

Innocuité, Qualité et Efficacité des Probiotiques

Le tractus gastro-intestinal est constitué d'un écosystème microbien complexe (100000 milliards de bactéries), individuel et typique pour chaque personne. Les microorganismes forment un microbiote qui exerce de nombreuses fonctions biochimiques et physiologiques notamment : complément à la fermentation des nutriments, effet de barrière pour protéger le système digestif contre les bactéries pathogènes, stimulation dans le développement du système immunitaire. Ce microbiote, terme qui remplace dorénavant microflore, est constitué de plus de 500 espèces différentes connues. La diversité d'espèces du microbiote intestinal dominant est spécifique de l'individu et le nombre d'espèces communes à plusieurs individus est très restreint (ou nul). Au plan quantitatif, celui-ci apparaît très stable au cours du temps pour un individu donné sur une période de 2 mois à 2 ans, bien qu'il ne soit pas possible de définir un microbiote intestinal de l'espèce humaine par le profil d'espèces dominantes. C'est un consortium adapté à l'hôte, stable et donc résistant à la modification. L'administration de probiotiques, favorisant le maintien de cet équilibre ou sa résistance à la modification chez une personne en santé, pourrait dès lors être considéré comme bénéfique.

Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui, lorsque consommés en quantité suffisante, jouent un rôle majeur dans l'équilibre et la stabilité du microbiote intestinal et confèrent un bénéfice santé à l'hôte notamment en prévenant les infections. Les probiotiques peuvent être consommés soit comme un aliment ou comme une préparation non alimentaire. Peu d'études ont comparé de façon rigoureuse les effets de bactéries vivantes par rapport à ces mêmes bactéries tuées. Étant donné que certains effets des préparations bactériennes peuvent être dus à leurs métabolites, à leur ADN ou à des particules présentes sur leurs parois, certains microorganismes peuvent engendrer des effets bénéfiques sans qu'il soit essentiel que ceux-ci demeurent vivants à la suite de leur passage à travers les muqueuses digestives. La mort des bactéries dans le tractus gastro-intestinal n'implique pas nécessairement une absence d'effets, pas plus que la

survie implique forcément un effet positif. Toutefois, comme l'effet bénéfique des composantes provenant de bactéries mortes n'est pas encore admis avec certitude, nous nous sommes basés sur la définition actuelle de probiotiques qui les identifie comme une monoculture ou une culture mixte de microorganismes vivants qui profitent au microbiote indigène de l'humain.

La valeur commerciale d'un produit de santé naturel ne dépend pas seulement du type de probiotique utilisé, mais dépend aussi de sa concentration qui doit être suffisante et de son activité métabolique. Ainsi, lors de l'évaluation des probiotiques, il est nécessaire de déterminer leur capacité à résister aux effets des sels pancréatiques et biliaires. Nous avons évalué les procédures disponibles pour déterminer la capacité des probiotiques à tolérer la présence élevée d'acides et de protéases, de survivre et de croître en présence d'acides biliaires, de survivre au passage dans l'estomac et l'intestin grêle et d'atteindre l'endroit cible. Les modèles *in vitro* statiques sont simples et peu coûteux. Par contre, puisque, 1) ils divisent le processus de digestion en plusieurs étapes indépendantes les unes des autres, 2) ils ne tiennent pas compte de l'influence de la diète et des variations constantes des paramètres lors de la digestion et 3) ils utilisent souvent des solutions approximatives afin de simuler les liquides digestifs, ils semblent moins appropriés que les modèles dynamiques *in vitro*. En effet, ceux-ci (TIM, SHIME et modèle de Mainville) sont plus proches des réalités physiologiques tout en restant faciles à utiliser. Néanmoins, ces modèles ne permettent pas d'étudier l'adhésion des probiotiques à la muqueuse intestinale ni d'estimer convenablement le taux de survie des probiotiques lors du transit intestinal. Les modèles *in vivo* ont l'avantage de permettre d'observer la survie des probiotiques dans l'environnement réel, soit le tube digestif. Ces modèles ont par contre pour désavantages leurs coûts élevés et les problèmes éthiques qu'entraînent les tests sur les humains ou les animaux, sans compter que le recrutement de volontaires soit souvent un facteur limitant dans ce type d'études. Il demeure par ailleurs important que le Canada initie des démarches institutionnelles afin d'identifier des unités potentielles de gastro-entérologie où des études cliniques pourraient y être mises sur pied. Toutefois, devant les difficultés qu'implique cette option à court et à moyen termes, les modèles *in vitro* dynamiques semblent être un bon compromis dans ce cas puisqu'ils se rapprochent davantage de la réalité que les modèles *in vitro* statiques, sans les facteurs limitants que comportent les modèles *in vivo*.

