

Flore microbienne intestinale

Physiologie
et pathologie digestives

Coordonné par :
Jean-Claude Rambaud
Jean-Paul Buts
Gérard Corthier
Bernard Flourié

Flore microbienne intestinale

Physiologie et pathologie digestives

Coordonné par : Jean-Claude Rambaud
Jean-Paul Buts
Gérard Corthier
Bernard Flourié

Chef-d'œuvre d'adaptation, l'organisme humain a su exploiter à son avantage le nombre et la variété des espèces microbiennes qui composent la flore intestinale et ses multiples rôles physiologiques : capacité fermentaire, pouvoir immunorégulateur, effets sur la motricité, la vascularisation et la trophicité intestinales, moyen efficace de défense contre les agents infectieux. La relation hôte/flore est un modèle de symbiose qui définit « l'écosystème intestinal ». Toutefois, l'équilibre de cet écosystème est fragile et sa rupture peut intervenir dans la physiopathologie de diverses affections digestives.

L'importance de la flore a généré ces dernières années un effort de recherche considérable utilisant les techniques les plus modernes de la biologie moléculaire, la microbiologie et la médecine. De plus, l'idée ancienne de moduler de façon positive une flore déséquilibrée, ou encore d'en reproduire certains effets bénéfiques, par l'administration de micro-organismes vivants sélectionnés, connaît un vif regain d'intérêt avec l'apparition du concept de micro-organismes « probiotiques ».

L'objet du présent ouvrage, d'essence pluridisciplinaire, est de constituer une mise au point complète et actualisée sur la flore intestinale et son impact en physiologie et pathologie digestives, à l'usage des médecins, pharmaciens, vétérinaires, chercheurs et étudiants intéressés par ce sujet passionnant.

 **John Libbey**
EUROTEXT

john-libbey-eurotext.fr

Flore microbienne intestinale

**Physiologie
et pathologie digestives**

ISBN 2-7420-0512-9

Éditions John Libbey Eurotext

127, avenue de la République, 92120 Montrouge, France

Tél : 01 46 73 06 60

E-mail : contact@john-libbey-eurotext.fr

Site internet : <http://www.john-libbey-eurotext.fr>

John Libbey Eurotext Limited

42-46 High Street

Esther, Surrey, KT 10 9QY

United Kingdom

© 2004, John Libbey Eurotext, Paris

Il est interdit de reproduire intégralement ou partiellement le présent ouvrage sans autorisation de l'éditeur ou du Centre Français d'Exploitation du Droit de Copie, 20, rue des Grands-Augustins, 75006 Paris.

Flore microbienne intestinale

**Physiologie
et pathologie digestives**

Coordonné par :
Jean-Claude Rambaud
Jean-Paul Buts
Gérard Corthier
Bernard Flourié

Comité éditorial

Jean-Claude Rambaud

Hôpital Lariboisière
Service d'Hépatogastro-entérologie
2, rue Ambroise Paré,
75010 Paris, France

Jean-Paul Buts

Université Catholique de Louvain
Cliniques Universitaires St Luc - a.s.b.l.
Avenue Hippocrate, 10
1200 Bruxelles, Belgique

Gérard Corthier

Unité Écologie et Physiologie
du Système Digestif
INRA.CRJ,
78350 Jouy-en-Josas, France

Bernard Flourié

Centre Hospitalier Lyon-Sud
Service de Gastro-entérologie
165, chemin Grand Revoyet,
69310 Pierre-Bénite, France

Liste des auteurs

Fernando Azpiroz

Unité de Recherches sur le Système Digestif,
Hôpital Universitaire Vall d'Hebron,
Université Autonome de Barcelone, Barcelone, Espagne

Annick Bernalier-Donadille

Unité de Microbiologie, INRA,
Centre de Recherches de Clermont-Ferrand / Theix,
Saint-Genès-Champanelle, France

Hervé Blottière

Institut National de la Recherche Agronomique,
Unité de Nutrition et Sécurité Alimentaire
Domaine de Vilvert, CRJ, Jouy-en-Josas, France

Yoram Bouhnik

Service d'Hépatogastro-entérologie et Assistance Nutritive,
Hôpital Lariboisière, 2, rue Ambroise Paré, Paris, France

Marie-José Butel

Département de Microbiologie, Faculté de Pharmacie,
Université Paris V-René Descartes,
12, rue de l'École de Médecine, Paris, France

Jean-Paul Buts

Université Catholique de Louvain
Cliniques Universitaires St Luc - a.s.b.l.
Avenue Hippocrate, 10, 1200 Bruxelles, Belgique

Claire Cherbuy

Institut National de la Recherche Agronomique,
Unité de Nutrition et Sécurité Alimentaire
Domaine de Vilvert, CRJ, Jouy-en-Josas, France

Benoit Coffin

Service d'Hépatogastro-entérologie, Hôpital Louis Mourier,
178, rue des Renouillers, 92000 Colombes, France

Anne Collignon

Service de Bactériologie, Hôpital Jean Verdier,
Avenue du 14 Juillet, 93140 Bondy, France.

Pierre Desreumaux

Service des Maladies de l'Appareil Digestif et de la Nutrition,
EPI 0114 – CHRU de Lille, Hôpital Swynghedauw
rue A. Verhaegh, 59037 Lille, France

Joël Doré

Unité d'Écologie et de Physiologie du Système Digestif
INRA-CRJ, 78350 Jouy-en-Josas, France

Pierre-Henri Duée

Institut National de la Recherche Agronomique,
Unité de Nutrition et Sécurité Alimentaire
Domaine de Vilvert, CRJ, 78350 Jouy-en-Josas, France.

Philippe Marteau

Service de Gastro-entérologie, Hôpital Européen Georges Pompidou,
20, rue Leblanc, 75015, Paris, France

Marie-Christiane Moreau

Unité d'Écologie et de Physiologie du Système Digestif,
INRA, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France.

Thierry Piche

Service d'Hépatogastro-entérologie, CHU de Nice,
Hôpital de l'Archet 2
151, route Saint-Antoine de Ginestière, BP 3079,
06200 Nice, France

Patrick Rampal

Service d'Hépatogastro-entérologie, Centre Hospitalier Princesse Grace,
avenue Pasteur, BP 48992018, 98000 Principauté de Monaco

Lionel Rigottier-Gois

Unité d'Écologie et de Physiologie du Système Digestif
INRA-CRJ, 78350 Jouy-en-Josas, France

Christel Rousseaux

Service des Maladies de l'Appareil Digestif et de la Nutrition,
EPI 0114 – CHRU de Lille, Hôpital Swynghedauw
rue A. Verhaegh, 59037 Lille, France.

