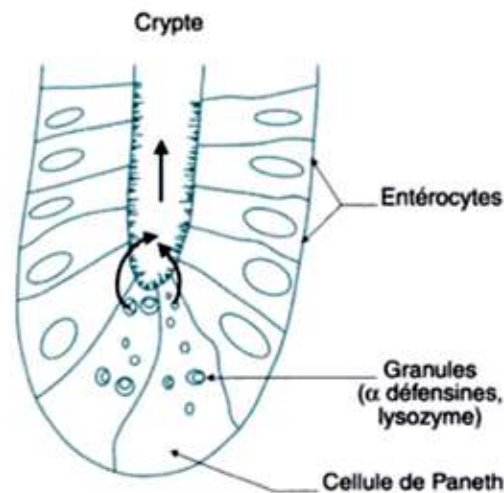


Figure 15 : Sécrétions des cellules de Paneth dans la lumière intestinale (28)

Le mucus sécrété par les cellules caliciformes tout au long du tube digestif constitue également une barrière physique et chimique contre les agressions provenant de la lumière intestinale (**Figure 16**). Il forme un gel hydraté sur la muqueuse, qu'il préserve ainsi de l'érosion mécanique. Il fait également office de « filtre » contre les particules de grande taille, qui pourraient léser les parois. Il évite ainsi que nombre de bactéries potentiellement pathogènes n'atteignent la muqueuse digestive. D'autre part, il retient les molécules anti-infectieuses précédemment citées et des immunoglobulines A (IgA) sécrétatoires (29).



Figure 16 : Coupe histologique de l'épithélium du jéjunum humain montrant deux cellules caliciformes produisant du mucus. Microscope optique, coloration hématoxyline/éosine, x 360 (30)

Le mucus est majoritairement composé de mucines, des glycoprotéines de haut poids moléculaire formées d'une portion protéique, l'apomucine, et de plusieurs chaînes glycaniques. Ces mucines ont une répartition donnée tout au long du tube digestif, qui est codée génétiquement. Leurs chaînes glycaniques disposent d'un pouvoir antioxydant contre les radicaux libres qui circulent dans la lumière intestinale, notamment au niveau du côlon. Elles miment également des récepteurs microbiens qui vont retenir les microorganismes par adhérence, dans le cadre d'interactions normales avec la flore endogène. Aucun tri qualitatif n'est effectué, le mucus se sature simplement en microorganismes commensaux, ne laissant pas de sites de fixation disponibles pour d'éventuelles bactéries ou levures exogènes (29).

En outre, bien que l'intestin soit un organe dédié à l'absorption des nutriments et de l'eau, il est également capable de sécrétion. En effet, lorsqu'une agression est perçue dans la lumière intestinale, les entérocytes sécrètent spécifiquement des ions chlorure ( $\text{Cl}^-$ ) et de l'eau. Ils provoquent ainsi une diarrhée sécrétoire qui vise à éliminer les microorganismes pathogènes et les toxines (27).

Finalement, le microbiote endogène empêche la colonisation du tube digestif par des populations exogènes, par compétition vis-à-vis des substrats nutritifs et des sites d'adhérence. Il produit également des métabolites antibactériens comme les bactériocines, ou des acides organiques toxiques pour certaines souches (31).

### ***b. Facteurs de l'immunité innée***

Parmi les moyens de défense non spécifiques, on retrouve aussi les facteurs de l'immunité innée. Les lymphocytes Natural Killer (NK) sécrètent des effecteurs chimiques provoquant la lyse des cellules exogènes potentiellement pathogènes. Les mastocytes, responsables en grande partie des réactions allergiques lors de leur dégranulation, ont aussi leur rôle à jouer, au même titre que les cellules phagocytaires (31).

La phagocytose des microorganismes pathogènes a lieu suite à la reconnaissance de motifs du non-soi hautement conservés appelés PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Ces PAMPs sont reconnus par les PRR (*Pattern Recognition Receptors*) qui rassemblent notamment les récepteurs *Toll-like* (TLR). Ceux-ci sont portés par les différentes cellules effectrices de l'immunité innée : cellules NK, macrophages, cellules dendritiques, mastocytes, etc. (32).

Les TLR sont de différents types et reconnaissent chacun des motifs donnés. Ainsi, les TLR-1, 2 et 6 reconnaissent le peptidoglycane des bactéries à Gram positif, des glycoprotéines et



certaines lipoprotéines de surface. Le TLR-4 reconnaît spécifiquement le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif et le TLR-5 reconnaît la flagelline, protéine constituant les flagelles bactériens. Les TLR-3, 7, 8 et 9 reconnaissent les acides nucléiques : les ARN doubles brins viraux ou parasitaires (TLR-3), les ARN simples brins viraux (TLR-7 et 8) et les motifs CpG non méthylés des ADN bactériens (TLR-9). Le TLR 10 n'a pas encore de ligand connu (**Figure 17**) (32).

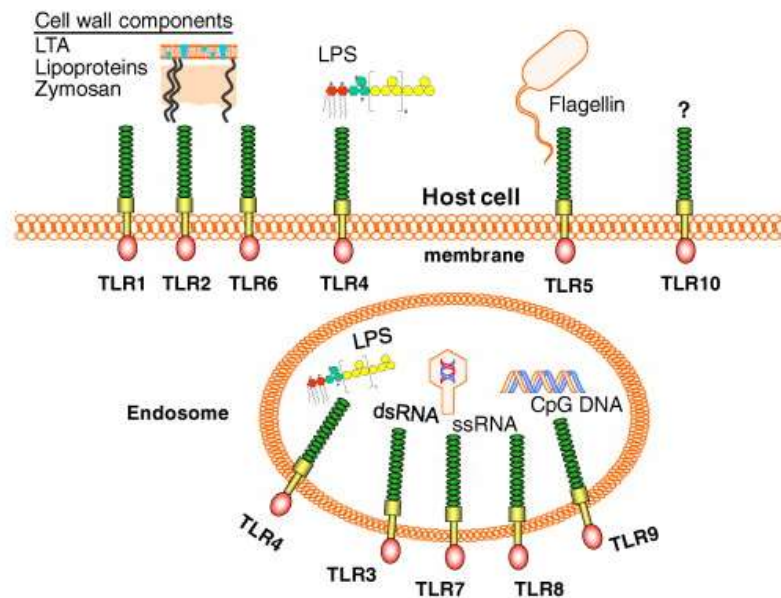


Figure 17 : Les récepteurs *Toll-like* et leurs ligands (33)

TLR : récepteur *Toll-like*.

LTA : acide lipoteichoïque, constituant de la paroi de bactéries à Gram positif.

Zymosan : structure glycoprotéique issue de la membrane cytoplasmique de levures.

LPS : lipopolysaccharide, composant essentiel de la paroi des bactéries à Gram négatif.

Flagellin : protéine constituant les flagelles bactériens.

dsRNA : ARN double brin.

ssRNA : ARN simple brin.

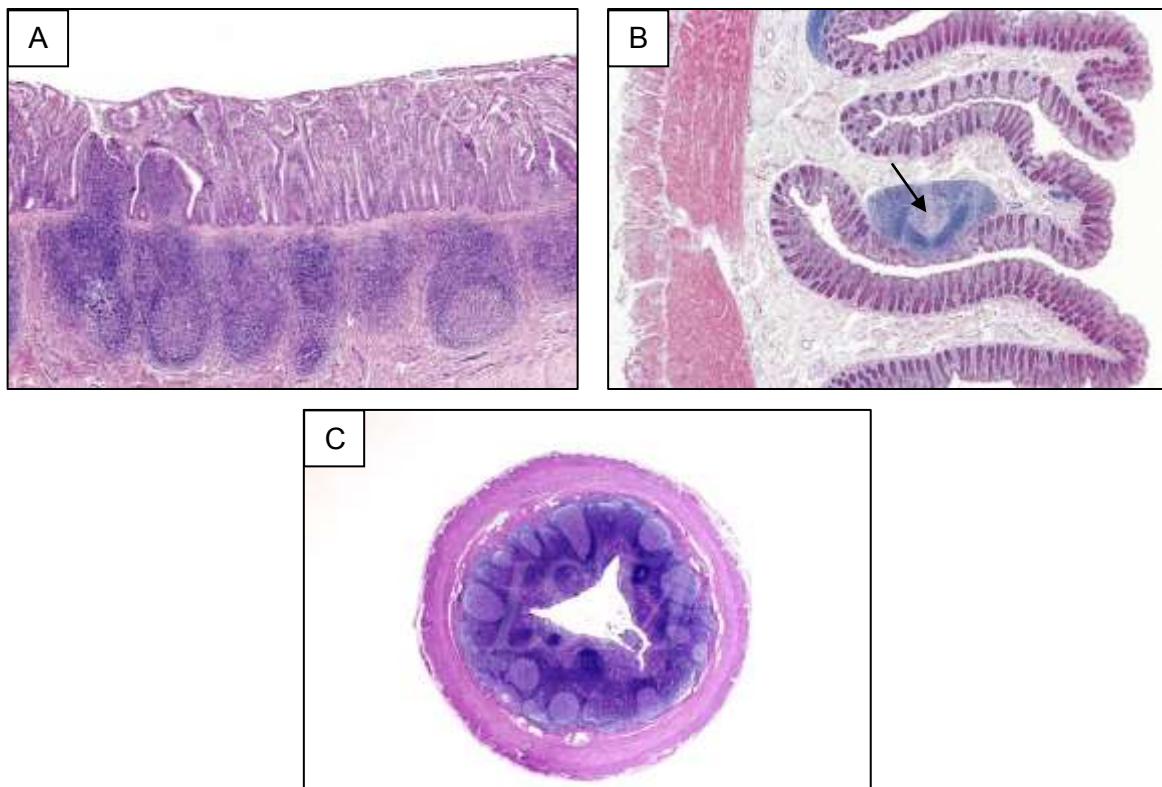
CpG DNA : motif CpG non méthylé de l'ADN bactérien.

En plus de provoquer la phagocytose des antigènes exogènes, l'activation des TLR par les PAMPs engendre la libération de facteurs solubles pro- et anti-inflammatoires. Parmi les médiateurs pro-inflammatoires, nous pouvons citer comme exemple le TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ), les interleukines (IL) 1, 6, 8, 12 et 18 ainsi que des substances vasodilatatrices telles que le monoxyde d'azote (NO). D'un autre côté, les cytokines anti-inflammatoires permettent de réguler et limiter la réponse inflammatoire. Elles rassemblent entre autres le TNF $\beta$ , l'IL-4 et l'IL-10 (32).

## 2. Les défenses spécifiques et l'immunité adaptative

### a. Cas de l'individu sain : rappels

Les moyens de défense spécifiques constituent l'immunité digestive à proprement parler. La réponse immunitaire est induite dans des structures lymphoïdes organisées : les amygdales, les follicules lymphoïdes, les plaques de Peyer dans la partie terminale de l'iléon et l'appendice iléocœcal (**Figure 18**). Des cellules lymphoïdes isolées sont également retrouvées tout au long du tube digestif. L'ensemble de ces structures constitue le tissu lymphoïde associé au tube digestif ou *gut associated lymphoid tissue* (GALT) en anglais. Il appartient au groupe des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (*mucous associated lymphoid tissue*, MALT, en anglais). Il existe donc un tissu immunitaire commun à toutes les muqueuses de l'organisme (31).



**Figure 18 : Coupes histologiques montrant des structures lymphoïdes organisées intestinales.**

A : Coupe histologique de l'iléon montrant des plaques de Peyer. Microscope optique, coloration hématoxyline/éosine, x 10,5. (34)

B : Coupe histologique de côlon montrant un follicule lymphoïde (flèche). Microscope optique, coloration hématoxyline/éosine. (35)

C : Coupe transversale de l'appendice iléocœcal montrant ses structures lymphoïdes organisées. Microscope optique, coloration hématoxyline/éosine, x 3. (36)

Les plaques de Peyer sont constituées d'un ensemble de follicules lymphoïdes séparés de la lumière intestinale par les cellules M (**Figure 19**). Ces dernières captent les antigènes microbiens et les mettent en contact avec des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les cellules dendritiques et les macrophages. L'activation des CPA entraîne une sécrétion accrue de cytokines et chimiokines qui agissent comme messagers intercellulaires et recrutent massivement de nouveaux agents de l'immunité innée. Elles engendrent aussi la réponse immunitaire spécifique qui se divise en réponses cellulaire et humorale (31).

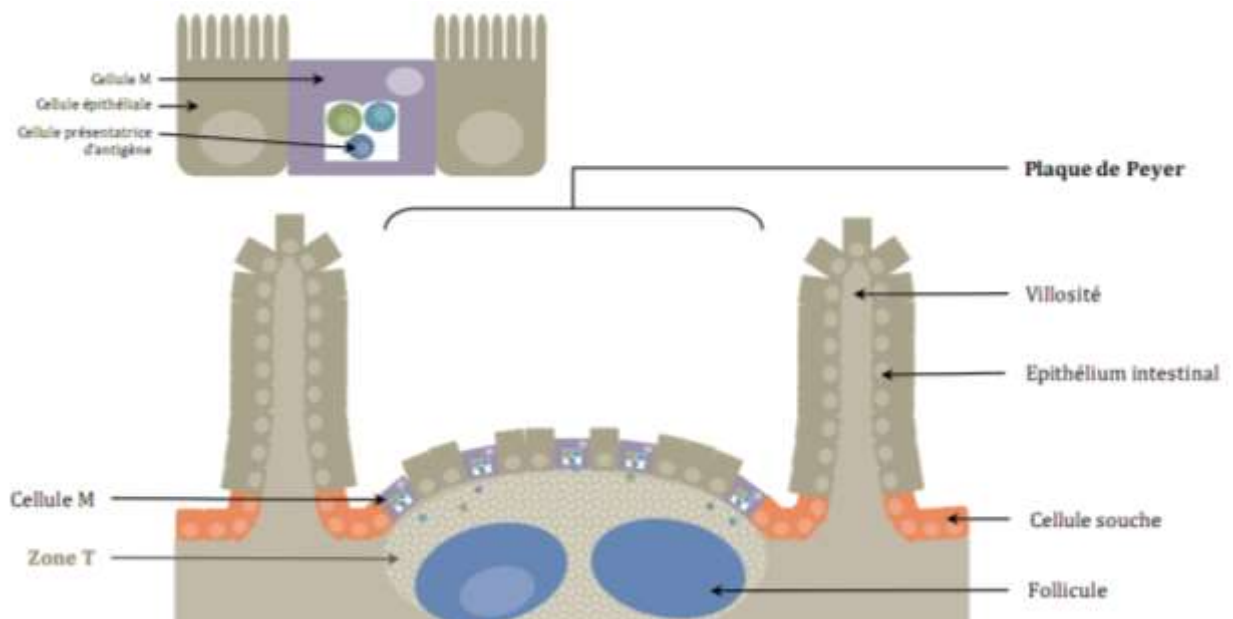


Figure 19 : Représentation schématique d'une plaque de Peyer et des cellules M (37)

Au niveau des plaques de Peyer, l'épithélium intestinal s'aplanit en un dôme, sous lequel se trouvent des follicules lymphoïdes constitués par des lymphocytes B.

Des lymphocytes T se trouvent également de manière diffuse autour des follicules (zone T).

Les cellules M bordent le dôme et permettent le passage des antigènes microbiens vers les cellules du système immunitaire. Elles forment une cavité dans laquelle se logent des cellules présentatrices d'antigènes, des macrophages ou des lymphocytes (37).

### (1) La réponse immunitaire cellulaire

La réponse cellulaire fait appel aux lymphocytes T de l'épithélium digestif et de la *lamina propria* (chorion). Après activation par les CPA, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (LTc) sécrètent des molécules entraînant l'apoptose des pathogènes (38).

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (LT CD4<sup>+</sup>) naïfs prolifèrent et se différencient en différents types de cellules selon la nature du pathogène, le type de CPA et le climat cytokinique au moment de la

présentation antigénique. On obtient les lymphocytes T auxiliaires, aussi nommés lymphocytes T *helper* (LTh) et les lymphocytes T régulateurs (LTreg) (**Figure 20**) (38).

Les LTh comptent trois sous-populations « effectrices » (38) :

- les LTh1 vont majoritairement participer à l'immunité cellulaire en produisant de l'interleukine-2 (IL-2), de l'interféron gamma (IFN  $\gamma$ ) et le *Tumor Necrosis Factor* bêta (TNF  $\beta$ ). Ils activent les LTc, les cellules NK et les macrophages.
- les LTh2 aident à la réponse humorale en stimulant la production d'anticorps par les plasmocytes, en produisant des IL-4, 5, 6, 10 et 13. Ils activent aussi les éosinophiles, qui sont mis en jeu dans les réactions d'hypersensibilité immédiate.
- Les LTh17 sont de découverte plus récente et leurs fonctions n'ont pas encore été clairement déterminées. Ils produisent des IL-17, 21 et 22 pro-inflammatoires, sont impliqués dans les réactions inflammatoires locales et jouent un rôle important lors de maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes (**Figure 20**).

À la naissance, la réponse immunitaire digestive est majoritairement orientée vers la production de LTh2. Les LTh1 sont quant à eux peu exprimés. Au fur et à mesure que l'intestin est colonisé par les microorganismes qui constitueront le microbiote intestinal, la réponse immunitaire Th1 augmente, jusqu'à obtenir un équilibre Th1/Th2, vers l'âge de deux ans (38).

Pour le bon fonctionnement du système immunitaire, il faut que cet équilibre soit maintenu. Toute perturbation de cette balance mène à des états pathologiques. En effet, une dysrégulation des populations en faveur des LTh1 ou LTh17 peut contribuer à l'apparition de maladies auto-immunes spécifiques d'organes ou de maladies inflammatoires chroniques. Une action trop importante des LTh2 oriente vers des pathologies allergiques (32).

En l'absence de stimuli bactérien, viral ou parasitaire, ces LTh2 pourraient rediriger leur action vers des antigènes alimentaires, donnant ainsi lieu à des réactions allergiques telles que l'allergie aux protéines de lait de vache. Toutefois, il est supposé que les LTh1 et LTh2 sont mutuellement suppresseurs (**Figure 20**), ce qui signifie qu'une réponse Th1 correctement menée pourrait protéger contre les maladies allergiques liées à une suractivation des LTh2 et inversement (32).

Les LTreg constituent une sous-population « régulatrice ». Ils ont pour but l'homéostasie des phénomènes immunologiques. Ils maintiennent la tolérance au « soi » et effectuent un rétrocontrôle sur des réactions immunitaires en cours. Ils participent activement à la tolérance orale aux antigènes (39).

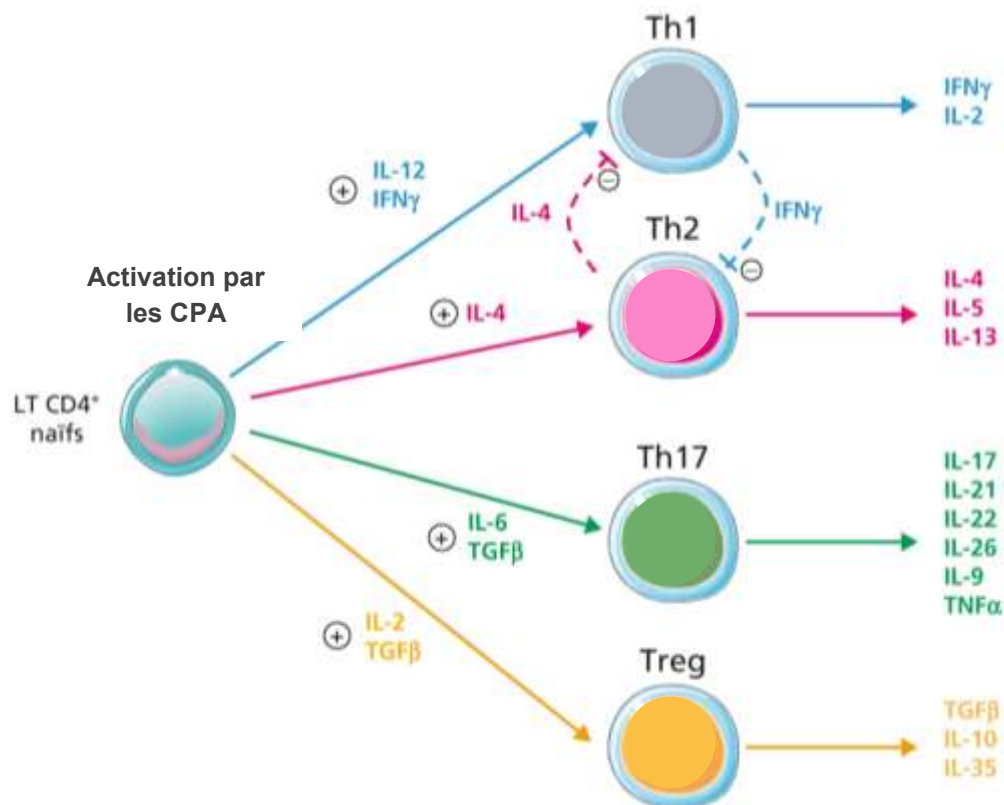


Figure 20 : Activation des LT CD4+ naïfs en LTh1, LTh2, LTh17 et LTreg et profils de sécrétion cytokinique respectifs (40)

Sous l'influence de cytokines produites par les CPA, les LT CD4+ naïfs se différencient en LTh1, LTh2, LTh17 et LTreg.

Chaque sous population de LT produit un ensemble de cytokines participant aux réponses immunitaires et inflammatoires.

Un équilibre s'établit entre les populations Th1 et Th2 qui sont mutuellement inhibitrices. Les LTh1 produisent de l'IFN  $\gamma$  qui réprime l'action des LTh2 et les LTh2 freinent l'action des LTh1 par le biais de l'IL-4 (40).

## (2) La réponse immunitaire humorale

Les lymphocytes B (LB) matures naïfs migrent dans les organes lymphoïdes secondaires, dont le GALT. Les antigènes rencontrés se fixent sur le récepteur BCR (*B-cell receptor*) et les LTh2 ayant rencontré les mêmes antigènes « valident » l'activation des LB. Ceux-ci peuvent alors débuter leur expansion clonale et leur maturation (41).

Les LB évoluent vers le système lymphatique mésentérique puis vers les ganglions. Ils s'y transforment en plasmoblastes à IgA qui gagnent finalement la circulation sanguine. Les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses les recrutent pour constituer une immunité commune à toutes les muqueuses. Les plasmoblastes achèvent alors leur maturation et deviennent des plasmocytes capables de produire des IgA dimériques sécrétées dans la lumière intestinale (41).

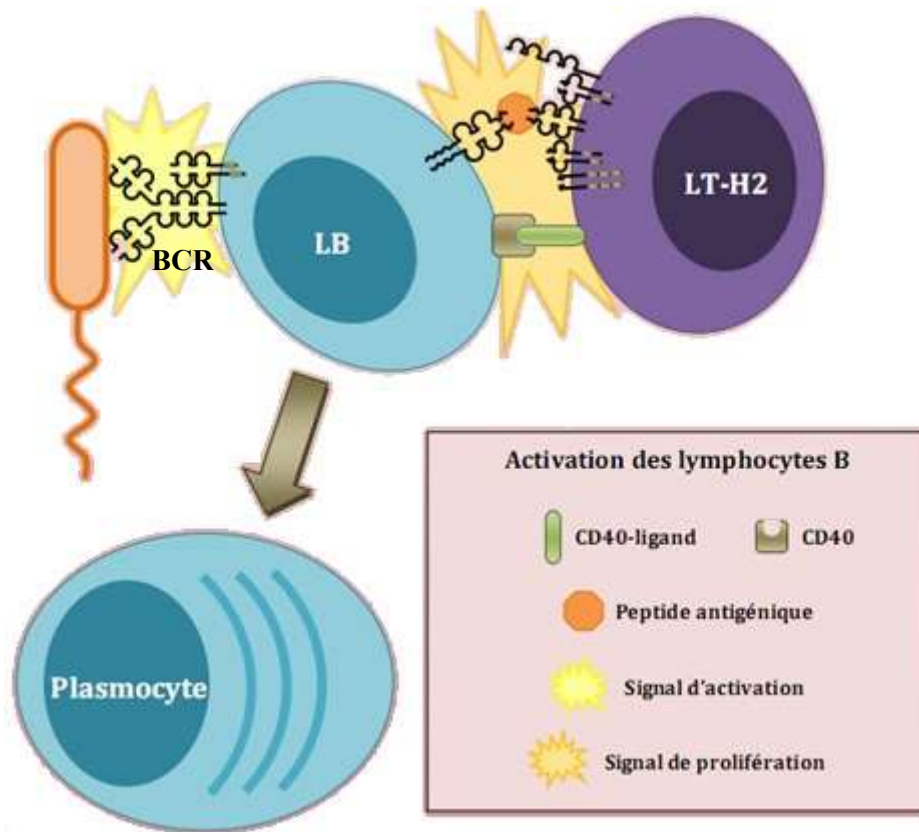


Figure 21 : Activation des lymphocytes B par fixation de l'antigène et le lymphocyte Th2 (42)

Le lymphocyte B (LB) fixe l'antigène sur son récepteur BCR.

Le lymphocyte Th2 (LTh2) valide le signal, notamment grâce à l'interaction entre le ligand du cluster de différenciation CD40 qu'il porte et le CD40 exprimé par le LB.

Le LB prolifère et se différencie en plasmocyte (41).

Le rôle des IgA sécrétoires est de neutraliser des antigènes microbiens et de potentialiser l'action de facteurs antibactériens cités précédemment, comme la lactoferrine ou le lysozyme (31).

### ***b. Rôle du microbiote intestinal dans l'immunité adaptative***

Des souris axéniques ou « *germ-free* », c'est-à-dire nées sans flore intestinale et maintenues en milieu stérile pour éviter toute colonisation du tube digestif, ont été utilisées pour mettre en évidence le rôle des micro-organismes intestinaux dans le développement et le bon fonctionnement du système immunitaire. Les effets ci-après décrits ne constituent pas une liste exhaustive et rendent compte de manière simplifiée des principaux points rencontrés dans la littérature.

### (1) *Impact sur le GALT*

La formation des plaques de Peyer et de l'ensemble des ganglions lymphatiques associés au tube digestif est préparée avant la naissance, sous contrôle d'informations génétiques. Leur développement post-natal est ensuite soumis à l'intervention de micro-organismes colonisant l'intestin (24).

Chez des souris axéniques, les plaques de Peyer sont ainsi plus petites et les cellules lymphoïdes isolées sont moins nombreuses que chez des souris possédant une flore digestive normale. Cependant, les mécanismes qui commandent le développement du GALT ne sont pas encore totalement connus à ce jour (24).

### (2) *Effets sur les lymphocytes T*

Lorsqu'on étudie le tissu lymphoïde de souris « *germ-free* », on remarque que les LT CD4+ et CD8+ sont moins nombreux. Une introduction progressive de micro-organismes au niveau digestif, par transplantation fécale, entraîne une augmentation de ces lymphocytes et active leur différenciation (25).

Les souris axéniques présentent également une balance Th1/Th2 inappropriée, orientée massivement vers une réponse Th2. L'équilibre peut être rétabli grâce à l'implantation digestive d'une bactérie commensale du microbiote intestinal murin : *Bacteroides fragilis*. Les LTh17 et LTreg sont aussi moins nombreux chez les souris axéniques, donnant lieu à des réactions inflammatoires anormales et non contrôlées. Dans ce cas, c'est l'implantation respective de bactéries filamenteuses segmentées et de certaines espèces de *Clostridia* qui permet un retour à la normale de la situation. Le microbiote participe donc activement au développement de la réponse cellulaire liée aux LT (25).

### (3) *Effets sur les lymphocytes B et la production d'IgA sécrétoires*

La quantité de LB au sein des follicules lymphoïdes de souris « *germ-free* » est réduite. Par conséquent, leur conversion en plasmocytes est faible et la production d'IgA sécrétoires est moindre (25).

Chez le nouveau-né, la production d'IgA sécrétoire est également faible. Elle augmente rapidement après le premier mois de vie, du fait de l'exposition croissante à des micro-organismes environnementaux. Il a également été démontré que les nourrissons des pays en développement présentaient une concentration d'IgA circulants plus importante que les



nourrissons des pays industrialisés, en raison de leur exposition massive aux bactéries de l'environnement dès la naissance. En conclusion, le développement du microbiote intestinal est aussi nécessaire à l'instauration de la réponse immunitaire humorale (25).

### 3. La tolérance orale

On entend par « tolérance immunitaire » un état de non réponse du système immunitaire face à l'introduction d'antigènes exogènes dans l'organisme. En ce sens, la tolérance orale correspond à l'absence de réponse immunitaire lorsque les antigènes sont apportés par voie orale, notamment par l'alimentation. Elle fait appel au travail combiné du système immunitaire digestif et du microbiote intestinal.

La muqueuse digestive est en permanence au contact d'un très grand nombre d'antigènes, issus de l'alimentation ou de germes commensaux et exogènes. Le système immunitaire digestif doit assurer sa protection contre les microorganismes potentiellement pathogènes, tout en assurant une tolérance optimale envers le microbiote intestinal et les antigènes alimentaires pour limiter les risques d'allergie.

Bien que les mécanismes exacts de la tolérance orale ne soient pas encore élucidés à ce jour, il est certain que les LTreg y jouent un rôle primordial. Au niveau du GALT, les cellules dendritiques qui présentent les antigènes à « tolérer » aux LT CD4<sup>+</sup> immatures orientent préférentiellement leur différenciation vers la forme Treg. Les LTreg produisent alors du *Tumor Growth Factor* bêta (TGFβ) et d'autres cytokines qui diminuent la production de LTh1, LTh2 et LTh17 et inhibent leur activité (43).

Des études réalisées sur des souris axéniques montrent que la tolérance ne peut s'établir que lorsqu'il y a introduction progressive d'antigènes bactériens dans le tube digestif à partir de la naissance (26).



## **Chapitre II : Les probiotiques**

## I. HISTORIQUE DES PROBIOTIQUES

Durant la seconde moitié du XIX<sup>e</sup> siècle, les travaux de Pasteur permirent de prendre conscience qu'un monde microscopique organisé et vivant était à l'origine non seulement des fermentations alcooliques déjà bien connues, mais également des fermentations lactiques. Il s'opposa ainsi aux diverses considérations de l'époque sur le sujet. En effet, pour ses prédécesseurs et certains de ses contemporains, la fermentation ne relevait que d'un phénomène de contact entre le sucre et les ferments. Pour d'autres, ces ferments étaient considérés comme des composés inertes qui altéreraient la structure moléculaire des produits fermentescibles lors de leur propre dégradation (44) (45).

Ses successeurs identifièrent peu à peu ces microorganismes et leur impact sur la santé humaine.

### A. Les bactéries « bifides » de Tissier

En 1899, Henry Tissier de l'Institut Pasteur mit en évidence la présence de bactéries « bifides », en forme de Y, dans les selles de nourrissons sains nourris exclusivement au lait maternel. Il découvrit ainsi *Bacillus bifidus communis* correspondant à l'actuel genre *Bifidobacterium*. Par ailleurs, ces mêmes bactéries bifides ne furent retrouvées qu'en petite quantité dans les selles d'enfants atteints de diarrhée (46).

Il souleva alors l'idée que ces microorganismes pourraient être administrés à des nourrissons souffrant de pathologies diarrhéiques, afin de remplacer les bactéries protéolytiques responsables des symptômes. Le but était de rétablir un équilibre bactérien favorable au bon fonctionnement du système digestif (46).

### B. Metchnikoff et le yaourt bulgare

Le biologiste russe Eli Metchnikoff fut le premier à travailler sur les effets positifs à long terme de certaines bactéries sur l'organisme humain. En 1907, il écrivit dans son ouvrage *Prolongation of Life*, que les populations consommant régulièrement du lait fermenté auraient une longévité supérieure à d'autres n'en consommant pas. Selon lui, certaines bactéries contenues dans les denrées à base de lait fermenté seraient à l'origine de ce phénomène. En effet, par le biais de l'acide lactique et de différents composés « désinfectants » qu'elles produisent, elles limiteraient la putréfaction et les fermentations délétères dans le côlon humain (47).

Son équipe de recherche à l'Institut Pasteur étudia tout particulièrement le cas des yaourts bulgares. Elle y retrouva une proportion élevée de ferments lactiques, appelés *Bulgarian bacillus*, qui seront renommés plus tard *Lactobacillus bulgaricus*. Il en fut conclu que les microbes intestinaux néfastes pouvaient être artificiellement remplacés par l'apport de microbes bénéfiques *per os*, en adoptant un régime alimentaire spécifique, riche en lait fermenté et/ou additionné de cultures pures de *Bulgarian bacillus* (47).

### C. Les prémices de l'industrie « probiotique » au Japon

En 1921, le japonais Minoru Shirota reprit la théorie de Metchnikoff et chercha à obtenir une bactérie lactique survivant dans le tractus digestif. Il y parvint en 1930 avec *Lactobacillus casei* Shirota. Son but fut ensuite de créer un vecteur simple et accessible à tous, pour administrer ces bactéries. Il développa ainsi la boisson lactée Yakult®, distribuée initialement depuis son laboratoire de recherches, puis à partir des années 1950, par les usines de production de la société Yakult® Honsha Ltd qui fut fondée (48).

### D. Les probiotiques, des composés « en faveur de la vie »

Bien que plusieurs scientifiques aient étudié ce concept depuis près d'un siècle, le terme « probiotique » ne vit le jour qu'en 1965. Les chercheurs Lilly et Stillwell l'utilisèrent pour décrire des produits d'origine microbienne stimulant la croissance d'autres organismes (49).

Si l'on prête attention à son étymologie, l'expression « probiotique » se compose de la préposition latine *pro*, « pour » ainsi que d'un adjectif grec *βιωτικός*, « biotique » provenant du nom *βίος*, « la vie ». La signification première du mot se dégage donc aisément de ses racines : un probiotique est un composé « en faveur de la vie ». À cette époque, la nature microbienne des probiotiques n'est cependant pas encore bien définie (49).

### E. Des définitions toujours plus précises

En 1974, l'idée de modulation de la microflore intestinale initialement soulevée par Tissier et Metchnikoff fut réintroduite dans la définition de Parker : les probiotiques sont des « *organismes et substances qui participent à l'équilibre microbien intestinal* ». Selon cette définition, la famille des probiotiques pourraient également englober des composés limitant le développement bactérien : les antibiotiques (50).

Cette imprécision fut relevée par Fuller en 1989, qui redéfini alors les probiotiques comme suit : « *des compléments nutritionnels vivants qui apportent un bénéfice à l'animal hôte en améliorant son équilibre microbien intestinal* » (51). Il appuya ainsi l'idée que les probiotiques sont des cellules vivantes et non des substances quelconques, tout en conservant la notion d'équilibre de l'écosystème bactérien intestinal.

Plusieurs auteurs réévaluèrent ensuite cette définition, lui apportant modifications et compléments successifs, jusqu'à celle actuellement retenue par l'Organisation Mondiale de la Santé.

## II. DÉFINITION ACTUELLEMENT RETENUE PAR L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ

Selon les experts rassemblés en 2001 par la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les probiotiques sont actuellement définis comme des « *microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte* » (52). Cette nouvelle description du terme est due au groupe de recherche de Guarner et Schaafsma qui la publia en 1998 dans *l'International Journal of Food Microbiology* (53).

Cette définition reprend les concepts généraux apportés précédemment. En effet, on y retrouve les notions de **compléments microbiens vivants** et leur **impact positif** sur la santé de l'individu qui les consomme. De plus, elle fait intervenir la notion nouvelle de **dose appropriée** qu'il faudra administrer dans le but d'obtenir ces effets.

Il faut aussi différencier les probiotiques des composés nommés prébiotiques. Ces derniers sont des éléments non dégradés dans le tube digestif. Ils parviennent tels qu'ingérés dans la lumière colique, où certaines bactéries vont les utiliser pour stimuler leur croissance. Ce sont généralement des glucides à chaîne carbonée de longueur variable, tels que les fructo-oligosaccharides (FOS) ou les fructanes. Leur but consiste notamment à stimuler sélectivement la croissance et l'activité de bactéries bénéfiques du tube digestif (54).

Lorsque prébiotiques et probiotiques sont associés au sein d'un même produit, on parle alors de symbiotique. Ces associations permettent en outre de prolonger la durée de vie des microorganismes probiotiques et d'améliorer leur croissance, grâce à l'apport conjoint des substrats nécessaires à leur développement (54).

### III. DESCRIPTION DES MICROORGANISMES UTILISÉS EN TANT QUE PROBIOTIQUES

Selon la définition précédente, tous les microorganismes administrés vivants et ayant une action positive sur la santé peuvent être considérés comme probiotiques. Seule une petite partie de ces microorganismes a fait l'objet d'études approfondies apportant les preuves de leurs effets bénéfiques. Les bactéries lactiques - dont les *Lactobacillus* – ainsi que le genre *Bifidobacterium* et les levures *Saccharomyces* semblent être les trois groupes les plus fréquemment utilisés. Certaines espèces de *Bacillus* sont également retrouvées.

#### A. Le groupe des bactéries lactiques

Traditionnellement utilisées pour la conservation des denrées alimentaires grâce à leurs capacités fermentaires, les bactéries lactiques ont aussi pour but d'améliorer les caractères organoleptiques des aliments (saveur et texture). Les espèces du genre *Lactobacillus* constituent le plus grand ensemble de microorganismes vivants ingérés *via* l'alimentation. Un intérêt croissant est aujourd'hui porté à l'usage clinique qu'il peut être fait de certaines espèces du groupe.

## 1. Classification

Les bactéries lactiques appartiennent au Phylum des *Firmicutes* et sont ensuite retrouvées dans la Classe des *Bacilli*, puis dans l'Ordre des *Lactobacillales*. Celui-ci compte six familles (*Aerococcaceae*, *Carnobacterium*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae*), qui renferment elles-mêmes trente-cinq genres distincts (**Figure 22**). Seulement six d'entre eux disposeraient de propriétés probiotiques : *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. Dans ce cadre, le genre le plus étudié et le mieux connu est *Lactobacillus* (55).