Plusieurs bactéries probiotiques d'origine intestinale comme les bifidobactéries ont développé des mécanismes pour résister à l'action détergente des sels biliaires et acquérir la capacité de les transformer. Cette activité enzymatique est la déconjugaison des sels biliaires

grâce à la « Bile Salt Hydrolase » (**BSH**, EC 3.5.1.24), qui est aussi appelée cholyglycine hydrolase. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des sels biliaires conjugués avec la glycine ou la taurine en résidus d'acides aminés et en sels biliaires libres. La plupart des bactéries probiotiques proposées comme produits de santé naturels peuvent posséder cette activité. Selon, le règlement, il est essentiel de s'assurer que la déconjugaison dans l'intestin grêle n'est pas accrue et qu'aucun changement ne survient dans le gros intestin. La revue des données scientifiques supporte l'hypothèse que la déconjugaison des sels biliaires par des bactéries possédant une activité BSH permet la détoxification de ceux-ci et augmente leur chance de survie dans l'intestin. L'activité BSH d'un probiotique sera donc désirable puisqu'elle maximise ses chances de survie dans le tractus gastro-intestinal. De plus, il a été proposé que la déconjugaison des sels biliaires possède des effets bénéfiques sur l'hôte comme la diminution des niveaux de cholestérol. Il est donc souhaitable de vérifier si un probiotique possède une activité BSH préalablement à sa mise en marché pour ses bénéfices escomptés. Afin de déterminer si la bactérie possède ou non une activité BSH, une simple vérification de la précipitation obtenue sur boîtes de Pétri à la suite de l'incubation avec des sels biliaires serait suffisante. Par contre, lorsqu'on désire vérifier si une souche a une activité BSH plus importante qu'une autre, on aura alors recours au HPLC qui est, parmi les techniques proposées, celle qui permet d'obtenir le plus de précision et de fiabilité.

La déhydroxylation des sels biliaires par certains microorganismes intestinaux, quant à elle, semble avoir plusieurs effets néfastes sur l'hôte. Il a été suggéré que les sels biliaires secondaires qui en découlent entraînent des dommages à l'ADN, augmentent les risques de cancer du colon et de calculs biliaires et peuvent causer des altérations de muqueuses digestives provoquant de l'inflammation et de la diarrhée. Par contre et jusqu'à maintenant, la capacité des bactéries intestinales à 7 α -déhydroxyler les acides biliaires n'est attribuée qu'aux genres *Clostridium* et *Eubacterium*. Les bactéries les plus fréquemment administrées comme probiotiques, soit les souches appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, sont incapables de déhydroxyler les sels biliaires déconjugés. La détermination de l'activité de déhydroxylation des sels biliaires ne semble pas nécessaire lorsque la souche utilisée est reconnue ne pas posséder cette activité. Par contre, dans l'ignorance, l'activité de déhydroxylation pourra être déterminée de façon simple et efficace par chromatographie sur couches minces ou par test de PCR.

Les concentrations de probiotiques parvenant vivants dans l'intestin sont influencées par les quantités ingérées et par le pourcentage de survie. Certains probiotiques sont détruits dès