Jean-Marc Sabaté

Service d'Hépatogastro-entérologie, Hôpital Louis Mourier,
178 rue des Renouillers, 92000 Colombes, France.

Philippe Seksik

Service de Gastro-entérologie, Hôpital Européen Georges Pompidou,
20 rue Leblanc, 75015 Paris, France.

Sommaire

Préface

Jean-Claude Rambaud XIII



Flore microbienne intestinale

Méthodes d'étude

Joël Doré, Lionel Rigottier-Gois 3

- Méthodes d'étude de la flore microbienne intestinale basées sur la culture 4
- Méthodes moléculaires d'étude de la flore microbienne intestinale basées sur l'ADN et l'ARN ribosomiques 7
- Perspectives 13

Établissement et composition de la flore microbienne intestinale

Anne Collignon, Marie-José Butel 19

- Colonisation digestive : interactions flore-hôte et bactérie-bactérie 19
- Composition et répartition topographique de la flore intestinale de l'homme adulte 21
- Variation de la flore intestinale au cours du temps 26
- Développement de la flore intestinale chez le nouveau-né 27

Facteurs de contrôle de la flore.

Définitions et mode d'action des probiotiques et prébiotiques

Philippe Marteau 37

- Facteurs abiotiques de contrôle de la flore 39
- Facteurs alimentaires 41
- Purges, clystères et antibiotiques 41
- Probiotiques 42
- Prébiotiques et symbiotiques 51



Rôles physiologique et physiopathologique de la flore

Principales fonctions métaboliques de la flore intestinale de l'homme

<i>Annick Bernalier-Donadille</i>	61
• Substrats disponibles pour la microflore colique	61
• Métabolisme des glucides	63
• Métabolisme des gaz par les micro-organismes hydrogénéotrophes	68
• Métabolisme des protéines	71
• Métabolisme des stéroïdes	74

Flore intestinale et gaz intestinaux

<i>Fernando Azpiroz</i>	81
• Aspects physiologiques	81
• Symptômes attribuables aux gaz	86
• Pneumatose kystique	90

Flore et motricité coliques. Données physiologiques et au cours du syndrome de l'intestin irritable

<i>Benoît Coffin, Jean-Marc Sabaté</i>	97
• Motricité colique pariétale normale chez l'homme	97
• Effets de la motricité colique sur la flore	99
• Effets de la flore colique sur la motricité pariétale et le transit colique	100
• Flore et syndrome de l'intestin irritable	102

Flore intestinale et épithélium colique

<i>Claire Cherbuy, Hervé Blottière, Pierre-Henri Duée</i>	107
• Structure et renouvellement de l'épithélium colique	107
• Effets des métabolites bactériens sur l'épithélium colique	113
• Polyamines et épithélium colique	118
• Flore microbienne : effet sur l'épithélium colique	119

Influence de la microflore intestinale sur l'immunité de l'hôte : conditions physiologiques

<i>Marie-Christine Moreau</i>	131
• Microflore intestinale résidente : importance de la période néonatale	131
• Brefs rappels sur l'immunité	133
• Rôles de la microflore intestinale sur l'immunité de l'hôte	135

Influence de la microflore intestinale sur l'immunité de l'hôte au cours des maladies inflammatoires intestinales

<i>Pierre Desreumaux, Christel Rousseaux</i>	151
• Flore et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	151
• Immunité et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	154
• Mécanismes de l'inflammation induite par la flore intestinale au cours des colites inflammatoires	160

Microflore saprophyte colique au cours des diarrhées aiguës infectieuses

<i>Philippe Seksik</i>	171
• Microflore saprophyte colique	171
• Modifications de la microflore saprophyte colique au cours de diarrhées infectieuses	173

Flore et diarrhées : diarrhées associées aux antibiotiques

<i>Yoram Bouhnik</i>	181
• Épidémiologie et facteurs de risque de la diarrhée associée aux antibiotiques	181
• Diarrhées dites « simples »	182
• Colites hémorragiques	184
• Colites pseudomembraneuses	187



Intérêt de l'administration de micro-organismes vivants

Probiotiques et affections digestives

<i>Thierry Piche, Patrick Rampal</i>	201
• Pharmacologie, effets biologiques et mécanismes d'action	201
• Diarrhée associée aux antibiotiques	203
• Cas particulier de <i>Clostridium difficile</i>	205
• Diarrhées infectieuses	206
• Troubles fonctionnels intestinaux et dyspepsie	209
• Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	210
• <i>Helicobacter pylori</i>	211
• Cancer du côlon	211
• Intolérance aux disaccharides	212
• Pullulation microbienne de l'intestin grêle	214
• Encéphalopathie hépatique	214
• Prévention des allergies	214

Exemple d'un médicament probiotique : Saccharomyces boulardii lyophilisé

<i>Jean-Paul Buts</i>	221
• Présentation et pharmacocinétique	221
• Propriétés pharmacodynamiques	223
• Études cliniques	235
• Sécurité d'utilisation	239

Index	245
-------------	-----

Préface

La flore intestinale, essentiellement colique et anaérobie, comprend environ 10^{14} micro-organismes en symbiose avec l'hôte. Son étude, grâce à la maîtrise de l'anaérobiose, a longtemps reposé sur la culture des fèces. Elle a conduit à la description des flores dominante, sous-dominante et en transit. Malgré des améliorations techniques récentes, une large part de la flore dominante anaérobie, soit 99 % de la flore fécale, échappe actuellement à la culture, mais peut être analysée par des méthodes moléculaires. Le clonage et le séquençage de l'ADN ribosomique 16S a révélé que la majeure partie des bactéries fécales appartenait à trois lignées phylogéniques majeures et que plus de 80 % des espèces moléculaires observées n'étaient actuellement pas cultivées. On peut calculer à cent en moyenne le nombre d'espèces dominantes de la flore fécale chez un homme sain. Chaque individu héberge une diversité d'espèces qui lui est propre et qui, à l'âge adulte, est stable dans le temps, les flores d'individus différents n'ayant en commun que très peu d'espèces. Le développement de sondes spécifiques de domaines, groupes, sous-groupes et espèces bactériens ciblant les ARN ribosomiques 16S permet l'analyse qualitative et quantitative en série des selles ou de prélèvements intracoliques.