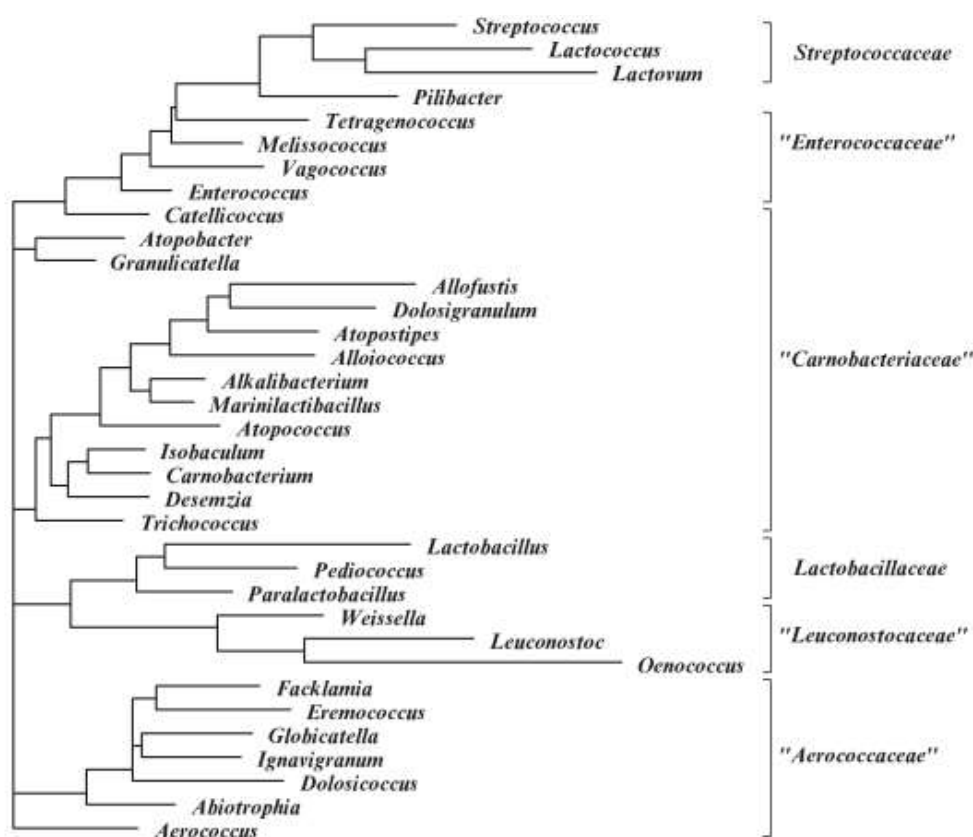


Figure 22 : Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'Ordre des *Lactobacillales* (56)

Il existe une classification phylogénétique basée sur les caractères phénotypiques et génotypiques des bactéries lactiques (**Figure 23**). Elle sépare les bactéries lactiques en différents groupes, notamment grâce à l'étude des séquences des sous-unités 16S des ARN ribosomiaux (57).

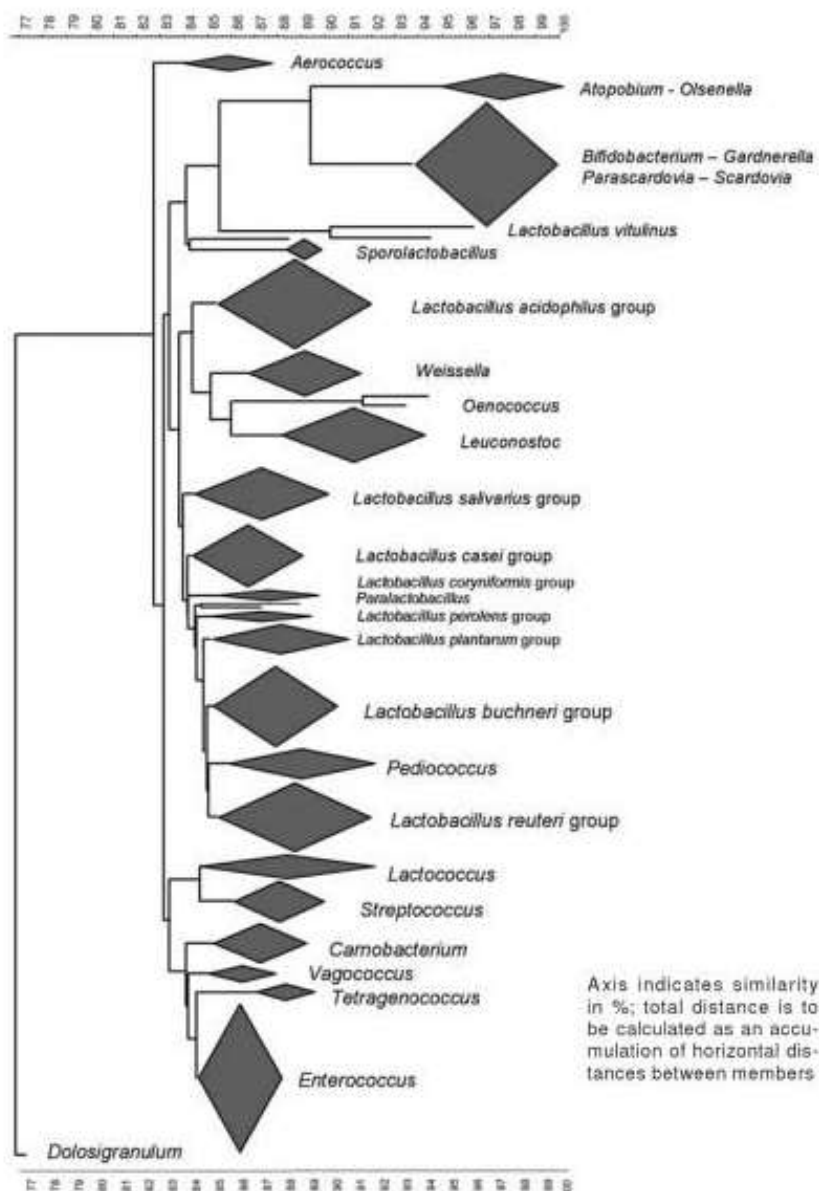


Figure 23 : Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques au sein de l'Ordre des *Lactobacillales*, basé sur les séquences des ARNr 16S (57)

## 2. Description

Les lactobacilles sont des bacilles ou coccobacilles à Gram positif, asporulants, immobiles et se développant facilement en milieu acide. Leur croissance se fait généralement en conditions anaérobies, bien que certaines de ces bactéries soient anaérobies facultatives. Elles sont par ailleurs dépourvues de catalase et de nitrate réductase. Etant incapables de synthétiser des acides aminés à partir de sources azotées, ceux-ci doivent leur être apportés par le milieu de culture, au même titre que certains minéraux et vitamines. Leur ADN est composé de moins de 55 % de guanosine (G) et cytosine (C) (57).



### 3. Caractéristique particulière : la production d'acide lactique

Les lactobacilles produisent de l'acide lactique grâce à la fermentation d'hexoses. Dans le même temps, les bactéries obtiennent l'énergie nécessaire à leur croissance et à leur développement sous forme de molécules d'Adénosine Triphosphate (ATP). La quantité d'acide lactique produit est variable suivant les espèces et la voie de fermentation employée (58).

Pour qu'il y ait fermentation, il est nécessaire que les hexoses traversent la membrane cellulaire. Les bactéries utilisent un système de transport actif. La force protomotrice générée par l'hydrolyse de molécules d'ATP couplée à la sortie de protons de la cellule permet d'activer une perméase. Celle-ci effectue le symport proton-sucre vers l'intérieur de la cellule. La phosphorylation de l'hexose est finalement réalisée dans le cytoplasme bactérien (58) (*Figure 24*).

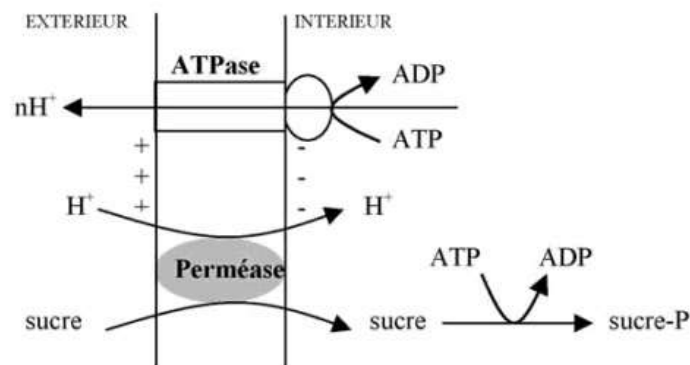


Figure 24 : Système de transport perméase ATP-dépendant (58)

Il existe un second système de transport actif : le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS) qui couple le transfert du sucre à sa phosphorylation (*Figure 25*). Il fait intervenir un ensemble d'enzymes et de protéines de transport spécifiques à chaque sucre. Ce deuxième système est plus énergétiquement rentable pour la bactérie, car il n'utilise pas de molécule d'ATP et phosphoryle le glucide dès son transport dans la cellule (58).

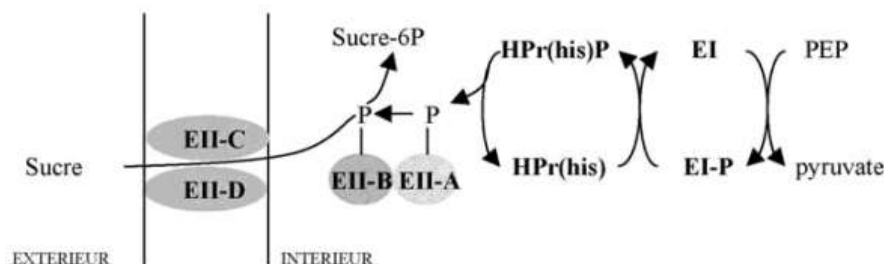


Figure 25 : Système de transport PTS (58)

Une fois le glucide transporté dans le cytoplasme, son catabolisme peut avoir lieu. Différentes voies fermentaires sont employées par les bactéries, selon leur patrimoine enzymatique (**Figure 26**). En premier lieu, la voie homofermentaire correspond à une glycolyse complète. Elle convertit le glucose en lactate avec production d'ATP. Cette voie peut être appelée « homolactique » pour des bactéries qui convertissent plus de 90 % du glucose en lactate (58).

Pour d'autres bactéries, la voie hétérofermentaire permet d'obtenir en plus du lactate, une quantité équimolaire de dioxyde de carbone, d'éthanol et/ou d'acétate. En milieu limitant en sucres, certaines bactéries homofermentaires peuvent avoir recours à un métabolisme mixte qui fait alors également intervenir la voie hétérofermentaire (58).

Les acides produits participent à l'acidification du milieu de culture et, de ce fait, à l'inhibition de la croissance d'autres microorganismes. Dans l'industrie agro-alimentaire, cette propriété est recherchée pour améliorer la conservation des produits et pour améliorer leur saveur (58).

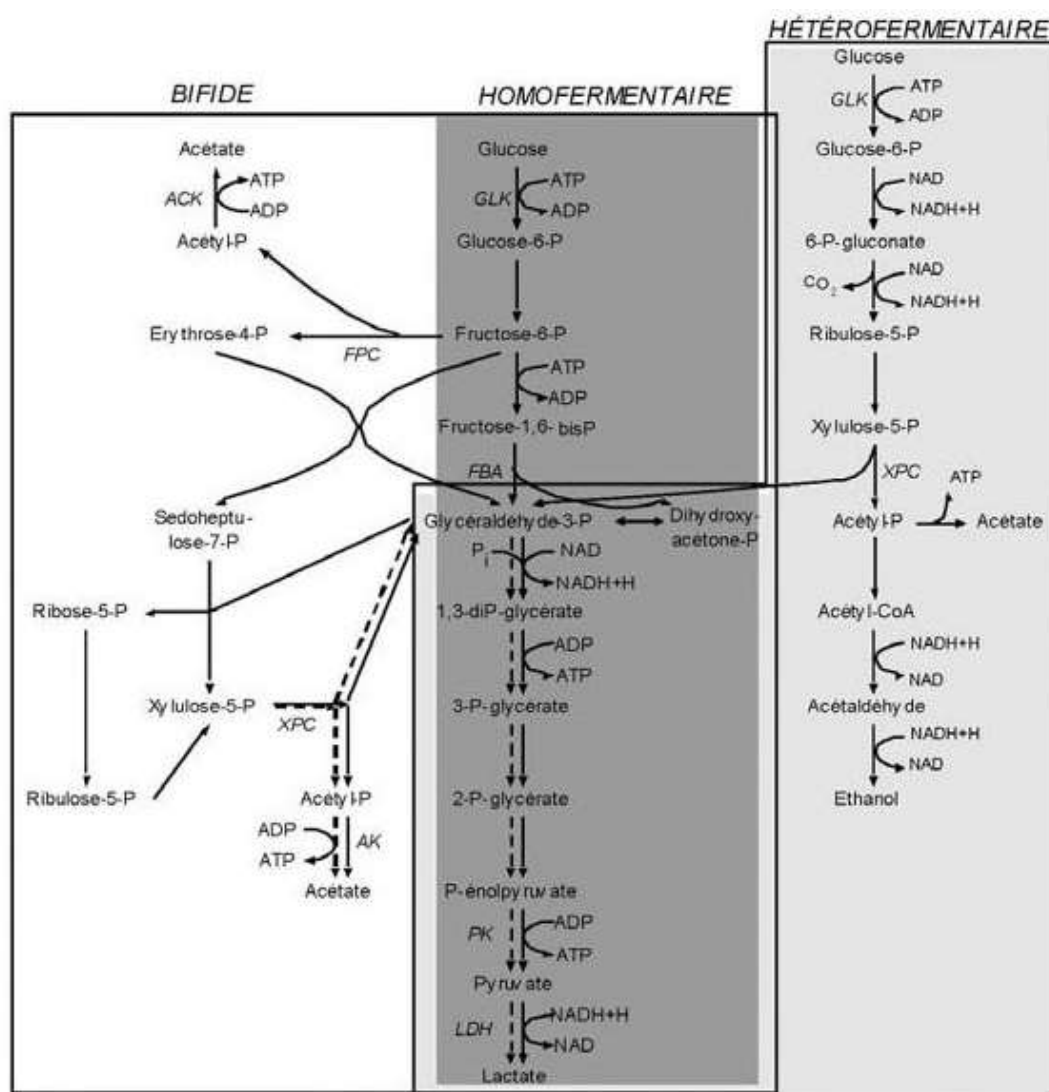


Figure 26 : Voies homofermentaire, hétérofermentaire et bifide de la dégradation du glucose (58)

### 4. Habitats naturels

Ubiquitaires, les bactéries lactiques sont largement retrouvées dans l'environnement. Elles sont présentes sur les surfaces végétales, notamment sur les fruits qui sont riches en sucres. Leur quantité augmente avec la pourriture du matériel végétal. Elles sont aussi retrouvées dans des aliments fermentés tels que la choucroute, certains produits laitiers ou des viandes, ainsi que dans les boissons fermentées comme le vin, la bière, les whiskies ou divers jus. Les ensilages destinés au bétail en contiennent également (57).

L'Homme et les animaux possèdent des bactéries lactiques au niveau des muqueuses respiratoires, digestives et vaginales. Elles sont aussi retrouvées dans les eaux usées (57).

### B. Les bifidobactéries : le genre *Bifidobacterium*

Longtemps considérées comme des bactéries lactiques, les bifidobactéries sont phylogénétiquement très éloignées de ces dernières. Elles sont employées dans l'industrie agro-alimentaire pour la production et la conservation des aliments. Elles font partie du microbiote intestinal humain et ce sont d'ailleurs les premières bactéries à coloniser l'intestin du nouveau-né nourri au sein. Une attention toute particulière est actuellement portée à ces bactéries qui pourraient avoir une importance capitale dans le développement de l'enfant.

#### 1. Classification

Le genre *Bifidobacterium* appartient au Phylum des *Actinobacteria*. Il est ensuite retrouvé dans la Classe des *Actinobacteria* et la Sous-Classe des *Actinobacteridæ*, l'Ordre des *Bifidobacteriales* et la famille des *Bifidobacteriaceæ* (59).

L'étude de l'ARNr 16S des bifidobactéries permet de faire apparaître différents groupes, dont le nom correspond à la première espèce qui y a été incluse (**Figure 27**) (60).

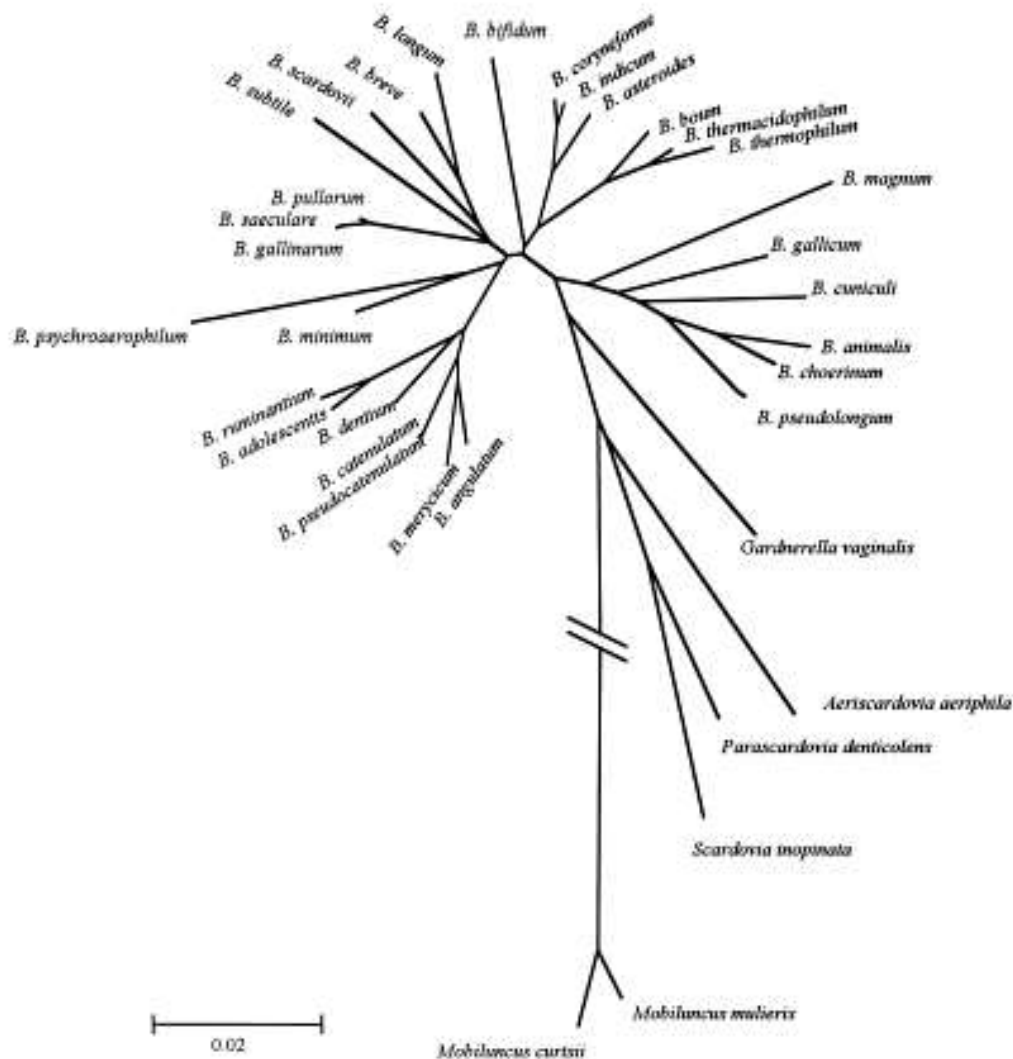


Figure 27 : Dendrogramme représentant les relations phylogénétiques entre les espèces de la famille des *Bifidobacteriaceæ*, basé sur l'analyse des ARNr 16S (60)

## 2. Description

Les bifidobactéries sont des bâtonnets ramifiés à Gram positif et présentant une organisation spatiale variable. En effet, elles peuvent être isolées ou s'assembler en chaînes ou amas. Immobiles et asporulantes, elles se développent en conditions anaérobies. Elles ne disposent pas de catalase, exception faite des espèces *Bifidobacterium indicum* et *Bifidobacterium asteroides* lorsqu'elles sont cultivées en présence d'oxygène. L'enzyme nitrate-réductase est également absente. Leur contenu en GC varie de 42 à 67 % (60).

### 3. Caractéristique particulière : la production d'acide lactique par la voie « bifide »

Les bifidobactéries se rapprochent du groupe des bactéries lactiques car elles synthétisent également de l'acide lactique à partir des hexoses. Les sucres sont transportés dans le cytoplasme par les mêmes mécanismes actifs que ceux exposés pour le groupe des bactéries lactiques, le système utilisé variant en fonction des espèces (**Figure 24 ; Figure 25**). Ensuite, elles emploient une voie fermentaire particulière, dite « bifide », grâce à laquelle elles dégradent les glucides en lactate tout en produisant de l'ATP (**Figure 26**) (58).

### 4. Habitats naturels

A l'état naturel, ces bactéries sont retrouvées dans l'intestin, en particulier celui des nourrissons, la cavité buccale et le vagin humains. Elles sont également présentes dans le rumen des bovins et l'intestin de certains insectes tels que l'abeille (60).

## C. Le genre *Bacillus*

Mieux connu pour ses espèces pathogènes que pour ses espèces à propriétés probiotiques, le genre *Bacillus* présente néanmoins un intérêt dans ce second cadre. En effet, ces bactéries produisent des endospores qui leur confèrent une résistance accrue aux conditions environnementales. Ainsi, ni les conditions de stockage et d'administration des produits, ni les variations de pH au sein du tube digestif ne poseraient problème lors de l'utilisation de *Bacillus* sp.

### 1. Classification

Le genre *Bacillus* constitue un ensemble très hétérogène de bactéries, tant sur le plan génétique que sur le plan métabolique. Il appartient au Phylum des *Firmicutes* et est retrouvé au sein de la Classe des *Bacilli*, dans l'Ordre des *Bacillales* et la famille des *Bacillaceæ* (61).

Historiquement, les *Bacilli* étaient classés selon leurs caractéristiques morphologiques et leur composition cellulaire. La forme des endospores, ainsi que leur localisation et la déformation engendrée au sein de la cellule bactérienne ont tout particulièrement permis de définir différents groupes d'espèces. En outre, la composition de la membrane cellulaire a été un autre critère important de classification (56).

Les méthodes moléculaires qui ont ensuite été utilisées ont aidé à clarifier la situation de ce genre hétérogène. Plusieurs groupes d'espèces ont été retirés du genre *Bacillus stricto sensu* pour être rassemblés sous de nouveaux genres tels que *Saccharococcus*, *Anoxybacillus* ou encore *Geobacillus*. Les *Bacillus stricto sensu* ont été reclassés en onze groupes présentant des espèces « types » connues et définies (56). Nous les recensons dans le tableau suivant (*Tableau V*).

Tableau V : Classification en onze groupes des espèces "types" de *Bacillus* (56)

Groupe	Espèces
a	<i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. atrophaeus</i> , <i>B. inojavensis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. sonorensis</i> , <i>B. vallismortis</i> , ( <i>Paenibacillus popilliae</i> )
b	<i>B. farraginis</i> , <i>B. fondii</i> , <i>B. fortis</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. galactosidilyticus</i>
c	<i>B. asahii</i> , <i>B. bataviensis</i> , <i>B. benzoovorans</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. cohnii</i> , <i>B. firmus</i> , <i>B. flexus</i> , <i>B. fumarioli</i> , <i>B. infernus</i> , <i>B. jeotgali</i> , <i>B. luciferensis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. methanolicus</i> , <i>B. niacini</i> , <i>B. novalis</i> , <i>B. psychrosaccharolyticus</i> , <i>B. simplex</i> , <i>B. soli</i> , <i>B. vireti</i>
d	<i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>B. thurigiensis</i> , <i>B. weihenstephanensis</i>
e	<i>B. aquimaris</i> , <i>B. marisflavi</i>
f	<i>B. badius</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. thermoamylovorans</i> , <i>B. acidicola</i> , <i>B. oleronius</i> , <i>B. sporothermodurans</i>
g	<i>B. alcalophilus</i> , <i>B. arsenicoselenatis</i> , <i>B. clausii</i> , <i>B. gibsonii</i> , <i>B. halodurans</i> , <i>B. horikoshii</i> , <i>B. krulwichiae</i> , <i>B. okhensis</i> , <i>B. okuhidensis</i> , <i>B. pseudoalcaliphilus</i> , <i>B. pseudofirmus</i>
h	<i>B. arsenicus</i> , <i>B. barnaricus</i> , <i>B. gelatini</i> , <i>B. decolorationis</i>
i	<i>B. carboniphilus</i> , <i>B. endophyticus</i> , <i>B. smithii</i>
j	<i>B. pallidus</i>
k	<i>B. funiculus</i> , <i>B. panaciterrae</i>

Bien que l'analyse de l'ARNr 16S constitue à ce jour une méthode de référence pour la classification phylogénétique, il semblerait qu'elle soit encore insuffisante pour déterminer précisément les liens entre les espèces d'un ensemble aussi complexe que le genre *Bacillus* (62).

### 2. Description

Les bactéries du genre *Bacillus stricto sensu* se présentent sous forme de bâtonnets isolés ou associés par paires ou en chaînettes, voire sous forme de longs filaments. Leur coloration de Gram est variable (62).

Elles ont la capacité de produire une endospore très résistante dont la forme et la localisation au sein de la cellule sont spécifiques. Ces endospores permettent à la bactérie d'entrer en dormance face à des conditions environnementales et nutritionnelles défavorables. Elles résistent ainsi à la chaleur, aux radiations ainsi qu'à la dessiccation (62).

Généralement mobiles grâce à un appareil ciliaire pérित्रiche, les représentants du genre peuvent aussi être immobiles, comme c'est le cas pour *Bacillus anthracis*. Bien que la plupart des espèces aient un métabolisme aérobie ou aérobie facultatif, un petit nombre n'évolue qu'en conditions anaérobies. La catalase est présente chez la majorité des espèces connues. Le contenu de leur ADN en GC varie de 32 à 66 %, ce qui témoigne bien de l'importante hétérogénéité du genre (62).


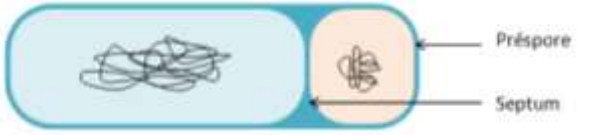




### 3. Caractéristique particulière : la sporulation

Les espèces du genre *Bacillus* peuvent sporuler lorsque la température, le pH, l'oxygénation, ou la concentration du milieu en certains composés deviennent inadaptés pour leur croissance. Sur le plan métabolique, aucune activité n'est détectable dans les endospores et elles ne contiennent pas d'ATP (62).

Les différents *Bacilli* seront également affectés par la densité de la population bactérienne dans l'environnement proche. En effet, lorsque ces bactéries se développent, elles envoient dans le milieu extracellulaire des peptides particuliers impliqués dans le *quorum sensing*, les CSF (*Competence and Sporulation Factor*). Plus la population bactérienne croît, plus la concentration de CSF augmente. Lorsque celle-ci atteint un seuil donné, elle déclenche la dérégulation de gènes impliqués dans la sporulation, par le biais de divers messagers intracellulaires (62).

Les endospores ne peuvent être obtenues que si la bactérie a déjà subi une première mitose. Leur formation nécessite une division cellulaire asymétrique en six étapes consécutives (62), détaillées dans le tableau ci-dessous (*Tableau VI*).

Tableau VI : Etapes de la sporulation des espèces de *Bacillus* (62)

Etape	Description	Illustration
1	L'ADN bactérien dupliqué et condensé prend une position axiale dans la cellule.	
2	Une septation asymétrique permet d'initier la formation de la préspore. L'ADN est fragmenté en deux parties	
3	La cellule mère englobe la préspore. Celle-ci est alors limitée par deux membranes de polarités opposées.	
4	Un cortex à base de petidoglycanes spécifiques aux spores bactériennes se forme entre les deux membranes de la préspore.	
5	Il y a également formation de l'exosporium, fine couche protéique qui englobe l'extérieur de la structure. La spore commence alors sa maturation. C'est notamment à ce stade qu'elle acquiert sa capacité de résistance à la chaleur.	
6	Finalement, la cellule-mère (ou sporange) se lyse et libère la spore néoformée dans le milieu.	



Les endospores bactériennes sont actuellement considérées comme les formes de vie les plus résistantes sur Terre. Ce sont d'ailleurs ces structures qui sont utilisées comme probiotiques pour le genre *Bacillus*. Leur thermostabilité et leur importante résistance au pH gastrique leur permettraient d'être ingérées et d'atteindre la lumière intestinale sans altération (62).

### 4. Habitats naturels

Ce sont des espèces ubiquitaires majoritairement saprophytes retrouvées dans les sols, l'eau douce ou l'eau de mer, les végétaux et dans des denrées alimentaires (62).

Les spores peuvent être répandues dans tout l'environnement *via* les poussières, les aérosols ou l'eau. Les germes sont donc facilement transportés de leur environnement naturel initial vers toutes les surfaces et corps voisins, inertes ou vivants. Elles résistent aux étapes de stérilisation et il est possible de les retrouver dans des produits alimentaires ou médicamenteux stérilisés (62).

Au sein du genre, il existe des pathogènes opportunistes ou obligatoires, comme *Bacillus anthracis* responsable de la maladie du charbon ou *anthrax*. Il est considéré comme arme potentielle du bioterrorisme depuis la Seconde Guerre Mondiale. *Bacillus cereus* est quant à lui responsable de toxi-infections alimentaires collectives (63).

## D. Les levures probiotiques : le genre *Saccharomyces*

Levure de bière ou levure de boulanger, *Saccharomyces cerevisiae* est l'une des plus anciennes levures utilisées dans la production de boissons alcoolisées telles que la bière, ou en boulangerie. Il existe une espèce proche, *Saccharomyces boulardii*, qui est, quand à elle, utilisée comme probiotique.

### 1. Classification

Le genre *Saccharomyces* appartient au règne des *Fungi* qui rassemble tous les macro- et micromycètes. Ces levures sont des Ascomycètes de la Classe des *Saccharomycotina*, l'Ordre des *Saccharomycetes* et la Famille des *Saccharomycetales* (64).

*Saccharomyces boulardii* fut découverte en Indochine par Henri Boulard, qui lui donna son nom en 1920. Sa classification a ensuite longtemps été débattue. Elle fut décrite comme une espèce à part entière, jusqu'à ce que les premières méthodes moléculaires la déclarent indistincte de

*Saccharomyces cerevisiae*. L'étude de leurs génomes permet finalement de différencier à nouveau ces deux espèces, dont le métabolisme et la physiologie sont d'ailleurs différents (65).

### 2. Description

*Saccharomyces boulardii* est un organisme eucaryote unicellulaire. Cette levure se présente sous forme de structures isolées, ovoïdes à rondes, pouvant mesurer jusqu'à 10 µm de long. Elle ne forme pas de filaments mycéliens et se reproduit majoritairement par bourgeonnement de la cellule-mère (65).



Figure 28 : Deux cellules de *Saccharomyces boulardii* observées au microscope électronique à balayage (66)

Sa paroi cellulaire est constituée de deux enveloppes. La couche externe est formée de mannose associé à des protéines (phosphopeptidomannanes) ou des lipides (phospholipomannanes) et la couche interne est composée de chitine et de glucane (65).

C'est une levure thermotolérante, dont la température optimale de croissance est 37°C, soit très proche de la température corporelle de l'Homme. Son développement est possible dans une large gamme de pH, avec un pH optimum acide, variant de 4,5 à 6,5 (65).

### 3. Habitats naturels (65)

*Saccharomyces boulardii* est une levure non pathogène d'origine tropicale, initialement isolée de boissons préparées à base de litchis et mangoustans par les populations d'Asie du Sud-est. La levure ne fait pas partie de la flore résidente de l'Homme.

## IV. EVALUATION DES PROBIOTIQUES

Qu'ils soient d'origine bactérienne ou fongique, tous les probiotiques doivent répondre à des critères définis d'efficacité et de sécurité. Il convient d'identifier clairement la souche probiotique, avant de réaliser différents tests *in vitro* et *in vivo*.

### A. Identification d'une souche probiotique

La Consultation mixte d'experts FAO/OMS de 2002 recommande que les probiotiques soient identifiés par combinaison de méthodes phénotypiques et génotypiques. Les analyses phénotypiques devraient comporter l'étude de la fermentation de différents sucres, notamment par le biais de galeries adaptées. Parmi les méthodes moléculaires, l'hybridation ADN-ADN est citée comme référence pour la détermination de la souche, mais peut cependant être remplacée par l'étude des séquences d'ARNr 16S ou toute autre méthode moléculaire reproductible validée au niveau international (67).

Une fois identifiés, les microorganismes doivent être nommés selon le Code international de Nomenclature, soit :

- Genre (Ex : *Lactobacillus*) ;
- Espèce (Ex : *Lactobacillus rhamnosus*) ;
- Sous-espèce, si il y a lieu (67).

À ces éléments il est important d'ajouter le nom de la souche considérée, car il a été démontré que les effets d'un probiotique étaient souche-dépendants. Par exemple, pour *Lactobacillus rhamnosus*, il existe la souche GG (ATCC 53103) et on notera donc : *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103). La souche doit finalement être déposée dans une collection de cultures internationalement reconnue (67).

### B. Tests *in vitro* : orientation des mécanismes d'action des probiotiques

Pour déterminer les effets de souches que l'on souhaite qualifier de probiotiques, des tests *in vitro* doivent être réalisés. Bien qu'ils ne permettent pas d'assurer un résultat identique au sein de l'organisme, ils restent importants pour orienter les études *in vivo* ultérieures (67).

De manière générale, au cours des tests *in vitro* des microorganismes destinés à la voie orale, on cherche à mettre en évidence leur capacité à survivre et agir dans le tube digestif de l'hôte.

Ainsi étudie-t-on leur résistance au pH gastrique et aux acides biliaires, ainsi que leur aptitude à les hydrolyser. Il faut également évaluer leur potentiel d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales, leur activité antimicrobienne face à des agents pathogènes et leur capacité à réduire l'adhésion des pathogènes aux cellules (67).

### C. Sécurité d'emploi

Avant de réaliser des tests *in vivo* sur l'Homme, il est nécessaire d'apporter les preuves que le probiotique potentiel ne risque pas de porter préjudice à la santé de l'individu qui l'ingère.

Beaucoup de probiotiques destinés à la voie orale, dont les lactobacilles et les bifidobactéries, font partie de la microflore normale du tube digestif de l'Homme. Une supplémentation orale en ces microorganismes n'a donc théoriquement pas d'effets indésirables. Chez l'individu sain, de nombreuses études ont montré que l'ingestion de divers probiotiques n'entraînait aucun effet négatif aux doses usuelles, y compris en cas d'administrations répétées. De ce fait, la U.S. Food and Drug Administration (FDA) a décidé d'accorder le statut « *Generally recognized as safe* » (GRAS) aux probiotiques, aux produits d'alimentation qui en contiennent, ainsi qu'aux métabolites qu'ils produisent, à l'image des spores de *Bacillus spp.*. Ce statut GRAS concerne toutes les substances intentionnellement ajoutées dans les denrées alimentaires, qui ont été jugées sans danger par un panel d'experts, dans leurs conditions normales et attendues d'utilisation (68).

La littérature recense cependant quelques cas d'effets indésirables liés aux probiotiques.

#### 1. Infections systémiques

De rares cas de bactériémie ou fongémie documentés sont retrouvés et concernent uniquement des patients à l'état de santé dégradé, immunodéprimés ou avec des pathologies sous-jacentes. L'ensemble de ces individus présente un système immunitaire déprimé et/ou un épithélium digestif fragilisé. Ces déficiences favorisent la translocation des microorganismes de la lumière intestinale vers la circulation générale, par l'intermédiaire des ganglions lymphatiques mésentériques ou du système porte. Différents organes peuvent ensuite être colonisés, comme le foie, la rate ou le cœur (**Figure 29**).

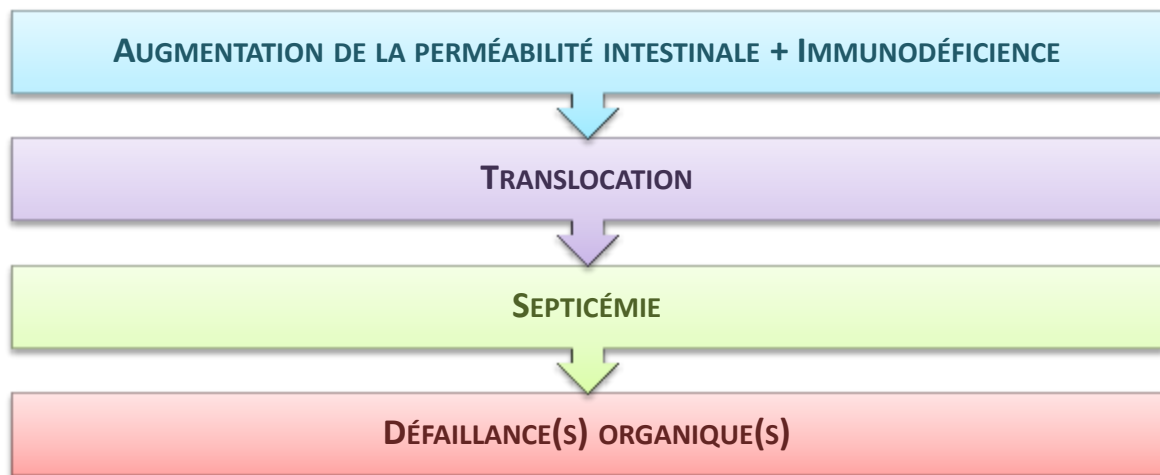


Figure 29 : Des facteurs de risques de la translocation aux défaillances multiviscérales

Aucune étude ne montre l'implication de souches probiotiques de *Bifidobacterium* dans des infections systémiques.

Les lactobacilles endogènes sont une source connue d'endocardite chez les individus ayant une malformation cardiaque ou une valvulopathie. Il est donc sensé de penser que des probiotiques de ce groupe bactérien puissent être à l'origine du même type de pathologie.

Une équipe de chercheurs a étudié en 2005 le cas de deux enfants qui ont présenté une infection invasive à *Lactobacillus rhamnosus* GG lors de leur hospitalisation. Le premier, un nourrisson de quatre mois hospitalisé pour une lourde opération cardiaque, avait été traité par *Lactobacillus rhamnosus* GG ( $10^{10}$  UFC par jour) suite à une diarrhée non sanglante consécutive à une antibiothérapie à large spectre. Après trois semaines, une endocardite s'était déclarée et des études moléculaires avaient permis d'établir l'identité de souche entre celle administrée par voie orale et celle retrouvée dans les hémocultures (69).