leur passage dans l'estomac alors que d'autres traversent l'intestin grêle et parfois le côlon à hautes concentrations. Les bactéries probiotiques peuvent survivre aux conditions gastriques (caractérisées par un pH 1.5-2.0 pendant le jeûne et de 4.0-5.0 après un repas ; coloniser l'intestin (au moins temporairement) en adhérant à la muqueuse intestinale grâce à des adhésines sur la surface des bactéries (protéines, polysaccharides et composants de paroi de cellules). Elles offrent ainsi de nouvelles solutions de rechange diététiques pour la stabilisation de la flore microbienne intestinale. Les souches les plus étudiées et les plus connues ne sont pas nécessairement les meilleures du point de vue de leur pharmacocinétique. La récupération fécale des bactéries semble être directement proportionnelle à la dose administrée. La persistance dans les fèces semble dépendre du nombre de doses de bactéries administrées plutôt que du nombre de bactéries dans une dose. La méthode utilisée pour le dénombrement devrait permettre de différencier les bactéries vivantes des bactéries mortes. Les méthodes moléculaires se basant sur l'ARN bactérien sont les plus appropriées. Le manque de concordance entre les différentes études pharmacocinétiques met en évidence la nécessité de standardiser les doses administrées, les méthodes de prélèvement et les méthodes de dénombrement des probiotiques.

La capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale est un des critères de sélection les plus importants des probiotiques parce qu'elle est considérée comme une condition préalable à la colonisation et la croissance; l'effet probiotique serait maximal si les organismes adhèrent aux cellules muqueuses intestinales. Toutefois, il y a peu d'évidence que les probiotiques exogènes administrés puissent le faire. Il semble qu'ils passent dans les fèces sans avoir adhéré ou s'être multipliés. Ainsi, selon plusieurs études pharmacocinétiques cliniques, il semble que la culture probiotique doit être continuellement ingérée pour qu'un effet probiotique exogène continu soit obtenu. De plus, si la translocation ou l'infection d'un agent pathogène commence à partir du moment de son adhésion au mucus du tractus intestinal, alors la capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale devient un critère d'efficacité exigé pour les probiotiques. Or, il semble que l'adhésion des probiotiques au tractus digestif est spécifique à la souche et plusieurs organismes probiotiques, selon les diverses méthodes utilisées, semblent aptes à démontrer de bonnes propriétés adhésives. Cependant, certaines études ont démontré que certaines souches actives, selon les modèles utilisés, ne détenaient pas toujours de bonnes propriétés adhésives. Ainsi, il serait important de revoir le critère d'adhésion, longtemps considéré comme prémisses nécessaires à l'action même des probiotiques dans l'intestin. L'adhésion des souches probiotiques à l'intestin peut être influencée par plusieurs paramètres comme l'utilisation des différents modèles, la présence de bactéries mortes ou vivantes, l'état de santé du donneur de mucus, etc. Un facteur

important influençant l'adhésion (dans un sens ou dans l'autre selon les souches) semble être les traitements (thermiques ou autres) administrés aux souches avant leur consommation. Quoique plus fastidieuse, une approche *in vivo* (biopsie) serait à privilégier. De plus, la complémentarité des techniques de mesure d'adhésion devrait faire préséance sur l'exclusivité d'une méthode en particulier pour la détermination de l'adhésion d'un nouveau produit probiotique au tractus digestif. Les probiotiques ne semblent pas disposer d'habiletés à dégrader le mucus intestinal. Cependant, d'autres études seront requises afin de corroborer cette affirmation. Les probiotiques agissent sur l'intestin, en favorisant, entre autres la production de mucus.

Certaines souches bactériennes peuvent produire des antibiotiques présentant des similarités de structure avec des antibiotiques importants en médecine humaine : l'exposition à ces bactéries encourage donc le développement de résistance à ces importants antibiotiques. Des souches du genre ne devraient pas être utilisées comme probiotiques. Les lactobacilles et les bifidobactéries ne sont pas connus pour produire des antibiotiques. De plus, il est extrêmement rare que les lactobacilles et les bifidobactéries soient la cause d'infection chez l'humain. La plupart, sinon toutes les bactéries, sont capables de produire des molécules qui peuvent être inhibitrices pour elles-mêmes et/ou pour d'autres bactéries. Les substances à effet bactéricide produites par les bactéries sont variées et comprennent le peroxyde d'hydrogène, l'acide lactique, les acides organiques et les bactériocines. La production de bactériocines par une souche bactérienne peut être déterminée par des tests simples de « spot » sur plaque d'agar et de diffusion radiale. Vu l'information restreinte sur les effets bactéricides d'une souche bactérienne, il est préférable d'effectuer les tests nécessaires afin de déterminer les effets d'une souche sur d'autres bactéries avant de mettre cette bactérie sur le marché en tant que probiotique. Il serait e plus souhaitable, pour le futur, de mettre sur pied une fiche technique exhaustive énumérant les souches cibles de chaque bactériocine connue.