La flore intestinale s'acquiert pendant les deux premières années de la vie. La capacité d'une espèce à coloniser durablement l'écosystème colique dépend d'interactions complexes hôte-bactérie, en partie génétiques, et bactérie-bactérie. Les facteurs intervenant dès la naissance et, notamment, les conditions d'environnement et d'hygiène, suscitent beaucoup d'intérêt du fait des modifications récentes observées dans la colonisation intestinale du bébé et de leurs liens possibles avec l'explosion de la pathologie allergique dans nos pays.

Il faut souligner maintenant que la grande majorité des études microbiologiques digestives ont concerné les fèces, reflet déjà imparfait du côlon gauche. Si la flore en transit de l'intestin grêle est bien connue, rares sont les études sur le caeco-ascendant dont la flore diffère notablement de la flore fécale et n'en a pas la stabilité, du fait de son exposition à la variété des substrats alimentaires. De même, la flore adhérente à la paroi colique, distincte de la flore fécale, a été peu étudiée jusqu'ici. Notons encore que ce qui va suivre sur les fonctions et les dysfonctions de la flore est le fruit d'études sur la flore fécale totale ou sur les espèces cultivables. Des gains majeurs dans la vision fonctionnelle de la flore résulteront de l'élargissement de l'approche moléculaire aux outils de la biologie intégrative.

La grande diversité des substrats alimentaires et endogènes métabolisés par la flore colique explique pour une large part sa diversité : la dégradation anaérobie des substrats est un processus complexe qui nécessite la contribution de nombreux groupes bactériens, aux activités métaboliques variées et complémentaires, qui ont fait l'objet d'un inventaire plus ou moins complet selon les cas. La dégradation des glucides conduit à la production des acides gras à chaîne courte (AGCC) avec, souvent, des métabolites intermédiaires tel l'acide lactique, et à celle de gaz, CO_2 et H_2 . Les bactéries hydrogénotrophes, dont les archaea méthanogènes, en

limitant la pression partielle d'H₂, jouent un rôle important. La fermentation des protéines produit également des AGCC et du NH₃ absorbé et utilisé comme source d'azote par de nombreuses espèces de la flore, ce qui en limite la toxicité.

Un déséquilibre entre la production et la consommation de gaz coliques et la production de gaz odoriférants, comme H₂S, explique les émissions excessives ou malodorantes de gaz rectaux. Beaucoup plus complexe est le ballonnement abdominal réel ou ressenti, dans lequel la production accrue de gaz, même si elle existe, n'est pas responsable des troubles, liés en fait à leur rétention par l'anus ou par une altération de la propulsion intestinale. Chez le sujet normal, si les caractéristiques de la motricité du côlon expliquent l'implantation d'une flore résidente, celle-ci exerce à son tour une influence sur la motricité pariétale et le transit colique. Cet effet est sans doute secondaire aux réactions de fermentation et à leurs produits.

L'épithélium colique, en constant renouvellement, tapisse les cryptes, où naissent, se multiplient et se différencient trois principaux types cellulaires, dont les cellules absorbantes ou colonocytes, et la surface muqueuse sur laquelle les cellules en fin de cycle desquament, sans doute par apoptose. Des mécanismes moléculaires, parmi lesquels la voie du signal Wnt joue un rôle clé, contrôlent finement ces processus.

Le butyrate, transporté par MCT1, est le substrat oxydatif majeur des colonocytes, où il est aussi un précurseur de la céto-genèse. Le butyrate et, à un moindre degré les autres AGCC, jouent un rôle important dans la prolifération et l'apoptose des colonocytes. L'action du butyrate est ambivalente. Sa carence entraîne une atrophie muqueuse mais, quand l'apport énergétique n'est pas limité, il inhibe *in vitro* et *in vivo* la prolifération cellulaire, comme dans les lignées tumorales coliques humaines, en stimulant l'expression de la protéine p21^{Cip1}.

Les données précédentes ont été confirmées *in vivo* sur des animaux à flore contrôlée. Un véritable partenariat s'établit entre la flore bactérienne et l'épithélium colique, comme l'illustre l'exemple des glycoconjugués glycosylés.

La flore colique a un rôle certain mais complexe dans la cancérogenèse colique. À côté de la production de facteurs protecteurs comme le butyrate, le caractère délétère possible du NH₄, du H₂S ou des polyamines a été souligné. Mais, surtout, le métabolisme microbien de procarcinogènes endogènes (sels biliaires) ou exogènes, en carcinogènes, ou la synthèse de puissants mutagènes comme les fécapentaènes, pourraient jouer un rôle actif dans la cancérogenèse, d'où les tentatives actuelles de prévention par l'administration de probiotiques.

Depuis longtemps, on s'interrogeait sur la dualité du système immunitaire associé à la muqueuse intestinale qui, d'une part, protège contre les agents pathogènes et, d'autre part, tolère le flux continu des antigènes alimentaires et bactériens, supprimant les réponses cellulaires et humorales, IgE notamment, au niveau intestinal et périphérique. La flore microbienne joue un rôle essentiel dans ces processus, ce qu'ont surtout établi les expériences sur animaux à flore contrôlée. Les composants bactériens, LPS notamment, provoquent la maturation des cellules présentatrices d'antigène (CPA) de l'immunité innée systémique, jouant en particulier un rôle crucial dans la balance des cellules Th1 et Th2 chez l'enfant, dont le déséquilibre conduit à l'augmentation actuelle des allergies. La présence de la flore intestinale agit également fortement, *via* les immunoglobulines naturelles, sur la diversité du répertoire des cellules B de la réponse immunitaire humorale systémique, jouant un rôle dans la prévention des maladies auto-immunes.

La flore intestinale joue le rôle essentiel dans le développement et l'activation du système immunitaire intestinal (SII), et notamment dans la production de l'IgA sécrétoire, et les perturbations dans la colonisation bactérienne séquentielle de l'intestin affectent le SII de l'enfant et probablement par la suite de l'adulte. Au cours de la diarrhée aiguë infantile à rotavirus, la réponse IgAs spécifique est modulée par des bactéries, *Bifidobacterium* et *Escherichia coli*, de la flore intestinale. La tolérance orale induite par l'ingestion préalable d'une protéine passe aussi par l'implantation, parfois depuis la naissance, d'espèces bactériennes telle que *Bifidobacterium infantis*. Les mécanismes impliqués sont encore mal connus, mais la sécrétion d'IL-10 par des

cellules Th3 joue certainement un rôle majeur. Quant à la tolérance de l'hôte à sa propre flore endogène, le blocage de l'activation de la voie NFκB par les bactéries de cette flore empêcherait la synthèse des cytokines et chimiokines inflammatoires. Une illustration de ce mécanisme serait l'activité de probiotiques dans la pouchite et les lésions coliques de la rectocolite hémorragique, par le rétablissement de l'équilibre rompu entre flore et muqueuse intestinale.