Dans le second cas, il est question d'une fillette de six ans, souffrant de paralysie cérébrale et alimentée par une sonde de jéjunostomie. Il lui avait été administré, *via* sa sonde, une gélule de *Lactobacillus rhamnosus* GG par jour ( $10^{10}$  UFC par gélule) pour traiter une diarrhée également liée aux antibiotiques. Après quarante-quatre jours de traitement et face à un état général dégradé, des hémocultures centrales et périphériques avaient montré une bactériémie provoquée par la même souche que celle apportée dans le tube digestif (69).

D'autres études montrent également que l'usage de *Lactobacilli* probiotiques chez des nouveaux-nés prématurés souffrant de syndrome du grêle court ou de laparoschisis est responsable de bactériémies (70). Dans ces différents cas, le tube digestif immature présentait

une anomalie sévère et ne pouvait plus assurer pleinement ses fonctions. En effet, le syndrome du grêle court est la conséquence d'une résection importante de l'intestin grêle suite à une affection l'ayant définitivement endommagé. Le laparoschisis, ou gastroschisis, consiste quant à lui, en une fermeture incomplète de la paroi abdominale au cours de la gestation. Elle laisse ainsi une fente à travers laquelle passent des anses intestinales non protégées par le péritoine (68).

Plusieurs cas de bactériémies et infections invasives à *Bacillus*, notamment à *Bacillus subtilis*, ont aussi été signalés. Seules quelques études ont mis en évidence l'homologie entre la souche probiotique administrée et celle à l'origine de l'infection grâce à des méthodes moléculaires. L'équipe d'Oggioni *et al.* a étudié le cas d'un patient âgé de soixante-treize ans atteint d'une leucémie lymphoïde chronique qui avait reçu  $10^9$  spores de *Bacillus subtilis* par jour pour traiter une diarrhée persistante. Le séquençage des ARNr 16S montra que la souche probiotique correspondait à celle responsable de la septicémie (71).

*Saccharomyces boulardii* est également tenu pour responsable de fongémies et chocs septiques. Certaines études suggèrent même que les infections à la levure probiotique pourraient avoir lieu de manière indirecte (72). En effet, l'équipe de Cassone *et al.* donne plusieurs exemples d'individus fragiles qui auraient été infectés par les probiotiques administrés *per os* à d'autres patients. Il y aurait eu portage cutané du germe d'un patient à un autre, contaminé par l'intermédiaire de son cathéter veineux central (73). Il n'est donc plus seulement question de translocation du microorganisme au niveau intestinal, mais aussi de contamination exogène, par un porteur sain ou des objets et surfaces souillées.

Par conséquent, il serait prudent de ne pas recommander l'usage des probiotiques chez des patients immunodéprimés et/ou présentant un épithélium intestinal altéré par une anomalie organique. La présence d'un cathéter veineux central doit faire exclure l'administration des probiotiques au patient lui-même et imposer une hygiène rigoureuse à l'entourage et au personnel soignant qui les administre à d'autres patients. On évite ainsi les contaminations accidentelles par voie parentérale. D'autre part, l'apport de *Lactobacillus* devrait être proscrit chez les patients ayant des malformations cardiaques ou des valvulopathies, du fait du risque accru d'endocardite infectieuse à lactobacilles. Finalement, l'administration des probiotiques par une sonde de gastro- ou jéjunostomie augmente les risques de translocation des germes et il serait donc préférable de l'éviter.

Dans le cas particulier des nouveau-nés prématurés, généralement immunodéprimés et présentant un système digestif immature, l'administration de probiotiques peut être bénéfique et n'est donc pas totalement à proscrire. Elle ne devrait néanmoins avoir lieu que sur avis médical spécialisé et avec un suivi minutieux de l'enfant par le médecin.

## 2. Activités métaboliques délétères

Le microbiote intestinal supporte de nombreuses activités métaboliques essentielles au bon fonctionnement de l'organisme de l'hôte. L'apport de probiotiques par voie orale augmente transitoirement le nombre de microorganismes dans le tube digestif, d'où une activité métabolique accrue. Des effets indésirables peuvent donc théoriquement apparaître. Nous expliquons ci-après les potentielles dérives des différents métabolismes et leurs conséquences à long et court termes sur la santé de l'hôte.

Les polysaccharides non digérés dans la partie initiale de l'intestin sont pris en charge par le microbiote colique. Les différentes transformations qu'ils subissent dépendent des espèces microbiennes présentes et de leur phénotype enzymatique. Il a été expliqué précédemment ([page 34 - Chapitre I :A.1](#)) que les métabolites intermédiaires étaient systématiquement convertis *in situ* pour former des AGCC réutilisés par l'organisme et des gaz tels que le méthane ou le sulfure d'hydrogène qui sont évacués. La littérature ne recense d'ailleurs pas de problèmes liés au métabolisme des polysaccharides dans le cadre de la prise de probiotiques.

Bien qu'étant quantitativement moins important que celui des polysaccharides, le métabolisme protéique colique joue un rôle fondamental pour le microbiote. En effet, nous avons vu que les protéines exogènes et endogènes sont dégradées par les bactéries qui en tirent l'azote nécessaire à leur néosynthèse protéique. Ces activités bactériennes s'accompagnent cependant de la production non négligeable de composés potentiellement toxiques pour l'hôte, à savoir l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ), les indoles et les phénols. Il a été démontré qu'une augmentation importante de ces composés était responsable d'une altération morphologique des cellules du côlon. Ce mécanisme serait en partie responsable de certains cancers du côlon, à long terme (22).

Les différentes modifications subies par les acides biliaires dans le côlon peuvent influencer sur les niveaux d'absorption et d'excrétion des lipides. Effectivement, il existe une possible variation de leurs taux sanguins et une modification de la consistance des selles avec risque de diarrhée. Certains acides biliaires secondaires ont également montré une toxicité vis-à-vis des cellules hépatiques ou coliques, pouvant mener *in fine* à la cancérisation (23).

De plus, le métabolisme des phospholipides alimentaires permet de libérer de la choline dont la conversion hépatique en triméthylamine oxyde pose des problèmes de toxicité vis-à-vis du système cardio-vasculaire de l'hôte. En effet, l'accumulation de ce métabolite chez la souris augmente la formation de plaques d'athérome dans les vaisseaux sanguins (23).

En pratique, lors d'une administration ponctuelle de probiotiques, les modifications du métabolisme des acides biliaires constituent le principal problème redouté, du fait de la diarrhée

qu'elles peuvent induire. Afin d'éviter l'exagération des diverses réactions métaboliques, les tests *in vitro* des probiotiques semblent primordiaux. En effet, ils permettent de sélectionner des souches selon leur matériel enzymatique et leurs capacités métaboliques, dans le but de limiter les effets indésirables.

### 3. Réactions immunologiques anormales

Il a été démontré que le microbiote intestinal était nécessaire au développement et au bon fonctionnement du système immunitaire, dont le GALT. En effet, chez des souris axéniques, le système immunitaire local montre de nombreux déficits, avec des réponses immunitaires innée et acquise non optimales (74). La muqueuse intestinale apparaît plus fine, la *lamina propria* moins riche en LT CD4+ et CD8+ et les IgA sécrétoires sont moins nombreuses. Comme nous l'avons vu précédemment, leur tolérance orale ne se développe pas non plus correctement (75). Nous pouvons donc penser qu'une quelconque manipulation du microbiote intestinal pourrait influencer sur le système immunitaire de l'hôte : stimulation excessive de l'immunité locale, réponse immunitaire inadaptée ...

Cette question se pose particulièrement dans le cas des nouveau-nés, chez qui l'immunité et la tolérance orale se mettent progressivement en place. L'apport de grandes quantités de probiotiques pour lesquels la tolérance n'est pas encore établie pourrait générer une réaction inflammatoire locale, avec apparition de diarrhée et de fièvre. La littérature ne recense cependant aucun cas de ce type.

Une autre population semble poser problème : les femmes enceintes. Au cours de la grossesse, l'équilibre préalablement établi entre les réponses à LTh1 et LTh2 se perd. Des études montrent que la réponse Th2 redevient prédominante. Il semblerait que ce phénomène permette le meilleur développement du fœtus (76). Cependant, l'apport oral de Lactobacilles engendre une augmentation relative de la réponse Th1 (77), qui viendrait donc rééquilibrer le rapport et pourrait ainsi être préjudiciable au bon déroulement de la grossesse. Des études supplémentaires restent nécessaires pour confirmer ce risque potentiel.



#### 4. Résistance aux antibiotiques et transferts de gènes

La résistance naturelle des souches probiotiques vis-à-vis des antibiotiques est un atout en cas d'utilisation conjointe de ces microorganismes et d'un traitement antibiotique. En effet, l'effet bactéricide ou bactériostatique de la molécule n'aura pas d'impact sur la croissance et l'activité du probiotique, mais uniquement sur le développement des germes sensibles. Toutefois, le problème du transfert des résistances à d'autres microorganismes se pose.

Certains lactobacilles disposent d'une résistance naturelle à la vancomycine. Cet antibiotique bactéricide de la famille des glycopeptides inhibe la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Il se fixe par 5 liaisons hydrogènes à l'extrémité terminale D-Alanine-D-Alanine du précurseur du peptidoglycane et inhibe ainsi la polymérisation des pentapeptides. Chez de nombreuses espèces de lactobacilles, le résidu terminal D-Alanine est remplacé par un résidu D-lactate ou D-sérine qui empêche donc la fixation de la molécule de vancomycine et la rend inactive (**Figure 30**) (78).

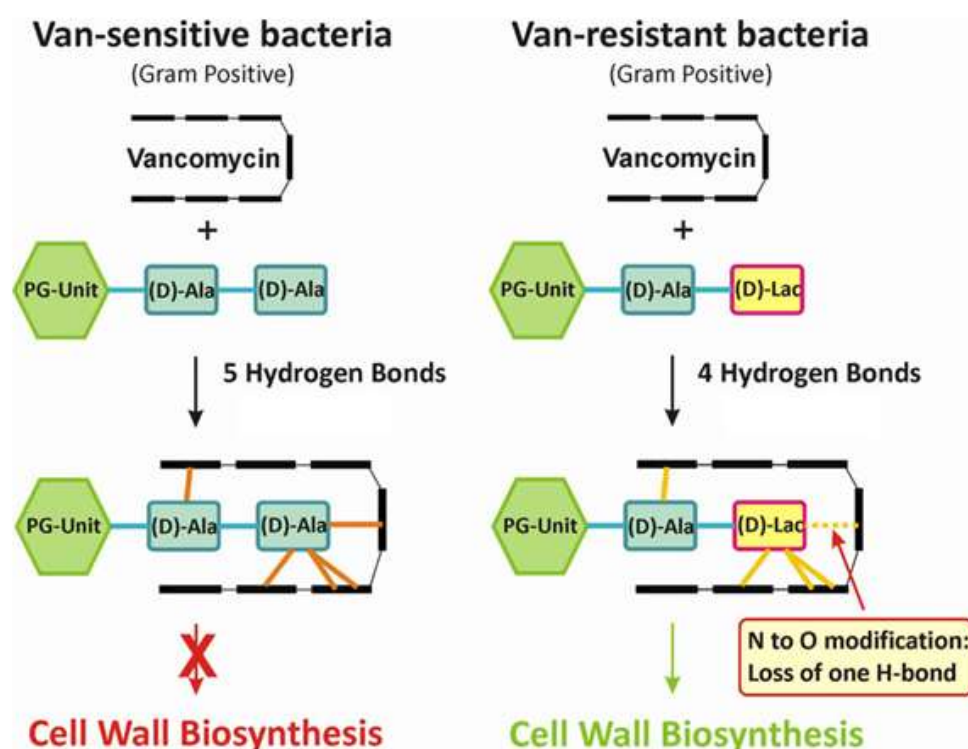


Figure 30 : Mécanisme d'action de la vancomycine et résistance chez les bactéries à Gram positif (79)

Van-sensitive bacteria : bactérie sensible à la vancomycine  
 Van-resistant bacteria : bactérie résistante à la vancomycine  
 PG-Unit : précurseur du peptidoglycane bactérien  
 D-Ala : résidu D-Alanine du peptidoglycane  
 D-Lac : résidu D-Lactate du peptidoglycane  
 H-bond : liaison hydrogène

Des mutations de la sous-unité 23S de l'ARN ribosomal ont également été identifiées chez certains lactobacilles, comme *Lactobacillus rhamnosus* E41 (80), et chez des bifidobactéries, telles que *Bifidobacterium bifidum* Yakult YIT 4007 (81). Elles les rendent insensibles à certains macrolides. Pour rappel, les macrolides se fixent aux ribosomes et empêchent la translocation du peptide lié à l'ARN de transfert (ARNt), d'où inhibition de la synthèse protéique chez la bactérie (**Figure 31**). Si l'ARN ribosomal est modifié, l'affinité de l'antibiotique pour le ribosome décroît et une résistance apparaît.

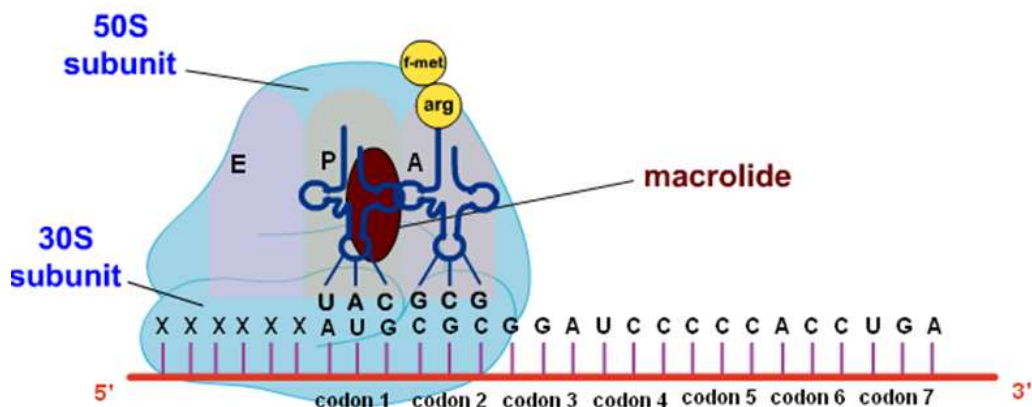


Figure 31 : Mécanisme d'action d'un macrolide (82)

F-met : N-formylméthionine, dérivé d'acide aminé amorçant la biosynthèse des protéines bactériennes

Arg : arginine, acide aminé

Site A : premier site de fixation de l'ARNt dans le ribosome

Site P : second site de fixation de l'ARNt dans le ribosome

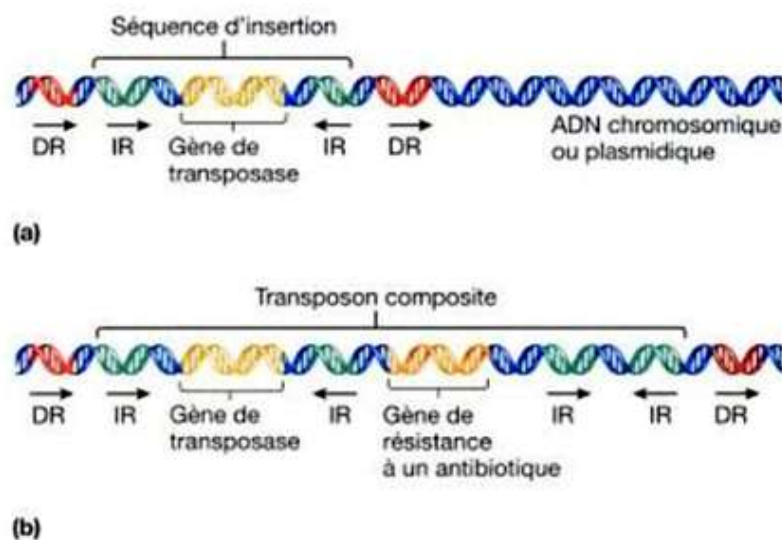
Site E : dernier site de fixation de l'ARNt dans le ribosome (site de sortie)

Le macrolide se fixe à la sous-unité 50S du ribosome et empêche la translocation du peptidyl-ARNt du site A au site P. La synthèse du polypeptide est stoppée. (82)

D'autres résistances portées par le matériel chromosomique ont été retrouvées chez diverses espèces probiotiques, mais le transfert horizontal de ces gènes de résistance semble peu probable. En effet, sous cette forme, les gènes sont principalement transmis verticalement, de la « bactérie-mère » à la « bactérie-fille ». Il reste néanmoins essentiel de connaître les antibiotiques potentiellement inactifs sur les souches probiotiques utilisées, dans le cas où il faudrait traiter une infection systémique qu'elles auraient causé.

Le problème de transfert de résistances concerne plutôt les gènes portés par des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides ou les transposons bactériens (83). Les plasmides sont des éléments d'ADN surnuméraires, complètement distincts des chromosomes, qui ne sont pas nécessaires à la survie de la bactérie. Ils lui confèrent des avantages sélectifs et

peuvent effectuer leur propre répllication. Les transposons, ou éléments transposables, sont des séquences d'ADN mobiles dans le génome, délimitées par deux séquences nucléotidiques identiques en orientation inverse, les séquences répétées inverses (IR, *Inverted Repeat*) (**Figure 32**). Elles permettent de déplacer les gènes qu'elles encadrent. Les transposons se déplacent dans le génome par le mécanisme de la transposition, grâce à une enzyme appelée transposase (84).



**Figure 32 : Structure de deux éléments transposables : une séquence d'insertion (a) et un transposon composite (b) (84)**

IR : Inverted Repeat, séquence répétée inverse  
DR : Direct Repeat, séquence répétée directe

(a) Les séquences d'insertion (SI) constituent les éléments transposables les plus simples : un gène de transposase est encadré de part et d'autre par des IR.

(b) Les transposons composites contiennent d'autres gènes, tels que des gènes de résistance à des antibiotiques, en plus du gène de transposase. Chaque gène est encadré par des IR.

Dans les deux cas de figure ci-dessus, le transposon est jouté de DR dans l'ADN de l'hôte (84).

La transmission horizontale des plasmides se fait généralement par conjugaison bactérienne. Une bactérie « donneuse » (F<sup>+</sup>), porteuse du plasmide F, et une autre « receveuse » (F<sup>-</sup>), ne disposant pas du plasmide F, se reconnaissent et se rapprochent par l'intermédiaire des pili sexuels (**Figure 33**). Lorsqu'elles sont au contact l'une de l'autre, un brin du plasmide est transféré de la bactérie « donneuse » vers la bactérie « receveuse » qui synthétise ensuite le second brin complémentaire. La bactérie « receveuse » se retrouve ainsi porteuse d'un nouveau plasmide et devient à son tour capable de conjugaison (**Figure 34**) (84).

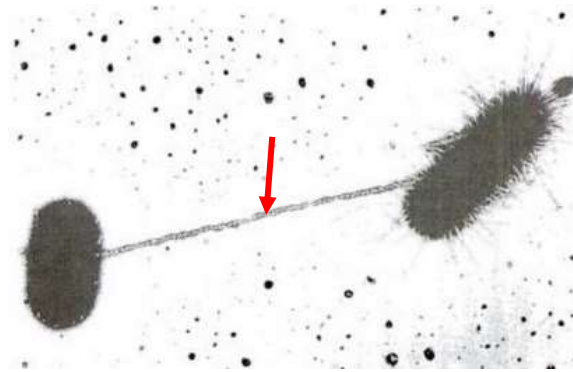


Figure 33 : Deux cellules d'*Escherichia coli* à un stade précoce de conjugaison, observées au microscope électronique (84)

Les deux bactéries se rapprochent par l'intermédiaire d'un pilus sexuel (flèche rouge).

De nombreuses résistances portées par ces éléments mobiles ont été étudiées. Elles concernent un vaste ensemble d'antibiotiques et peuvent être uniques ou multiples pour une même bactérie. On en retrouve, non exclusivement, chez des espèces de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ou encore *Bacillus*. Les mécanismes de résistance sont variables avec, par exemple la formation de pompes d'efflux des macrolides ou des tétracyclines, la synthèse de protéines protectrices des ribosomes, ou encore l'émission d'enzymes dégradant les antibiotiques :  $\beta$ -lactamases dégradant les  $\beta$ -lactamines, acétyltransférases ou phosphotransférases inactivant les aminosides (83).

Tous ces éléments peuvent être transférés à des bactéries commensales de l'intestin, voire à de potentiels pathogènes en transit dans le tube digestif. De nombreux traitements antibiotiques sont ainsi rendus inactifs. Le problème se pose notamment pour les staphylocoques ou les entérocoques, qui possèdent déjà de nombreuses résistances naturelles et acquises.

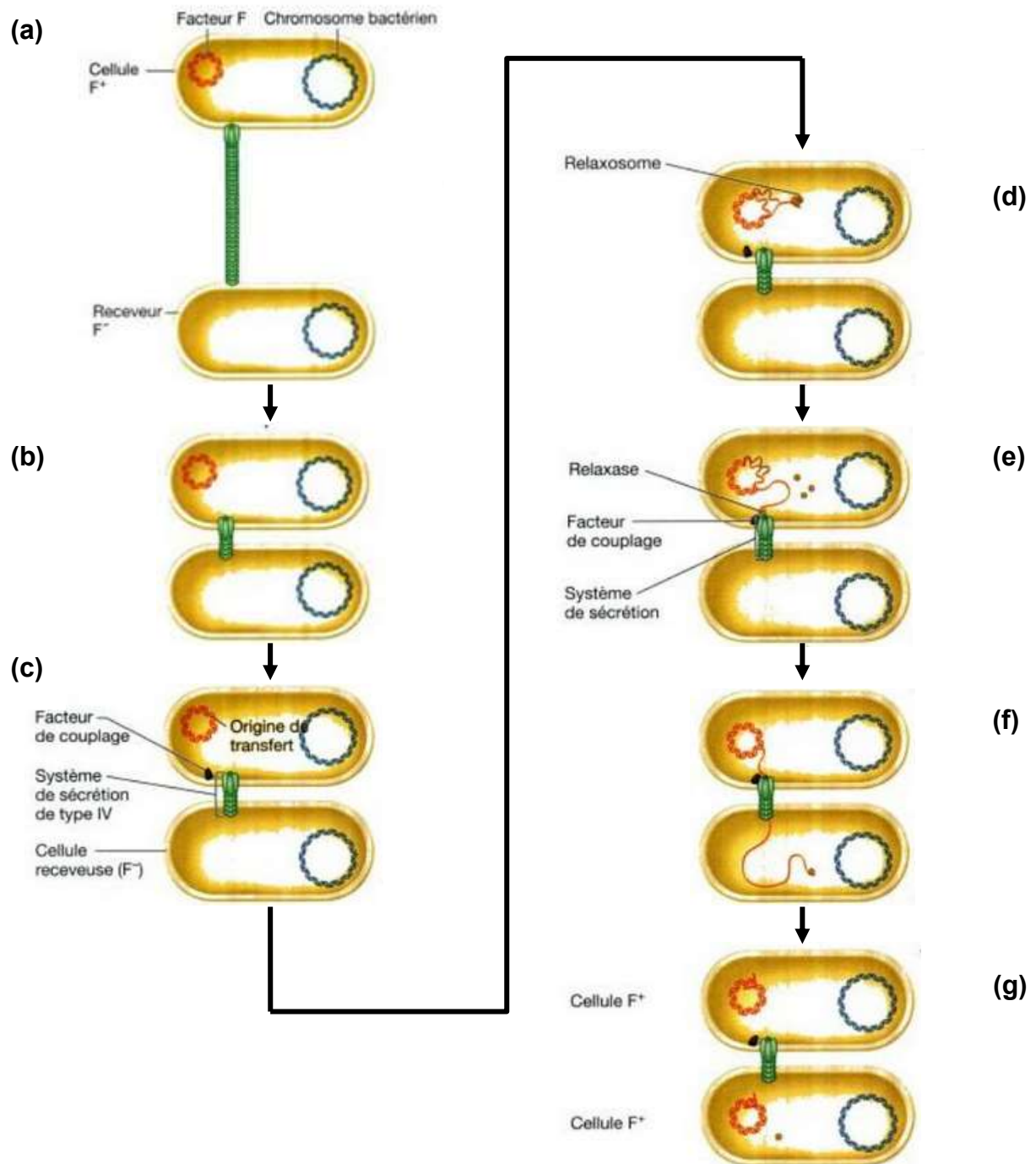


Figure 34 : Exemple de conjugaison bactérienne avec transfert du plasmide bactérien F (84)

- (a) La bactérie « donneuse » F<sup>+</sup> établit le contact avec une bactérie « receveuse » F<sup>-</sup> par l'intermédiaire d'un pilus sexuel.
- (b) Les cellules sont rapprochées par contraction du pilus sexuel.
- (c) Un système de sécrétion est constitué entre les deux bactéries.
- (d) Un relaxosome (relaxase et protéines accessoires) coupe le plasmide F à son origine de transfert. La séparation des brins d'ADN débute.
- (e) Les protéines accessoires du relaxosome sont libérées. Le facteur de couplage reconnaît le complexe formé par le brin d'ADN et la relaxase et permet son transfert par le système de sécrétion.
- (f) Le complexe ADN/relaxase passe dans la cellule « receveuse » F<sup>-</sup>.
- (g) Dans chaque cellule, le brin d'ADN se réplique. On obtient deux cellules disposant du plasmide F dans son Intégrité (84).

### 5. Autres risques à explorer

Pour certaines souches soumises aux études préliminaires *in vitro*, il est également nécessaire de se pencher sur les questions des toxines et de l'activité hémolytique. En effet, si la souche à évaluer appartient à un genre ou une espèce connue pour sa production de toxines actives chez les mammifères, la synthèse de toxines doit impérativement être contrôlée. Il en va de même pour les souches issues de genres ou espèces à activité hémolytique connue (67).

### D. Etudes *in vivo* et essais cliniques

Une fois que la souche probiotique a prouvé *in vitro* qu'elle était sûre, les études *in vivo* peuvent être menées sur des modèles animaux et sur l'Homme. Leur but sera essentiellement de confirmer les activités probiotiques qui ont été explorées *in vitro*. Les études sur les animaux sont recommandées en première ligne, mais ne permettent pas toujours d'assurer que l'action du probiotique sera identique chez l'Homme.

Les études de sécurité peuvent alors être renforcées par des tests *in vivo* chez l'Homme. Ils correspondent ainsi à la phase I de l'essai clinique. Sur de petits groupes de sujets sains et généralement volontaires, on évalue la tolérance et l'absence d'effets indésirables. Pour les denrées alimentaires enrichies en probiotiques, aucun effet indésirable ne devrait être décelé.

La phase II permet ensuite de tester l'efficacité du probiotique et la dose optimale à administrer pour obtenir les effets positifs sur la santé de l'hôte. Ces études doivent préférentiellement être randomisées, en double aveugle et réalisées contre placebo. Les patients sont répartis de façon aléatoire dans les groupes expérimentaux et témoins, sans que les sujets ou les investigateurs n'aient connaissance de la distribution réalisée. De nombreux biais sont ainsi évités et on augmente la validité interne de l'étude. Elle pourra faire ressortir au mieux les preuves de l'activité du probiotique. Il faudrait également préférer les études multicentriques qui augmentent la crédibilité des résultats.

Les probiotiques inclus dans des produits d'alimentation ne nécessitent pas d'être évalués en phase III. Cette étape s'avère cependant incontournable pour les médicaments car elle permet de comparer l'efficacité du probiotique à un traitement de référence de la pathologie concernée, sur un vaste groupe de patients. Il est recommandé de la réaliser selon les mêmes modalités que celles citées pour la phase II : étude multicentrique, randomisée, en double aveugle et avec groupe contrôle, qui recevra ici la spécialité de référence.

Des tests statistiques permettent d'exploiter les résultats bruts des essais et d'assurer qu'ils sont significatifs, c'est-à-dire que le même résultat ne pourrait être obtenu par hasard.

## V. CADRES LÉGISLATIFS ET RÉGLEMENTAIRES DES PROBIOTIQUES

Les lois et règlements qui entourent la production et l'usage des probiotiques sont variables d'un pays à l'autre et il n'existe actuellement pas de statut particulier pour les probiotiques. Au niveau européen, ils peuvent être considérés selon plusieurs points de vue :

- médicaments lorsqu'ils disposent d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) ;
- compléments alimentaires ou additifs d'un aliment (tel qu'une préparation pour nourrissons), disposant éventuellement d'une allégation santé ;
- composants d'aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales (ADDFMS) lorsqu'ils sont employés dans le cadre d'un régime alimentaire particulier, soumis à contrôle médical ;
- dispositifs médicaux (DM) s'ils bénéficient du marquage CE.

### A. Médicaments avec AMM

Lorsque les probiotiques constituent le(s) principe(s) actif(s) d'un médicament, ils sont soumis aux lois et réglementations relatives aux produits pharmaceutiques du Code de la Santé Publique.

#### 1. Définition du médicament

Selon l'article L5111-1 du Code de la Santé Publique, modifié par la loi n°2007-248 du 26 février 2007, « *on entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique* » (85).

#### 2. Demande d'AMM

Afin d'obtenir le statut de médicament, un principe actif doit répondre aux critères de validation du dossier d'AMM déposé auprès de l'autorité compétente. Au niveau national, il s'agit de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) et au niveau

européen, de l'Agence Européenne du Médicament (EMA). Une procédure spécifique doit être suivie et permet de garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité du médicament (86).

Le dossier d'AMM constitué par le laboratoire pharmaceutique doit comporter différentes parties rassemblant les données nécessaires à l'évaluation du futur médicament par l'autorité compétente. Une première partie porte sur la qualité et explique les méthodes d'obtention du principe actif et du produit fini, ainsi que les points de contrôle utilisés lors de la fabrication, dont les méthodes justifiant la reproductibilité du procédé (86).

Une seconde partie concerne la sécurité du principe actif et du produit fini. Elle rassemble les études *in vivo* réalisées chez l'animal et les données obtenues sur les plans pharmacodynamique, pharmacocinétique et toxicologique (86).

La troisième et dernière partie du dossier d'AMM renseigne les résultats des études cliniques réalisées. Elle permet à l'autorité compétente de définir le rapport bénéfice/risque du médicament, qui doit impérativement être favorable pour que le produit soit commercialisé (86).

Le résumé des caractéristiques du produit (RCP), ainsi que la notice destinée au patient et les informations concernant l'étiquetage doivent également figurer dans le dossier d'AMM. Ces éléments ont pour but de garantir le bon usage du médicament par le corps médical et le patient lui-même (86).

En Europe, la mise sur le marché des médicaments étant communautaire depuis 1998, les procédures nationales sont de moins en moins employées. Elles continuent cependant d'être utilisées pour le maintien des AMM historiquement délivrées en France. Différentes procédures sont accessibles pour les laboratoires désirant déposer un dossier d'AMM au niveau européen. La procédure centralisée consiste à déposer la demande auprès de l'EMA : la validation du dossier engendre l'obtention d'une AMM valable auprès de tous les Etats membres de l'Union Européenne. La procédure de reconnaissance mutuelle permet au laboratoire de ne réaliser le dépôt du dossier qu'auprès d'un seul Etat membre. Si celui-ci le valide, l'autorisation est ensuite étendue aux autres Etats. Finalement, la procédure décentralisée oblige le laboratoire à déposer la demande auprès de tous les Etats membres. Un seul d'entre eux est désigné comme référence et étudie le dossier. S'il accorde l'AMM, le médicament pourra être commercialisé en même temps dans tous les autres Etats membres (86).



## **B. Compléments alimentaires contenant des probiotiques**

Le statut de complément alimentaire et nutritionnel est amplement retrouvé lorsqu'on parle de probiotiques. Les compléments alimentaires sont considérés comme des denrées alimentaires et doivent de ce fait répondre aux exigences du droit alimentaire en matière de sécurité, composition et information.

Des dispositions particulières, énoncées dans le décret n°2006-352 du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires, s'ajoutent à ces règles générales. Le droit français de ce secteur découlant en partie du droit européen, les définitions et dispositions ci-après exposées se retrouvent également dans la directive 2002/46/CE du Parlement européen et du Conseil du 10 juin 2002 relative au rapprochement des législations des Etats membres concernant les compléments alimentaires (87).

### **1. Définition du complément alimentaire**

Selon l'article 2 du décret n°2006-352 du 20 mars 2006, *« on entend par compléments alimentaires les denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisés sous forme de doses, à savoir les formes de présentation telles que les gélules, les pastilles, les comprimés, les pilules et autres formes similaires, ainsi que les sachets de poudre, les ampoules de liquide, les flacons munis d'un compte-gouttes et les autres formes analogues de préparations liquides ou en poudre destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité »* (88).

Sont définis comme « nutriments », les composés vitaminiques et minéraux. Les « substances à but nutritionnel ou physiologique » rassemblent quant à elles les produits chimiquement définis qui justifient d'effets nutritionnels ou physiologiques, à l'exclusion des nutriments précédemment définis et des composés aux seules propriétés pharmacologiques (88). Les probiotiques entrent dans la catégorie des substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique.

En sus des ingrédients actifs, l'article 4 du décret prévoit que tous les autres ingrédients, additifs, arômes et auxiliaires technologiques autorisés en alimentation humaine puissent également entrer dans la composition des compléments alimentaires (89).

## 2. Déclaration de première mise sur le marché français

Pour pouvoir commercialiser un complément alimentaire, le laboratoire doit obligatoirement déclarer le nouveau produit auprès de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF), conformément aux articles 15 et 16 du décret n°2006-352 du 20 mars 2006 (90) (91). L'article 16 correspond aux substances non commercialisées en France, mais autorisées dans d'autres Etats membres de l'Union Européenne, pour lesquelles le laboratoire cherche à obtenir la reconnaissance mutuelle (91).

La déclaration de première mise sur le marché français d'un complément alimentaire doit comporter un modèle de son étiquetage et les informations justifiant le bien-fondé de la demande. La déclaration doit être réalisée séparément pour chaque produit, chacune de ses compositions en ingrédients actifs et chacune de ses formes galéniques (par exemple : gélules, liquide en flacon compte-gouttes, comprimés ...). Toute modification du complément alimentaire devrait également faire l'objet d'une nouvelle déclaration de mise sur le marché (92).

Suivant l'article 3 de ce même décret n°2006-352, les substances entrant dans la composition des compléments alimentaires doivent impérativement conduire à la fabrication de produits sûrs et non préjudiciables à la santé du consommateur. Pour ce faire, les évaluations de sécurité doivent être menées par le responsable de la mise sur le marché des produits et les résultats des investigations nécessitent d'être communiqués à la DGCCRF (93).

## 3. Allégations santé

Contrairement aux médicaments qui peuvent prétendre traiter et réguler les pathologies, les compléments alimentaires ne peuvent que faire l'objet d'allégations. Au niveau européen, ces allégations ont été définies et les règles qui les encadrent harmonisées, grâce au règlement n° 1924/2006 du Parlement européen et du Conseil du 20 décembre 2006 concernant les allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires. Ce règlement a pour but de garantir le bon fonctionnement du marché européen tout en assurant la protection des consommateurs.

Pour commencer, rappelons qu'une allégation correspond à : *« tout message ou toute représentation, non obligatoire en vertu de la législation communautaire ou nationale, y compris une représentation sous la forme d'images, d'éléments graphiques ou de symboles, quelle qu'en soit la forme, qui affirme, suggère ou implique qu'une denrée alimentaire possède des caractéristiques particulières »* (94).

En ce sens, il est possible de déterminer trois types principaux d'allégations, qui peuvent être indiqués sur l'étiquetage et les supports publicitaires des compléments alimentaires (94) :

- les allégations nutritionnelles : elles impliquent que la denrée alimentaire considérée a des propriétés nutritionnelles bénéfiques de par sa valeur énergétique et sa composition en termes de nutriments ou autres substances actives ;
- les allégations santé : elles permettent de justifier le lien entre la denrée alimentaire ou l'un de ses constituants et la santé de l'individu qui la consomme ;
- les allégations relatives à la réduction d'un risque de maladie : elles entérinent la relation entre la consommation de la denrée alimentaire ou de l'un de ses constituants et la diminution de facteurs de risques de développement d'une pathologie chez l'Homme.

Les différentes allégations sont autorisées par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (European Food Safety Authority - EFSA), secondée en France par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES).

Bien entendu, l'emploi de ces allégations n'est autorisé que si les preuves scientifiques confirment les effets nutritionnels et/ou physiologiques bénéfiques de la substance considérée. Les Autorités compétentes de chaque pays peuvent demander à consulter les données obtenues lors des études d'activité effectuées par le responsable de la mise sur le marché du produit. En France, il s'agit de la DGCCRF. Il faut également que le composé soit présent en quantités significatives, c'est-à-dire provoquant l'effet positif attendu, et sous une forme biodisponible dans le complément alimentaire. L'allégation doit, de plus, être facilement compréhensible pour le consommateur (94).

Les Autorités européennes, représentées par l'EFSA et la Commission européenne, se sont prononcées en 2012 sur la légitimité de nombreuses allégations santé d'aliments et de compléments alimentaires. Un rigoureux examen des données scientifiques fournies par les fabricants leur a permis d'évaluer les allégations santé et de déterminer lesquelles peuvent être employées (95).

En décembre 2007, le Comité permanent sur la chaîne alimentaire et la santé animale de la Commission européenne a publié ses conclusions relatives à la mise en œuvre du règlement n° 1924/2006 (96). Il soulève quelques problèmes posés par le règlement initialement proposé et y apporte les solutions pratiques. Pour certaines allégations, une différence est à faire selon le nutriment ou la substance concernée. Ainsi, en ce qui concerne l'allégation « *contient [nom*

*du nutriment ou d'une autre substance]* », il est important de faire la différence entre les deux catégories d'allégations possiblement retrouvées (96) :

- si la dénomination de la substance ne contient que des informations factuelles, il s'agit d'une allégation nutritionnelle. Par exemple : « *contient de la vitamine C* » ;
- si la dénomination de la substance décrit l'une de ses fonctions ou son implication sur la santé, il s'agit d'une allégation de santé. Par exemple : « *contient un antioxydant* ».