Le microbiote intestinal est la source quantitativement la plus importante de stimulation microbienne pouvant avoir des effets néfastes et bénéfiques sur la santé humaine. Il peut ainsi fournir un signal primaire qui conduit à la maturation postnatale du système immunitaire, ce qui aide au développement de la tolérance orale et au développement du système immunitaire. Il est possible que le microbiote acquis pendant et juste après la naissance soit nécessaire pour le développement de l'immunité systémique et mucoale du nouveau-né, bien qu'il puisse aussi orienter les réponses inflammatoires dans les maladies allergiques et inflammatoires des intestins. Les probiotiques pourraient contrecarrer un tel processus inflammatoire par une

stabilisation de l'environnement microbien de l'intestin et de la barrière responsable de la perméabilité de l'intestin, par une augmentation de la dégradation des antigènes entériques et une modification de leur immunogénicité. L'immuno-stimulation ou -modulation tient une place importante parmi les mécanismes suggérés par lesquels les probiotiques peuvent agir contre les bactéries pathogènes. L'interaction des probiotiques avec les entérocytes constitue l'événement initial dans l'effet immunomodulateur de ces organismes et nécessitera une attention particulière. Les effets des probiotiques sur le système immunitaire sont dépendants des souches.

Les effets de probiotiques sur le système immunitaire ne dépendent pas absolument de la viabilité des souches probiotiques. En effet, certains métabolites peuvent influencer la réponse immunitaire, notamment par la reconnaissance des composantes bactériennes par les TLR. Les modèles mimant la muqueuse intestinale devront être favorisés, autant que possible, pour évaluer les fonctions immunitaires des probiotiques. Bien que plus pratique et fréquemment utilisée, l'évaluation de la réponse immunitaire de cellules sanguines à une stimulation par des probiotiques ne représente pas la réalité physiologique alors que la réponse de cellules immunitaires intestinales s'avère être un meilleur choix. Pour chaque nouvelle souche probiotique, le profil de cytokines sécrétées par les lymphocytes, entérocytes et/ou cellules dendritiques (DC) mis en contact avec cette souche devrait être établi. Ceci permettrait de certifier si la dite souche exerce une action pro ou anti-inflammatoire et justifierait son utilisation pour une approche clinique spécifique. Les produits probiotiques qui affirment agir sur l'immunité devront présenter des allégations précises quant aux effets immunomodulateurs des souches employées. Il serait souhaitable que les effets des probiotiques observés *in vitro* soient appuyés d'études cliniques bien organisées (randomisées et à l'aveugle). Des études plus approfondies devront être réalisées afin de déterminer les modes d'action précis des probiotiques sur l'immunité de la muqueuse intestinale et systémique. L'utilisation de souris transgéniques, « knock-out », et autres modèles animaux pourront permettre une meilleure compréhension de ces mécanismes. Des subventions dans ce domaine devraient encourager les laboratoires de pointe à s'intéresser aux probiotiques.

Jusqu'ici, la longue histoire d'une utilisation sûre des probiotiques demeure la meilleure preuve de leur sûreté. Puisque l'on assume que le risque avec chaque probiotique est très bas, la meilleure approche pour l'évaluation de leur sûreté est probablement d'analyser de manière

rétrospective les études épidémiologiques et d'utiliser à l'avenir des méthodes de pharmacovigilance.