À partir de ces données, quels facteurs étiopathogéniques expliquent l'émergence et la chronicité des maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) ? L'intervention de la flore dans la dysrégulation immunitaire qui les caractérise est appuyée par des études bactériologiques chez les malades et par la plupart des modèles de colite expérimentale animale. Dans les MICI, les récepteurs muqueux CD14 et TLR4 aux LPS bactériens sont surexprimés et le récepteur PPARγ sous-exprimé, dérégulant les voies de NFκB et des MAPK de la réponse inflammatoire. D'autres molécules sécrétées par les bactéries intestinales sont aussi impliquées.

La rupture de la tolérance de l'hôte aux bactéries de sa flore fait intervenir un déséquilibre des profils cytokiniques différent dans les lésions aiguës et chroniques de la maladie de Crohn. La découverte, dans un sous-groupe de sujets atteints de maladie de Crohn, de mutations du gène CARD15, qui a un rôle clé dans le contrôle des infections muqueuses intestinales et qui est régulé en boucle par le TNFα, renforce encore l'hypothèse microbienne dans la pathogénie de cette affection.

La perturbation de l'écosystème microbien colique est le dénominateur commun aux diarrhées associées à l'antibiothérapie. Curieusement, elle n'a pas été directement étudiée, alors que la diminution des anaérobies et l'augmentation du taux des aérobies dans les fèces ont été mises en évidence dans les diarrhées aiguës infectieuses, justifiant les traitements préventifs et curatifs par les probiotiques dans ces affections. Si les diarrhées simples liées aux antibiotiques sont principalement dues à la perte de l'activité métabolique de la flore colique, la perte de l'effet de barrière de celle-ci explique la colonisation intestinale par *Clostridium difficile*, dont la conséquence majeure est la colite pseudomembraneuse, prototype des affections nosocomiales. Ses aspects épidémiologiques, sa présentation clinique, son diagnostic endoscopique et bactériologique, ce dernier basé sur la mise en évidence des toxines A et B dont le mode d'action est élucidé, et son traitement par la métronidazole et la vancomycine sont bien connus.

Fait plus nouveau, l'efficacité de l'immunité vis-à-vis de la bactérie joue un rôle probablement essentiel dans l'expression clinique des infections à *Clostridium difficile* et dans la fréquence de leurs rechutes interactives, dont les probiotiques sont un traitement préventif efficace, principalement *Saccharomyces boulardii*.

Tout ce qui précède justifie les tentatives de traitement, restées longtemps empiriques, par les probiotiques, « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte » (OMS). Leurs principes actifs étant encore souvent mal connus, leur pharmacocinétique se limite en règle générale à leur survie au cours de leur transit dans le tube digestif. Ils exercent des effets directs dans la lumière ou sur la paroi intestinale et notamment son système immunitaire, et des effets indirects *via* la flore endogène.

La sûreté d'emploi des probiotiques est très élevée, les rares infections provoquées par certains d'entre eux ayant été observées dans des circonstances particulières. Les probiotiques peuvent être associés à des prébiotiques, « ingrédients alimentaires non digestibles qui stimulent de manière sélective au niveau du côlon la multiplication et l'activité d'un nombre limité de groupes bactériens susceptibles d'améliorer l'état de l'hôte ». L'emploi, dans l'industrie agro-alimentaire, des prébiotiques essentiellement glucidiques se multiplie, mais les associations symbiotiques avec des probiotiques restent à démontrer.

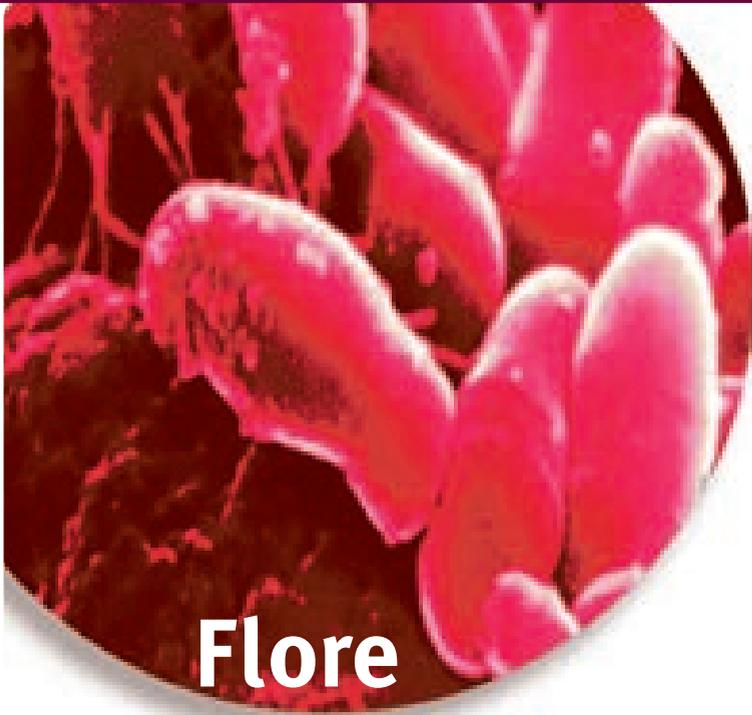
L'action préventive des probiotiques sur les diarrhées associées aux antibiotiques est la plus anciennement connue. Fait plus neuf, la prévention des rechutes des infections coliques par *Clostridium difficile* est bien établie. La prévention et le traitement des autres diarrhées infectieuses, notamment celles dues au rotavirus chez l'enfant, bénéficient aussi d'un haut niveau de preuve.