De cette manière, l'allégation « *contient des probiotiques* » est une allégation de santé car la définition sous-entendue par le terme « *probiotiques* » décrit une relation directe entre leur consommation et la santé.

### 4. Etiquetage

Les compléments alimentaires suivent les règles d'étiquetage des denrées alimentaires au sens large, imposées par le Règlement n°1169/2011 du Parlement européen et du Conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires. Les indications portées sur le conditionnement permettent au consommateur de disposer d'informations essentielles, obligatoirement lisibles et compréhensibles, tout en garantissant sa protection (97).

D'après la Consultation mixte d'experts FAO/OMS de 2002, l'étiquetage des denrées alimentaires contenant des probiotiques devrait comporter l'identification précise du ou des probiotique(s) :

- nom(s) de genre(s) ;
- espèce(s) ;
- souche(s) présente(s).

La quantité minimale viable de chaque souche au terme de la durée de conservation devrait également apparaître, au même titre que l'allégation santé du produit si elle existe et le nombre d'unités de prise permettant d'obtenir l'effet escompté. Les conditions de stockage du produit ainsi que les coordonnées du fabricant ou de l'exploitant devraient aussi être données (52).

## C. Préparations pour nourrissons et préparations de suite

Les préparations pour nourrissons et les préparations de suite sont des denrées alimentaires destinées à une alimentation particulière. Les règles qui leur sont relatives sont harmonisées au niveau européen par la Directive 2009/39/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 mai 2009, ainsi que par la Directive 2006/141/CE de la Commission des Communautés européennes du 22 décembre 2006.

### 1. Définitions

Les denrées alimentaires destinées à une alimentation particulière sont définies par la Directive 2009/39/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 mai 2009 comme étant : « *des denrées alimentaires qui, du fait de leur composition particulière ou du processus particulier de leur fabrication, se distinguent nettement des denrées alimentaires de consommation courante, qui conviennent à l'objectif nutritionnel indiqué et qui sont commercialisées de manière à indiquer qu'elles répondent à cet objectif* » (98).

Selon la Directive 2006/141/CE de la Commission des Communautés européennes du 22 décembre 2006, les préparations pour nourrissons correspondent aux « *denrées alimentaires destinées à l'alimentation particulière des nourrissons pendant les premiers mois de leur vie et répondant à elles seules aux besoins nutritionnels de ces nourrissons jusqu'à l'introduction d'une alimentation complémentaire appropriée* » (99). Ce sont donc les laits dits « premier âge », pouvant être utilisés chez les nourrissons de la naissance à six mois.

Les préparations de suite sont quant à elles des « *denrées alimentaires destinées à l'alimentation particulière des nourrissons lorsqu'une alimentation complémentaire appropriée est introduite et constituant le principal élément liquide d'une alimentation progressivement diversifiée de ces nourrissons* » (99). Sous ce nom sont donc rassemblés les laits « deuxième âge », pour les nourrissons de six à douze mois, ainsi que les laits « croissance » pouvant être employés chez les jeunes enfants jusqu'à trois ans.

### 2. Composition

La Directive 2006/141/CE de la Commission des Communautés européennes du 22 décembre 2006 précise que les préparations pour nourrissons et les préparations de suite destinées aux nourrissons en bonne santé sont fabriqués à partir de lait de vache ou de soja, auquel sont

ajoutés diverses substances alimentaires telles que des vitamines, des éléments minéraux ou des acides aminés autorisés par la Directive (99).

Les préparations ne doivent présenter aucun composant susceptible de nuire à la santé des nourrissons ou des jeunes enfants (99).

### **3. Allégations santé**

Tout comme les compléments alimentaires, les préparations pour nourrissons et les préparations de suite peuvent faire l'objet d'allégations autorisées par l'EFSA. Elles peuvent ainsi présenter des allégations nutritionnelles, des allégations santé et/ou des allégations relatives à la réduction d'un risque de maladie (94) (99).

Dans le cas des probiotiques, ce sont les allégations santé qui sont principalement recherchées par les fabricants.

### **4. Commercialisation et étiquetage**

Pour mettre sur le marché une préparation pour nourrisson ou une préparation de suite, le fabricant ou l'importateur doit fournir à l'Autorité compétente du pays concerné un modèle de l'étiquetage du produit. En France, l'Autorité compétente est la DGCCRF (99).

Comme les compléments alimentaires, les différentes préparations suivent les règles d'étiquetage imposées par le Règlement n°1169/2011 du Parlement européen et du Conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires (97).

D'autres mentions sont rendues obligatoires par la Directive 2006/141/CE, concernant notamment la valeur énergétique, les teneurs en nutriments, vitamines et minéraux, ainsi que les instructions nécessaires au bon usage des préparations. Pour les préparations pour nourrissons, l'étiquetage doit préciser que le produit convient à l'alimentation des nourrissons dès la naissance, dans le cas où ils ne sont pas allaités. La supériorité de l'allaitement maternel par rapport à tout allaitement artificiel doit également être mentionnée sur les conditionnements (99).

Pour les préparations de suite, il doit être indiqué que le produit convient à l'alimentation des nourrissons à partir de six mois et qu'il doit être utilisé dans le cadre d'une alimentation diversifiée, sur avis de spécialistes du domaine des soins maternels et infantiles (99).

Il convient également de préciser qu'en Europe, les préparations pour nourrisson ne peuvent faire l'objet d'aucune publicité grand public. Seules les publications destinées à la communauté scientifique ou aux spécialistes de la puériculture sont autorisées. La publicité pour les préparations de suite est autorisée (99).

### **D. Aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales (ADDFMS)**

Plusieurs aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales sont actuellement vecteurs de probiotiques. Il est important de rappeler quelles exigences spécifiques ces produits doivent suivre au niveau européen.

#### **1. Définition**

Selon l'article L5137-1 du Code de la Santé Publique, modifié par l'Ordonnance 2007-613 du 26 avril 2007, « *On entend par aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales les aliments destinés à une alimentation particulière qui sont spécialement traités ou formulés pour répondre aux besoins nutritionnels des patients. Ils sont destinés à constituer l'alimentation exclusive ou partielle des patients dont les capacités d'absorption, de digestion, d'assimilation, de métabolisation ou d'excrétion des aliments ordinaires ou de certains de leurs ingrédients ou métabolites sont diminuées, limitées ou perturbées, ou dont l'état de santé appelle d'autres besoins nutritionnels particuliers qui ne peuvent être satisfaits par une modification du régime alimentaire normal ou par un régime constitué d'aliments destinés à une alimentation particulière ou par une combinaison des deux. Ils ne peuvent être utilisés que sous contrôle médical* » (100).

#### **2. Classification et composition**

La Directive 1999/21/CE de la Commission européenne du 25 mars 1999 classe les ADDFMS en trois catégories distinctes. En premier lieu, nous retrouvons les aliments complets d'un point de vue nutritionnel, qui peuvent constituer l'alimentation exclusive des patients auxquels ils sont dédiés. Les aliments complets sur le plan nutritionnel pour nourrissons sont classés dans cette catégorie (101).

En second lieu, la directive place les aliments complets d'un point de vue nutritionnel, dont la composition permet de répondre aux besoins liés à une pathologie donnée, et qui peuvent être

employés dans ce cadre en tant qu'alimentation exclusive, en remplacement d'une partie du régime habituel, ou en complément de ce régime (101).

Finalement, la troisième catégorie correspond aux aliments incomplets du point de vue nutritionnel, utilisés uniquement en remplacement d'une partie du régime habituel ou en complément de ce régime, en réponse aux besoins propres d'une pathologie ou d'un état donné. Dans cette classe, nous retrouvons les solutés de réhydratation orale (SRO), employés dans le traitement des diarrhées aiguës du nourrisson (101).

La composition des ADDFMS doit suivre les règles spécifiées dans la Directive 1999/21/CE de la Commission européenne du 25 mars 1999, de manière à ce que leur utilisation soit sûre et efficace lorsque celle-ci suit les indications du fabricant. Les besoins nutritionnels spécifiques des patients bénéficiant de ces ADDFMS doivent être parfaitement couverts. Les règles de composition énoncées par la Commission européenne sont basées sur de solides données scientifiques, médicales et nutritionnelles (101).

### 3. Commercialisation et étiquetage

Les Etats membres doivent veiller à ce que les ADDFMS ne puissent être commercialisés au sein de l'Union européenne que s'ils répondent aux spécifications et suivent les règles imposées par la Directive 1999/21/CE de la Commission européenne du 25 mars 1999.

L'étiquette de l'ADDFMS doit présenter les différentes notions demandées par le Règlement n°1169/2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires, établi par le Parlement européen et le Conseil (97). Elle doit porter la mention « *Aliment diététique destiné à des fins médicales spéciales* » en toutes lettres et dans l'une des langues officielles de l'Union européenne, appropriée au pays dans lequel le produit est commercialisé. D'autres mentions obligatoires sont listées par la Directive 1999/21/CE, concernant notamment la valeur énergétique disponible, la teneur en vitamines, minéraux et éléments nutritifs de l'ADDFMS (101).

Certaines notions spécifiques doivent être précédées de la mention « *Avis important* » afin d'alerter le consommateur, notamment lorsque le produit doit être utilisé sous contrôle médicale, ou lorsqu'il ne doit être administré que dans des cas pathologiques précis, ou pour une gamme d'âge donnée. Le cas échéant, les indications précises de l'ADDFMS doivent être spécifiées, ainsi que ses éventuelles précautions d'emploi et contre-indications. Les conditions de préparation, utilisation et conservation du produit sont impérativement notées sur son conditionnement (101).



## **E. Dispositifs médicaux (DM) contenant des probiotiques**

Les probiotiques peuvent être inclus dans un produit disposant du statut de dispositif médical. Voyons quelles caractéristiques celui-ci doit remplir pour être commercialisé en France et en Europe.

### **1. Définition**

Selon l'article L.5211-1 du Code de la Santé Publique, on entend par dispositif médical (DM) *« tout instrument, appareil, équipement, matière, produit, à l'exception des produits d'origine humaine, ou autre article utilisé seul ou en association, y compris les accessoires et logiciels nécessaires au bon fonctionnement de celui-ci, destiné par le fabricant à être utilisé chez l'homme à des fins médicales et dont l'action principale voulue n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens. Constitue également un dispositif médical le logiciel destiné par le fabricant à être utilisé spécifiquement à des fins diagnostiques ou thérapeutiques »* (102).

### **2. Classification**

Les DM sont groupés en quatre classes de produits selon les risques potentiels qu'ils présentent pour le corps humain (103) :

- Classe I : dispositifs présentant un risque faible pour la santé ;
- Classe IIa : dispositifs présentant un risque potentiel modéré et mesuré pour les utilisateurs ;
- Classe IIb : DM présentant un risque potentiel élevé ;
- Classe III : DM présentant le plus haut niveau de risque.

La classe du DM est déterminée par le fabricant, qui s'appuie pour ce faire sur la Directive 93/42/CEE du Conseil des Communautés Européennes du 14 juin 1993 relative aux dispositifs médicaux. La classe est directement dépendante des revendications médicales faites pour le dispositif (103) (104).

### 3. Marquage CE et mise sur le marché des DM

La mise sur le marché d'un DM est conditionnée à l'obtention préalable du marquage CE. Celui-ci traduit la conformité du dispositif aux exigences de santé et de sécurité spécifiées dans les textes de loi européens.

Le fabricant est responsable de la mise sur le marché de son dispositif, quelle qu'en soit la classe. En ce sens, il doit constituer un dossier technique prouvant que le DM remplit les objectifs fixés par la législation. D'une part, le dispositif ne doit ni altérer l'état de santé des patients, ni compromettre la sécurité des divers utilisateurs. D'autre part, les performances revendiquées doivent être réellement atteignables et le rapport bénéfice/risque doit être acceptable. Une évaluation clinique doit donc être réalisée, soit sous la forme d'un essai clinique, soit par analyse critique de la littérature en cas d'équivalence démontrée avec un ou d'autre(s) DM(s) existant(s) (103) (104).

Pour les DM de classe I, le marquage CE peut être apposé sur le dispositif suite à une auto-certification par le fabricant. Pour les DM de classe IIa, IIb et III, le fabricant doit faire appel à un organisme notifié qui va évaluer la conformité du DM aux exigences essentielles définies par la Directive européenne 93/42/CEE avant de délivrer le marquage CE (103) (104).

L'organisme notifié est un organisme tiers, indépendant, intègre, impartial, formé et compétent. Les différents organismes auxquels les fabricants peuvent faire appel sont désignés et évalués par les Autorités compétentes de chaque état membre de l'Union européenne. En France, l'Autorité compétente est l'ANSM. Une fois le DM évalué par l'organisme notifié, celui-ci dresse un certificat de conformité qui permet au fabricant d'apposer le marquage CE. Le dispositif peut alors être mis sur le marché, où il sera surveillé par l'Autorité compétente du pays concerné (ANSM en France) (103).

## VI. MÉCANISMES D'ACTION DES PROBIOTIQUES : DES EFFETS SOUCHE-DÉPENDANTS

À l'instar des microorganismes composant le microbiote intestinal, les probiotiques sont nombreux et très différents les uns des autres. Leurs constitutions génétique et phénotypique leur confèrent des caractéristiques propres qui influent sur leurs effets *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, chaque genre, chaque espèce et *a fortiori* chaque souche est responsable d'effets biologiques spécifiques, qu'il n'est pas possible d'extrapoler aux autres souches proches sans les avoir préalablement étudiés.

### A. Pharmacocinétique des probiotiques administrés *per os*

On admet qu'un probiotique apte à surmonter les obstacles de la digestion est capable d'avoir une action à un niveau donné du tube digestif. L'étude pharmacocinétique des probiotiques permet ainsi d'avoir une vue d'ensemble de leur capacité de survie dans le tube digestif et de leur aptitude à coloniser le milieu.

#### 1. Capacité de survie dans le tube digestif

Lorsqu'un aliment est ingéré, les mécanismes de la digestion permettent sa transformation en nutriments assimilables par l'organisme. De la même façon, des probiotiques apportés par voie orale risquent eux aussi d'être altérés lors de leur passage dans les différentes portions du tube digestif et leur capacité de survie détermine directement leurs effets *in situ*. L'acidité gastrique et les sels biliaires constituent les deux principaux obstacles que les souches probiotiques doivent franchir pour jouer leur rôle au niveau de l'intestin grêle et du côlon. Ces deux paramètres font d'ailleurs partie des essais *in vitro* de sélection des souches probiotiques.

##### a. Acido-résistance

Il existe un mécanisme par lequel les bactéries s'adaptent à des pH inhabituellement bas, appelé *Acid Tolerance Response* (ATR). L'ATR met en jeu la transcription de certains gènes, avec synthèse d'enzymes et de protéines protectrices pour le microorganisme. Elles lui permettent par exemple d'éliminer les protons de son cytoplasme grâce à des pompes à ATP spécifiques ou de produire des ions ammoniac qui tamponnent le milieu cellulaire et y maintiennent un pH alcalin (105).

L'ATR peut être déclenché par une pré-exposition des probiotiques à des milieux acides avant leur incorporation dans la matrice qui est ingérée. Ainsi, lorsque les microorganismes rencontrent le pH acide de l'estomac, les mécanismes d'ATR sont fonctionnels et leur permettent de transiter sans encombre jusqu'à l'iléon (105).

Notre étude bibliographique a pu recenser quelques publications portant sur l'étude *in vivo* de l'acido-résistance de diverses souches probiotiques. Par exemple, Saarela *et al.* montrent que pour les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, la réponse au stress acide est espèce et souche-dépendante (106). Par ailleurs, les lactobacilles disposent naturellement d'une plus grande capacité de résistance au pH acide que les bifidobactéries (105).

L'essai contrôlé et randomisé mené par Collins *et al.* en 2002 met en évidence que *Lactobacillus salivarius* UCC118 est retrouvée dans la portion proximale de l'iléon à hauteur de  $10^{6,3}$  UFC/mL après ingestion d'une dose quotidienne de lait fermenté contenant  $10^{10,2}$  UFC. La souche dispose donc de mécanismes de résistance au pH acide de l'estomac, avec un taux de survie moyen estimé à 11,8 % (107).

Parmi les bifidobactéries, l'espèce *Bifidobacterium animalis* possède une résistance naturellement élevée à des pH acides tels que le pH gastrique. *Bifidobacterium longum* BL1 met également en jeu un mécanisme d'ATR qui lui permet de résister à des pH inférieurs à 3 (105). Concernant la souche *Bifidobacterium lactis* Bb12, l'ingestion de  $10^{10}$  UFC permet d'augmenter le taux de bifidobactéries iléales de  $10^{2,2}$  à  $10^{6,4}$  UFC/mL, avec un taux de survie de 23,5 %. La souche de *Bifidobacterium bifidum* contenue dans les produits fermentés Ofilus® dispose quant à elle d'un taux de survie au passage gastrique de 37,5 % (32).

Les bactéries du yaourt telles que *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* résistent peu au passage gastrique. En effet, dès 1985, une étude met en évidence que ces bactéries rejoignent l'iléon chez seulement un quart des sujets après consommation de 500 mL de yaourt (32). Quelques années plus tard, Pochart *et al.* réalisent des prélèvements duodénaux chez des individus ayant consommé du yaourt contenant  $10^{11}$  UFC de ces deux espèces : seul 1 % des bactéries y sont retrouvées vivantes (108).

De même, la souche *Lactococcus lactis* MG1363 semble moins bien résister à l'acidité gastrique que d'autres bactéries lactiques. En effet, à peine 1% des microorganismes ingérés sont retrouvés vivants dans l'iléon après ingestion de  $10^{10,2}$  UFC (32).

### **b. Bilio-résistance et survie fécale**

Les acides biliaires facilitent non seulement la digestion mais ils jouent également un rôle antimicrobien, sélectionnant les microorganismes lors de l'établissement du microbiote intestinal. Ils sont capables de déstabiliser leurs phospholipides membranaires, de détériorer leurs protéines de surface et de perturber leur homéostasie cellulaire. Seules les bactéries tolérantes aux acides biliaires sont capables de transiter vivantes dans l'intestin et de le coloniser.

Contrairement au milieu gastrique, le milieu intestinal combine un ensemble de facteurs potentiellement bactéricides. De ce fait, peu d'études *in vivo* mesurent la résistance des probiotiques aux seuls acides biliaires. Les résultats montrent plus généralement la tolérance ou non tolérance au passage intestinal.

À titre d'exemple, l'étude de la survie fécale de *Lactobacillus rhamnosus* GG montre que ce probiotique résiste bien au passage intestinal. En effet, après ingestion quotidienne de  $1,6 \cdot 10^{11}$  UFC de la souche dans du lactosérum, on retrouve  $10^{7,7}$  UFC/ g de fèces (109).

Les essais *in vitro* de Shinoda *et al.* confirment que des extraits fécaux contenant des acides biliaires n'ont pas d'effet bactéricide sur la souche *Lactobacillus rhamnosus* GG. À l'inverse, ces mêmes extraits fécaux diminuent significativement le nombre de *Lactobacillus helveticus* CP53 dénombrés (110). La résistance au milieu intestinal et, *a fortiori* aux acides biliaires, n'est donc pas identique entre ces deux lactobacilles.

En raison de leur faible survie au passage des voies digestives hautes, le devenir des bactéries du yaourt *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* a peu été exploré en aval de l'iléon. Il en va de même pour *Lactococcus lactis* (32).

La composition globale de la bactérie, la présence d'une enveloppe ou d'un exo-polymère sont autant de facteurs qui augmentent sa bilio-résistance. Les études prouvent une fois encore que la résistance à la bile est une caractéristique souche-dépendante. Néanmoins, les mécanismes mis en jeu par les micro-organismes restent majoritairement méconnus. Comme pour l'ATR, une pré-exposition à de faibles concentrations de bile lors de la préparation des probiotiques peut déclencher une réelle bilio-résistance ultérieure (105).

## 2. Influence du milieu vecteur et de la galénique sur la survie des probiotiques

*Lactobacillus rhamnosus* GG est un probiotique largement étudié qui dispose d'une capacité de résistance acide importante. Goldin et ses collaborateurs ont montré qu'il existait une différence de son taux de survie en fonction du milieu transportant le probiotique. Le lactosérum confère un taux de survie plus important à la souche qu'un lait fermenté ou qu'un lait contenant un concentré congelé de probiotiques. En effet, le passage gastrique est facilité par le pouvoir tampon du lactosérum, qui est plus élevé que celui du lait fermenté (109).

Les aliments sont fréquemment utilisés comme vecteurs pour apporter les probiotiques dans l'organisme. Nombre de publications mettent en avant le rôle prépondérant du type de denrée alimentaire utilisé dans la survie, le développement et l'action des probiotiques. Les produits laitiers tels que les laits fermentés, les yaourts et les fromages, restent les principales matrices alimentaires utilisées pour transporter les microorganismes d'intérêt dans le tube digestif.

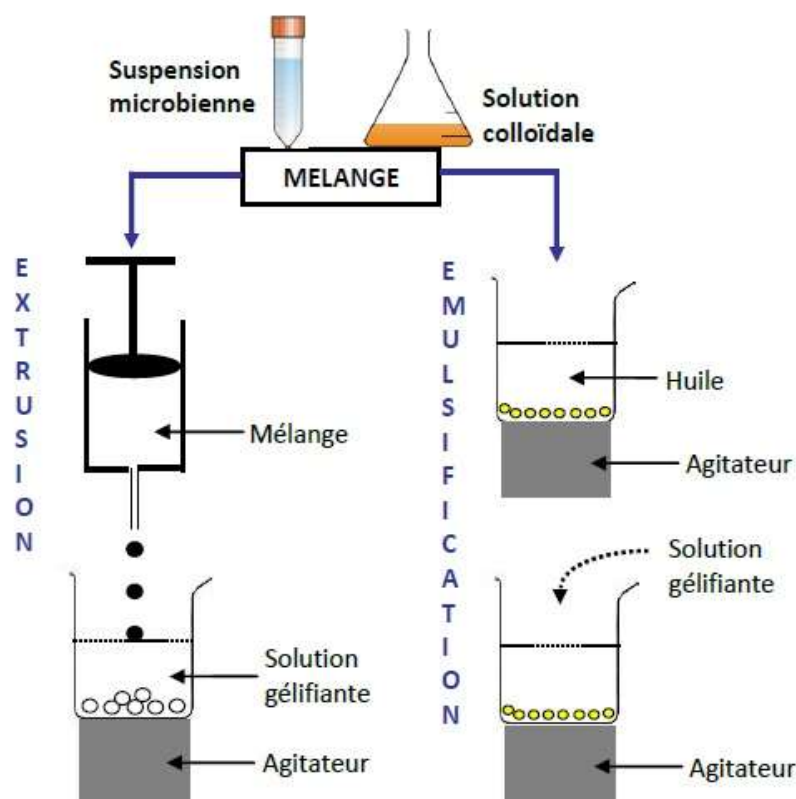
D'autres types d'aliments peuvent également être employés comme vecteurs de probiotiques, notamment des produits céréaliers ainsi que des jus de fruits ou de légumes. En raison de l'importante prévalence des intolérances au lactose et des allergies aux protéines de lait de vache (APLV), l'intérêt des industriels pour ces « nouvelles » matrices alimentaires se développe de manière considérable. Dans tous les cas, le pH de la denrée, sa teneur en acides gras, l'ajout de prébiotiques à sa formule, ou le pouvoir antioxydant de ses ingrédients sont autant de paramètres qui peuvent influencer sur la survie des probiotiques au sein du produit lui-même, puis au sein du tractus digestif (111).

Dans un autre contexte, en 2002, une étude portant sur la souche *Propionibacterium freundenreichii* Propiofidus® SI41 met en évidence que l'inclusion de  $10^{9,6}$  UFC dans des gélules acido-résistantes permet d'obtenir une concentration fécale égale à celle obtenue avec des gélules classiques contenant dix fois plus d'UFC (112). Les gélules acido-résistantes, également appelées gastro-résistantes, semblent donc être un bon moyen d'apporter des probiotiques sensibles au pH gastrique jusque dans l'intestin grêle, où ils pourront alors exercer leurs effets.

En outre, les récentes évolutions des procédés d'encapsulation des principes actifs permettent d'amener des probiotiques intacts directement dans l'intestin grêle ou dans le côlon. L'encapsulation vise en effet à introduire des composants bioactifs tels que les microorganismes probiotiques dans une matrice assurant leur transport et leur protection, tout en contrôlant leur libération (113). De nombreuses méthodes d'encapsulation sont aujourd'hui employées et reposent sur trois étapes successives :

- Première étape : l'élément bioactif est incorporé dans la matrice choisie ;
- Deuxième étape : des procédés mécaniques permettent d'encapsuler les composés ;
- Troisième étape : le système est stabilisé par des procédés chimiques ou physico-chimiques (113).

Parmi les différentes techniques existantes, l'extrusion et l'émulsification sont particulièrement adaptées à l'encapsulation des probiotiques (**Figure 35**). Ce sont des méthodes douces qui n'altèrent pas les cellules (113).



**Figure 35 : Encapsulation des microorganismes par les techniques d'extrusion et d'émulsification (113)**

Une suspension contenant les probiotiques est mélangée à une solution colloïdale.

Dans le procédé d'extrusion, le mélange est placé dans un dispositif permettant de former des gouttelettes. Elles tombent dans une solution gélifiante, sous faible agitation, afin de former de petites billes gélifiées contenant les probiotiques (113).

Dans le procédé d'émulsification, le mélange est dispersé dans un plus grand volume d'huile végétale, sous agitation. Un agent gélifiant est ensuite ajouté à l'émulsion pour former des capsules contenant les probiotiques (113).

En plus de protéger les probiotiques, les matériaux utilisés doivent être biocompatibles et non toxiques pour l'organisme qui les ingère. Le choix des matériaux se porte donc préférentiellement sur des polymères naturels, d'origine végétale ou animale (113). Le tableau suivant donne quelques exemples de polymères naturels utilisés dans les méthodes d'encapsulation (*Tableau VII*).

Tableau VII : Exemples de polymères naturels pouvant être utilisés dans les procédés d'encapsulation (113)

Origine	Nature du polymère		
	Polysaccharide	Protéine	Lipide
<b>Végétale</b>	Agarose Alginate Amidon Caroube Carraghénane Cellulose Gomme arabique Gomme guar Pectine	Gluten	Cires Huile de palme hydrogénée Huile de ricin hydrogénée Lécithine de soja
<b>Animale ou bactérienne</b>	Chitosan Dextran Gomme gellane Gomme xanthane	Albumines Caséines Collagène Gélatine Protéines de lactosérum	

Dans le cas des gélules acido-résistantes et de l'encapsulation, la forme galénique permettrait de déterminer le lieu d'action de la souche. Il ne serait donc plus nécessaire de sélectionner les probiotiques selon leurs acido- et bilio-résistances.



### 3. Importance de la dose administrée

Comme nous venons de le voir, la totalité des probiotiques ingérée n'arrive pas intacte dans l'intestin grêle ou le côlon. Malgré les mécanismes de résistance aux étapes de la digestion, une partie de ces microorganismes est altérée ou tuée. Il est donc important de connaître la dose minimale de probiotiques à administrer pour obtenir un effet bénéfique dans le système digestif.

Prenons le cas de la souche *Lactobacillus rhamnosus* GG. Dans l'étude de Goldin *et al.* exposée précédemment, on constate que quel que soit le vecteur utilisé pour l'administration du probiotique, des bactéries vivantes sont retrouvées dans les selles. Les doses ingérées, de l'ordre de  $10^{10}$  à  $10^{11}$  UFC, sont donc ici suffisantes pour assurer la présence du microorganisme vivant dans le tube digestif (109).

Dans une autre étude portant sur cette même souche bactérienne,  $1,6.10^8$  UFC consommées quotidiennement ne permettent pas de détecter le probiotique vivant dans les échantillons de fèces, tandis qu'une dose de  $1,2.10^{10}$  UFC permet de le retrouver à une concentration moyenne de  $10^6$  UFC/g de selles (114).

Nous pouvons donc en conclure qu'une dose quotidienne minimale de  $10^{10}$  UFC de *Lactobacillus rhamnosus* GG devrait être administrée pour obtenir l'action probiotique *in vivo*.

La dose optimale de microorganismes à apporter pour obtenir les effets bénéfiques attendus est évaluée lors de la phase II des essais cliniques des médicaments et compléments alimentaires contenant des probiotiques. Il est généralement admis que pour être actifs dans l'intestin grêle, les probiotiques doivent y être retrouvés vivants à hauteur de  $10^6$  UFC/mL de chyme. De même, leur activité colique est reconnue pour des concentrations de l'ordre de  $10^8$  UFC/g de contenu. Ces valeurs « théoriques » reposent toutefois sur peu de bases scientifiques et demanderaient à être expérimentalement réévaluées.

### 4. Colonisation du tube digestif et persistance de la souche après administration

La majorité des publications étudiées montre qu'il n'existe pas de réelle colonisation de l'intestin par les probiotiques. Après leur administration, la plupart des souches probiotiques sont rapidement évacuées par le tube digestif. Quelques exceptions montrent une persistance de la souche dans les selles ou au niveau de la muqueuse colique après arrêt de l'administration.

C'est le cas de *Lactobacillus rhamnosus* GG qui est retrouvé dans les fèces de 33 % des individus sept jours après arrêt de la consommation d'une dose quotidienne moyenne de

$10^{11}$  UFC (109). Après quatorze jours, la bactérie vivante n'est plus détectable. Des recherches au niveau de la muqueuse colique permettent toutefois de retrouver la souche probiotique jusqu'à vingt-huit jours après arrêt de l'ingestion (115). Ces résultats traduisent une persistance du microorganisme dans l'intestin, très certainement liée à sa multiplication *in situ*.

Collins *et al.* ont également testé la persistance fécale de *Lactobacillus salivarius* UCC118. Le probiotique a été ingéré durant trois semaines à raison de  $10^{10}$  UFC/jour. Selon les auteurs, la souche probiotique reste décelable dans les fèces de 20 % des patients durant vingt-et-un jours après arrêt de la consommation. Pour l'un d'entre eux, la souche UCC118 est encore retrouvée vivante dans les selles six mois plus tard (107).

L'équipe de Bouhnik a étudié la souche de *Bifidobacterium bifidum* des produits Ofilus®. Après administration quotidienne de  $10^{11,5}$  UFC durant huit jours, la concentration fécale du probiotique diminue progressivement jusqu'à ce qu'il ne soit plus détectable, huit jours après l'arrêt de la consommation (116).

En conclusion, quelques cas montrent une colonisation durable de la muqueuse intestinale ou des fèces par des probiotiques. Toutefois, la majorité des souches probiotiques ne persiste dans le tube digestif que pendant la période d'ingestion, puis en sont éliminées en de brefs délais.

### **B. Pharmacologie des probiotiques administrés *per os***

Les tentatives de traitement et de prévention des pathologies digestives par les probiotiques ont longtemps relevé d'essais empiriques. Les études scientifiques ont peu à peu permis de mettre en évidence qu'il n'existe pas de probiotique provoquant tous les résultats attendus, mais que chaque effet est souche-dépendant. Si l'analyse pharmacocinétique des probiotiques met en lumière leur évolution au long du tube digestif, leur analyse pharmacologique propose de déterminer leurs différents modes d'action *in situ*.

#### **1. Effets anti-adhésifs**

##### ***a. Adhésion du probiotique à l'épithélium intestinal***

Dans la seconde moitié des années 1980, il a été démontré que des bactéries lactiques d'origine génito-urinaire étaient capables d'adhérer aux cellules épithéliales du tractus urinaire. Elles empêchent ainsi la colonisation par des microorganismes pathogènes (117) (118) (119) (120). Il a ensuite été supposé que cette propriété pourrait être retrouvée au niveau digestif.

Les premiers tests *in vitro* des années 1990 ont eu lieu sur des modèles de cellules intestinales humaines différenciées présentant les mêmes caractéristiques phénotypiques qu'une portion de l'épithélium intestinal dans l'organisme. Par exemple, la lignée cellulaire Caco-2, largement utilisée en industrie pharmaceutique pour prédire l'absorption intestinale de principes actifs, a permis d'étudier les capacités d'adhésion épithéliale de différentes souches probiotiques. En testant vingt-cinq souches de *Lactobacillus*, Chauvière *et al.* montrent que toutes ne présentent pas la même adhésivité aux cellules Caco-2 (121).

Plusieurs études ultérieures visent à estimer plus précisément cette capacité d'adhésion des probiotiques. Dans l'ensemble, elles s'accordent à dire que les bactéries lactiques d'origine humaine adhèrent facilement aux cellules Caco-2 *in vitro*. Une adhésivité forte est retrouvée pour *Lactobacillus johnsonii* Lal, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* LB (122), ainsi que pour *Bifidobacterium breve* 4 ou *Bifidobacterium infantis* I (123). L'adhésivité des probiotiques à la muqueuse intestinale a également été évaluée *in vivo*, confirmant que c'est une propriété souche-dépendante (124).

### ***b. Compétition pour les récepteurs de fixation de l'épithélium intestinal***

En adhérant à la muqueuse intestinale, les probiotiques entrent en compétition avec les potentiels pathogènes pour les mêmes récepteurs de fixation. Certains augmentent également la production de mucines, qui limitent l'adhésion des pathogènes.

Par exemple, en présence de *Lactobacillus plantarum* 299v ou de *Lactobacillus rhamnosus* GG, Mack et ses collaborateurs observent une augmentation de la sécrétion des mucines MUC3. S'ensuit une inhibition de l'adhésion de la souche entéropathogène *Escherichia coli* E2348/69 (125). Collado *et al.* montrent que l'adhésion de souches entéropathogènes de *Clostridium*, *Escherichia coli* et *Salmonella* à la muqueuse intestinale de cochon est réduite en présence des probiotiques *Bifidobacterium lactis* Bb12 et *Lactobacillus rhamnosus* GG (126).

Dans une autre étude *in vitro*, l'équipe de Collado met en évidence que douze souches différentes de probiotiques sont capables d'inhiber l'adhésion au mucus intestinal humain de *Bacteroides vulgatus*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* et *Enterobacter aerogenes*. Ces mêmes probiotiques semblent également pouvoir déplacer de leurs sites de fixation les pathogènes cités, ainsi que *Listeria monocytogenes* (127).

## 2. Effets anti-invasifs

Nombre de pathogènes intestinaux exercent leurs effets en envahissant les cellules épithéliales intestinales. Il serait donc intéressant de trouver des probiotiques en mesure d'inhiber ce phénomène.

Altenhoefer *et al* rapportent qu'*Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) inhibe *in vitro* l'invasion de cellules épithéliales intestinales par *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Legionella pneumophila* et *Listeria monocytogenes*. Pour exercer son action anti-invasive, il est nécessaire que la souche EcN soit vivante. Néanmoins, le contact direct entre le probiotique et les pathogènes ou l'épithélium intestinal n'est pas obligatoire. Ces résultats suggèrent qu'EcN exerce son action anti-invasive par l'intermédiaire de composés sécrétés dans l'environnement, de structure encore inconnue (128).

Le même phénomène anti-invasif a été retrouvé pour *Lactobacillus casei* DN-114 001 vis-à-vis de certaines souches entéroinvasives d'*Escherichia coli* (129), ou pour *Lactobacillus acidophilus* LB (130) et *Bifidobacterium lactis* Bb12 à l'encontre de *Salmonella typhimurium* (131).

Ces capacités n'ont pour le moment été démontrées qu'*in vitro*. Des études *in vivo* chez l'animal et chez l'Homme sont encore nécessaires pour confirmer que certaines souches probiotiques disposent de propriétés anti-invasives contre les pathogènes.

## 3. Production de composés antimicrobiens

### a. Bactériocines

De nombreuses bactéries à Gram positif, dont les bactéries lactiques, produisent des protéines antimicrobiennes appelées bactériocines. Elles sont sécrétées dans le but d'inhiber la croissance d'autres microorganismes, notamment des pathogènes (131).

Les bactériocines peuvent être regroupées en deux catégories : les composés peptidiques et les composés non peptidiques (peroxyde d'hydrogène ou acides gras à courte chaîne carbonée tels que l'acide lactique). Elles sont actives sur la majorité des bactéries à Gram positif mais ont peu d'effet sur les bactéries à Gram négatif souvent retrouvées en infectiologie digestive. De plus, elles ne détruisent pas les virus tels que le *Rotavirus* (131).

### ***b. Antibiotiques***

En plus des bactériocines, certaines souches probiotiques sont capables de produire des substances antibiotiques. C'est le cas de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 qui libère un composé antimicrobien à large spectre appelé reuterine. Celui-ci dispose d'une activité inhibitrice à l'encontre des bactéries Gram positif et négatif, des micromycètes, de certains protozoaires et virus (131).

### ***c. Microcines***

Les microcines sont des peptides de faible poids moléculaire disposant d'un spectre d'activité restreint. Ces molécules antimicrobiennes sont fréquemment produites par les probiotiques et présentent des homologies de structure avec certaines bactériocines (131).

## **4. Compétition pour les ressources limitantes**

Le meilleur exemple de ressource limitante est celui du fer qui est indispensable au métabolisme et à la croissance de la majorité des bactéries. Les bactéries lactiques font exception à la règle car elles ne nécessitent pas de fer pour survivre. Elles présentent donc un avantage sélectif vis-à-vis d'autres microorganismes dans les milieux pauvres en fer (131).

De plus, les espèces *Lactobacillus delbrueckii* et *Lactobacillus acidophilus* disposent de récepteurs liant les molécules d'hydroxyde de fer à leur surface, le rendant indisponible pour les microorganismes avoisinants (131).

## **5. Effets anti-toxiniques**

Les toxines constituent un facteur de virulence fréquemment rencontré chez les microorganismes entéropathogènes. Certains probiotiques exercent leurs effets protecteurs sur l'hôte en inhibant l'expression des toxines.

Ainsi, Asahara *et al.* démontrent que *Bifidobacterium breve* Yakult® et *Bifidobacterium pseudocatenulatum* DSM 20439 sont en mesure d'inhiber la production de shiga toxine par *Escherichia coli* O157:H7 chez la souris. À l'inverse, les souches probiotiques *Bifidobacterium bifidum* ATCC 15696 et *Bifidobacterium catenulatum* ATCC 27539 ne présentent aucune activité anti-toxinique. L'activité des deux premières souches semble liée à leur production importante d'acide acétique et à la diminution du pH du milieu (132).