Les souches utilisées comme nouveaux probiotiques devraient être sélectionnées de la flore commensale de l'homme ou de l'animal et ne devraient pas transporter de manière intrinsèque des caractères de résistance aux antibiotiques. Il serait souhaitable que les souches probiotiques soient acheminées à un centre de référence pour une caractérisation moléculaire. Les bactéries lactiques ne devraient pas être administrées comme traitement alternatif aux patients hospitalisés traités à la vancomycine puisqu'il y a risque de favoriser les lactobacillémies. Le personnel soignant devra se montrer vigilant quant à l'utilisation de *S. boulardii* comme agent probiotique à titre de produit de santé naturel chez les patients hospitalisés étant donné le risque élevé de fongémie. La résistance aux antibiotiques des souches de probiotiques utilisées devra être rigoureusement évaluée afin de minimiser le risque de transfert horizontal. Dans cette optique, les produits contenant des entérocoques devront possiblement être évités. Afin de mesurer l'impact qu'aura une consommation accrue de produits contenant des probiotiques sur le risque d'infection par ces organismes, une approche de pharmacovigilance est suggérée. Tous les cas d'infections opportunistes par des lactobacilles, bifidobactéries et autres organismes considérés comme probiotiques devront être répertoriés par les centres de santé. Des analyses moléculaires des isolats cliniques devront être réalisées pour déterminer si les bactéries isolées dans les sites d'infection correspondent à celles présentes dans les produits probiotiques consommés. La création d'un centre de référence pourrait être envisagée.

Chaque souche probiotique devrait être évaluée à la gamme des doses prévues pour l'usage et des doses effectives minimales et optimales devraient être définies. Aucune procédure n'est proposée actuellement pour rencontrer ces exigences. Cette approche devrait s'ajouter à celles qui sont nécessaires pour évaluer la sûreté d'une souche probiotique : étude sur les propriétés intrinsèques de la souche, étude sur la pharmacocinétique de la souche (survie, activité dans l'intestin, relation dose-réponse, récupération au niveau fécal et muqueux) et finalement, étude recherchant des interactions entre la souche et l'hôte en particulier les effets à court et à long terme sur l'immunoréaction et le risque d'infection.

La survie des bactéries probiotiques en vrac ou en capsules est problématique du fait de leur grande sensibilité à l'oxygène, de leur faible tolérance aux acides issus de leur métabolisme et de leurs exigences nutritionnelles. En supposant que les probiotiques doivent être vivants pour

exercer leurs effets bénéfiques, la faible survie des probiotiques dans les diverses préparations et la difficulté de coloniser et de survivre dans le tractus intestinal atténue donc leur action sur la santé. Les produits probiotiques devraient être normalisés sur la base du compte viable parce que l'on présume que la viabilité des probiotiques est une mesure raisonnable de l'activité des probiotiques. Le nombre de cellules présentes dans les produits est un indicateur utile pour estimer la viabilité probiotique en assumant que c'est le facteur important à considérer dans la fonctionnalité du produit. Pour exprimer cette fonctionnalité, les probiotiques doivent être viables au moment de la consommation, survivre aux acides et aux enzymes digestives lors de leur passage dans l'estomac et le petit intestin et survivre une fois qu'elles atteignent le côlon. Il n'existe à ce jour aucune méthode standard de dénombrement des probiotiques comme les bifidobactéries ni aucune étude permettant de mesurer leurs modes d'action lors du transit intestinal. Les méthodes de culture restent peu adaptées et laborieuses pour quantifier et différencier les probiotiques ou autres types de souches dans les écosystèmes complexes comme les produits probiotiques et le contenu intestinal. Pour exprimer ses activités métaboliques au cours du transit intestinal, un microorganisme doit avoir un niveau de population suffisant; le seuil limite doit être de l'ordre de 10^6 - 10^7 microorganismes vivants par gramme de contenu intestinal.

Chercheur principal:

Denis Roy, Ph.D.

Titulaire de Chaire de recherche du Canada

Biotechnologies des cultures lactiques d'intérêt laitier et probiotique

Co-chercheurs :

Jean Amiot : DM, Ph. D., Professeur Titulaire, Directeur du
Département des Sciences des aliments et de nutrition, Université Laval

Yvan Boutin : Ph. D., Chercheur-Professeur (TransBIOTech).

Maryse Lamoureux : Ph. D., Professeure Associée au
Département des Sciences des aliments et de nutrition, Université Laval.

Coordinatrice du projet :

Véronique Delcenserie, DMV, Ph D., chercheure post-doc, INAF.

Adjoints à la recherche :

Amélie Grenier : Maîtrise en physiologie.

Dominic Martel, Maîtrise en immunologie.

La production de ce rapport a été rendue possible grâce à une contribution financière provenant de Santé Canada. Les vues exprimées ne reflètent pas nécessairement les vues de Santé Canada.

2006-08-31