L'application à la diarrhée du voyageur, principalement due à *Escherichia coli* entérotoxigène, s'avère plus complexe et son résultat semble dépendre du lieu de destination. L'intérêt de certains probiotiques dans le traitement des symptômes de l'intestin irritable et surtout dans la prévention des rechutes des maladies inflammatoires de l'intestin s'insère dans le vaste champ d'étude de la physiopathologie de ces affections chroniques. L'action des probiotiques sur les étapes de la carcinogenèse colique dépendantes de la flore ouvre la voie à des études d'intervention chez l'homme. En pathologie intestinale, l'intolérance aux disaccharides est améliorée par les probiotiques sécrétant l'enzyme déficiente. Leur utilisation dans le traitement de l'anse stagnante, qui constitue une niche écologique originale, a fait l'objet de travaux contradictoires. Hors du tube digestif, l'allergie, en constante augmentation, est un domaine très prometteur des probiotiques, sous-tendu par le rôle des perturbations de la flore infantile dans sa genèse.

De tous les probiotiques, *Saccharomyces boulardii* a été le plus étudié. Le lecteur trouvera dans le chapitre écrit par J.-P. Buts une description complète de ses effets cliniques et, surtout, une analyse en profondeur de ses propriétés pharmacodynamiques. On ne pourra que citer sans exhaustivité la sécrétion de protéases antitoxines et antirécepteurs, ainsi que celle de peptides agissant sur les voies de signalisation impliquées dans des mouvements électrolytiques entérocytaires, l'inflammation muqueuse et les processus d'internalisation de pathogènes, la stimulation de l'immunité humorale intestinale, l'augmentation d'enzymes de la bordure en brosse entérocytaire, probablement par les polyamines libérées dans le grêle par la lyse partielle des levures.

Après une longue pause, le champ des connaissances sur la flore intestinale et sur les probiotiques a connu au cours des vingt dernières années une extension considérable. Mais les découvertes accumulées amènent à se poser des questions encore plus nombreuses, dont les réponses seront suivies d'interrogations nouvelles.

Jean-Claude Rambaud



Flore

**microbienne
intestinale**



Méthodes d'étude

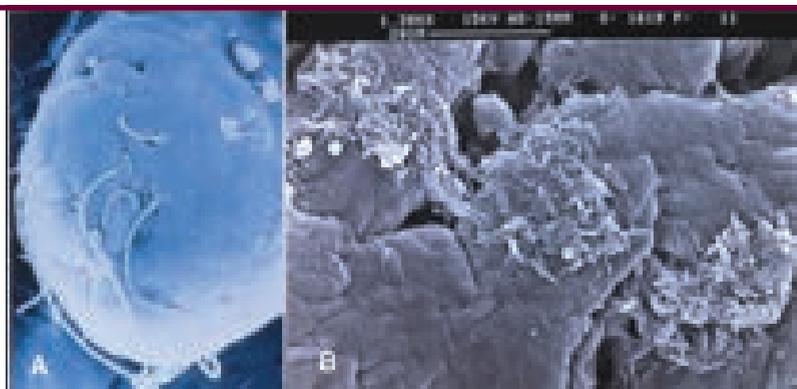
Joël Doré,
Lionel
Rigottier-Gois

INRA. Unité d'Écologie
et de Physiologie
du Système Digestif, CRI,
Jouy-en-Josas, France

Le tube digestif héberge des micro-organismes dans tous les compartiments qui le composent, et ceux-ci représentent au total dix à cent fois plus de cellules que n'en contient le corps humain. Cependant, ce n'est qu'au niveau de l'intestin et surtout dans le côlon que les populations microbiennes sont très denses, atteignant 10^{11} micro-organismes par gramme de contenu. Comme la grande majorité des écosystèmes de la planète, le tube digestif a été colonisé par le monde microbien. Ce fut le cas pour de nombreuses espèces animales, bien avant l'apparition de l'Homme (Figure 1). Dans tous ces contextes, c'est par co-évolution que se sont mises en place les interrelations fonctionnelles qui relient l'hôte (ou son génome) et sa microflore gastro-intestinale complexe et diversifiée (multitude de génomes microbiens). Chez l'Homme, ces inter-relations fonctionnelles intimes entre ce que l'on pourrait considérer comme les deux génomes humains agissent finalement sur la santé de l'hôte dans son acception la plus large.

Figure 1.

A : bactéries filamenteuses dans l'iléon de souris.
B : bactéries fusiformes dans le caecum de souris
(clichés M. Bastide, F. Castex, Faculté de Pharmacie, Montpellier)



Nous allons, dans ce chapitre, présenter les méthodes d'étude de la microflore intestinale et évoquer les progrès dans la connaissance auxquels elles ont contribué. Notre compréhension de la flore microbienne intestinale a en effet évolué de façon chaotique, accompagnant l'amélioration des méthodes d'étude. Il y a encore dix ans, les connaissances étaient essentiellement fondées sur quelques grandes études de la composition de la

microflore fécale, basées sur la caractérisation de micro-organismes cultivables. Cependant, l'utilisation récente d'approches moléculaires indépendantes de la culture anaérobie est en passe de bouleverser totalement notre vision de l'écosystème digestif humain, donnant à la période actuelle toute la richesse des grandes périodes de révisions conceptuelles. Deux revues récentes abordent ce sujet [1, 2].

Méthodes d'étude de la flore microbienne intestinale basées sur la culture

Depuis la description pionnière de *Bacterium coli communior* par Escherich en 1885, des développements méthodologiques successifs ont permis une amélioration constante, bien qu'irrégulière, des méthodes aboutissant progressivement à la possibilité de mettre en culture *in vitro*, puis d'isoler en culture pure, les micro-organismes de la flore intestinale. Même si au tout début du siècle dernier, les travaux de Pasteur avaient ouvert au concept de vie microbienne en absence d'oxygène, ce n'est que dans les années 1970 que la microbiologie digestive humaine a connu son plus fort essor. L'anaérobiose est alors maîtrisée grâce aux travaux de Hungate et de Freter [3, 4] (Figure 2).