D'autre part, *Lactobacillus rhamnosus* GG est capable de lier une mycotoxine appelée déoxynivalénol, qui est responsable de gastroentérites. Il en abaisse ainsi la biodisponibilité et diminue le risque de symptômes digestifs lors de l'ingestion de produits céréaliers contaminés par des moisissures du genre *Fusarium* (133).

Cette même souche probiotique lie également des aflatoxines produites par diverses espèces d'*Aspergillus*. Elle diminue ainsi leur absorption intestinale et augmente leur excrétion fécale, avec pour conséquence, la réduction de la toxicité hépatique (134). Plus important encore, il a été montré *in vitro* que *Lactobacillus rhamnosus* GG amoindrait l'effet mutagène et carcinogène des aflatoxines (135).

La levure probiotique *Saccharomyces boulardii* est capable d'inhiber l'action de la toxine A de *Clostridium difficile* par différents mécanismes. D'une part, elle sécrète des protéases altérant la structure de la toxine (136). D'autre part, elle empêche l'activation de signaux inflammatoires médiés par la toxine (137). Enfin, elle stimule la production d'IgA anti-toxine A (138).

À ce jour, l'identification de récepteurs liant diverses toxines bactériennes ou fongiques ouvre de nouvelles perspectives. Elle permettrait de créer à volonté des probiotiques recombinants, exprimant à leur surface ces récepteurs. Les toxines seraient alors captées par les probiotiques et ne pourraient plus atteindre les cellules-cibles de l'hôte : leurs effets délétères seraient ainsi limités et la pathologie évitée. Le problème de l'usage d'organismes génétiquement modifiés (OGM) en thérapeutique se pose néanmoins.

## 6. Immunomodulation

Comme nous l'avons vu précédemment ([page 47 – Chapitre I :B.2.b](#)), le microbiote intestinal participe activement à la mise en place et à l'efficacité de l'immunité digestive. Tout comme ce dernier, les probiotiques peuvent interagir avec le système immunitaire de l'hôte, notamment par le biais de cytokines et d'autres messagers chimiques solubles qui rejoignent la *lamina propria*.

### a. Modulation de l'immunité innée

Nous savons que l'immunité innée a pour but d'éliminer rapidement et non spécifiquement des molécules du « non-soi » tels que les pathogènes grâce à divers mécanismes physiques, chimiques et cellulaires.

### (1) Maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal

Il a été démontré que des probiotiques aident à maintenir l'intégrité de la barrière physique constituée par l'épithélium intestinal. En effet, la souche *Escherichia coli* Nissle 1917 est capable de modifier l'action de protéine kinases C (PKC) et d'amplifier l'expression des protéines *zonula occludens 2* (ZO-2). Celles-ci participent au maintien des jonctions serrées de l'épithélium intestinal (139).

En 2007 l'équipe de Yan *et al.* a découvert deux protéines sécrétées par *Lactobacillus rhamnosus* GG capables de promouvoir l'homéostasie de l'épithélium colique. Ces deux protéines, appelées p75 et p40 en raison de leur poids moléculaires (respectivement 75 kDa et 40 kDa), inhibent l'apoptose des cellules épithéliales intestinales induite par des cytokines comme le *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ) en activant le facteur anti-apoptotique Akt. Elles contribuent ainsi au maintien de l'intégrité de la muqueuse intestinale (140).

Des études *in vitro* ont montré le rôle des probiotiques dans la sécrétion de défensines par les cellules de Paneth. Effectivement, la flagelline constituant les flagelles d'*Escherichia coli* Nissle 1917 fonctionne comme un inducteur de la sécrétion de  $\beta$ -défensine 2 par les cellules de Paneth. Ce probiotique aide ainsi à réguler les populations microbiennes digestives et à maintenir les éventuels pathogènes à distance de l'épithélium intestinal (141).

### (2) Cellules NK

Takeda *et al.* ont montré *in vivo* que *Lactobacillus casei* Shirota était en mesure de promouvoir l'activité de cellules NK. En effet, la souche probiotique ingérée augmente la sécrétion d'IL-12 par les monocytes du sang périphérique et permet ainsi d'accroître l'activation des cellules NK (142).

Le même résultat a été trouvé *in vitro* par Haller *et al.* concernant le probiotique *Lactobacillus johnsonii* La1. Dans cette étude, les auteurs précisent cependant qu'un contact entre les monocytes sécrétant l'IL-12 et les cellules NK est nécessaire pour obtenir leur activation. Ils suggèrent ainsi que des signaux de co-stimulation et les interleukines sont deux facteurs essentiels à l'augmentation de l'activité des cellules tueuses (143).

Dans une autre étude comparative, les effets immunomodulateurs de six probiotiques ont été testés : *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus reuteri* NCIMB 11951, *Bifidobacterium longum* SP 07/3 et *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5. Chacune de ces souches est en mesure d'augmenter l'activité des cellules NK *in vitro*, sans différence significative entre elles (144).

En somme, la littérature rassemble nombre d'études montrant que les bactéries lactiques augmentent l'activité cytotoxique des cellules NK *in vitro* et *in vivo*, chez l'animal et chez l'Homme. Nous pouvons ainsi conclure qu'elles concourent au renforcement de l'immunité innée et à la lutte contre les phénomènes infectieux.

### (3) Inflammation

L'étude *in vivo* menée par Schultz et ses collaborateurs met en évidence la capacité de *Lactobacillus rhamnosus* GG de diminuer la sécrétion de TNF $\alpha$ , d'IL-6 et d'IFN $\gamma$  pro-inflammatoires, tout en augmentant l'émission d'IL-10 et 4, au rôle anti-inflammatoire (145).

Nous savons que les acides teichoïques (TA) des bactéries à coloration de Gram positive et plus particulièrement les acides lipoteichoïques (LTA) (**Figure 36**), ont la capacité de moduler la réponse inflammatoire de l'hôte. Par exemple, lors d'une infection liée au pathogène *Staphylococcus aureus*, les LTA induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (146).

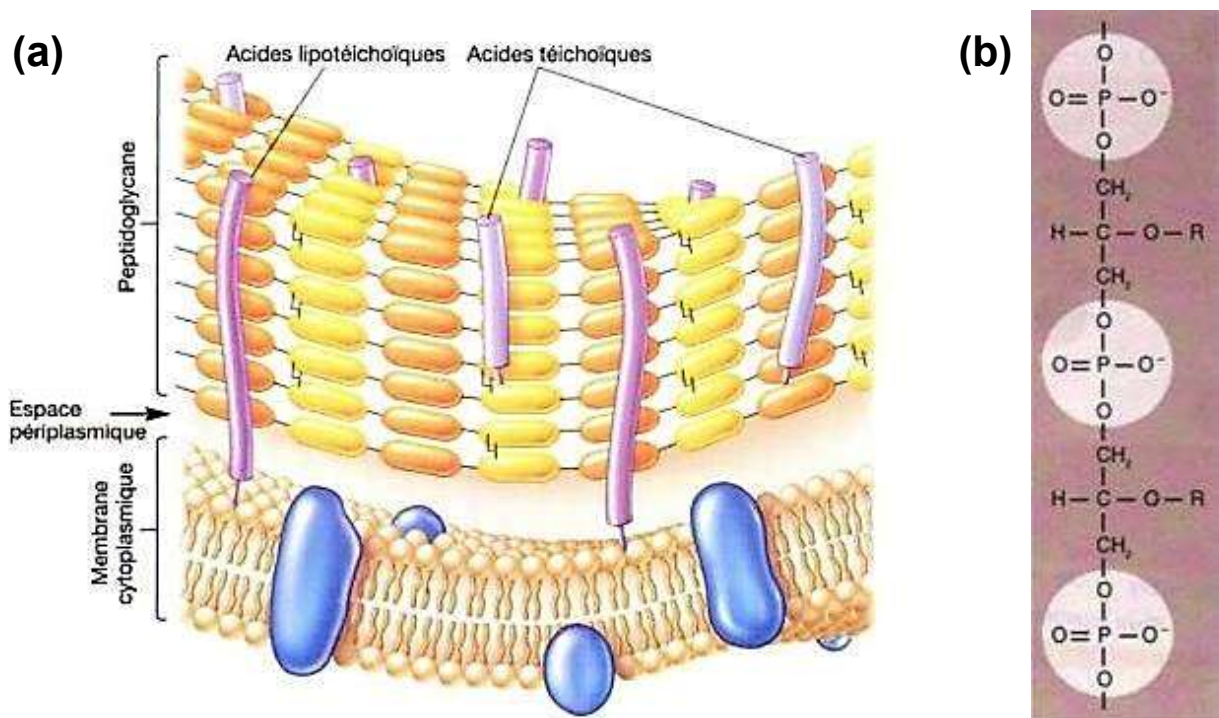


Figure 36 : Composition de la paroi des bactéries à Gram positif (a) et structure générale d'un acide teichoïque (b) (84)

(a) La paroi des bactéries à Gram positif est constituée d'une membrane cytoplasmique, séparée d'un épais peptidoglycane par un espace périplasmique. Des acides teichoïques et lipoteichoïques sont enchâssés dans le peptidoglycane (84).

(b) Les acides teichoïques sont des polymères de glycérol (ou de ribitol) reliés par des groupes phosphate et portant des résidus latéraux (R) constitués par de la D-alanine, du glucose, ou d'autres molécules (84).



La composition des LTA, notamment leur teneur en D-Alanine (D-Ala) semble jouer un rôle clé dans la fonction immunomodulatrice des bactéries. Grangette *et al.* ont ainsi étudié la capacité de la souche *Lactobacillus plantarum* NCIMB8826 d'induire une réponse pro- ou anti-inflammatoire en fonction de la composition du LTA. La souche sauvage disposant d'un LTA riche en D-Ala, induit une réponse pro-inflammatoire marquée, augmentant les sécrétions de TNF $\alpha$  et d'IL-1, 6 et 8. Une souche mutante, insérant du glucose en lieu et place des résidus D-Ala, induit quant à elle une forte augmentation de la sécrétion d'IL-10, anti-inflammatoire. Les résultats obtenus *in vitro* sur des cellules immunitaires mononucléées circulantes a été confirmé *in vivo* sur un modèle murin de colite induite par le TNBS (acide 2,4,6-trinitrobenzène-sulfonique). De plus, l'équipe de chercheurs a montré que les effets ci-dessus exposés étaient dépendants de la reconnaissance des LTA par les TLR-2 (147).

Cette analyse montre donc que l'orientation de la réponse inflammatoire est souche-dépendante et qu'elle peut être différente en fonction de la simple composition des LTA de la paroi bactérienne.

En outre, les acides nucléiques des probiotiques jouent eux-mêmes un rôle anti-inflammatoire en activant les TLR-9. À l'inverse, les acides nucléiques de certains pathogènes engendrent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (148). Les mécanismes de cette immunomodulation par l'ADN bactérien sont peu connus à ce jour.

### ***b. Modulation de l'immunité adaptative***

L'immunité adaptative permet une réponse spécifique à un antigène donné. Lorsque l'organisme rencontre cet antigène, le système immunitaire répond de manière ciblée en activant des lymphocytes T et B et en produisant des immunoglobulines protectrices. Au niveau des muqueuses, la protection est essentiellement assurée par des IgA, tandis que les IgG se retrouvent majoritairement en périphérie, dans la circulation.

#### *(1) Effets sur les LTreg*

*In vitro*, les probiotiques *Lactobacillus fermentum* CECT5716 et *Lactobacillus salivarius* CECT5731 issus du lait de femme entraînent l'activation des lymphocytes T lorsqu'ils sont mis en contact avec des cellules mononucléées sanguines. En effet, Francisco *et al.* constatent qu'ils augmentent modérément les taux de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et induisent plus fortement la différenciation en LTreg. Ces deux souches probiotiques semblent donc avoir un effet sur l'immunité adaptative. L'activation préférentielle des LTreg suppose que ces souches

probiotiques tendent à limiter les réactions immunitaires abusives, notamment en maintenant la tolérance au « soi ». Les auteurs suggèrent qu'ils trouveraient ainsi leur place dans la prévention ou le traitement des maladies inflammatoires du tube digestif (149).

Cette activation des LT CD4+ avec différenciation en LTreg a également été démontrée suite à l'administration *per os* de *Lactobacillus rhamnosus* GG chez des volontaires sains (145).

### (2) Effets sur les LT CD8+ cytotoxiques

Dans leur étude *in vitro*, Dong et ses collaborateurs montrent que *Lactobacillus casei* Shirota augmente l'activation des lymphocytes T, dont une majorité de LT CD8+ (150). Il en va de même pour les cinq souches probiotiques *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus reuteri* NCIMB 11951, *Bifidobacterium longum* SP 07/3 et *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5 (144).

*In vivo*, l'activation préférentielle des LT CD8+ par divers probiotiques est confirmée dans plusieurs études. En effet, Meyer *et al.* constatent que l'ingestion quotidienne de yaourt classique (contenant  $6,4 \cdot 10^7$  UFC/mL de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et  $3,9 \cdot 10^7$  UFC/mL de *Streptococcus thermophilus*) ou de yaourt enrichi en probiotiques (contenant  $10^7$  UFC/mL de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*,  $2,0 \cdot 10^8$  UFC/mL de *Streptococcus thermophilus* et  $3,8 \cdot 10^7$  UFC/mL de *Lactobacillus casei* DN 114 001) permet d'accentuer l'activation des LT CD4+ et CD8+, avec un effet plus marqué concernant les LT CD8+ (151).

Dans un autre essai randomisé contre placebo, l'administration orale quotidienne de *Saccharomyces boulardii* permet d'augmenter le taux sanguin de LT CD8+ chez des enfants âgés de six mois à dix ans, atteints de diarrhées (152).

Finalement, l'essai randomisé en double-aveugle et contre placebo réalisé par l'équipe de De Vrese, montre que *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *Bifidobacterium longum* SP 07/3 et *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5 augmentent également significativement l'activation des LT CD4+ et encore plus fortement celle des LT CD8+ (153).

### (3) Effets sur la balance LTh1/LTh2

Comme nous l'avons vu dans la partie consacrée à la réponse immunitaire cellulaire (page 44 – Chapitre I :B.2.a(1)), les populations de LTh sont de plusieurs types et concourent, avec l'aide des LTreg, à l'homéostasie des réponses immunitaires. Une mauvaise balance entre les différents LTh entraîne l'émergence d'affections de type auto-immunes, inflammatoires

chroniques et/ou allergiques. L'installation progressive et correcte du microbiote intestinal permet de maintenir les proportions LTh1/LTh2. Nous pouvons donc supposer que l'ingestion de probiotiques rigoureusement sélectionnés aiderait à les rétablir dans les cas où la balance ne serait plus équilibrée.

L'équipe finlandaise d'Isolauri *et al.* a étudié l'effet des souches *Lactobacillus rhamnosus* GG et *Bifidobacterium lactis* Bb12 dans l'APLV. Ceux-ci ont constaté que les deux types de probiotiques disposaient d'une action préventive à l'encontre de l'allergie et d'une action bénéfique sur les symptômes de l'APLV déclarée (dermatite atopique) (154).

Ces dernières années, on compte de nombreux essais portant sur l'analyse des effets des probiotiques sur la balance Th1/Th2. Parmi celles-ci, Ren et ses collaborateurs montrent que, chez la souris, *Lactobacillus plantarum* CGMCC 1.557 maintient plus efficacement la balance Th1/Th2 que *Lactobacillus salivarius* CICC 23174 (155).

Une autre étude chez la souris met en avant la capacité qu'a *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 d'accroître l'activité Th1, aux dépens de l'activité Th2 (156). Toutefois, d'autres probiotiques semblent préférentiellement augmenter l'action des LTh2, en renforçant leur effet anti-inflammatoire (32).

#### (4) Lymphocytes B et IgA sécrétoires

Lorsque des antigènes infectieux arrivent dans le tube digestif, les lymphocytes B sécrètent des IgA dans le but de protéger la muqueuse digestive des pathogènes. Le microbiote intestinal participe activement au développement de cette réponse immunitaire humorale. Ainsi, il est fait l'hypothèse que certains probiotiques permettraient de réguler l'activation des LB et la production d'IgA sécrétoires, afin d'augmenter les défenses de l'organisme vis-à-vis des phénomènes infectieux.

Depuis de nombreuses années, des études portant sur *Lactobacillus rhamnosus* GG mettent en évidence sa capacité à accroître la production d'IgA sécrétoires chez les enfants atteints de diarrhées à Rotavirus (32).

Les travaux de Fukushima *et al.* montrent que *Bifidobacterium lactis* Bb12 est capable d'augmenter le taux d'IgA fécales et d'IgA anti-poliovirus dans une population pédiatrique japonaise vaccinée contre ce pathogène (157).

Cette même souche augmente également les taux d'IgA anti-rotavirus dans une étude menée par Kandasamy et ses collaborateurs sur des porcelets « *germ-free* ». Par ailleurs, elle permet de réguler la réponse des cellules immunitaires au vaccin anti-Rotavirus (158).

De même, *Lactobacillus plantarum* AYA accroît significativement les taux d'IgA dans les plaques de Peyer de l'intestin grêle lorsqu'elle est administrée *per os* chez la souris. Cette activation de la sécrétion d'immunoglobulines semble médiée par les TLR-2 (159).

Notre étude bibliographique nous amène à constater que la liste de probiotiques ayant la capacité de moduler positivement les taux d'IgA produites par les plasmocytes digestifs est longue. Bien que les récepteurs TLR-2 aient été identifiés comme lien nécessaire à l'augmentation de la sécrétion d'IgA, les mécanismes exacts de l'interaction probiotiques-LB reste encore peu clairs et nécessiteraient d'être plus amplement étudiés.

### 7. Bilan

Les différents genres et espèces probiotiques disposent de propriétés intrinsèques variables, mises en lumière par de nombreuses publications. À ce jour, la littérature nous montre que les probiotiques disposent d'effets anti-adhésifs, anti-invasifs, anti-microbiens et anti-toxiniques, tout en entrant en compétition avec d'autres microorganismes potentiellement pathogènes pour l'utilisation des ressources limitantes. D'autre part, avec des effets déterminés sur les facteurs de l'immunité innée et de l'immunité adaptative, les probiotiques pourraient devenir un moyen de choix dans la prévention et la régulation de maladies infectieuses, inflammatoires et allergiques.

Notre étude nous a également permis de constater que les effets des probiotiques sont pour la plupart dépendants des souches, impliquant un usage ciblé de chacune d'entre elles. Pour beaucoup de probiotiques, l'ensemble des propriétés d'intérêt n'a pas été testé *in vivo* chez l'Homme. Il serait souhaitable de disposer de plus de données de ce type, afin de réaliser un bilan clair des effets alloués à chaque souche utilisable en thérapeutique humaine.

De plus, bien que les recherches actuelles tentent d'élucider quels composants actifs et quels mécanismes sont mis en œuvre par les probiotiques, on ignore encore souvent leur exacte nature.

# **Chapitre III : Etat des lieux concernant l'usage des probiotiques dans les pathologies intestinales du nourrisson**

## **I. L'ENTÉROCOLITE ULCÉRO-NÉCROSANTE (ECUN)**

### **A. Généralités**

L'entérocolite ulcéro-nécrosante (ECUN) est une maladie néonatale survenant essentiellement chez le prématuré (< 37 semaines de gestation révolues), généralement entre le troisième et le vingtième jour de vie. Cette maladie inflammatoire provoque une nécrose de la paroi intestinale de l'iléon terminal et du côlon distal. D'issue fatale dans 15 à 30 % des cas, c'est une pathologie grave qui nécessite une prise en charge adaptée en unité de soins intensifs néonatals (160).

La fréquence de la maladie est d'autant plus élevée que l'âge gestationnel et le poids de naissance sont faibles. Selon l'OMS, le poids de naissance est considéré comme faible lorsque le nouveau-né pèse moins de 2500 grammes, très faible s'il pèse moins de 1500 grammes et extrêmement faible lorsqu'il pèse moins de 1000 grammes (161). L'incidence des ECUN est de 1 à 2 % chez les nouveau-nés de poids de naissance compris entre 1000 et 1500 grammes. En-dessous de 1000 grammes, la fréquence des cas augmente pour atteindre 15 % (160).

### **B. Physiopathologie et principaux facteurs de risque**

Bien que la physiopathologie de l'ECUN soit encore mal connue, on sait aujourd'hui que c'est une atteinte multifactorielle du tube digestif. La prématurité amène un ensemble de facteurs favorisant la maladie, notamment liés à l'immatunité fonctionnelle du système intestinal.

#### **1. Dysfonctions de la motilité intestinale et de la digestion**

La motilité intestinale du fœtus commence à se développer au cours du second trimestre de grossesse, mais n'est pleinement effective qu'à la fin du troisième trimestre. Dans le cas d'une naissance prématurée, le contenu du tube digestif ne circulera donc pas toujours aisément, avec risque accru de stase des produits de digestion. Les fonctions digestives sont par ailleurs peu efficaces et l'on retrouve des composants non ou incomplètement digérés qui peuvent altérer les parois intestinales (27).

## **2. Dysfonctions de la circulation sanguine mésentérique**

Dans certains cas pathologiques exposant le nouveau-né à une hypoxie, l'organisme redirige préférentiellement le sang vers le cœur et l'encéphale, organes « essentiels », tout en négligeant les autres composants du corps. C'est par exemple ce qu'il se produit lors d'accidents hémorragiques ou lorsque l'enfant souffre d'une cardiopathie congénitale cyanosante (27).

En dehors de ces cas particuliers graves, des études suggèrent que l'organisme du prématuré répond également de manière anormale à l'alimentation entérale ou à la colonisation bactérienne, en diminuant la perfusion mésentérique. Le système digestif est alors mal irrigué, provoquant une hypoxie locale à l'origine d'altérations de l'épithélium intestinal (27).

## **3. Immaturité de la fonction barrière intestinale**

Comme nous l'avons vu précédemment, l'intestin mature constitue une véritable barrière vis-à-vis des microorganismes pathogènes ou des toxines. Chez un nouveau-né prématuré, cette fonction barrière n'est pas encore opérationnelle (27).

Sécrétées par les cellules de Paneth en réponse à des stimuli microbiens ou pro-inflammatoires, les défensines et les cathélicidines favorisent l'élimination de bactéries, virus, micromycètes ou protozoaires. Les cellules de Paneth des cryptes intestinales sont moins nombreuses chez les prématurés que chez les nouveau-nés à terme et produisent moins de peptides antimicrobiens, notamment de défensines  $\alpha$ . L'intestin sera donc exposé aux pathogènes non pris en charge par les défenses biochimiques (27).

Les cellules caliciformes sont également immatures chez le nouveau-né prématuré. En effet, le mucus qu'elles produisent a une composition différente de celle retrouvée chez le nouveau-né à terme ou chez l'adulte. Il semblerait que les gènes codant les mucines et leur organisation spatiale s'expriment chez le fœtus entre la vingt-troisième et la vingt-septième semaine de gestation. Par conséquent, les enfants nés avant cette période ne disposeraient pas d'un mucus suffisamment efficace pour jouer son rôle de protection physico-chimique. L'adhérence bactérienne *via* les chaînes glycaniques et la perméabilité digestive seraient alors accrues. La muqueuse digestive serait exposée à un risque élevé de lésions par des composants endogènes ou exogènes, qu'ils soient habituellement considérés comme pathogènes ou non (27).

Les fonctions d'absorption et de sécrétion de l'intestin grêle et du côlon se mettent en place chez le fœtus à partir de la vingt-sixième semaine de gestation et poursuivent leur

développement jusqu'au terme de la grossesse. Chez les prématurés extrêmes ou les grands prématurés, ces éléments ne sont pas encore constitués et les pathogènes ou les toxines ne peuvent pas être efficacement drainés hors du tube digestif par le mécanisme de diarrhée sécrétoire (27).

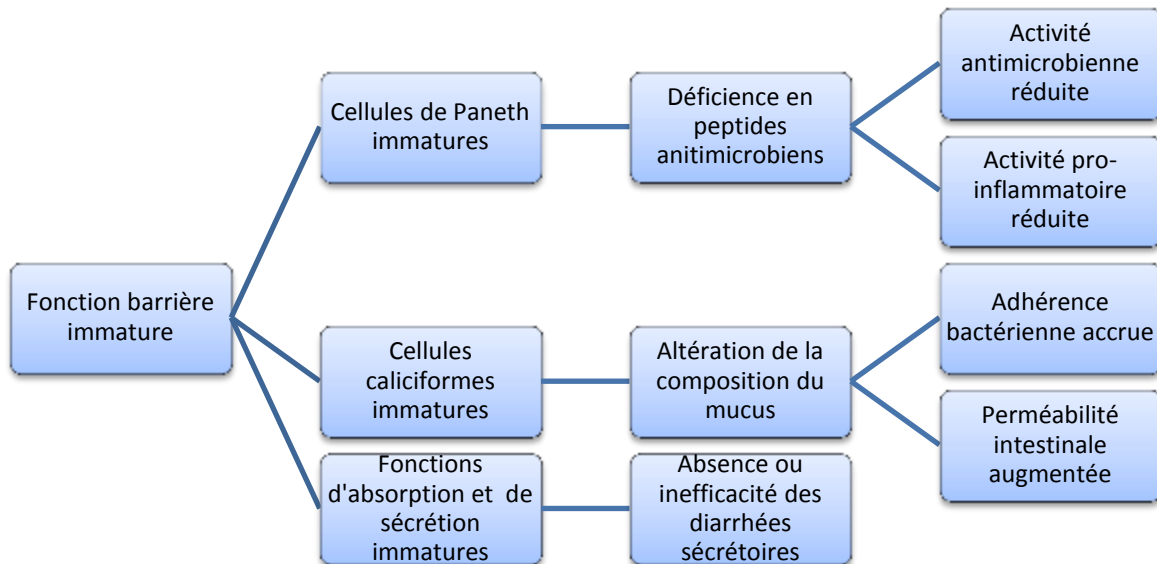


Figure 37 : Immaturité de la fonction barrière intestinale (27)

#### 4. Immaturité du système immunitaire digestif

L'inflammation est un mécanisme de défense nécessaire à l'homéostasie de l'organisme. On sait cependant que les cellules effectrices de la réponse inflammatoires relarguent des molécules qui peuvent endommager les cellules de l'hôte, tels que les espèces réactives de l'oxygène, ou des protéases. Sous l'effet de ces agressions chimiques, la barrière intestinale peut être altérée et laisser passer certains micro-organismes normalement cantonnés à la lumière intestinale. Une fois dans les tissus, ces derniers augmentent localement la réponse inflammatoire (27).

Deux cas de figure sont envisagés par les chercheurs. D'une part, on suppose que l'ECUN est liée à une hyperactivation de la réponse inflammatoire en présence d'antigènes pathogènes au niveau digestif. Cette réponse impliquerait certains médiateurs pro-inflammatoires tels que le *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ) et des interleukines, ainsi que les récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes (*Pattern recognition receptors*, PRR) (27).



D'autre part, l'hypothèse d'une réponse inflammatoire insuffisante chez le nouveau-né atteint d'ECUN a été émise. Cette anomalie de l'inflammation serait responsable d'une diminution des médiateurs anti-apoptotiques, engendrant la destruction de nombreuses cellules épithéliales digestives. De plus, la prolifération bactérienne ne serait plus aussi finement régulée. En conséquence, la muqueuse serait de plus en plus vulnérable aux attaques physiques, chimiques et microbiennes (27).

## 5. Anomalies de colonisation du tube digestif

Le lien entre la composition du microbiote intestinal et l'état de santé du nouveau-né prématuré a été analysé par l'équipe de Wang en 2009. L'étude a montré qu'une importante quantité de protéobactéries, notamment des entérobactéries des genres *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, ou *Shigella*, était spécifiquement retrouvée chez les nourrissons nés prématurément et souffrant d'ECUN (162). Un lien indéniable a ainsi été mis en évidence entre la composition de la flore bactérienne intestinale et le développement de l'ECUN.

Comme vu au chapitre précédent, le microbiote joue de nombreux rôles au sein de l'organisme. Il participe activement à la fonction barrière digestive et à la digestion. Il aide à la mise en place ainsi qu'à la régulation de l'immunité. Les bactéries commensales contribuent aussi au contrôle des phénomènes inflammatoires locaux. Si la colonisation du tube digestif est anormale, les fonctions du microbiote intestinal sont perturbées et l'intestin est alors exposé aux agressions de microorganismes de l'environnement.

Pour un nouveau-né prématuré, on sait que la colonisation bactérienne est retardée et qu'un nombre réduit d'espèces est retrouvé durant les premiers jours de vie. Des microorganismes « anormaux » peuvent de ce fait s'installer et proliférer dans les niches écologiques inoccupées, qu'ils soient d'origine bactérienne, virale ou fongique (163).

De nombreuses espèces du genre *Clostridium* font partie intégrante du microbiote intestinal de l'Homme. Certaines sont néanmoins considérées comme pathogènes lorsque leur croissance n'est pas limitée par d'autres espèces bactériennes. C'est le cas de *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* et *Clostridium butyricum* qui ont prouvé leur implication dans les lésions intestinales de nouveau-nés atteints d'ECUN (163).

Des bactéries responsables de sepsis sont également impliquées dans le déclenchement d'ECUN. On retrouve ainsi *Pseudomonas aeruginosa*, les espèces du genre *Acinetobacter* et des souches productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) de *Klebsiella pneumoniae*. Des cas d'infections nosocomiales avec ECUN ont également été rapportés. Ils

étaient liés à la bactérie *Cronobacter sakazakii* (autrefois *Enterobacter sakazakii*), qui avait contaminé différents lots de formule lactée en poudre pour nourrissons. D'autres bactéries telles que *Staphylococcus epidermidis* ou *Enterococcus faecalis* semblent liées au déclenchement d'ECUN chez le nouveau-né prématuré, mais les études ne prouvent pas leur rôle direct dans la genèse de la pathologie (163).

Plusieurs virus à tropisme digestif ont également été retrouvés chez des nourrissons souffrant d'ECUN tels que le *Rotavirus* et le *Norovirus*. L'infection intestinale à *Rotavirus* est fréquente chez les enfants en bas-âge. Associé à des espèces de *Clostridium*, ce virus augmente les risques de lésions intestinales et d'ECUN. Il en va de même pour les infections fongiques à *Candida* et *Mucor sp* (163).

## 6. Rôles délétères de l'alimentation

Les nouveau-nés prématurés présentent une tolérance alimentaire réduite en raison de l'immaturité de leur tube digestif. Comme nous venons de le voir, les différents mécanismes nécessaires à la digestion sont peu efficaces et les aliments ou nutriments ne peuvent être pris en charge correctement. L'alimentation constitue ainsi l'un des principaux facteurs de risque d'ECUN et il est à noter que plus de 90 % des cas d'ECUN surviennent chez des nouveau-nés alimentés par voie entérale (164).

## C. Clinique

Les signes cliniques de l'ECUN sont à la fois généraux et gastro-intestinaux. Dans les cas les moins graves, les signes gastro-intestinaux prédominent et évoluent lentement. *A contrario*, les cas sévères débutent souvent brutalement et montrent une altération rapide de l'état général associée à la dégradation des paramètres respiratoires et sanguins.

En 1978, Bell et ses collaborateurs ont proposé une classification des cas d'ECUN en trois différents stades (165) (

**Tableau VIII**). Cette classification repose sur les signes cliniques et l'exploration réalisée chez le nouveau-né.

Tableau VIII : Classification de Bell des cas d'ECUN (165)

Stade	Stade I : ECUN suspectée	Stade II : ECUN prouvée	Stade III : ECUN évoluée
<b>Manifestations systémiques</b>	<b>Non spécifiques, légères :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- instabilité thermique</li> <li>- bradycardie</li> <li>- apnée</li> <li>- léthargie</li> </ul>	<b>Non spécifiques, légères à modérées :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- instabilité thermique</li> <li>- bradycardie</li> <li>- apnée</li> <li>- léthargie</li> </ul>	<b>Détérioration sévère des paramètres vitaux :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- détresse respiratoire</li> <li>- bradycardie</li> <li>- hypotension ± collapsus</li> <li>- acidose respiratoire et/ou métabolique</li> <li>- CIVD</li> <li>- déséquilibres hydro-électrolytiques</li> </ul>
<b>Manifestations gastro-intestinales</b>	<b>Légères :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- diminution des prises alimentaires</li> <li>- augmentation des résidus alimentaires gastriques</li> <li>- distension abdominale mineure</li> <li>- vomissements</li> <li>- sang occulte dans les selles</li> </ul>	<b>Modérées :</b> signes du stade I et <ul style="list-style-type: none"> <li>- distension abdominale marquée</li> <li>- douleurs abdominales</li> <li>- absence de bruits intestinaux</li> <li>- possibles masses abdominales palpables</li> <li>- rectorragie</li> </ul>	<b>Sévères :</b> signes du stade II et <ul style="list-style-type: none"> <li>- distension abdominale forte</li> <li>- érythème cutané abdominal</li> <li>- défense abdominale à la palpation</li> </ul>
<b>Imagerie</b>	Normale ou image non spécifique de la pathologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anse(s) intestinale(s) dilatée(s) et fixe(s)</li> <li>- occlusion intestinale</li> <li>- pneumatose intestinale</li> <li>- ± aéroportie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ascite</li> <li>- perforation intestinale</li> <li>- pneumopéritoine</li> <li>- péritonite</li> </ul>

## **D. Les probiotiques utilisés dans les entérocolites ulcéro-nécrosantes : mise à jour des connaissances par la revue d'intervention Cochrane de 2014**

Du fait de son tube digestif immature, le nouveau-né prématuré est largement exposé au risque d'ECUN. Nous avons vu que parmi les multiples facteurs à l'origine de cette pathologie, il existait des anomalies de colonisation du tube digestif. Au regard des diverses propriétés qui leur sont attribuées, les probiotiques semblent constituer un moyen de choix pour corriger ces déséquilibres et favoriser l'implantation d'un microbiote intestinal sain (166).

### **1. Description de la revue d'intervention**

En 2014, la Collaboration Cochrane a publié une revue systématique d'intervention concernant les probiotiques en prévention des ECUN chez les nouveau-nés prématurés. Dans ce bilan, le groupe de travail a rassemblé les résultats de vingt-quatre études randomisées et contrôlées, portant sur l'administration entérale de probiotiques chez des nourrissons nés à moins de 37 semaines de gestation et/ou pesant moins de 2500 g à la naissance. Ils réalisent ainsi un état des lieux de l'efficacité et de la sécurité d'emploi des probiotiques administrés durant au minimum sept jours, contre placebo ou « non-intervention » (166).

Les vingt-quatre études rassemblent au total 2761 nourrissons prématurés traités par des probiotiques et 2768 nourrissons « contrôle ». Dans ces essais, on constate que les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont les plus étudiés, suivis de l'espèce *Saccharomyces boulardii*. Neuf essais portent sur des mélanges de différentes espèces probiotiques (166).

De manière générale, l'initiation du traitement a lieu dans les premières 24h ou la première semaine de vie de l'enfant. De plus, selon les études, la durée d'administration des probiotiques varie de deux semaines à plus de six semaines, voire jusqu'à ce que le nourrisson soit en mesure de quitter le service de soins intensifs néonataux (166).

### **2. Résultats des interventions**

#### **a. Effets généraux**

Parmi les différentes études, vingt analysent la survenue d'ECUN sévère, de stade II ou III. Pour chacune d'entre elles, l'administration de probiotiques, quels qu'ils soient, permet de réduire significativement l'incidence de la pathologie chez des prématurés de faible poids de naissance et de très faible poids de naissance. De même, dix-sept essais étudient le taux de

mortalité lié aux ECUN au sein des groupes traités et non traités. Les groupes de nourrissons de faible poids et de très faible poids de naissance ayant bénéficié du traitement prophylactique probiotique montrent un taux de mortalité bien plus faible que les groupes « contrôles » (166).

Deux études seulement étudient ces paramètres chez des prématurés de poids de naissance extrêmement faible. Elles ne montrent pas d'effet significatif des probiotiques sur l'incidence d'ECUN, ni sur le taux de mortalité. On note cependant que les échantillons de population considérés sont de petite taille et que les résultats ne peuvent être interprétés de manière appropriée (166).

D'autre part, six essais mettent en évidence que l'administration de probiotiques permet de réduire la durée d'hospitalisation des nouveau-nés et huit montrent que les enfants traités peuvent plus rapidement passer en alimentation entérale complète que ceux n'ayant pas bénéficié des probiotiques. Cependant, aucune étude ne parvient à prouver un quelconque effet des probiotiques sur les conséquences à long terme de la prématurité, telles que les retards mentaux ou les paralysies cérébrales (166).

#### ***b. Comparaison des espèces probiotiques***

Parmi les résultats relevés, la revue Cochrane pointe du doigt les différences d'effet entre les diverses espèces probiotiques employées dans les essais. En effet, les espèces de *Lactobacillus* et les mélanges de plusieurs probiotiques diminuent significativement l'incidence des ECUN sévères, de stade II ou III, tandis que les espèces de *Bifidobacterium* seules ou *Saccharomyces boulardii* seul n'ont pas d'effet significatif (166).

Le taux de mortalité est quant à lui plus fortement diminué par les mélanges de plusieurs probiotiques que par les espèces administrées de manière isolée (166).

#### ***c. Comparaison des moments d'initiation du traitement***

Quel que soit le moment d'introduction du traitement, les effets ci-dessus exposés sont retrouvés. Il semble néanmoins que l'incidence des ECUN ainsi que le taux de mortalité diminuent plus fortement dans les cas où les probiotiques commencent à être administrés lors de l'instauration de l'alimentation entérale (166).

*d. Comparaison des durées de traitement*

Les études montrent que dès quatre semaines de traitement prophylactique, on observe une réduction des cas sévères d'ECUN. Le taux de mortalité est quant à lui significativement abaissé pour des traitements d'un minimum de six semaines (166).

**3. Bilan**

Premièrement, les vingt-quatre études sélectionnées apportent des résultats complémentaires et convergents : les probiotiques préviennent les cas d'ECUN sévères et aident à réduire la mortalité chez les nouveau-nés prématurés (166).

Deuxièmement, bien que les nouveau-nés prématurés soient fragiles, aucun effet indésirable lié à l'administration entérale de probiotiques n'a été mis en évidence. D'après le groupe de travail Cochrane, les lactobacilles, les bifidobactéries et *Saccharomyces boulardii* sont donc des probiotiques sûrs, qu'il est possible d'employer chez les prématurés (166).