Figure 2.
Enceinte anaérobie (cliché BCX)

Hungate distribue stérilement et sous un flux constant de CO₂ des milieux préparés pour simuler les conditions physicochimiques de l'environnement digestif (température, pH, potentiel redox très bas, présence de minéraux, d'oligo-éléments et de vitamines, d'acides gras volatils, d'ammoniaque comme source d'azote principale...). Il s'intéresse avant tout aux bactéries et protozoaires du rumen, mais sa technique est appliquée par la suite par Moore

et Holdeman pour la caractérisation de la microflore intestinale humaine. Freter, de son côté, met en place le système de la chambre de Freter, enceinte à atmosphère contrôlée, que nous connaissons toujours et qui permet de manipuler des échantillons et des milieux sur boîtes de Pétri en absence d'oxygène. Ces progrès ont permis d'isoler et d'inventorier de nombreuses espèces microbiennes de la flore fécale dominante et de les répertorier selon les règles de la taxonomie classique. Grâce à quelques études ayant porté sur un grand nombre d'échantillons fécaux, il a été possible d'avoir une vue d'ensemble de la composition globale de la microflore fécale humaine cultivable [5-8]. Les genres microbiens anaérobies principaux ainsi répertoriés sont : *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium* et *Clostridium*. Les genres cultivables dominants sont présentés sur le **Tableau I** [7-9].

Tableau I. <i>Genres bactériens dominants de la microflore fécale humaine cultivable</i>	Importance relative (pourcentage des anaérobies totaux)		
	Genre	[7]	Référence [8]
	<i>Bacteroides</i>	30	56
	<i>Eubacterium</i>	26	14
	<i>Bifidobacterium</i>	11	4
	<i>Peptostreptococcus</i>	9	4
	<i>Fusobacterium</i>	8	0.1
	<i>Ruminococcus</i>	4	9
	<i>Clostridium</i>	2	2
	<i>Lactobacillus</i>	2	6
	<i>Streptococcus</i>	2	6
	Autres	3	1

Prenant en compte le nombre d'espèces observées une seule fois par rapport au nombre total d'espèces identifiées, le calcul du *coverage* selon Good [10] a indiqué que jusqu'à quatre cents espèces différentes pourraient composer la flore fécale de l'Homme, faisant de l'intestin humain l'un des écosystèmes microbiens les plus diversifiés. Ce chiffre a dès lors toujours été repris sans jamais avoir été vérifié expérimentalement. Seules vingt-cinq à quarante espèces composeraient cependant la flore dominante d'un individu, parfois dite autochtone ou active [11, 12]. La flore dominante est constituée des micro-organismes présents à des niveaux de population de 10^8 à 10^{11} par gramme de fèces. Cette composante, à laquelle on confère intuitivement un rôle fonctionnel prépondérant, n'est restée accessible jusqu'à une époque récente que par les méthodes de culture. Les limites de ces méthodes sont cependant nombreuses. Il est certain que seuls les micro-organismes pour lesquels la niche écologique peut être reproduite en laboratoire ont pu être isolés et identifiés. Toutes les espèces dépendantes d'inter-relations étroites avec des partenaires ou exigeant des apports nutritionnels difficiles à satisfaire *in vitro* auront de ce fait toujours échappé à la culture et

l'identification. À titre d'exemple, l'isolement des micro-organismes sous forme de colonies ne donne accès à aucune espèce bactérienne dépendante d'une autre espèce pour sa croissance. On connaît aujourd'hui de nombreux exemples de dépendances nutritionnelles, de substrats énergétiques ou de cofacteurs vitaminiques, qu'il est difficile de contourner. Les archaea méthanogènes, dont la présence était détectée par l'analyse du méthane dans l'air expiré, n'ont pu être cultivées qu'après la mise en place des méthodes de culture sous H₂/CO₂ en atmosphère pressurisée à 2 bars [13]. Les améliorations techniques apportées depuis les années 1970 ont ainsi permis la culture et le dénombrement des archaea méthanogènes [14-16] et des bactéries acétogènes capables d'utiliser des gaz comme source de carbone et d'énergie [17, 18]. D'autres espèces bactériennes nouvelles sont continuellement isolées de la flore dominante après sélection pour des activités particulières comme la cellulolyse (Bernalier, communication personnelle) ou le métabolisme de composés aromatiques [19, 20].

Les micro-organismes moins représentés (10⁶ à 10⁸ UFC/g) composent la flore sous-dominante. Ceux-ci ont pu être étudiés grâce au développement de milieux sélectifs. La présence d'anaérobies facultatifs dans la flore sous-dominante fait qu'on en connaît très bien certaines composantes, *Escherichia coli* par exemple. Enfin, on isole facilement une fraction mineure composée de micro-organismes parfois aérobies à des niveaux inférieurs à 10⁶ par gramme de fèces, et qui ne font que transiter dans le tube digestif.

Les quelques études ayant comparé la flore de différents individus ont conduit à la conclusion que des sujets différents hébergent des flores dominantes différentes [9, 21, 22].

La nécessité de cultiver *in vitro* les micro-organismes pour caractériser la flore digestive a toujours conduit à sous-estimer les populations. Malgré l'utilisation de nombreux milieux de culture *in vitro*, simulant l'écosystème, les expérimentateurs ont toujours observé de grandes différences entre les souches issues d'enrichissements et les échantillons naturels du point de vue qualitatif mais aussi quantitatif. L'« anomalie de dénombrement » a été vérifiée à de multiples reprises (Tableau II), soulignant qu'une large part des espèces bactériennes de la flore fécale dominante de l'Homme sain échappe à la culture anaérobie en conditions de laboratoire. La fraction cultivable a pu être estimée entre 10 % et 90 % suivant les études : (93 %) [7], (58 %) [23], (20 % à 30 %) [24], (24 %) [8], (14 % à 37 %) [25], ce qui traduit une tendance à la reconnaissance croissante de la part du non cultivable.

Référence	Année	Fraction cultivée (%)	Tableau II. Évaluation de la fraction cultivable de la microflore fécale humaine
[7]	1974	93	
[23]	1996	58	
[24]	1999	20-30	
[8]	1983	24	
[25]	1995	14-37	

Ainsi, si les méthodes de culture ont, en un demi-siècle, permis d'apprendre beaucoup de l'écosystème intestinal, la fraction d'espèces bien décrites reste encore limitée. Alors que les progrès en matière de culture anaérobie semblaient n'offrir que peu de possibilités d'amélioration, le développement des phylogénies ribosomiques à la fin des années 1970 [26] et leur application ultérieure à l'écologie microbienne à la fin des années 1980 [27-29] ont représenté un pas décisif vers l'utilisation de techniques indépendantes de la culture. Cela a ouvert de nouvelles perspectives et permis un essor considérable des connaissances, essor que nous traversons encore à ce jour. La culture anaérobie demeure cependant le standard incontournable pour l'identification et la description formelle d'espèces nouvelles dont la validation passe par l'approbation du comité international de systématique.