Au regard des ces résultats, la revue d'intervention encourage l'administration entérale de probiotiques en prévention des ECUN. En parallèle, elle recommande la réalisation de nouveaux essais confrontant différentes préparations et différentes posologies, afin de comparer plus précisément leurs effets. Il sera ainsi possible de déterminer le traitement probiotique prophylactique optimal à appliquer chez le nouveau-né prématuré, en termes de souche, dose, fréquence et durée d'administration (166).

## II. LES GASTRO-ENTÉRITES AIGÜES

### A. Généralités

La gastro-entérite aiguë est une pathologie digestive d'apparition brutale, caractérisée par l'émission d'au moins trois selles anormalement molles ou liquides par jour, pouvant être accompagnée de fièvre et de vomissements. Elle résulte d'une infection intestinale par divers virus, bactéries ou parasites. Ils peuvent être transmis par l'eau, les aliments, ou par contact humain direct ou indirect. En général, la gastro-entérite aiguë dure moins de sept jours, mais dans certains cas les symptômes peuvent durer jusqu'à quatorze jours. Au-delà, on parle de diarrhée persistante ou chronique (167).

Dans le monde, les diarrhées aiguës constituent la deuxième cause de mortalité chez les enfants de moins de cinq ans, après les pneumonies et les autres infections respiratoires aiguës. Elles tuent 760 000 enfants chaque année, essentiellement dans les pays en développement d'Asie du Sud et d'Afrique subsaharienne. En effet, les pertes hydro-électrolytiques mènent à la déshydratation et accentuent la malnutrition préexistante (168).

### B. Les diarrhées aiguës virales : cas du *Rotavirus*

#### 1. Généralités

Dans les pays industrialisés, les virus sont responsables de 80 % des cas de diarrhée aiguë chez les nourrissons et jeunes enfants. Parmi les agents viraux, le *Rotavirus* (**Figure 38**) est le plus fréquemment rencontré chez les nourrissons, causant près de 40 % des cas de gastro-entérite aiguë. Les autres virus responsables de gastro-entérites sont moins fréquemment retrouvés : *Adenovirus*, *Astrovirus*, *Calicivirus* ou *Norovirus* tel que l'agent de Norwalk (169).

Dans le monde, le *Rotavirus* est chaque année responsable de 136 millions de gastro-entérites chez les enfants de moins de 5 ans, avec 2 millions d'hospitalisations et près de 440 000 décès. L'infection à *Rotavirus* a la même incidence dans l'ensemble des pays du monde, mais pose de plus importants problèmes de morbidité et mortalité dans les pays en développement. Dans les pays industrialisés, il est principalement à l'origine d'épidémies hivernales communautaires dont les coûts socio-économiques sont élevés. En effet, plus de la moitié des hospitalisations en pédiatrie pour diarrhée aiguë est liée à ce virus. Il est également impliqué dans près de 20 % des infections nosocomiales en service de pédiatrie, du fait de sa très grande résistance dans l'environnement et de son importante contagiosité (169).

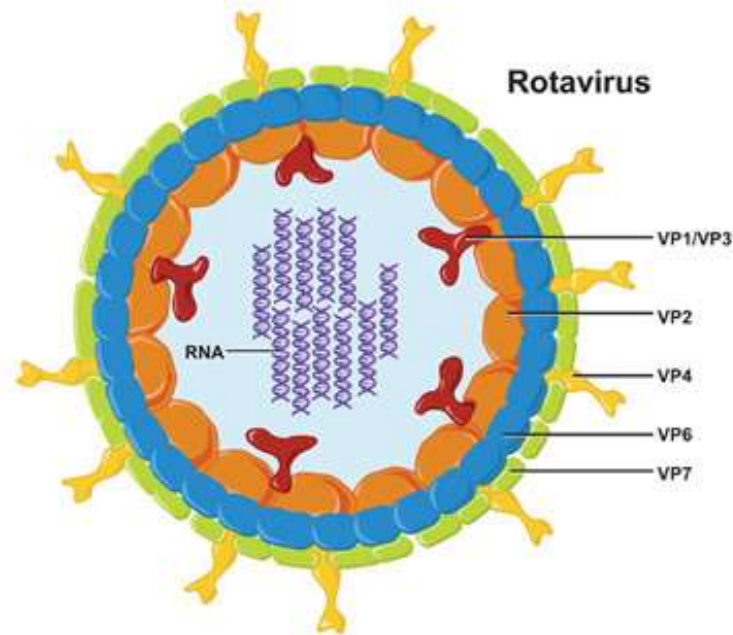


Figure 38 : Représentation schématique de la structure du *Rotavirus* (170)

Le *Rotavirus* est un virus non enveloppé à ARN double-brin segmenté, appartenant à la famille des *Reoviridae*. Sa capsid est constituée de trois couches concentriques renfermant 11 segments d'ARN. Chaque segment code l'une des 6 protéines structurales de la capsid (VP) et des 5 protéines non structurales (NSP). VP4 et VP7 composent la couche la plus externe de la capsid, VP6 forme la couche intermédiaire, VP2, VP1 et VP3 appartiennent à la couche la plus interne de la capsid (170).

## 2. Clinique

Entre la naissance et l'âge de deux ans, la quasi-totalité des enfants est infectée une ou plusieurs fois par le *Rotavirus*. Après une première infection, l'enfant acquiert une immunité protectrice vis-à-vis du sérotype concerné. Les réinfections restent possibles, mais avec une symptomatologie moins importante, voire nulle. Par conséquent, en fonction de l'âge de l'enfant et du nombre d'expositions préalables au virus, la clinique est variable (171).

Classiquement, l'enfant souffre de diarrhées aqueuses fréquemment accompagnées de fièvre et vomissements qui majorent le risque de déshydratation. Les douleurs abdominales sont inconstantes, au même titre que l'anorexie. Chez l'adolescent et l'adulte, l'infection à *Rotavirus* est le plus souvent asymptomatique (171).

La rémission est spontanée, en moins de sept jours, et sans séquelle. Il faut savoir que le virus est excrété dans les selles dès l'apparition des premiers symptômes et jusqu'à une semaine après la guérison clinique. L'enfant est donc contagieux pour son entourage durant douze à quinze jours. Les infections communautaires, en crèches ou établissements scolaires, sont ainsi favorisées (171).



## C. Les diarrhées aiguës bactériennes

Moins courantes que les infections virales, les gastro-entérites bactériennes sont la plupart du temps estivales. Elles mettent en cause les bactéries des genres *Salmonella* et *Shigella*, ainsi que *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* ou *Escherichia coli*. Les diarrhées bactériennes peuvent être classées en grandes familles de syndromes : les syndromes « cholériformes », les syndromes « dysentériques » et les syndromes mixtes liés aux salmonelles.

### 1. Les syndromes « cholériformes »

Les syndromes dits « cholériformes » sont des diarrhées de type sécrétoire. Ils mettent en jeu des mécanismes toxiques avec une atteinte essentielle de l'intestin grêle proximal. Les bactéries pénètrent dans le tube digestif, colonisent la muqueuse intestinale sans léser les entérocytes, puis sécrètent des entérotoxines qui vont augmenter la perméabilité cellulaire. Il en résulte une fuite d'eau et d'électrolytes vers la lumière intestinale, responsable d'une diarrhée aqueuse, généralement apyrétique (171).

Parmi les bactéries responsables de ces syndromes « cholériformes », on retrouve *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC) ou certains agents responsables de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) tels que *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*. Les TIAC touchent majoritairement les adultes et les enfants dont l'alimentation est diversifiée. Les jeunes nourrissons sont donc peu concernés (171).

### 2. Les syndromes « dysentériques »

Les syndromes de type « dysentérique » impliquent des bactéries entéroinvasives : elles pénètrent dans les entérocytes et s'y multiplient. Elles lèsent la muqueuse intestinale et provoquent une inflammation locale, notamment au niveau colique. Le patient présente alors une diarrhée glaireuse et/ou sanglante avec sensation de faux besoin, épreintes (contraction douloureuse du côlon) et ténésmes (contraction douloureuse du sphincter anal). Il y a également de la fièvre (171).

Les bactéries responsables de ces syndromes entéroinvasifs sont *Shigella spp.*, *Escherichia coli* de types entéroinvasif (EIEC), entéropathogène (EPEC) et entérohémorragique (EHEC), *Yersinia spp.* et *Campylobacter jejuni* (171).

### 3. Les syndromes mixtes dus à *Salmonella spp.*

Les salmonelles sont des entérobactéries pathogènes strictes du tube digestif de l'Homme qui causent les salmonelloses non typhiques et typhiques. Ces infections associent mécanismes invasifs et production de toxines (171).

Les salmonelloses non typhiques sont principalement dues à deux sérotypes de *Salmonella enterica* qui sont *Salmonella enterica* Enteridis et *Salmonella enterica* Typhimurium, à l'origine de 64 % des TIAC. Elles se caractérisent par une diarrhée aqueuse ou glairo-sanglante accompagnée de fièvre, de céphalées, de vomissements et de douleurs abdominales (171).

Les salmonelloses typhiques sont liées aux sérotypes *Salmonella enterica* Typhi et Paratyphi. Les symptômes sont les suivants : diarrhée en « jus de melon », altération de l'état général, fièvre élevée. Des signes neurologiques et cutanés caractéristiques apparaissent :

- Le tufhos : il s'agit d'un état d'abattement extrême, de prostration ;
- Les taches rosées lenticulaires : ce sont des macules érythémateuses qui évoluent par poussées au niveau du tronc et de la racine des membres, sans causer de prurit (171).

Les complications sont nombreuses et volontiers sévères, avec des risques de perforation et d'hémorragie digestives, d'atteinte hépatique, d'inflammations péricardique et myocardique (171).

### **D. Les probiotiques utilisés dans le traitement des gastro-entérites aiguës pédiatriques : recommandations de l'European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) publiées en 2014**

Il est important de rappeler que la réhydratation reste la première mesure corrective à mettre en place lorsqu'un nourrisson souffre de gastro-entérite. Quel que soit le microorganisme impliqué, les solutés de réhydratation orale (SRO), remboursables par la Sécurité Sociale, constituent un moyen de choix pour limiter la déshydratation (172).

La littérature recense de très nombreux essais portant sur le traitement des gastro-entérites aiguës par les probiotiques. Bien que les résultats convergent globalement vers la réduction de la durée et de la sévérité des symptômes, les études ne sont pas toujours suffisamment nombreuses pour attester d'une réelle efficacité et souffrent souvent de multiples biais (172).

Afin de clarifier la situation, l'ESPGHAN a récemment publié un document dans laquelle elle prend position par rapport à l'usage de diverses souches probiotiques dans le traitement des gastro-entérites aiguës en pédiatrie. Cette revue systématique rassemble les résultats d'essais randomisés contrôlés et de méta-analyses de la Collaboration Cochrane (172).

### **1. Description du travail mené par l'ESPGHAN**

L'ESPGHAN a décidé de n'inclure dans son analyse que des essais portant sur des souches communément employées en Europe. Six groupes taxonomiques sont donc principalement ciblés : *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces* et *Streptococcus*. Parmi ceux-ci, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Saccharomyces boulardii* et *Enterococcus faecium* SF68 sont les trois souches les plus étudiées (172).

Dans l'ensemble des essais, les résultats mesurés sont la durée de la diarrhée et l'évolution de la consistance des selles. Certaines études évaluent également d'autres paramètres, tels que la durée et l'évolution des vomissements, les admissions en milieu hospitalier ou la durée d'hospitalisation (172).

Afin de synthétiser son avis, l'ESPGHAN a employé le système GRADE (« *The Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation* »). Cet outil permet d'évaluer de manière objective le niveau de qualité des données scientifiques et de grader les recommandations finales. D'une part, on retrouve quatre niveaux de qualité des preuves : élevé, modéré, faible ou très faible, qui traduisent directement le degré de confiance que l'on peut accorder aux résultats des études. D'autre part, deux catégories de recommandations sont élaborées : forte ou faible, dépendant directement du rapport bénéfice/risque de l'intervention, de son coût et de la qualité des données scientifiques fournies (172).

### **2. Résultats et recommandations établies**

Trois catégories de probiotiques ont été déterminées par le groupe de travail de l'ESPGHAN :

- Les probiotiques disposant d'une recommandation positive ;
- Les probiotiques disposant d'une recommandation négative ;
- Les probiotiques dont le niveau de preuve est insuffisant pour établir une recommandation (172).

**a. Probiotiques disposant d'une recommandation positive**

Trois souches probiotiques disposent d'une recommandation positive de l'ESPGHAN dans le traitement des gastro-entérites aiguës pédiatriques : *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Saccharomyces boulardii* et *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (**Tableau IX**). Une quatrième souche bactérienne, *Lactobacillus acidophilus* LB, est également recommandée par le groupe de travail, mais elle ne répond pas à la définition actuelle des probiotiques, car il s'agit d'un microorganisme tué (172).

Le groupe de travail montre que *Lactobacillus rhamnosus* GG réduit la durée moyenne de la diarrhée de 27 heures ainsi que le nombre de selles émises au deuxième jour de traitement. La souche ne semble pas avoir d'effet sur le volume total des selles, mais elle limite les risques de diarrhée de durée supérieure à 4 jours. Pour obtenir les effets recherchés, le probiotique doit être administré à la posologie minimale de  $10^{10}$  UFC/jour, durant 5 à 7 jours (172).

Dans la population pédiatrique, *Saccharomyces boulardii* permet de réduire la durée de la diarrhée d'environ une journée et limite les risques de diarrhée de durée supérieure à 4 jours. Ce probiotique réduit également la durée d'hospitalisation des enfants souffrant de gastro-entérite aiguë de 19 heures en moyenne. Pour obtenir les effets attendus, la levure doit être administrée à hauteur de 250 à 750 mg/jour, durant 5 à 7 jours (172).

Malgré un niveau de qualité de preuves faible, le groupe de travail recommande fortement l'usage de *Lactobacillus rhamnosus* GG et de *Saccharomyces boulardii* pour le traitement des gastro-entérites aiguës des jeunes enfants, en complément de la réhydratation (172).

Concernant *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, les études sélectionnées montrent que la souche est en mesure de diminuer la durée de l'épisode diarrhéique de près de 32 heures chez des nourrissons hospitalisés. De plus, les chances de rémission au troisième jour de traitement sont accrues. Aucune information concernant le volume des selles émises n'est cependant fournie par les équipes de recherche. La posologie minimale efficace est par ailleurs fixée à  $10^8$  UFC/jour, durant 5 à 7 jours (172).

Le niveau de qualité de preuve est ici très faible, mais le groupe de travail de l'ESPGHAN recommande l'usage de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 dans la prise en charge des gastro-entérites aiguës en pédiatrie, toujours en complément de la réhydratation (172).

Tableau IX : Probiotiques recommandés pour le traitement des gastro-entérites aiguës des jeunes enfants (172)

Probiotique	Niveau de qualité des preuves	Grade de recommandation	Posologie recommandée
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Faible	Fort	10 <sup>10</sup> UFC/jour 5 à 7 jours
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Faible	Fort	250 à 750 mg/jour 5 à 7 jours
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938	Très faible	Faible	10 <sup>8</sup> UFC/jour 5 à 7 jours

**b. Probiotiques disposant d'une recommandation négative**

Une seule souche étudiée par le groupe de travail de l'ESPGHAN dispose d'une forte recommandation négative. Selon la revue systématique, *Enterococcus faecium* SF68 ne doit pas être employé dans le traitement des gastro-entérites aiguës des jeunes enfants, pour des raisons de sécurité. En effet, cette souche constitue un réservoir potentiel de gènes de résistance à la vancomycine et le risque de conjugaison *in vivo* ne peut être évité (172).

**c. Probiotiques dont le niveau de preuve est insuffisant pour établir une recommandation**

Parmi les probiotiques sélectionnés par le groupe de travail, 6 espèces/souches et 8 mélanges ne peuvent bénéficier de recommandations de l'ESPGHAN. Le tableau suivant résume les biais et problèmes rencontrés lors de leur évaluation (**Tableau X**) (172).

Tableau X : Probiotiques dont le niveau de preuve est insuffisant pour établir une recommandation (172)

Probiotique ou mélange	Problème(s) rencontré(s)	Niveau de qualité des preuves
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12	Manque de données concernant l'usage de la souche seule	Aucun
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Problèmes méthodologiques	Très faible
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Souche non indiquée	Très faible
<i>Lactobacillus acidophilus</i> et <i>Bifidobacterium bifidum</i>		Très faible

**CHAPITRE III : ETAT DES LIEUX CONCERNANT L'USAGE DES PROBIOTIQUES DANS LES PATHOLOGIES INTESTINALES DU NOURRISSON**

<i>Lactobacillus acidophilus</i> et <i>Bifidobacterium infantis</i>	Souche non indiquée	Très faible
<i>Bacillus clausii</i> O/C84, N/R84, T84, SIN84	Un seul essai randomisé contrôlé disponible : données insuffisantes	Très faible
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12 et <i>Streptococcus thermophilus</i> TH4		Très faible
<i>Lactobacillus acidophilus rhamnosus</i> 573L/1, 573L/2, 573L/30		Modéré
<i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 et <i>Lactobacillus rhamnosus</i> R0011		Très faible
<i>Lactobacillus paracasei</i> ST11		Modéré
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> var. <i>bulgaricus</i> LMG-P17550, <i>Lactobacillus acidophilus</i> LMG-P17549, <i>Streptococcus thermophilus</i> LMG-P17503 et <i>Bifidobacterium bifidum</i> LMG-P17500		Très faible
<i>Bacillus mesentericus</i> , <i>Clostridium butyricum</i> et <i>Enterococcus faecalis</i>	Un seul essai randomisé contrôlé disponible : données insuffisantes  Souche non indiquée	Très faible
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> et <i>Streptococcus thermophilus</i>		Très faible
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> et <i>Saccharomyces boulardii</i>		Modéré

### 3. Bilan

La réhydratation, par SRO, doit rester le traitement de première intention pour tout nourrisson ou enfant atteint de gastro-entérite aiguë. Il est possible d'ajouter un traitement par probiotique à cette mesure clé, afin de réduire la durée et la sévérité de la diarrhée (172).

Les effets des probiotiques étant souche-dépendants, il est important d'employer préférentiellement les souches dont les effets sur les symptômes de la gastro-entérite aiguë ont été démontrés et approuvés par des organisations telles que l'ESPGHAN. Ainsi, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Saccharomyces boulardii* et *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 constituent des probiotiques de choix dans cette indication (172).

Concernant les probiotiques dont les niveaux de preuve sont encore insuffisants pour établir une recommandation, l'ESPGHAN demande que de nouvelles études soient menées. Certaines souches prometteuses de Lactobacilles ou Bifidobactéries pourraient ainsi venir compléter la liste des probiotiques déjà recommandés dans le traitement des diarrhées infectieuses (172).

### III. LES DIARRHÉES POST-ANTIBIOTIQUES ET COLITES PSEUDO-MEMBRANEUSES À *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

#### A. Généralités

Les traitements antibiotiques sont fréquemment responsables de modifications du transit intestinal et de la consistance des selles. De nombreuses molécules sont à l'origine de diarrhées, notamment lorsque leur concentration intestinale est élevée et lorsque leur spectre d'action inclut les entérobactéries et les bactéries anaérobies. C'est le cas des bêta-lactamines (pénicillines et céphalosporines) et des cyclines. Le microbiote digestif s'en retrouve perturbé et n'exploite plus les composants non digestibles du chyme intestinal de manière optimale ; les résidus glucidiques qui ne sont pas métabolisés par les bactéries s'accumulent et créent une diarrhée osmotique. De plus, l'effet barrière n'est plus assuré et le tube digestif devient vulnérable à la colonisation par les pathogènes tels que le *Clostridium difficile* toxigène (173).

*Clostridium difficile* est une bactérie anaérobie commensale du tube digestif de l'Homme : environ 5 % des adultes et 50 à 70 % des nourrissons de moins de deux ans en sont porteurs sains. Il en existe deux souches différentes : l'une non toxigène et l'autre toxigène, pathogène. Cette dernière produit une entérotoxine A responsable de l'inflammation de l'épithélium intestinal et une cytotoxine B qui augmente la perméabilité de la muqueuse digestive (171).

#### B. Clinique

*Clostridium difficile* toxigène cause des diarrhées post-antibiotiques modérées à sévères. La forme modérée est la plus fréquente et se traduit par une diarrhée isolée, apyrétique, cessant en deux à trois jours après arrêt de l'antibiothérapie en cause. La colite pseudo-membraneuse est une forme plus sévère de l'infection qui se manifeste dans les sept jours suivant le début du traitement antibiotique, par une diarrhée liquide abondante et non sanglante, accompagnée de fièvre et de douleurs abdominales. Il y a également une hyperleucocytose. À l'endoscopie, des lésions aphtoïdes jaunâtres sont visibles : ce sont les pseudo-membranes qui adhèrent aux muqueuses rectale et colique inflammées. Dans ces formes sévères, il existe des risques de choc septique, de mégacôlon toxique et de perforation digestive avec péritonite (171).



### **C. Les probiotiques utilisés en prévention des diarrhées post-antibiotiques : mise à jour des connaissances par la revue d'intervention Cochrane de 2011**

Les probiotiques semblent pouvoir aider à restaurer l'équilibre du microbiote intestinal. Effectivement, de multiples études suggèrent que ces microorganismes aideraient à prévenir et à traiter les diarrhées associées aux antibiotiques, ainsi que les infections digestives à *Clostridium difficile*. Afin d'éclaircir la situation, la Collaboration Cochrane a publié en 2011 une revue d'intervention portant sur l'usage des probiotiques en prévention des diarrhées post-antibiothérapie (174).

#### **1. Description de la revue d'intervention**

Seize études prospectives randomisées et contrôlées ont été analysées par le groupe de travail Cochrane en 2011. Elles rassemblent un total de 3432 enfants de un mois à dix-huit ans traités par antibiotique en raison de diverses infections ORL, broncho-pulmonaires, gastro-intestinales, dermatologiques ou encore méningites (174).

Les probiotiques retrouvés dans les différents essais sont de type *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* ou *Saccharomyces boulardii*, seuls ou en mélanges et à des doses variables. Selon les études, le traitement prophylactique est administré *per os* durant dix jours à trois mois (174).

#### **2. Résultats des interventions**

Quinze des seize essais considérés font état d'une réduction des diarrhées associées aux antibiotiques dans les groupes d'enfants recevant des probiotiques, quels qu'ils soient. En moyenne, seuls 9 % des patients traités déclarent une diarrhée, contre 18 % des patients « contrôle ». Les résultats les plus significatifs et les plus probants sont ici obtenus pour *Lactobacillus rhamnosus* GG et *Saccharomyces boulardii*. De plus, les analyses du groupe de travail montrent qu'il serait nécessaire d'administrer un minimum de  $5.10^{12}$  UFC de probiotiques par jour pour protéger l'enfant des risques de diarrhées post-antibiothérapie (174).

L'évaluation des niveaux de preuve des diverses études a été réalisée selon le système GRADE. Les auteurs concluent que le niveau de preuve est faible pour l'ensemble des essais. En effet, ils soulignent que les résultats sont encore trop peu nombreux et qu'il existe un biais d'attrition lié aux patients perdus de vue au cours des essais. Ils recommandent donc la

réalisation d'essais complémentaires afin de déterminer les effets de souches probiotiques précises sur l'incidence des diarrhées post-antibiotiques et leur durée (174).

## **D. Les probiotiques utilisés en prévention des infections et diarrhées associées à *Clostridium difficile* : mise à jour des connaissances par la revue d'intervention Cochrane de 2013**

### **1. Description de la revue d'intervention**

Vingt-trois études randomisées et contrôlées ont été analysées par le groupe de travail Cochrane en 2013, prenant en compte les résultats de 4492 patients, enfants et adultes suivant une antibiothérapie. Les probiotiques visés dans ces essais sont principalement de type lactobacilles, mais on retrouve également quelques bifidobactéries, ainsi que *Streptococcus thermophilus*, *Clostridium butyricum* et *Saccharomyces boulardii*. Les différentes souches probiotiques sont administrées par voie orale, à des posologies variables (175).

### **2. Résultats des interventions**

Le principal paramètre évalué par le groupe de travail est l'incidence des diarrhées associées à *Clostridium difficile* : existence d'une diarrhée et détection de la bactérie et/ou des cytotoxines dans les fèces. Les résultats sont significativement en faveur des groupes « tests » ayant bénéficié d'un traitement probiotique prophylactique. En effet, on n'y retrouve que 2 % de cas de diarrhées liées à *Clostridium difficile*, contre 5,5 % dans les groupes « contrôles ». D'autre part, l'incidence des infections à *Clostridium difficile* sans diarrhées a également été évaluée. Les résultats ne montrent pas de différence significative entre les deux groupes, et ce, quelle que soit la nature du contrôle, placebo ou absence de traitement, l'âge des patients, ou le probiotique employé (175).

De plus, la méta-analyse montre que *Lactobacillus rhamnosus* GG préviendrait moins efficacement les diarrhées liées à *Clostridium difficile* que *Saccharomyces boulardii* ou qu'un mélange de *Lactobacillus acidophilus* CL1285 et *Lactobacillus casei* LBC80R. Toutefois, cette comparaison étant réalisée entre des études différentes, menées par plusieurs équipes de recherche, il reste nécessaire de conduire de nouvelles études dans le but d'apporter plus de crédibilité à ces résultats (175).

Le groupe de travail Cochrane a ici encore évalué le niveau de qualité des preuves selon le système GRADE. Il a conclu à un niveau de qualité des preuves modéré, soutenant l'effet protecteur des probiotiques vis-à-vis des diarrhées associées à *Clostridium difficile*. Les auteurs de la revue systématique proposent cependant que des essais soient menés afin de déterminer les souches et dosages optimaux à employer dans cette indication (175).

## IV. LES COLIQUES DU NOURRISSON

### A. Généralités

Les premiers mois de vie du nourrisson sont rythmés par le seul moyen de communication qu'il possède : les pleurs. Il informe son entourage de ses besoins par des périodes de pleurs plus ou moins intenses, dont la durée évolue de manière homogène chez l'ensemble des nourrissons en bonne santé. À partir de la naissance, la durée des pleurs physiologiques augmente progressivement pour atteindre trois heures par jour à l'âge de six semaines. Elle diminue à nouveau jusqu'à douze à seize semaines, où l'on comptabilise finalement moins d'une heure de pleurs par jour (176).

On juge que les pleurs du nourrisson de moins de quatre mois sont excessifs dès lors qu'ils suivent la règle des trois de Wessel : ils durent plus de trois heures par jour et persistent plus de trois jours par semaine sur une période supérieure à trois semaines. En l'absence de cause organique décelable et dans le cas où la croissance du nourrisson est satisfaisante, les pleurs excessifs et inconsolables chez l'enfant de moins de quatre mois sont appelés « coliques » (177).

### B. Epidémiologie

La prévalence des coliques dans la population pédiatrique varie de 10 à 30 % en fonction de l'âge des nourrissons et des symptômes pris en compte dans les études (177).

D'après l'analyse de Crowcroft et Strachan, portant sur les origines sociales des coliques, cette pathologie survient plus volontairement lorsque la mère est âgée de 30 à 34 ans et qu'il s'agit du premier enfant d'un couple issu des catégories socioprofessionnelles et socioéconomiques supérieures. De même, plus les parents ont un niveau d'éducation élevé, plus les nourrissons souffrent de coliques dans leurs premiers mois de vie. On note également que la parité influence la prévalence des coliques, puisque celle-ci diminue nettement à mesure que le nombre d'enfants du couple augmente (178).

Finalement, bien que l'allaitement maternel ait longtemps été considéré comme un facteur favorisant l'apparition des coliques, les études montrent que son lien avec la pathologie reste mineur : les enfants nourris au sein ne souffrent pas plus de coliques que ceux allaités artificiellement. Le changement de méthode d'allaitement peut cependant contribuer à augmenter la prévalence des coliques (178).

### C. Origine des coliques

L'origine exacte des coliques reste méconnue. Il semblerait qu'elle soit multifactorielle, faisant intervenir différents éléments d'une hypersensibilité viscérale médiée par un déséquilibre du microbiote intestinal (177).

Plusieurs études indiquent que les lactobacilles intestinaux sont moins nombreux chez les nourrissons souffrant de coliques que chez les nourrissons sains, tandis que les coliformes voient leur colonisation accrue (179).

Les facteurs psychologiques et comportementaux entreraient également en jeu et les pédiatres reconnaissent volontiers qu'il existe un transfert des angoisses parentales vers le nourrisson, qui s'exprime alors en pleurant. Un cercle vicieux se met généralement en place : le nourrisson informe son entourage de ses désordres digestifs en pleurant, les parents s'inquiètent et transmettent leur stress à l'enfant, qui pleure d'autant plus. La pathologie du nourrisson devient progressivement psychosomatique (180).

### D. Clinique

Les épisodes de coliques surviennent tout au long de la journée, mais sont à prédominance vespérale. Les pleurs débutent habituellement au décours ou peu de temps après la fin des repas et s'accompagnent d'autres manifestations physiques. On pourra observer une rougeur du visage chez un nourrisson crispé, repliant les cuisses sur le bassin et/ou serrant les poings. Celui-ci produit de nombreux gaz et l'émission des selles est difficile, voire douloureuse. La fréquence et la consistance des selles peuvent également être modifiées (177) (180).

### E. Les probiotiques utilisés dans les coliques du nourrisson : effets démontrés de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938

Facteurs environnementaux, hypersensibilité digestive et déséquilibre microbiotique semblent se combiner dans la physiopathologie des coliques infantiles. Toutefois, l'origine de ces troubles est encore méconnue et les traitements conventionnels n'apportent pas toujours les résultats escomptés (179).

Du fait de leurs potentiels effets régulateurs sur le microbiote intestinal, les probiotiques ont logiquement été proposés dans le traitement des coliques du nourrisson. À ce jour, peu d'espèces ont été étudiées dans cette indication, mais nous recensons quelques essais portant sur *Lactobacillus reuteri* (179).

### 1. Description des études considérées

La revue systématique réalisée par Anabrees et ses collaborateurs parue au journal *BioMed Central Pediatrics (BMC Pediatrics)* en 2013, fait état de trois études randomisées exploitables portant sur les probiotiques contre les coliques infantiles. La première porte sur la souche *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, administrée *per os* à des nourrissons exclusivement nourris au sein et âgés de 21 à 90 jours. Les deux autres essais montrent les effets de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 chez des nourrissons exclusivement ou en majeure partie nourris au sein, âgés dans tous les cas de moins de 5 mois (179).

### 2. Résultats des études

Les trois études évaluées par Anabrees et son équipe montrent que les deux souches de *Lactobacillus reuteri* réduisent le temps des pleurs quotidiens chez les nourrissons souffrant de coliques dès la première semaine de traitement. En moyenne, les enfants pleurent une heure de moins par jour qu'à l'initiation du traitement. Après trois semaines, les effets semblent atteindre leur maximum : les nourrissons traités par les probiotiques pleurent alors moins de trois heures par jour (179).

Il est à noter que dans les groupes « contrôles », la durée quotidienne des pleurs est également dégressive entre le premier et le dernier jour de traitement. Toutefois, l'évolution est moins prononcée que dans les groupes « test » recevant les probiotiques. Cette observation peut être liée à un effet placebo, ou à l'évolution naturelle du phénomène des coliques (179).

### 3. Bilan

La souche *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 étant reconnue vecteur potentiel de plasmides de résistance à certains antibiotiques de la famille des tétracyclines, il n'est pas recommandé de l'employer en thérapeutique. On lui préférera la souche *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, dont la sécurité d'emploi est avérée (179).

De nouvelles études portant sur d'autres souches probiotiques s'avèrent nécessaires pour compléter les recommandations des probiotiques dans les coliques infantiles. À ce jour, seul *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 semble disposer d'un effet bénéfique sur cette pathologie (179).

## V. LA CONSTIPATION FONCTIONNELLE CHEZ LE NOURRISSON

### A. Généralités

La constipation se définit comme l'émission potentiellement douloureuse et difficile, de selles dures insuffisamment hydratées. Chez le nourrisson qui bénéficie d'un allaitement maternel exclusif, on admet que moins de deux selles par jour peuvent être le signe d'une constipation. Pour un nourrisson allaité artificiellement et/ou dont l'alimentation est diversifiée, on retient le seuil de trois selles par semaine (181).

Ces fréquences ne sont qu'indicatives et tous les cas de constipation ne répondent pas systématiquement à ces critères. Ainsi, un nouveau-né allaité au sein pourra ne présenter qu'une selle hebdomadaire sans être constipé. L'allaitement maternel peut être vu comme un régime « sans résidus », au cours duquel la quasi-totalité des éléments digestibles du lait sont assimilés par l'enfant. Ce sont les symptômes associés à la diminution de fréquence des selles qui devront être pris en compte pour poser le diagnostic de constipation (181).

Lors des épisodes de constipation, certains parents relatent l'apparition brusque d'une diarrhée. Il s'agit en réalité d'une « fausse diarrhée » causée par la putréfaction des matières fécales piégées dans l'intestin (181).

Le terme de constipation « fonctionnelle » s'oppose à celui de constipation « organique » dans le sens où sa cause n'est ni médicale, ni chirurgicale. Les origines organiques sont essentiellement évoquées chez le nouveau-né ou chez le nourrisson de moins de dix-huit mois et rassemblent, entre autres : les malformations anorectales, la maladie de Hirschprung, l'hypothyroïdie, la mucoviscidose, les troubles métaboliques liés à une déshydratation chronique, les atteintes neurologiques et les myopathies intestinales. Dans ces cas, on observe un infléchissement de la courbe de croissance du nourrisson, voire une altération de son état général (181).

### B. Epidémiologie

En-dessous d'un an, la constipation est un problème peu rapporté chez les nourrissons, avec seulement 3 à 5 % de cas (182). La prévalence de ce trouble digestif tend à augmenter lorsque l'enfant grandit et atteint 10 % chez les nourrissons âgés de un à deux ans (183).

La constipation fonctionnelle concerne la majorité des cas et moins de 5 % des nourrissons sont atteints de constipation d'origine organique. D'autre part, les études montrent que le sexe de l'enfant n'a pas d'influence sur la prévalence de la pathologie : garçons et filles souffrent de constipation de manière équivalente (183).

### **C. Origines et facteurs de risque**

La constipation fonctionnelle peut avoir de nombreuses origines. Des modifications du régime alimentaire ou du rythme de vie peuvent avoir un impact sur les défécations. À ce titre, le risque de constipation chez le nourrisson augmente lors du sevrage et lors de la diversification alimentaire avec introduction d'aliments solides. De même, des erreurs diététiques peuvent provoquer les troubles. Ainsi, la reconstitution et l'éventuel épaississement des formules lactées doivent être scrupuleusement réalisés : un lait trop concentré ou trop épaissi pourra être difficile à digérer, encombrer l'intestin et entraîner une constipation (181).

### **D. Les probiotiques utilisés dans la constipation fonctionnelle chez le nourrisson : des données encore insuffisantes**

Les études portant sur l'amélioration de la constipation par des probiotiques portent le plus souvent sur une population adulte. Les résultats obtenus dans ces groupes d'individus ne peuvent être extrapolés aux nourrissons sans que de nouvelles études ne soient menées. En effet, le microbiote intestinal évolue énormément de la naissance à l'âge adulte et les effets des probiotiques peuvent être très différents entre ces deux types de patients.

#### **1. *Lactobacillus reuteri* DSM 17398 augmenterait le nombre de défécations hebdomadaires chez des nourrissons constipés**

Les études menées chez les nourrissons ou les jeunes enfants sont peu nombreuses. Nous avons pu trouver une étude portant sur les probiotiques utilisés contre la constipation chez des nourrissons de six mois ou plus, allaités artificiellement. Cet essai randomisé, en double-aveugle et contrôlé contre placebo, analyse l'effet de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 sur le nombre de défécations hebdomadaires ainsi que sur la consistance des fèces (184).

Sur les 44 nourrissons de l'essai, 22 bénéficient du traitement probiotique. Dans ce groupe, la fréquence des défécations hebdomadaires augmente de manière significative durant les huit semaines de traitement, pour atteindre 5 à 7 selles par semaine chez 18 nourrissons. De plus,



le nombre de défécations est significativement plus important dans le groupe « test » que dans le groupe « contrôle » tout au long de l'essai. Ainsi, au décours de la deuxième semaine, 13 nourrissons traités par *Lactobacillus reuteri* ont de 5 à 7 défécations par semaine, contre seulement 7 nourrissons recevant le placebo (184).

En ce qui concerne la consistance des selles, aucun effet significatif du probiotique n'a pu être mis en évidence dans l'essai (184).

En conclusion, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 semble être en mesure d'augmenter la fréquence des selles chez des nourrissons constipés, mais n'a pas montré d'efficacité sur l'amélioration de leur consistance. Il serait appréciable de disposer de plus de données pour recommander l'utilisation de ce probiotique en thérapeutique pédiatrique (184).

## **2. Effets de souches probiotiques sur la constipation d'adultes et d'enfants de plus de deux ans**

Une revue systématique concernant les probiotiques utilisés comme traitement de la constipation fonctionnelle a été réalisée en 2010 par une équipe de chercheurs de Varsovie. L'article paru au *World Journal of Gastroenterology* montre que chez des adultes, *Bifidobacterium lactis* DN-173010, *Lactobacillus casei* Shirota et *Escherichia coli* Nissle 1917 auraient un effet favorable sur la fréquence des défécations et amélioreraient la consistance des selles (185).

Par ailleurs, chez des enfants âgés de deux à seize ans, *Lactobacillus rhamnosus* GG associé au lactulose ne semble pas avoir plus d'effet sur la constipation que du lactulose seul. *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 permettrait quant à lui d'augmenter la fréquence des selles, tout en réduisant les douleurs abdominales et en améliorant la consistance des selles chez des enfants de deux à dix ans (185).

Les auteurs estiment cependant que les preuves apportées par les différents essais sont insuffisantes pour conclure avec certitude que ces souches probiotiques disposent d'effets bénéfiques dans le traitement de la constipation fonctionnelle de l'adulte et de l'enfant. Ils suggèrent que les études devraient être reconduites sur des échantillons de patients plus conséquents, en respectant scrupuleusement la randomisation et le double-aveugle (185).

De plus, les probiotiques ayant montré des effets positifs sur l'amélioration de la consistance des selles et l'augmentation du nombre de défécations chez l'adulte devraient également être testés chez les nourrissons, afin de vérifier leur impact sur la constipation dans la population pédiatrique (185).

## VI. LES PROBIOTIQUES POUR NOURRISSONS À L'OFFICINE

Dans cette partie, nous analyserons la composition de quelques médicaments, compléments alimentaires, dispositifs médicaux ou aliments pour nourrissons contenant des probiotiques. Destinés à la prévention ou au traitement des pathologies digestives des nourrissons, il est aujourd'hui possible de trouver de nombreux produits dans les officines françaises. Une attention toute particulière doit être portée à leur formulation, afin de choisir celui qui sera le mieux adapté au patient considéré.

### A. Médicaments probiotiques pédiatriques

En France, aucun médicament répondant à la définition des probiotiques ne dispose d'une AMM chez l'enfant de moins de vingt-quatre mois. Toutefois, selon les recommandations de l'ESPGHAN, la levure *Saccharomyces boulardii*, retrouvée dans la spécialité ULTRA-LEVURE®, pourrait être utilisée chez le nourrisson souffrant de gastro-entérite aiguë, en complément de la réhydratation (172).

Un autre médicament, LACTEOL®, contient les espèces bactériennes *Lactobacillus delbrueckii* et *Lactobacillus fermentum* inactivées. Il ne répond donc pas à la définition actuelle des probiotiques, qui rappelle que les microorganismes utilisés doivent être vivants. Sous sa forme sachets, LACTEOL® dispose d'une AMM pour le traitement d'appoint symptomatique de la diarrhée chez le nourrisson, l'enfant et l'adulte, en complément de la réhydratation et/ou des mesures hygiéno-diététiques. Ce médicament s'administre par voie orale, après dissolution du contenu du sachet dans un demi-verre ou un biberon d'eau. La posologie varie d'un à deux sachets par jour en fonction de l'intensité des troubles, avec une dose initiale qui peut être augmentée à trois sachets le premier jour de traitement (186).

### B. Compléments alimentaires probiotiques pour nourrissons à l'officine

Un nombre sans cesse croissant de compléments alimentaires contenant des souches probiotiques est retrouvé sur le marché. Nous réalisons ici un état des lieux concernant les produits les plus fréquemment rencontrés à l'officine. Un parallèle avec les différentes recommandations de l'ESPGHAN et les revues systématiques analysées permettent de mettre en évidence les points positifs et négatifs de chacun d'entre eux.

### 1. Complément alimentaire n°1 : association de vitamine D et de cinq souches « microbiotiques »

Le premier complément alimentaire étudié se présente sous forme de sachets de poudre renfermant de la vitamine D et cinq souches « microbiotiques », terme employé par le fabricant (**Tableau XI**) (187).

Tableau XI : Composition qualitative et quantitative du complément alimentaire n°1 (187)

Composé	Dosage par sachet
<i>Bifidobacterium longum</i> LA 101	4.10 <sup>9</sup> UFC
<i>Lactobacillus helveticus</i> LA 102	4.10 <sup>9</sup> UFC
<i>Lactococcus lactis</i> LA 103	4.10 <sup>9</sup> UFC
<i>Streptococcus thermophilus</i> LA 104	4.10 <sup>9</sup> UFC
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LA 801	4.10 <sup>9</sup> UFC
Vitamine D	150 UI (3,75 µg) soit 75 % des Apports Journaliers Recommandés (AJR)

Le laboratoire indique que ce complément alimentaire peut être utilisé dès la naissance et jusqu'à l'âge de quatre ans en cas de troubles digestifs et d'allergies alimentaires, à raison d'un sachet par jour, à diluer dans du lait ou de l'eau. La poudre peut éventuellement être mélangée à un aliment froid tel qu'une compote de fruits ou un yaourt. Afin de ne pas inactiver les bactéries qu'il contient, le produit reconstitué ne doit pas être chauffé à plus de 37°C, ni placé au micro-onde (187).

La durée du traitement varie de dix jours à plusieurs mois, en fonction des symptômes que présente le nourrisson ou le jeune enfant. Dans le cas de troubles gastro-intestinaux de type gastro-entérite, coliques ou constipation occasionnelle, un traitement d'une durée de dix jours est préconisé et peut être renouvelé si besoin. Dans le cas de troubles digestifs liés à un terrain atopique, chez un enfant présentant éventuellement des intolérances ou allergies alimentaires, un traitement « de fond » pourra être mené pendant une durée minimale d'un mois, renouvelable selon l'évolution de la symptomatologie (187).

L'effet positif de la vitamine D sur la santé est ici présenté par l'allégation « *contient de la vitamine D qui intervient dans la croissance normale et le développement des os chez les enfants* ». En 2012, l'évaluation des allégations de santé par l'EFSA et la Commission

européenne a autorisé l'emploi de cette mention sur les compléments alimentaires contenant de la vitamine D (188).

L'effet positif des composants « microbiotiques » utilisés reste quant à lui controversé. En 2013 et 2014, suite aux demandes du fabricant, l'EFSA a rendu plusieurs avis négatifs sur la justification d'allégations de santé concernant l'association des quatre souches *Bifidobacterium longum* LA 101, *Lactobacillus helveticus* LA 102, *Lactococcus lactis* LA 103 et *Streptococcus thermophilus* LA 104. Le groupe spécial sur les produits diététiques, la nutrition et les allergies a conclu à l'absence de relation de cause à effet entre la consommation d'un aliment combinant ces quatre bactéries et :

- L'amélioration de la fonction intestinale par augmentation de la fréquence des selles (189) (190) ;
- La réduction de l'inconfort intestinal (191) (192).

L'EFSA n'ayant pas autorisé l'utilisation de ces allégations de santé, aucune mention de l'effet « probiotique » des souches utilisées n'est apposée sur le conditionnement du complément alimentaire.

Concernant la souche *Lactobacillus rhamnosus* LA 801, nous n'avons pu retrouver aucun article faisant état d'un avis positif relatif à son utilisation en pathologie digestive.

Cependant, comme le signale le fabricant sur son site Internet et dans les documents destinés aux professionnels de santé, les critères nécessaires à la mise sur le marché du complément alimentaire ont été remplis. Effectivement, le laboratoire a démontré l'innocuité des cinq souches, leur résistance à l'acidité gastrique et aux acides biliaires ainsi que leur capacité d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales. De plus, les souches employées sont stables dans le mélange fini, lorsque les conditions de conservation recommandées sont respectées (température inférieure ou égale à 20°C) (187).

## **2. Complément alimentaire n°2 : association de vitamine D3 et de trois bactéries lactiques**

Le complément alimentaire n°2 renferme trois types de bactéries lactiques d'origine humaine, ainsi que de la vitamine D3 (cholécalférol). Aucune allégation de santé concernant les bactéries lactiques ne figure sur le conditionnement du produit (193). Sa composition globale est exposée ci-après (**Tableau XII**) :

Tableau XII : Composition qualitative et quantitative du complément alimentaire n°2 (193)

Composé	Dosage par sachet
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	10 <sup>9</sup> UFC
<i>Lactobacillus fermentum</i>	10 <sup>9</sup> UFC
<i>Bifidobacterium infantis</i>	10 <sup>9</sup> UFC
Vitamine D3	0,75 µg (30 UI) soit 15 % des Apports Journaliers Recommandés (AJR)

Le complément alimentaire se présente sous forme de sachets de poudre qui peuvent être administrés aux enfants dès la naissance, dans du lait tiède ou de l'eau. Le produit reconstitué ne doit pas être placé au micro-onde ni chauffé à plus de 37°C afin de maintenir la survie des différents probiotiques (193).

En cas de troubles digestifs tels que des régurgitations, des coliques ou des diarrhées, le fabricant recommande d'administrer un sachet par jour, dans le premier biberon de la journée, jusqu'à disparition des symptômes. Ce complément peut également être employé en accompagnement d'un traitement antibiotique, dans le but de limiter l'agression du microbiote intestinal et de diminuer les risques de diarrhée post-antibiothérapie (193).

La vitamine D3 est présente en quantité suffisante pour être indiquée sur le conditionnement du complément alimentaire. Le fabricant signale également qu'elle est « *nécessaire à la croissance et au développement osseux des enfants* », allégation santé autorisée par l'EFSA (188).

Comme expliqué précédemment, le groupe de travail pour les probiotiques et prébiotiques de l'ESPGHAN recommande l'usage de *Lactobacillus rhamnosus* GG dans le traitement des gastro-entérites aiguës en pédiatrie. Il existe des preuves de l'efficacité du probiotique dans cette indication. Les souches des deux autres bactéries lactiques associées dans le complément alimentaire ne sont pas précisées par le fabricant. De ce fait, les effets de chacune d'entre elle ne sont pas clairement définissables et aucune de ces deux espèces n'est retrouvée dans les recommandations actuelles.

Cependant, *Bifidobacterium infantis* est une bifidobactérie issue du lait maternel. En ce sens, elle disposerait peut-être d'un effet bifidogène sur le microbiote intestinal des nourrissons les plus fragiles, prématurés, nés par césarienne et/ou non allaités. De plus, le laboratoire signale que les trois bactéries sélectionnées sont résistantes à l'acidité gastrique et aux sels biliaires et qu'elles sont stables dans le produit fini (193).

### 3. Complément alimentaire n°3 : *Lactobacillus reuteri* DSM 17938

Le troisième complément alimentaire, destiné aux enfants de 0 à 3 ans, se présente sous forme de gouttes et contient la souche probiotique brevetée *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. Afin de faciliter son administration, le complément est conditionné en flacon compte-gouttes et ne nécessite pas d'être réfrigéré (194).

Le laboratoire indique que les gouttes peuvent être employées dans les troubles fonctionnels gastro-intestinaux des nourrissons et jeunes enfants, souvent liés à un déséquilibre du microbiote intestinal. Il propose de les utiliser en traitement de diverses pathologies telles que les diarrhées virales ou bactériennes, les diarrhées liées aux antibiotiques, les coliques ou la constipation (194).

En pratique, il est préconisé d'administrer cinq gouttes du complément alimentaire par jour (correspondant à  $10^8$  UFC du probiotique), soit directement dans la bouche de l'enfant à l'aide d'une cuillère à café, soit dans un peu de lait ou d'eau. Le flacon compte-gouttes permet de faire un traitement de trois semaines, qui correspond à la durée minimale du programme conseillé par le fabricant. Comme pour les produits décrits précédemment, le probiotique ne doit pas être soumis à des températures dépassant 37°C (194).

Il a été démontré que le probiotique *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 permettait de traiter les gastro-entérites aiguës en pédiatrie et l'ESPGHAN recommande son utilisation dans cette indication. D'autre part, les études montrent l'efficacité de la souche dans le traitement des coliques du nourrisson et son utilisation semble *a priori* améliorer le confort digestif des nourrissons constipés.

#### 4. Complément alimentaire n°4 : association de *Lactobacillus rhamnosus* GG et de vitamine D3

Le complément alimentaire n°4 est une suspension huileuse de *Lactobacillus rhamnosus* GG associé à de la vitamine D3 se présentant en flacon compte-gouttes de 10 mL pouvant être conservé à température ambiante (195) (*Tableau XIII*).

Tableau XIII : Composition qualitative et quantitative du complément alimentaire n°4 (195)

Composé	Dosage pour 5 gouttes
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	10 <sup>9</sup> UFC
Vitamine D3 d'origine végétale	10 µg (400 UI) soit 200 % des Apports Journaliers Recommandés (AJR)

Le fabricant conseille d'utiliser ce complément alimentaire chez les nourrissons et les enfants en bas âge souffrant d'inconfort abdominal, de coliques ou de diarrhées. Cinq gouttes doivent être administrées chaque jour durant un mois, directement dans la bouche à l'aide d'une cuillère ou mélangées à une boisson telle que du lait, à température inférieure à 37°C (195).

La vitamine D3 est ici présente en quantité suffisante pour que le laboratoire puisse mentionner son effet bénéfique sur la santé : il note ainsi que la vitamine D est un « *acteur majeur des défenses de l'organismes et de la croissance des enfants* ». Ces deux considérations font partie des allégations santé autorisées par l'EFSA pour les compléments alimentaires contenant de la vitamine D (188).

*Lactobacillus rhamnosus* GG dispose d'une recommandation positive de l'ESPGHAN dans le traitement des gastro-entérites aiguës en pédiatrie. Il permet donc de restaurer un microbiote sain lorsque celui-ci est perturbé par un agent infectieux. À ce jour, la souche ne bénéficie d'aucune recommandation officielle dans le traitement des coliques du nourrisson ou dans le cadre de l'amélioration du confort digestif.

### 5. Complément alimentaire n°5 : association de quatre ferments lactiques, d'inuline de chicorée et de zinc

Le cinquième complément alimentaire étudié se compose d'une association d'inuline de chicorée, de zinc et de quatre ferments lactiques : *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* et *Streptococcus thermophilus* (**Tableau XIV**). Les souches ne sont pas précisées par le fabricant. Le complément alimentaire se présente sous forme de sachets de poudre (196).

Tableau XIV : Composition qualitative et quantitative du complément alimentaire n°5 (196)

Composé	Dosage par sachet de 2g
Inuline de chicorée	900 mg
Bisglycinate de zinc	3 mg, soit 30 % des Apports Journaliers Recommandés (AJR)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	Total de 10 <sup>10</sup> UFC

Le fabricant atteste que ce complément permet de « rééquilibrer la flore intestinale » chez les enfants, dont le microbiote est encore immature et très sensible aux perturbations liées à l'environnement, au stress, à l'alimentation, ou à des infections et à leurs traitements. Il est possible de l'utiliser dès l'âge de 1 mois, à raison d'un sachet par jour, à donner le matin ou le soir, de préférence avant le repas. La poudre doit être diluée dans un liquide ou éventuellement un aliment semi-liquide, telle qu'un yaourt ou une compote, et ne doit pas être soumise à des températures supérieures à 37°C. Un programme de 10 jours est conseillé (196).

Selon le laboratoire, l'inuline extraite de la racine de chicorée est apportée dans un but « prébiotique », c'est-à-dire pour favoriser la croissance des bactéries bénéfiques dans l'intestin (196). Néanmoins, le potentiel prébiotique de ce fructo-oligosaccharide (FOS) peine à être pleinement démontré. En l'absence de preuves scientifiques suffisantes, les Autorités européennes ont conclu que les produits contenant ces FOS ne pouvaient pas prétendre :

- Aider au bon fonctionnement intestinal ou colique ;
- Améliorer le confort intestinal ;
- Favoriser le développement du microbiote intestinal (188).



Aucune allégation de santé concernant l'inuline de chicorée n'a pas été apposée sur le conditionnement du complément alimentaire n°5.

D'autre part, le zinc, présent sous forme de bisglycinate assurant une bonne biodisponibilité, a pour objectif de renforcer l'immunité. L'allégation de santé correspondante a été autorisée par l'EFSA et la Commission européenne dans leur évaluation de 2012, dans le cas où le sel minéral est présent en quantité suffisantes (188). Les AJR de zinc s'élevant à 10 mg, la quantité minimale requise pour que le fabricant puisse en mentionner la présence correspond à 1,5 mg pour 100 g, 100 mL ou pour une unité de prise de produit fini (197). Ici on retrouve 3 mg de zinc par sachet de complément alimentaire : l'allégation de santé relative au zinc est donc légitime.

Concernant les quatre bactéries employées, aucune souche n'est précisée. En ce sens, il n'est pas possible de connaître leurs effets exacts sur la santé des nourrissons qui les ingèrent. Sous cette appellation, elles ne font l'objet d'aucune recommandation actuelle.

### **C. Préparations pour nourrissons et préparations de suite contenant des probiotiques à visée digestive**

Il existe actuellement un très grand nombre de préparations destinées à l'allaitement artificiel, dont la composition tend à se rapprocher de celle du lait maternel. Depuis plusieurs années, les fabricants ont réalisé un important travail de formulation, cherchant à répondre aux besoins nutritionnels quotidiens ou occasionnels des nourrissons :

- Laits standards pour nourrissons et enfants en bonne santé ;
- Laits favorisant le transit (lutte contre la constipation) ;
- Laits satiétants ;
- Laits anti-régurgitations ;
- Laits hypoallergéniques ...

De manière générale, les préparations pour nourrissons et les préparations de suite sont retrouvées à l'officine sous forme de poudre à reconstituer à 13,5 % avec de l'eau adaptée à l'alimentation des nourrissons et des jeunes enfants. Pour chaque préparation en poudre, une cuillère-mesure permettant de doser la quantité de lait à reconstituer est fournie. Ainsi, quelle que soit la préparation employée, il convient de prélever une cuillère-mesure de poudre arasée mais non tassée, pour 30 mL d'eau. Par exemple, pour réaliser un biberon avec 120 mL d'eau, il faudra utiliser 4 cuillères-mesures de préparation en poudre. Le nombre de biberons et leur volume doivent être adaptés à l'âge et au poids de l'enfant, suivant l'avis d'un professionnel de santé formé à la nutrition infantile.

**1. Préparations pour nourrissons et de suite enrichies en *Lactobacillus fermentum* CECT5716**

Sur le marché français, nous avons pu recenser plusieurs préparations pour nourrissons et de suite enrichies en *Lactobacillus fermentum* CECT5716. Issue de la recherche laitière, cette souche bactérienne est naturellement présente dans le lait maternel (149).

Bien qu'elle semble faire preuve d'effets immunomodulateurs (149) et protecteurs vis-à-vis des infections gastro-intestinales (198), elle ne fait actuellement l'objet d'aucune recommandation positive en pathologie digestive chez le nourrisson.

**2. Préparations pour nourrissons et de suite enrichies en *Bifidobacterium lactis* Bb12**

*Bifidobacterium lactis* Bb12 fait partie des probiotiques ayant montré des effets anti-adhésifs (127) et anti-invasifs (131) à l'égard de pathogènes intestinaux. Il est donc légitime de penser que la souche pourrait protéger les nourrissons des infections gastro-intestinales, en renforçant la barrière digestive. C'est d'ailleurs cette propriété protectrice que les fabricants cherchent à mettre en avant.

Les études menées par l'ESPGHAN n'ont toutefois pas permis de faire apparaître suffisamment de preuves confortant les effets de la bifidobactérie sur la santé de l'hôte. *Bifidobacterium lactis* Bb12 ne dispose d'aucune recommandation en pratique clinique, par manque de données exploitables.

**3. Préparations pour nourrissons et de suite enrichies en *Lactobacillus reuteri* DSM17938**

Sous licence, la souche brevetée *Lactobacillus reuteri* DSM17938 est exploitée par un laboratoire spécialisé en nutrition infantile depuis 2008 (199). Au-delà du partenariat commercial constitué, il est important de noter que les préparations ainsi formulées présentent un intérêt non négligeable pour la santé digestive des nourrissons.

Comme vu précédemment, *Lactobacillus reuteri* DSM17938 permet de réduire la durée des épisodes diarrhéiques en cas de gastro-entérite aiguë, en association avec les mesures de réhydratation orale. Il a également un effet favorable sur les coliques et semble prometteur dans le traitement de la constipation chez le nourrisson. Une cuillère-mesure de ces préparations en poudre contient  $4,5 \cdot 10^6$  UFC de probiotiques. En fonction de la quantité de lait reconstitué administrée, le nourrisson ingère en moyenne  $10^8$  UFC à  $10^9$  UFC par jour, ce qui

correspond à la dose recommandée par l'ESPGHAN dans le cadre du traitement des gastro-entérites aiguës.

Ainsi, un avantage économique se profile pour les familles : un seul et unique lait permettrait de prendre en charge les besoins nutritionnels quotidiens du nourrisson, tout en limitant la durée de ses éventuels troubles digestifs. Il faut néanmoins veiller à ce que la composition nutritionnelle et les autres propriétés du lait choisi (épaissi, acidifié, enrichi en fibres, relais de l'allaitement maternel ...) correspondent aux besoins actuels du nourrisson considéré.

#### **4. Préparations pour nourrissons et de suite enrichies en « ferments lactiques »**

Nombreux sont les fabricants indiquant que leurs préparations pour nourrissons ou de suite sont enrichies en « ferments lactiques ». Selon les cas, le rôle qui leur est attribué est variable. Pour certains, le but est d'acidifier la formule afin d'accélérer la vidange gastrique et d'améliorer le transit intestinal. Pour d'autres, c'est l'activité lactasique des bactéries qui est recherchée, ayant pour objectif de faciliter la digestion du lactose chez des nourrissons sujets aux ballonnements et aux coliques. Dans tous les cas, ces préparations sont destinées à la prise en charge des troubles digestifs fonctionnels bénins hauts et bas tels que les rejets physiologiques, la constipation ou les coliques du nourrisson.

Sans précisions de genre, d'espèce et de souche, il est difficile d'analyser l'intérêt réel de ces bactéries ajoutées aux formules infantiles. De plus, dans certains cas, les microorganismes sont inactivés après fermentation : ils ne répondent alors plus à la définition des probiotiques *stricto sensu*.

### **D. Aliment diététique destiné à des fins médicales spéciales (ADDFMS)**

#### **1. SRO enrichi en *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 et zinc**

Il a récemment été développé un SRO enrichi en *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 et en zinc, à utiliser chez le nourrisson ou le jeune enfant en cas de gastro-entérite aiguë avec diarrhées et/ou vomissements. Comme tout SRO, il a pour vocation première d'éviter la déshydratation, en restaurant l'équilibre hydro-électrolytique de l'organisme. Sa composition (**Tableau XV**) suit les recommandations de l'ESPGHAN, avec une osmolarité de 220 mOsm/mL (200).

Tableau XV : Composition qualitative et quantitative du SRO enrichi en *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 et zinc (200)

Composant	Quantité par sachet de 5,5 g
Glucides	3,75 g
Sodium	0,35 g
Potassium	0,2 g
Chlorures	0,4 g
Citrates	0,5 g
Zinc	1,5 mg
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938	10 <sup>9</sup> UFC

Plusieurs études ont démontré que le zinc contribuait à réduire la durée et la sévérité des épisodes diarrhéiques (201) (202) et l'OMS recommande actuellement la supplémentation en zinc lors des gastro-entérites infectieuses (203). D'autre part, comme nous l'avons vu précédemment, l'ESPGHAN recommande l'utilisation du probiotique *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. Ces deux composants ont donc été ajoutés à la formule de base du SRO.

Un sachet du SRO doit être reconstitué à l'aide de 250 mL d'eau potable adaptée à l'usage pédiatrique. Il est ensuite administré selon les mêmes modalités qu'un SRO « classique » : à volonté, de manière fréquente et par petites quantités, jusqu'à amélioration de l'état de l'enfant. La solution reconstituée se conserve 6 h au réfrigérateur ou 3 h à température ambiante. (200)

## E. Dispositif médical (DM)

### 1. Dispositif médical associant siméticone et spores de *Bacillus coagulans*

Cette association de siméticone (émulsion à 30 %) et de spores de *Bacillus coagulans* (1,5.10<sup>9</sup> UFC/g de suspension) est un dispositif médical non remboursable de classe IIa. Le marquage CE a été délivré par un organisme habilité italien, l'Istituto Superiore di Sanità (204).

Le DM se présente sous forme de suspension buvable, conditionnée en flacon compte-gouttes afin d'en faciliter l'administration. Les gouttes peuvent être utilisées chez le nourrisson dès le plus jeune âge, afin de traiter flatulences, ballonnements et coliques, et/ou de réduire le temps de vidange gastrique, (le fabricant précise que le dispositif peut également être employé en

accompagnement des traitements éradiquant *Helicobacter pylori*). Chez le nourrisson, 10 gouttes doivent être administrées 2 à 4 fois par jour, soit pures, soit diluées dans un liquide alimentaire. Le produit se conserve jusqu'à 30 jours après ouverture du flacon (204).

Les spores constituent la forme de résistance des espèces de *Bacillus*. Ce sont des structures vivantes qui peuvent être considérées comme des probiotiques. La siméticone est une substance physiologiquement inerte, dépourvue d'activité pharmacologique que l'on retrouve dans plusieurs spécialités médicamenteuses avec AMM. C'est un silicone classiquement employé comme pansement intestinal et anti-flatulent. Il modifie la tension de surface des bulles de gaz piégées dans l'intestin, provoquant leur coalescence et soulageant ainsi les douleurs abdominales (205).

Pour obtenir le marquage CE, le fabricant a dû prouver que son dispositif ne présentait pas de danger pour la santé et la sécurité des patients. L'espèce *Bacillus coagulans* ne présente donc pas de risques pour les utilisateurs. Les revendications concernant ses effets positifs sur la santé ont également été évaluées par l'organisme notifié. Le marquage CE ayant été délivré, il est possible de conclure que ce dispositif médical est sûr d'emploi et efficace dans les indications prévues par le fabricant, notamment les coliques du nourrisson.

Toutefois, aucune recommandation actuelle n'encourage l'utilisation de cette bactérie en pathologie digestive chez le nourrisson.

# **Conclusion**

Vous l'aurez compris, le domaine d'utilisation des probiotiques est vaste et il reste encore beaucoup à découvrir sur l'usage qu'il peut être fait de ces bactéries amies de notre santé. Par son rôle de conseil, le pharmacien d'officine semble aujourd'hui être un acteur privilégié de ce que nous pouvons appeler la « thérapeutique microbienne ». Il est nécessaire que nous conservions un œil critique sur les produits probiotiques et les bienfaits médiatisés par leurs fabricants. Gardons à l'esprit que toutes les souches ne se valent pas en termes d'effets et d'efficacité. Chaque souche dispose d'une pharmacocinétique et d'une pharmacodynamique qui lui sont propres et qui ne peuvent être extrapolées à d'autres souches. Afin d'agir au niveau intestinal, la survie digestive des probiotiques est primordiale : ils doivent franchir la barrière acide de l'estomac, puis résister aux sels biliaires rencontrés dans l'intestin grêle. Leurs activités et modes d'action *in situ* sont ensuite variés, offrant de multiples possibilités préventives et curatives.

Celles-ci reposent encore sur de nombreuses hypothèses et les investigations expérimentales ou cliniques ne suffisent pas toujours à confirmer les arguments « *marketing* » des industriels. Nous avons pu constater que de nombreuses études, initialement prometteuses, souffraient de faiblesses méthodologiques et de biais statistiques. Les recherches, notamment *in vivo* chez l'Homme, doivent être poursuivies afin de clarifier les modes d'action des probiotiques, d'établir leurs indications et leurs posologies.

Plusieurs souches caractérisées disposent aujourd'hui d'indications réelles en pathologie digestive chez le nourrisson. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, *Lactobacillus rhamnosus* GG et *Saccharomyces boulardii* ont tous trois montré leur efficacité dans le traitement des gastro-entérites infectieuses en pédiatrie. Ils constituent ainsi un précieux soutien aux moyens de réhydratation, en diminuant la durée de la diarrhée. D'autre part, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 est défini comme la bactérie de choix pour la prise en charge des coliques du nourrisson, réduisant la durée quotidienne des pleurs dès la première semaine de traitement.

Les études offrent des résultats encourageants pour les autres affections intestinales que nous avons vues. Les nouveau-nés prématurés pourraient bénéficier d'une prophylaxie probiotique en vue de réduire les risques d'ECUN, pathologie intestinale dramatique, redoutée des néonatalogistes. Dans le cadre des antibiothérapies, un apport conjoint de probiotiques de type *Saccharomyces boulardii* limiterait la survenue de diarrhées et d'infections à *Clostridium difficile* chez les nourrissons traités. Finalement, certains probiotiques pourraient améliorer le confort digestif des nourrissons constipés.

À ce jour, les probiotiques ne constituent qu'une facette des traitements microbiens qui peuvent être employés. Dans le cas de pathologies intestinales lourdes, liées à un déséquilibre extrême du microbiote, une alternative aux traitements conventionnels peut être proposée : la greffe

fécale. Par exemple, lors d'infections récidivantes à *Clostridium difficile*, le microbiote fécal d'un individu sain est administré dans le tube digestif du patient malade afin d'éradiquer le pathogène. L'ANSM a publié en 2014 un document définissant la transplantation de microbiote fécal et son encadrement. Elle a pour l'heure fait le choix de considérer la greffe fécale comme un médicament, qui doit être préparé par les Pharmacies à Usage Intérieur (PUI) et utilisé dans le cadre d'essais cliniques autorisés. Les donneurs doivent faire l'objet d'une sélection rigoureuse, par le biais de questionnaires, d'entretiens médicaux et d'analyses de sang et de selles. Les produits fécaux employés doivent finalement faire l'objet d'une traçabilité rigoureuse du donneur au receveur (206).

À l'issue de ce travail, je suis convaincue que le microbiote intestinal tend à devenir un acteur incontournable de la santé de chacun. Les probiotiques offrent d'ores et déjà de belles possibilités de traitement des dysbioses intestinales et de nombreuses pistes restent encore à explorer. Les thérapeutiques microbiennes, en plein essor, rythmeront peut-être le quotidien des professionnels de santé dans un avenir proche.



# Bibliographie

1. **FONTY, G. et CHAUCHEYRAS-DURAND, F.** *Les écosystèmes digestifs*. Paris : Lavoisier, 2007. pp. 33-70.
2. **DORE, J. et RIGOTTIER-GOIS, L.** Flore microbienne intestinale. Méthodes d'études. [auteur du livre] J.-C. RAMBAUD, et al. *Flore microbienne intestinale. Physiologie et pathologie digestives*. Montrouge : John Libbey Eurotext, 2004, pp. 3-18.
3. **HUYBENS, N., MAINIL, J. et MARLIER, D.** Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 2009, 153, pp. 112-128.
4. **Groupe National Interprofessionnel des Semences et plants.** L'amplification d'ADN in vitro : la PCR. *GNIS Pédagogie*. [En ligne] [Citation : 15 Octobre 2015.] <http://www.gnis-pedagogie.org/biotechnologie-biologie-amplification-fragment-adn.html>.
5. **Groupe National Interprofessionnel des Semences et plants.** Visualisation d'un fragment d'ADN. *GNIS Pédagogie*. [En ligne] [Citation : 15 Octobre 2015.] <http://www.gnis-pedagogie.org/biotechnologie-biologie-visualisation-fragment-adn.html>.
6. **ROUX, V. et ROLAIN, J.-M.** Identification des bactéries par biologie moléculaire. *EMC - Maladies infectieuses*. 2014, Vol. 11, 1.
7. **COUTOULY, G., KLEIN, E., BARBIERI, E. et KRIAT, M.** *Travaux dirigés de biochimie, biologie moléculaire et bioinformatique*. 3<sup>e</sup> édition. Rueil-Malmaison : Doin, 2006.
8. **Metagenomics of the Human Intestinal Tract.** MetaHIT in brief ! *MetaHIT*. [En ligne] 2012. [Citation : 21 Avril 2015.] <http://www.metahit.eu/>.
9. **ARRIETA, M.C., et al.** The intestinal microbiome in early life : health and disease. *Frontiers in Immunology*. 2014, Vol. 5, 427.
10. **Organisation Mondiale de la Santé (OMS).** Les naissances prématurées. *Organisation Mondiale de la Santé*. [En ligne] [Citation : 03 mars 2015.] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/fr/>.
11. **AAGAARD, K., et al.** The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine*. 2014, 6, pp. 237–265.

12. **COLLIGNON, A. et BUTEL, M.-J.** Etablissement et composition de la flore microbienne intestinale. [auteur du livre] J.-C. RAMBAUD, et al. *Flore microbienne intestinale. Physiologie et pathologie digestives*. Montrouge : John Libbey Eurotext, 2004, pp. 19-38.
13. **JAKOBSSON, H.E., et al.** Decreased gut microbiota diversity, delayed bacteroidetes colonisation and reduced th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*. 2014, 63, pp. 559-566.
14. **RODRIGUEZ, J.M., et al.** The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2015, Vol. 26, 26050.
15. **JOST, T., et al.** Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breast feeding. *Environmental Microbiology*. 2014, Vol. 16, 9, pp. 2891-2904.
16. **VANDENPLAS, Y., et al.** Functional food and growth and development in infants. [auteur du livre] M. ROBERFOID et V., DELZENNE, N. COXAM. *Aliments fonctionnels*. 2è édition. Paris : Lavoisier, 2008, 19, pp. 563-574.
17. **Organisation Mondiale de la Santé (OMS).** Principes directeurs pour l'alimentation complémentaire de l'enfant allaité au sein. *Organisation Mondiale de la Santé*. [En ligne] 2003. [Citation : 21 Avril 2015.] [http://www.who.int/maternal\\_child\\_adolescent/documents/a85622/fr/](http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/a85622/fr/).
18. **FALLANI, M., et al.** Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe : geographic influence beyond delivery mode, breastfeeding, and antibiotics. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2010, Vol. 51, 1, pp. 77-84.
19. **STEWART, J.A.** Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria in the faecal microflora of children. *Journal of Medical Microbiology*. 2005, 54, pp. 1239-1242.
20. **TURNBAUGH, P.J., et al.** A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009, Vol. 457, 7228, pp. 480-484.
21. **BERNALIER-DONADILLE, A. et DORE, J.** Structure et fonctions métaboliques du microbiote gastro-intestinal de l'homme. [auteur du livre] M. ROBERFROID, V. COXAM et N. DELZENNE. *Aliments Fonctionnels*. 2è édition. Paris : Lavoisier, 2008, 14, pp. 429-460.
22. **BERNALIER-DONADILLE, A.** Activités métaboliques du microbiote intestinal humain. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. Septembre 2010, Vol. 34, 4S1, pp. 17-23.
23. **GERARD, P.** Les relations entre microbiote intestinal et lipides. *Cahier de Nutrition et de Diététique*. Novembre 2014, Vol. 49, 5, pp. 213-217.

24. **SHI, H.N. et WALKER, A.** Bacterial colonization and the development of intestinal defences. *Canadian Journal of Gastroenterology*. 2004, Vol. 18, 8, pp. 493-500.
25. **IVANOV, I.I. et HONDA, K.** Intestinal commensal microbes as immune modulators. *Cell Host Microbe*. 2012, Vol. 12, 4, pp. 496-508.
26. **SUDO, N., SAWAMURA, S. et TANAKA, K.** The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *The Journal of Immunology*. 1997, 159, pp. 1739–1745.
27. **LIN, P.W. et STOLL, B.J.** Necrotising enterocolitis. *Lancet*. 2006, Vol. 368, pp. 1271-1283.
28. **MARTEAU, P.** Les moyens de défense du tube digestif contre les agents infectieux. [auteur du livre] P. RAMPAL, et al. *Colites infectieuses de l'adulte*. Paris : John Libbey Eurotext, 2000, pp. 40-52.
29. **GAUDIER, E. et HOEBLER, C.** Rôles physiologiques des mucines dans la barrière colique. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. 2006, 30, pp. 965-974.
30. **Carolina Biological Supply Company.** ISM Photo - Réf : 012695-34 jéjunum humain, montrant 2 cellules épithéliales caliciformes produisant du mucus. *ISM - Image Science Médecine*. [En ligne] 2013. [Citation : 11 Mars 2016.] <http://www.ismphoto.com/photozoom.php?idp=12309>.
31. **DRAY, X. et MARTEAU, P.** Physiologie gastro-intestinale de l'homme. [auteur du livre] M. ROBERFROID, V. COXAM et N. DELZENNE. *Aliments fonctionnels*. 2è édition. Paris : Lavoisier, 2008, pp. 409-428.
32. **Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA).** *Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'adulte*. 2005.
33. **HAJISHENGALLIS, G. et LAMBRIS, J.D.** Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system. *Trends in Immunology*. Avril 2010, Vol. 31, 4, pp. 154-163.
34. **Carolina Biological Supply Company.** ISM Photo - Réf : 012700-34 Plaques de Peyer. *ISM - Image Science Médecine*. [En ligne] 2013. [Citation : 11 Mars 2016.] <http://www.ismphoto.com/photozoom.php?idp=12439>.
35. **Carolina Biological Supply Company.** ISM Photo - Réf : 014872-93 Gros intestin (côlon) humain. *ISM - Image Science Médecine*. [En ligne] 2013. [Citation : 11 Mars 2016.] <http://www.ismphoto.com/photozoom.php?idp=12168>.

36. **Carolina Biological Supply Company.** ISM Photo - Réf : 012719-34 CT d'un appendice iléo-caecal humain. *ISM - Image Science Médecine*. [En ligne] 2013. [Citation : 11 Mars 2016.] <http://www.ismphoto.com/photozoom.php?idp=12685>.
37. **SIMON, M.** Les cellules immunitaires et les organes lymphoïdes. *Cours-Pharmacie*. [En ligne] 7 Septembre 2009. [Citation : 11 Mars 2016.] <http://www.cours-pharmacie.com/immunologie/les-cellules-immunitaires-et-les-organes-lymphoides.html>.
38. **ESSAKALLI, M., et al.** Le lymphocyte TH17 dernier-né de la famille des lymphocytes T CD4+. *Pathologie Biologie*. 2010, 58, pp. 437-443.
39. **CORVAISIER-CHIRON, M. et BEAUVILLAIN, C.** Les lymphocytes T régulateurs et les lymphocytes Th17 : fonctions physiologiques et pathologiques. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2010, 424, pp. 31-40.
40. **BOSCHETTI, G., et al.** Réponses immunitaires au cours des MICI : implication de l'axe IL-23/Th17. *Hépto-Gastro & Oncologie Digestive*. Juin 2012, Vol. 19, 6, pp. 446-454.
41. **PLONQUET, A.** Différenciation lymphocytaire B normale. *Revue francophone des laboratoires*. 2013, 452, pp. 27-35.
42. **SIMON, M.** Activation des lymphocytes. *Cours-Pharmacie*. [En ligne] 7 Septembre 2009. [Citation : 11 Mars 2016.] <http://www.cours-pharmacie.com/immunologie/activation-des-lymphocytes.html>.
43. **WALKER, A.** Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2013, 63, pp. 8-15.
44. **PASTEUR, L.** Annales de chimie et de physique - Mémoire sur la fermentation appelée lactique. *Gallica Bibliothèque Nationale de France*. [En ligne] 1858. [Citation : 18 Décembre 2014.] <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k347939/f403.image.r=Annales+de+chimie+et+de+physique.langFR.03651444>.
45. **PASTEUR, L.** Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences - Mémoire sur la fermentation appelée lactique. *Gallica Bibliothèque Nationale de France*. [En ligne] 1857. [Citation : 18 Décembre 2014.] <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k30026.image.r=+COMPTES+RENDUS+++DES+S%C3%89ANCES+DE+L.f915.langFR.00014036>.