Méthodes moléculaires d'étude de la flore microbienne intestinale basées sur l'ADN et l'ARN ribosomiques

Les méthodes d'étude basées sur l'analyse moléculaire des ADN et ARN 16S ribosomiques (ADNr 16S et ARNr 16S), combinées aux études électrophorétiques en gradient dénaturant de l'ARNr ont conduit au bouleversement des connaissances sur l'écosystème intestinal humain.

Les méthodes ribosomiques doivent leur très large diffusion et leur essor rapide à quelques caractéristiques intrinsèques aux molécules cibles que l'on peut résumer en quatre points :

- ADNr et ARNr sont présents dans toutes les cellules vivantes ;
- ces molécules ne sont pas sujettes à des transferts latéraux de matériel génétique entre micro-organismes contemporains ;
- la juxtaposition de régions très conservées et de régions variables a facilité la constitution rapide d'une large base de séquences (plus de 60 000 à ce jour) ;
- la structure primaire, mosaïque, est informative du domaine (bacteria, eucarya, archaea) jusqu'à l'espèce.

L'application des méthodes ribosomiques à l'écologie microbienne peut être subdivisée en deux grandes approches que différencient leurs niveaux de résolution : le plus haut niveau de résolution donne accès à l'inventaire d'espèces dominantes, tandis qu'un niveau plus large s'intéresse à la composition en grands groupes de la flore dominante et à sa quantification (Figure 3). Nous allons détailler les différentes stratégies possibles pour ces deux grandes approches dont la limite majeure est qu'elles n'informent qu'en termes purement phylogénétiques sur les échantillons caractérisés, n'offrant pas de vision fonctionnelle.

Diversité d'espèces de la microflore intestinale humaine

Inventaire des espèces de la microflore fcale

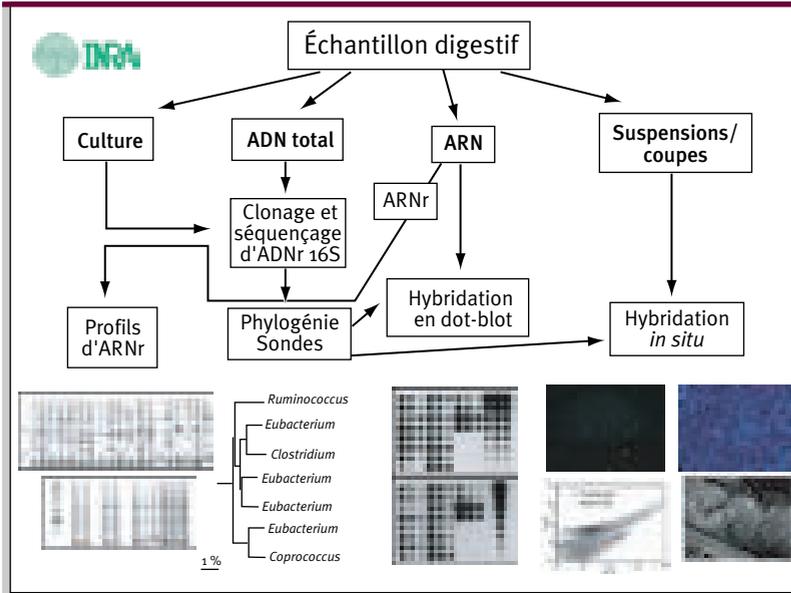


Figure 3. Stratégies d'écologie moléculaire de la microflore colique par des méthodes basées sur l'analyse comparée de séquences d'ADN et d'ARN ribosomique

humaine

L'analyse comparée de séquences d'ADNr 16S permet d'inférer le degré de parenté et de représenter sous forme graphique (arbres ou dendrogrammes) les relations évolutives naturelles qui existent entre des organismes contemporains [26]. C'est le principe de l'analyse phylogénétique. Celle-ci a tout d'abord été appliquée à des micro-organismes isolés et conservés en collection de souches. Plus récemment, la même approche a été appliquée à des ADN ribosomiques 16S obtenus par PCR à partir d'ADN extrait d'écosystèmes naturels et séparés par clonage. Depuis les travaux pionniers de Wilson [23], qui avait ainsi analysé quelques séquences partielles d'ADNr 16S clonés d'un échantillon fécal humain, nous avons inventorié les espèces dominantes de la flore fécale de plusieurs sujets sains [24, 30]. Nous avons retenu comme critère d'appartenance à la même espèce moléculaire un degré de similarité de séquence d'ADNr 16S supérieur à 98 %. L'étude de plus de mille séquences clonées a montré que :

- la flore fécale est essentiellement composée de trois lignées phylogénétiques majeures : le groupe *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella*, le groupe *Clostridium coccoides* et le groupe *Clostridium leptum* ;
- les espèces n'appartenant pas aux groupes phylogénétiques dominants semblent relativement disséminées dans la phylogénie bactérienne à l'exception de *Collinsella aerofaciens* et apparentés et du genre *Bifidobacterium*, qui, bien que moins représentés numériquement, restent assez fréquents dans la flore fécale de l'adulte sain ;
- le nombre moyen d'espèces dominantes de chaque flore fécale du sujet adulte en bonne santé peut être évalué par interférence mathématique à cent en moyenne (de cinquante à cent quatre-vingt en fonction des individus) ;
- chaque flore fécale présente une diversité d'espèces qui lui est propre ;

- les flores intestinales de différents individus n'ont en commun que très peu d'espèces (une seule espèce commune à quatre flores fécales) ;
- plus de 80 % des espèces moléculaires observées n'ont pas de représentant dans les collections de souches actuelles, pouvant ainsi correspondre à des micro-organismes non encore cultivés.

Plus récemment, nous avons observé que les flores intestinales de sujets âgés semblent héberger une diversité d'espèces plus large que celles d'adultes sains. Il en va de même de la flore fécale de patients atteints de maladie de Crohn, une maladie inflammatoire cryptogénétique de l'intestin.

Par comparaison avec des travaux similaires appliqués à d'autres écosystèmes digestifs animaux [31-33], les mêmes groupes phylogénétiques dominants semblent présents, même si la flore fécale humaine pourrait présenter une moins grande diversité phylogénétique.