46. **TISSIER, H.** *Recherches sur la flore intestinale (état normal et pathologique) des nourrissons*. Thèse de doctorat. Paris : Université de médecine, 1900.
47. **METCHNIKOFF, E.** Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. *The prolongation of life : Optimistic studies*. Londres : G.P. Putnam's Sons, 1907, pp. 161-183.
48. **Yakult Honsha Company, Ltd.** The history of Yakult's research institute. *Yakult Central Institute*. [En ligne] [Citation : 10 Juin 2014.] <http://institute.yakult.co.jp/english/about/history/>.
49. **LILLY, D.M. et STILLWELL, R.H.** Probiotics : Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 1965, 147, pp. 747-748.
50. **PARKER, B.** Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health*. 1974, 29, pp. 4-8.
51. **FULLER, R.** A review : Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Microbiology*. 1989, 66, pp. 365-378.
52. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/ Organisation Mondiale de la Santé (OMS).** *Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes*. Cordoba, Argentine : FAO/OMS, 2001.
53. **GUARNER, F. et SCHAAFSMA, G.J.** Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, 1998, 39, pp. 237-238.
54. **VASSON, M.-P.** Modulation nutritionnelle de la réponse immunitaire. [auteur du livre] M.B. ROBERFROID, V. COXAM et N. DELZENNE. *Aliments fonctionnels*. 2<sup>e</sup> édition. Paris : Lavoisier, 2008, 15, p. 476.
55. **The Universal Protein Resource.** Lactobacillales. *UniProt*. [En ligne] [Citation : 9 Janvier 2015.] <http://www.uniprot.org/taxonomy/186826>.
56. **LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.-H. et WHITMAN, W.B.** Revised road map to the phylum Firmicutes. [auteur du livre] Paul Vos, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>e</sup> édition. New York : Springer, 2009, Vol. 3, pp. 1-14.
57. **DE VOS, P., et al.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 3<sup>e</sup> édition. New York : Springer, 2009. pp. 464-735. Vol. 3.

58. **MONNET, V., et al.** Métabolisme et ingénierie métabolique. [auteur du livre] Georges Corrieu et François-Marie Luquet. *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments*. Cachan : Lavoisier, 2008, pp. 271-411.
59. **The Universal Protein Resource.** Bifidobacterium. *UniProt*. [En ligne] [Citation : 9 Janvier 2015.] <http://www.uniprot.org/taxonomy/1678>.
60. **DELLAGLIO, F. et FELIS, G.E.** Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. [auteur du livre] G.W. TANNOCK. *Probiotics and Prebiotics : Scientific Aspects*. Norfolk : Caister Academic Press, 2005, pp. 25-50.
61. **The Universal Protein Resource.** Bacillus. *UniProt*. [En ligne] [Citation : 9 Janvier 2015.] <http://www.uniprot.org/taxonomy/1386>.
62. **DE VOS, P., et al.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 3è édition. New York : Springer, 2009. pp. 21-127. Vol. 3.
63. **Autorité européenne de sécurité des aliments.** Résumé : Avis du groupe scientifique sur les risques biologiques concernant *Bacillus cereus* et les autres *Bacillus* spp. dans les denrées alimentaires. *Autorité européenne de sécurité des aliments*. [En ligne] [Citation : 9 Janvier 2015.] [http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/biohaz\\_op\\_ej10\\_bacillus\\_summary\\_fr1,0.pdf](http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/biohaz_op_ej10_bacillus_summary_fr1,0.pdf).
64. **The Universal Protein Resource.** Saccharomycetaceae. *The Universal Protein Resource*. [En ligne] [Citation : 9 Janvier 2015.] <http://www.uniprot.org/taxonomy/4893>.
65. **CZERUCKA, D., PICHE, T. et RAMPAL, R.** Review article : yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. John Wiley and Sons, 2007, 26.
66. **BUTS, J.-P.** Exemple d'un médicament probiotique : *Saccharomyces boulardii* lyophilisé. [auteur du livre] J.-C. RAMBAUD, et al. *Flore microbienne intestinale. Physiologie et pathologie digestives*. Montrouge : John Libbey Eurotext, 2004, pp. 221-244.
67. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/ Organisation Mondiale de la Santé (OMS).** *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London Ontario : FAO/OMS, 2002.
68. **LIONG, M.-T.** Safety of probiotics: translocation and infection. *Nutrition Reviews*. 2008, Vol. 66, 4, pp. 192-202.
69. **LAND, M.H., et al.** Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics*. 2005, 115, pp. 178–181.

70. **DE GROOTE, M.A., et al.** Lactobacillus rhamnosus GG bacteremia associated with probiotic use in a child with short gut syndrome. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2005, 24, pp. 278–280.
71. **OGGIONI, M.R., et al.** Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of Bacillus subtilis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998, 36, pp. 325-326.
72. **PERAPOCH, J., PLANES, A.M. et QUEROL, A.** Fungemia with Saccharomyces cerevisiae in two newborns, only one of whom had been treated with ultra-levura. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. Juin 2000, Vol. 19, 6, pp. 468-470.
73. **CASSONE, M., SERRA, P. et MONDELLO, F.** Outbreak of Saccharomyces cerevisiae subtype boulardii fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003, 41, pp. 5340-5343.
74. **BAUER, H., et al.** The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. Studies on germfree mice. *The American Journal of Pathology*. 1963, Vol. 42, pp. 471–483.
75. **SMITH, K., McCOY, K.D. et MACPHERSON, A.J.** Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Seminars in Immunology*. 2007, Vol. 19, pp. 59–69.
76. **WEGMANN, T.G., et al.** Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship : is successful pregnancy a TH2 phenomenon ? *Immunology Today*. 1993, Vol. 14, pp. 353-356.
77. **POCHARD, P., GOSSET, P. et GRANGETTE, C.** Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2002, Vol. 110, pp. 617-623.
78. **DELCOUR, J., et al.** The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*. Juillet-Novembre 1999, Vol. 76, 1-4, pp. 159-184.
79. **CRYLE, M.** Glycopeptide Biosynthetic P450s. *Max Planck Institute for Medical Research*. [En ligne] 2016. [Citation : 13 Mars 2016.] <http://www.mpimf-heidelberg.mpg.de/groups/cytochrome/glykopeptide>.
80. **FLOREZ, A.B., et al.** Acquired macrolide resistance in the human intestinal strain Lactobacillus rhamnosus E41 associated with a transition mutation in 23S rRNA genes. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007, Vol. 30, pp. 341–344.

81. **SATO, T. et IINO, T.** Genetic analyses of the antibiotic resistance of *Bifidobacterium bifidum* strain Yakult YIT 4007. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, Vol. 137, pp. 254–258.
82. **HADI, I.** Foundation Block - Pharmacology. *Imran Hadi Medical Student*. [En ligne] 22 Octobre 2014. [Citation : 13 Mars 2016.] <https://drimranhadi.wordpress.com/2014/10/22/foundation-block-pharmacology/>.
83. **GUEIMONDE, M., et al.** Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 18 Juillet 2013, Vol. 4.
84. **WILLEY, J. M., et al.** *Microbiologie*. 3ème édition. Bruxelles : De Boeck, 2010. pp. 317-356.
85. Code de la santé publique - Article L5111-1. *Legifrance*. [En ligne] [Citation : 12 février 2015.] <http://legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?idArticle=LEGIARTI000006689867&cidTexte=LEGITEXT000006072665&dateTexte=20150212>.
86. **LEEM - Les entreprises du médicament.** Comment se décide une autorisation de mise sur le marché ? *LEEM - Les entreprises du médicament*. [En ligne] [Citation : 12 février 2015.] <http://www.leem.org/article/comment-se-decide-une-autorisation-de-mise-sur-marche-0>.
87. Directive 2002/46/CE du Parlement européen et du Conseil du 10 juin 2002 relative au rapprochement des législations des États membres concernant les compléments alimentaires. *EUR-Lex - L'accès au droit de l'Union européenne*. [En ligne] [Citation : 20 février 2015.]
88. Décret n°2006-352 du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires - Article 2. *Légifrance*. [En ligne] [Citation : 12 février 2015.] [http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexteArticle.do;jsessionid=F18264F78F9FCB6DF87A403F08FE453C.tpdila08v\\_1?idArticle=LEGIARTI000006290521&cidTexte=LEGITEXT000006053466&dateTexte=20150211](http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexteArticle.do;jsessionid=F18264F78F9FCB6DF87A403F08FE453C.tpdila08v_1?idArticle=LEGIARTI000006290521&cidTexte=LEGITEXT000006053466&dateTexte=20150211).
89. Décret n°2006-352 du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires - Article 4. *Légifrance*. [En ligne] [Citation : 12 février 2015.] [http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexteArticle.do;jsessionid=ECF88AEF6E3B77C1A6E7579B3133640F.tpdila08v\\_1?idArticle=LEGIARTI000006290523&cidTexte=LEGITEXT000006053466&dateTexte=20150211](http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexteArticle.do;jsessionid=ECF88AEF6E3B77C1A6E7579B3133640F.tpdila08v_1?idArticle=LEGIARTI000006290523&cidTexte=LEGITEXT000006053466&dateTexte=20150211).



90. Décret n°2006-352 du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires - Article 15. *Légifrance*. [En ligne] [Citation : 12 février 2015.] [http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexteArticle.do;jsessionid=ECF88AEF6E3B77C1A6E7579B3133640F.tpdila08v\\_1?idArticle=LEGIARTI000006290537&cidTexte=LEGITEXT000006053466&dateTexte=20150211](http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexteArticle.do;jsessionid=ECF88AEF6E3B77C1A6E7579B3133640F.tpdila08v_1?idArticle=LEGIARTI000006290537&cidTexte=LEGITEXT000006053466&dateTexte=20150211).
91. Décret n°2006-352 du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires - Article 16. *Légifrance*. [En ligne] [Citation : 12 février 2015.] [http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexteArticle.do;jsessionid=395FCBEFA6BF8BF98E3C6756409E3E15.tpdila08v\\_1?idArticle=LEGIARTI000006290538&cidTexte=LEGITEXT000006053466&dateTexte=20150211](http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexteArticle.do;jsessionid=395FCBEFA6BF8BF98E3C6756409E3E15.tpdila08v_1?idArticle=LEGIARTI000006290538&cidTexte=LEGITEXT000006053466&dateTexte=20150211).
92. Compléments alimentaires. *Le portail des ministères économiques et financiers*. [En ligne] [Citation : 12 février 2015.] <http://www.economie.gouv.fr/dgccrf/Securite/Produits-alimentaires/Complements-alimentaires>.
93. Décret n°2006-352 du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires - Article 3. *Légifrance*. [En ligne] [Citation : 12 février 2015.] [http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexteArticle.do;jsessionid=ECF88AEF6E3B77C1A6E7579B3133640F.tpdila08v\\_1?idArticle=LEGIARTI000006290522&cidTexte=LEGITEXT000006053466&dateTexte=20150211](http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexteArticle.do;jsessionid=ECF88AEF6E3B77C1A6E7579B3133640F.tpdila08v_1?idArticle=LEGIARTI000006290522&cidTexte=LEGITEXT000006053466&dateTexte=20150211).
94. Règlement n° 1924/2006 du Parlement européen et du Conseil du 20 décembre 2006 concernant les allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires. *EUR-Lex - L'accès au droit de l'Union européenne*. [En ligne] [Citation : 12 février 2015.] <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1924-20121129&from=EN>.
95. Règlement n° 432/2012 de la Commission du 16 mai 2012. *EUR-Lex - L'accès au droit de l'Union européenne*. [En ligne] [Citation : 20 février 2015.] <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX:32012R0432>.
96. **Standing committee on the food chain and animal health**. Guidance on the implementation of regulation n°1924/2006 on nutrition and health claims made on foods. *European Commission*. [En ligne] 14 Décembre 2007. [Citation : 18 Janvier 2015.] [http://ec.europa.eu/food/food/labellingnutrition/claims/guidance\\_claim\\_14-12-07.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/labellingnutrition/claims/guidance_claim_14-12-07.pdf).
97. Règlement n° 1169/2011 du Parlement européen et du Conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires. *EUR-Lex - L'accès au droit de l'Union européenne*. [En ligne] [Citation : 20 février 2015.] <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex:32011R1169>.

98. Directive 2009/39/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 mai 2009 relatives aux denrées alimentaires destinées à une alimentation particulière. *EUR-Lex - L'accès au droit de l'Union européenne*. [En ligne] [Citation : 15 octobre 2015.] <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009L0039&from=FR>.
99. Directive 2006/141/CE de la Commission des Communautés européennes du 22 décembre 2006 concernant les préparations pour nourrissons et les préparations de suite et modifiant la directive 1999/21/CE. *EUR-Lex - L'accès au droit de l'Union européenne*. [En ligne] [Citation : 15 octobre 2015.] <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0141&from=FR>.
100. Code de la santé publique - Article L5137-1. *Légifrance*. [En ligne] [Citation : 15 octobre 2015.] [http://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?sessionId=CC2634F8D50FAA71E8C2CA54F7E54785.tpdila19v\\_3?idArticle=LEGIARTI000006690163&cidTexte=LEGITEXT000006072665&dateTexte=20150115](http://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?sessionId=CC2634F8D50FAA71E8C2CA54F7E54785.tpdila19v_3?idArticle=LEGIARTI000006690163&cidTexte=LEGITEXT000006072665&dateTexte=20150115).
101. Directive 1999/21/CE de la Commission européenne du 25 mars 1999 relative aux aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales. *EUR-Lex - L'accès au droit de l'Union européenne*. [En ligne] [Citation : 15 octobre 2015.] <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:31999L0021&from=FR>.
102. Code de la santé publique - Article L5211-1. *Légifrance*. [En ligne] [Citation : 15 octobre 2015.] <http://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006690281>.
103. Dispositifs médicaux. *Ministère des Affaires sociales, de la Santé et des Droits des femmes*. [En ligne] 19 janvier 2015. [Citation : 15 octobre 2015.] <http://www.sante.gouv.fr/dispositifs-medicaux,16157.html>.
104. Directive 93/42/CEE du Conseil du 14 juin 1993 relative aux dispositifs médicaux. *EUR-Lex - L'accès au droit de l'Union européenne*. [En ligne] [Citation : 15 octobre 2015.] <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?qid=1417793098931&uri=CELEX:01993L0042-20071011>.
105. **EBEL, B.** *Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la survie et de la fonctionnalité d'une bactérie modèle, Bifidobacterium bifidum, par modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz*. Thèse de doctorat d'Université. Dijon : Université de Bourgogne, 2012.

106. **SAARELA, M., et al.** Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2004, 96, pp. 1205-1214.
107. **COLLINS, J., et al.** 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 Ecology in Health and Disease*. 2002, 14, pp. 81-89.
108. **POCHART, P., et al.** Viable starter culture, beta-galactosidase activity, and lactose in duodenum after yogurt ingestion in lactase-deficient humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1989, 49, pp. 828-831.
109. **GOLDIN, B. R., et al.** Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive Diseases and Sciences*. 1992, 37, pp. 121-128.
110. **SHINODA, T., et al.** Survival of *Lactobacillus helveticus* strain CP53 in the human gastrointestinal tract. *Letters in Applied Microbiology*. 2001, 32, pp. 108-113.
111. **RANADHEERA, R.D.C.S., BAINES, S.K. et ADAMS, M.C.** Importance of food in probiotic efficacy. *Food research International*. 2010, 43, pp. 1-7.
112. **JAN, G., et al.** Survival and beneficial effects of *Propionibacteria* in the human gut : in vivo and in vitro investigations. *Lait*. 2002, 82, pp. 131-144.
113. **GBASSI, G.K.** *Aspects physicochimiques de l'encapsulation et de la désencapsulation des probiotiques. Thèse de doctorat d'université.* Strasbourg : Université de Strasbourg, 2010.
114. **SAXELIN, M., PESSI, T. et SALMINEN, S.** Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. *International Journal of Food Microbiology*. 1995, 25, pp. 199-203.
115. **ALANDER, M., et al.** Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 65, pp. 351-354.
116. **BOUHNİK, Y., et al.** Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* sp ingested in fermented milk. *Gastroenterology*. 1992, 102, pp. 875-878.
117. **REID, G., et al.** Prevention of urinary tract infection in rats with an indigenous *Lactobacillus casei* strain. *Infection and Immunity*. 1985, 49, pp. 320-324.

118. **CHAN, R.C., REID, G. et IRVIN, R.T.** Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments. *Infection and Immunity*. 1985, 47, pp. 84-89.
119. **REID, G., COOK, R.L. et BRUCE, A.W.** Examination of strains of lactobacilli for properties that may influence bacterial interference in the urinary tract. *Journal of Urology*. 1987, 138, pp. 330-335.
120. **BRUCE, A.W. et REID, G.** Intravaginal instillation of lactobacilli for prevention of recurrent urinary tract infections. *Canadian Journal of Microbiology*. 1988, 34, pp. 339–343.
121. **CHAUVIERE, G., COCONNIER, M.H. et KERNEIS, S.** Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Journal of General Microbiology*. 1992, 138, pp. 1689–1696.
122. **TUOMOLA, E.M. et SALMINEN, S.J.** Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, 41, pp. 45-51.
123. **BERNET, M.F., et al.** Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen–cell interactions. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993, 59, pp. 4121-4123.
124. **SERVIN, A.L. et COCONNIER, M.-H.** Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2003, Vol. 17, 5, pp. 741-754.
125. **MACK, D.R., et al.** Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*. 2003, 52, pp. 827–833.
126. **COLLADO, M.C., GRZESKOWIAK, L. et SALMINEN, S.** Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Current Microbiology*. 2007, 55, pp. 260-265.
127. **COLLADO, M.C., MERILUOTO, J. et SALMINEN, S.** Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*. 2007, 45, pp. 454-460.
128. **ALTENHOEFER, A., et al.** The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunology Medical Microbiology*. 2004, 40, pp. 223-229.

129. **INGRASSIA, I., LEPLINGARD, A. et DARFEUILLE-MICHAUD, A.** Lactobacillus casei DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive Escherichia coli isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71, pp. 2880–2887.
130. **COCONNIER, M.-H., et al.** Antagonistic Activity of Lactobacillus acidophilus LB against Intracellular Salmonella enterica Serovar Typhimurium Infecting Human Enterocyte-Like Caco-2/TC-7 Cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, 66, pp. 1152–1157.
131. **OELSCHAEGER, T.A.** Mechanisms of probiotic actions – A review. *International Journal of Medical Microbiology*. 2010, 300, pp. 57-62.
132. **ASAHARA, T., et al.** Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7. *Infection and Immunity*. 2004, 72, pp. 2240–2247.
133. **TURNER, P.C., et al.** Lactobacillus rhamnosus strain GG restores alkaline phosphatase activity in differentiating Caco-2 cells dosed with the potent mycotoxin deoxynivalenol. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, 46, pp. 2118-2123.
134. **GRATZ, S., et al.** Lactobacillus rhamnosus strain GG modulates intestinal absorption, fecal excretion, and toxicity of aflatoxin B1 in rats. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, 72, pp. 7398-7400.
135. **GRATZ, S., et al.** Lactobacillus rhamnosus strain GG reduces aflatoxin B1 transport, metabolism, and toxicity in Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73, pp. 3958–3964.
136. **CASTAGLIUOLO, I., et al.** Saccharomyces boulardii protease inhibits Clostridium difficile toxin A effects in the rat ileum. *Infection and Immunity*. 1996, 64, pp. 5225–5232.
137. **CHEN, X., et al.** Saccharomyces boulardii inhibits ERK1/2 mitogen-activated protein kinase activation both in vitro and in vivo and protects against Clostridium difficile toxin-A induced enteritis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006, 281, pp. 24449-24454.
138. **QAMAR, A., et al.** Saccharomyces boulardii stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to Clostridium difficile toxin A in mice. *Infection and Immunity*. 2001, 69, pp. 2762–2765.
139. **ZYREK, A.A., et al.** Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of Escherichia coli Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cellular Microbiology*. 2007, 9, pp. 804-816.

140. **YAN, F., et al.** Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology*. 2007, Vol. 132, pp. 562–575.
141. **SCHLEE, M., et al.** Induction of human  $\beta$ -defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infection and Immunity*. 2007, 75, pp. 2399–2407.
142. **TAKEDA, K., et al.** Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. *Clinical and Experimental Immunology*. 2006, 146, pp. 109-115.
143. **HALLER, D., et al.** Activation of Human NK Cells by Staphylococci and Lactobacilli Requires Cell Contact-Dependent Costimulation by Autologous Monocytes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2002, 9(3), pp. 649-657.
144. **DONG, H., ROWLAND, I. et YAQOOB, P.** Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro. *British Journal of Nutrition*. 2012, 108(3), pp. 459-470.
145. **SCHULTZ, M., et al.** Immunomodulatory consequences of oral administration of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in healthy volunteers. *Journal of Dairy Research*. 2003, 70, pp. 165-173.
146. **MORATH, S., GEYER, A. et HARTUNG, T.** Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001, 193(3), pp. 393-397.
147. **GRANGETTE, C., et al.** Enhanced anti-inflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences - USA*. 2005, 102, pp. 10321-10326.
148. **RACHMILEWITZ, D., et al.** Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology*. 2004, 126, pp. 520-528.
149. **PEREZ-CANOA, F.J., DONG, H. et YAQOOB, P.** In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713 : two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology*. 2010, Vol. 215, 12, pp. 996-1004.
150. **DONG, H., ROWLAND, I. et TUOHY, K.M.** Selective effects of *Lactobacillus casei* Shirota on T cell activation, natural killer cell activity and cytokine production. *Clinical and Experimental Immunology*. 2010, 161, pp. 378–388.

151. **MEYER, A.L., MICKSCHE, M. et HERBACEK, I.** Daily intake of probiotic as well as conventional yogurt has a stimulating effect on cellular immunity in young healthy women. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2006, 50, pp. 282–289.
152. **OZKAN, T.B., SAHIN, E. et ERDEMIR, G.** Effect of *Saccharomyces boulardii* in children with acute gastroenteritis and its relationship to the immune response. *Journal of International Medical Research*. 2007, 35, pp. 201–212.
153. **DE VRESE, M., WINKLER, P. et RAUTENBERG, P.** Effect of *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *Bifidobacterium longum* SP07/3, *B. bifidum* MF 20/5 on common cold episodes : a double blind, randomized, controlled trial. *Clinical Nutrition*. 2005, 24, pp. 481–491.
154. **ISOLAURI, E., et al.** Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical and Experimental Allergy*. 2000, 30, pp. 1604-1610.
155. **REN, D., et al.** Evaluation of immunomodulatory activity of two potential probiotic *Lactobacillus* strains by in vivo tests. *Anaerobe*. 2015, 35, pp. 22-27.
156. **IMANI FOOLADI, A.A., et al.** Th1 Cytokine Production Induced by *Lactobacillus acidophilus* in BALB/c Mice Bearing Transplanted Breast Tumor. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2015, 8(4).
157. **FUKUSHIMA, Y., et al.** Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, 42, pp. 39-44.
158. **KANDASAMY, S., et al.** *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* enhance mucosal B cell responses and differentially modulate systemic antibody responses to an oral human rotavirus vaccine in a neonatal gnotobiotic pig disease model. *Gut Microbes*. 2014, 5(5), pp. 639-651.
159. **KIKUCHI, Y., et al.** In vivo dose response and in vitro mechanistic analysis of enhanced immunoglobulin A production by *Lactobacillus plantarum* AYA. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. 2015, 34(3), pp. 53-58.
160. **LACHANCE, C. et ST-VIL, D.** Entérocolite nécrosante. [auteur du livre] J. TURGEON, et al. *Dictionnaire de thérapeutique pédiatrique Weber*. 2è édition. Montréal : Editions de La Chenelière, 2008, pp. 509-511.
161. **Organisation Mondiale de la Santé (OMS).** *International statistical classification of diseases and related health problems*. 10è révision. Genève : OMS, 2010. Vol. 2.

162. **WANG, Y., et al.** 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *The International Society for Microbial Ecology Journal*. 2009, 3, pp. 944-954.
163. **GRISHIN, A., et al.** The Role of the Intestinal Microbiota in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis. *Seminars in Pediatric Surgery*. Mai 2014, 22(2), pp. 69-75.
164. **MILLET, V., LACROZE, V. et SIMEONI, U.** Enfant prématuré. [auteur du livre] O. GOULET, M. VILDAILHET et D. TURCK. *Alimentation de l'enfant en situations normale et pathologique*. 2è édition. Rueil-Malmaison : Wolters-Kluwer France, 2012, Chapitre 46.
165. **BELL, J.M., et al.** Neonatal Necrotising Enterocolitis : Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Annals of surgery*. Janvier 1978, Vol. 187, 1.
166. **ALFALEH, K. et ANABREES, J.** Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014, 4.
167. **WIECKOWSKA, A. et GERVAIS, P.** Diarrhée chronique et malabsorption. [auteur du livre] J. TURGEON, et al. *Dictionnaire de thérapeutique pédiatrique Weber*. 2è édition. Montréal : Editions la Chenelière, 2008, pp. 422-429.
168. **Organisation Mondiale de la Santé (OMS).** Enfants: réduire la mortalité. *Organisation Mondiale de la Santé*. [En ligne] Septembre 2014. [Citation : 14 Avril 2015.] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs178/fr/>.
169. **LORROT, M., BENHAMADOUCHE-CASARI, H. et VASSEUR, M.** Physiopathologie de la diarrhée à Rotavirus. *Virologie*. 2009, 9, pp. 9-15.
170. **National Institute of Allergy and Infectious Diseases.** Rotavirus Structure. *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*. [En ligne] 19 Juillet 2010. [Citation : 16 Mars 2016.] <https://www.niaid.nih.gov/topics/rotavirus/Pages/rotavirusIllustration.aspx>.
171. **EL ANBASSI, S., BIANCHI, V. et DUPLOYEZ, N.** *Bactériologie, virologie*. Paris : De Boeck Supérieur, 2013.
172. **European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN).** Use of Probiotics for Management of Acute Gastroenteritis : A Position Paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2014, 58, pp. 531-539.
173. **CARRE, D.** Conduite à tenir devant une diarrhée aiguë. Etiologies. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale - Chirurgie*. Octobre 2004, Vol. 1, 5, pp. 493-532.



174. **JOHNSTON, B.C., et al.** Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011, 11.
175. **GOLDENBERG, J.Z., et al.** Probiotics for the prevention of Clostridium difficile-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2013, 5.
176. **SPIGELBLATT, L. et COUSINEAU, D.** Pleurs excessifs et coliques. [auteur du livre] J. TURGEON, et al. *Dictionnaire de thérapeutique pédiatrique Weber*. 2è édition. Montréal : Editions de la Chenelière, 2008, pp. 1022-1026.
177. **BRUYAS-BERTHOLON, V., et al.** Quels traitements pour les coliques du nourrisson ? *La Presse Médicale*. 2012, 41, pp. 404-410.
178. **CROWCROFT, N.S. et STRACHAN, D.P.** The social origins of infantile colic : questionnaire study covering 76,747 infants. *British Medical Journal*. 1997, 314, pp. 1325-1328.
179. **ANABREES, J., et al.** Probiotics for infantile colic : a systematic review. *BMC Pediatrics*. 2013, Vol. 13, 186.
180. **BOIGE, N.** Le nourrisson en pleurs : reflux, coliques ou colère. Une approche psychosomatique. *Médecine du Sommeil*. Septembre 2008, Vol. 5, 17, pp. 5-11.
181. **LACHAUX, A. et ROY, P.** La constipation. *Archives de pédiatrie*. 2008, 15, pp. 95-101.
182. **VAN TILBURG, M.A.L., et al.** Prevalence of Functional Gastrointestinal Disorders in Infants and Toddlers. *The Journal of Pediatrics*. Mars 2015, Vol. 166, 3, pp. 684-689.
183. **LOENING-BAUCKE, V.** Prevalence, symptoms and outcome of constipation in infants and toddlers. *The Journal of Pediatrics*. 2005, Vol. 146, 3, pp. 359-363.
184. **COCCORULLO, P., et al.** Lactobacillus reuteri (DSM 17938) in Infants with Functional Chronic Constipation : A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. *The Journal of Pediatrics*. 2010, Vol. 157, 4, pp. 598-602.
185. **CHMIELEWSKA, A. et SZAJEWSKA, H.** Systematic review of randomised controlled trials : Probiotics for functional constipation. *World Journal of Gastroenterology*. Janvier 2010, Vol. 16, 1, pp. 69-75.
186. **Thériaque.** LACTEOL 340 mg, poudre orale sachet - Monographie spécialité. *Thériaque*. [En ligne] [Citation : 13 Août 2015.] <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=2268>.

187. **Laboratoire PiLeJe.** Lactibiane® Enfants. *Lactibiane® Probiotiques*. [En ligne] [Citation : 13 Octobre 2015.] <http://www.probiotiques-lactibiane.fr/lactibiane-enfant>.
188. **Autorité européenne de sécurité des aliments.** EU Register on nutrition and health claims. *Commission européenne*. [En ligne] 2012. [Citation : 15 Octobre 2015.] <http://ec.europa.eu/nuhclaims/resources/docs/euregister.pdf>.
189. **Autorité européenne de sécurité des aliments.** Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to a combination of Bifidobacterium longum LA 101, Lactobacillus helveticus LA 102, Lactococcus lactis LA 103 and Streptococcus thermophilus LA 104 and improves stool frequency. *Autorité européenne de sécurité des aliments*. [En ligne] Février 2013. [Citation : 17 Octobre 2015.] <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/pub/3086>.
190. **Autorité européenne de sécurité des aliments.** Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to a combination of Bifidobacterium longum LA 101, Lactobacillus helveticus LA 102, Lactococcus lactis LA 103 and Streptococcus thermophilus LA 104 and improvement of bowel function. *Autorité européenne de sécurité des aliments*. [En ligne] Mai 2014. [Citation : 17 Octobre 2015.] <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/pub/3659>.
191. **Autorité européenne de sécurité des aliments.** Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to a combination of Bifidobacterium longum LA 101, Lactobacillus helveticus LA 102, Lactococcus lactis LA 103 and Streptococcus thermophilus LA 104 and reducing intestinal discomfort. *Autorité européenne de sécurité des aliments*. [En ligne] Février 2013. [Citation : 17 Octobre 2015.] <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/pub/3085>.
192. **Autorité européenne de sécurité des aliments.** Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to a combination of Bifidobacterium longum LA 101, Lactobacillus helveticus LA 102, Lactococcus lactis LA 103 and Streptococcus thermophilus LA 104 and reducing intestinal discomfort. *Autorité européenne de sécurité des aliments*. [En ligne] Mai 2014. [Citation : 17 Octobre 2015.] <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/pub/3658>.
193. **Laboratoire Nutergia.** Ergyphilus® Enfants. *Nutergia*. [En ligne] [Citation : 20 Octobre 2015.] [http://www.nutergia.com/complement-alimentaire/fr/produits-nutergia/vos-besoins/specifiques-enfants/nutergia-ergyphilus-enfants\\_BQ.php](http://www.nutergia.com/complement-alimentaire/fr/produits-nutergia/vos-besoins/specifiques-enfants/nutergia-ergyphilus-enfants_BQ.php).
194. **Laboratoire PediAct.** Biogaia® ProTectis. *Laboratoire PediAct*. [En ligne] [Citation : 20 Octobre 2015.] <http://www.pediact.com/produits/biogaia-protectis/>.
195. **Laboratoire Pediakid.** Pediakid® Colicillus® Bébé. *Laboratoire Pediakid*. [En ligne] [Citation : 20 Octobre 2015.] <http://www.pediakid.com/fr/nos-complements-alimentaires/equilibre-intestinal/pediakid-colicillus-bebe>.

196. **Laboratoire Pediakid.** Pediakid® Probiotiques 10M. *Laboratoire Pediakid*. [En ligne] [Citation : 20 Octobre 2015.] <http://www.pediakid.com/fr/nos-complements-alimentaires/defenses/pediakid-probiotiques-10m>.
197. Directive 2008/100/CE de la Commission du 28 Octobre 2008 modifiant la directive 90/496/CEE du Conseil relative à l'étiquetage nutritionnel des denrées alimentaires en ce qui concerne les apports journaliers recommandés. *EUR-Lex - L'accès au droit de l'Union européenne*. [En ligne] [Citation : 02 Octobre 2015.] <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:285:0009:0012:FR:PDF>.
198. **MALDONADO, J., CANABATE, F. et SEMPERE, L.** Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2012, 54, pp. 55–61.
199. **Laboratoires Guigoz®.** *Laboratoires Guigoz®*. [En ligne] [Citation : 03 Octobre 2015.] <https://www.guigoz.fr/>.
200. **Laboratoire PediAct.** BioGaia® ProTectis SRO. *Laboratoire PediAct*. [En ligne] [Citation : 20 Octobre 2015.] <http://www.pediact.com/produits/biogaia-protectis-sro/>.
201. **SAZAWAL, S., et al.** Efficacy of zinc supplementation in reducing the incidence and prevalence of acute diarrhea - a community-based, double blind, controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1997, 66, pp. 413-418.
202. **BAHL, R.** Effect of zinc supplementation on clinical course of acute diarrhoea – report of a meeting, New Delhi, 7-8 mai 2001. *Journal of Health, Population and Nutrition*. 2001, Vol. 19, 4, pp. 338-346 .
203. **Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et Fonds des Nations Unies pour l'enfance (UNICEF).** Déclaration commune de l'OMS et de l'UNICEF - Prise en charge clinique de la diarrhée aiguë. *Organisation mondiale de la santé*. [En ligne] Mai 2004. [Citation : 03 Octobre 2015.] [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68718/1/WHO\\_FCH\\_CAH\\_04.7\\_fre.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68718/1/WHO_FCH_CAH_04.7_fre.pdf).
204. **BAUSCH & LOMB.** Bloxair - Dispositif Médical. *BAUSCH & LOMB - LABORATOIRE CHAUVIN*. [En ligne] 2014. [Citation : 08 Octobre 2015.] [http://www.bausch.fr/OTC/site/Produits/Gastro-enterologie/GASTRO-ENTEROLOGIE-Fiches-produits-et-mentions-legales/BLOXAIR-Dispositif-Medical\\_828\\_1123.html](http://www.bausch.fr/OTC/site/Produits/Gastro-enterologie/GASTRO-ENTEROLOGIE-Fiches-produits-et-mentions-legales/BLOXAIR-Dispositif-Medical_828_1123.html).
205. **Thériaque.** Siméticone - Monographie substance active. *Thériaque*. [En ligne] [Citation : 03 Octobre 2015.] <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SAC&id=4319>.

206. **Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM).** La transplantation de microbiote fécal et son encadrement dans les essais cliniques. *ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé*. [En ligne] Mars 2014. [Citation : 2 Novembre 2015.] [http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/67bf4a575cb388616d3b7f5a1d8ab4d7.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/67bf4a575cb388616d3b7f5a1d8ab4d7.pdf).
207. **JOBIN, A.** Colorectal Cancer : CRC - all about microbial products and barrier function ? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. Décembre 2012, 9, pp. 694-696.

## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 30 mai 2016

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR  
EN PHARMACIE

présenté par : Noémie BIARD

Sujet : LE MICROBIOTE INTESTINAL, LES  
PROBIOTIQUES ET LEUR PLACE DANS LES  
PATHOLOGIES DIGESTIVES BASSES DU NOURRISSON

Jury :

Président : M. Raphaël DUVAL, Professeur des Universités  
Directeur : M. Raphaël DUVAL, Professeur des Universités  
Juges : Mme Roudayna DIAB, Maître de Conférences  
M. Gabriel TROCKLE, Maître de Conférences  
Mme Delphine VALANCE, Pharmacien d'officine

Vu,

Nancy, le 05/04/2016

Dr. R. DUVAL

Le Président du Jury

Directeur de Thèse

*M. Raphaël DUVAL*

Vu et approuvé,

Nancy, le 19.04.2016

Doyen de la Faculté de Pharmacie  
de l'Université de Lorraine,



Vu,

Nancy, le - 6 MAI 2016

Le Président de l'Université de Lorraine,

*Pierre MUTZENHARDT*

N° d'enregistrement : 9152



N° d'identification :

**TITRE :**

**LE MICROBIOTE INTESTINAL, LES PROBIOTIQUES ET LEUR PLACE  
DANS LES PATHOLOGIES DIGESTIVES BASSES DU NOURRISSON**

Thèse soutenue le 30 mai 2016

Par Noémie BIARD

**RESUME :**

Le microbiote intestinal joue un rôle fondamental dans l'homéostasie de l'organisme. De nombreux facteurs peuvent toutefois le déséquilibrer : alimentation inadaptée, infections, traitements médicamenteux, stress, etc. La période d'installation progressive du microbiote intestinal chez le nourrisson, de la naissance à l'âge de deux ans, constitue également une étape de grande fragilité. Les niches écologiques intestinales non encore colonisées laissent un intestin immature à la merci de toutes sortes de toxiques et de pathogènes. L'intestin malmené souffre alors de dysbiose, à l'origine de multiples pathologies intestinales. Depuis le début des années 2000, un nombre sans cesse croissant d'études s'intéressant au microbiote intestinal et à son potentiel sont publiées. Les découvertes progressives ouvrent de nouvelles pistes thérapeutiques : les micro-organismes pourraient devenir une alternative « écologique » aux traitements conventionnels dans certaines pathologies digestives, notamment du nourrisson. C'est ici qu'interviennent ces bactéries vivantes apportées par voie orale, que l'on appelle probiotiques.

Leur nature, leurs cadres réglementaires et législatifs, ainsi que leurs mécanismes d'action sont nombreux et variés. Face aux offres pléthoriques des marchés pharmaceutiques et agroalimentaires, le pharmacien d'officine doit pouvoir orienter le patient vers les probiotiques les mieux adaptés à son cas.

**MOTS CLES :**

MICROBIOTE INTESTINAL, PROBIOTIQUES, NOURRISSON, IMMUNITE DIGESTIVE, MUQUEUSE INTESTINALE, ENTEROCOLITE ULCERO-NECROSANTE, GASTRO-ENTERITE, DIARRHEE, COLIQUES, CONSTIPATION

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Raphaël DUVAL	Microbiologie clinique	Expérimentale <input type="checkbox"/>
		Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/>
		Travail personnel <input type="checkbox"/>

**THEMES**

1 – Sciences fondamentales

3 – Médicament

☒ 5 – Biologie

2 – Hygiène/Environnement

☒ 4 – Alimentation – Nutrition

6 – Pratique professionnelle