La stratégie d'inventaire moléculaire de la diversité d'espèces dominantes apporte une richesse d'information inégalée et permet la constitution d'une base de données de séquences. Elle présente cependant des limites méthodologiques liées essentiellement aux biais possibles d'extraction et d'amplification. Il est ainsi possible que des micro-organismes plus difficiles à lyser soient sous représentés dans les banques d'ADN ribosomique analysées. Par ailleurs, ces méthodes sont peu sensibles et ne donnent de l'écosystème qu'une vue de la flore dominante (99 % des bactéries présentes). Enfin, la réalisation d'un inventaire représente un investissement lourd et cette stratégie n'est pas applicable à un grand nombre d'échantillons dans un contexte dynamique ou comparatif.

Analyse dynamique

de la diversité d'espèces de la microflore intestinale

Une méthode de séparation électrophorétique, l'électrophorèse en gradient dénaturant, a été récemment appliquée à l'analyse dynamique (dans le temps ou entre sujets) de la flore intestinale. Dans le principe, cette technique permet la séparation dans un gel dénaturant de fragments d'ARNr obtenus par PCR (tous de même taille) sur la base de leur dynamique de dénaturation qui détermine leur séquence interne, et notamment leur pourcentage en bases nucléiques G et C. Le résultat obtenu est un profil électrophorétique pour lequel chaque bande correspond en première approximation à une espèce dominante de l'écosystème de départ. Cette technique est tout à fait applicable à un grand nombre d'échantillons. Les travaux pionniers de Zoetendal *et al.* [34] avaient montré que, bien que très différente d'un individu à l'autre, la diversité d'espèces dominantes de la flore fécale est, chez l'homme sain, très stable dans le temps sur une durée de plusieurs mois. Nous avons pu observer cette stabilité sur plusieurs années [35]. Cette stratégie offre un potentiel d'analyse comparative très attrayant. De plus, il est possible d'exciser et séquencer une bande apparaissant ou disparaissant dans un contexte nutritionnel ou pathologique particulier pour réaliser l'identification par séquençage de l'espèce correspondante. Enfin, l'étape de PCR initiale ouvre la possibilité de faire un « zoom » sur une population donnée et d'aller ainsi chercher des modifications de flore sous-dominante avec un niveau accru de sensibilité. Appliqué aux bifidobactéries ou aux lactobacilles, cette approche permet de détecter des bactéries ayant un niveau de population de l'ordre de 10^6 par gramme de fèces. Des informations

similaires peuvent être obtenues en analysant sur un séquenceur le polymorphisme de fragments d'ADNr simples brins (*Single Strand Conformation Polymorphism*, SSCP) obtenus par amplification et marqués. Pour ce qui concerne les biais possibles d'extraction et d'amplification, les limites de ces techniques sont les mêmes que pour l'inventaire moléculaire complet [36].

Composition en grands groupes phylogénétiques et écologie moléculaire de la microflore intestinale humaine

La base de données de séquences ribosomiques a permis de développer un panel de sondes oligonucléotidiques ciblant les ARNr 16S qui sont mises en jeu par diverses techniques d'hybridation et qui permettent l'analyse qualitative et quantitative de la composition de la flore intestinale de façon indépendante de la culture. L'intérêt de la structure mosaïque de l'ARNr prend tout son sens dans ce contexte de recherche de signatures nucléotidiques. En effet, les régions hautement conservées permettent le développement de sondes universelles, ou de domaines Bacteria, Archaea, Eucarya [37], tandis que les régions variables permettent le développement de sondes de groupes phylogénétiques, de genres, voire d'espèces [38].

Groupe phylogénétique cible	Séquence (5'-3')	Nom (nomenclature OPD) ¹	Réf.	Tableau III. <i>Sondes oligonucléotidiques utilisées en hybridation quantitative en dot-blot</i>
Sonde universelle	GACGGCGGTGTGTACAA	S-*-Univ-1390-a-A-18	[53]	
Domaine Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	S-D-Bact-0338-a-A-18	[54]	
Domaine Archaea	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	S-D-Arch-0915-a-A-20	[54]	
Domaine Eucarya	ACCAGACTTGCCCTCC	S-D-Euca-0502-a-A-16	[54]	
Groupe Bacteroides	GCACTTAAGCCGACCT	S-*-Bacto-1080-a-A-18	[55]	
Entérobactéries	CTTTTGACGCCACT	S-G-Enter-1432-a-A-15	**	
Genre Bifidobacterium	CCGGTTTTMAGGGATCC	S-G-Bif-1278-b-A-17	[40]	
Groupe Lactobacillus	YCACCCTACACATGRAGTCCACT	S-G-Lactb-0722-a-A-25	[56]	
Groupe C. leptum	GTTTTATCAACGGCAGTC	S-G-Clept-1089-a-A-18	[39]	
Groupe C. coccoides	GCCATGTRACTGATTCTTCG	S-*-Erec-0482-a-A-19	[41]	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Oligonucleotide Probe Database [57] 2. Cible les genres Bacteroides, Porphyromonas, Prevotella 3. Cible les genres Lactobacillus, Streptococcus, Enterococcus 4. Cible des espèces appartenant aux genres Clostridium mais aussi Eubacterium, Ruminococcus, ainsi que Faecalibacterium prausnitzii pour le groupe C. leptum et Coprococcus eutactus et Butyrivibrio spp. pour le groupe C. coccoides 				

Les premières applications à la caractérisation de la microflore intestinale humaine ont porté sur l'application de techniques d'hybridation quantitative de type dot-blot sur ARN fécal total. Un panel de dix sondes allant des domaines aux grands groupes bactériens a été utilisé afin d'analyser la composition de la flore à partir d'échantillons digestifs congelés. Le **Tableau III** présente cette série de sondes d'hybridation [39].

Les archaea et les cellules eucaryotes ne contribuent que de façon marginale à l'ARN fécal total de l'Homme sain (< 3 %) par rapport aux bactéries [40]. Six sondes de groupes bactériens du panel évoqué plus haut (*Bacteroides* et apparentés, *Clostridium leptum* et apparentés, *Clostridium coccoïdes* et apparentés, entérobactéries, *Lactobacillus-Streptococcus-Enterococcus*, et le genre *Bifidobacterium*) ont permis de prendre en compte plus de 70 % de la flore fécale du jeune adulte [39] contre 50 % à 70 % chez l'enfant jeune et la personne âgée (Doré, non publié) suggérant, dans ces deux derniers cas, l'existence d'espèces différentes. Confirmant les résultats d'inventaires moléculaires, cette technique a montré que, chez l'adulte sain, les groupes ou sous-groupes *Bacteroides*, *Clostridium leptum* et *Clostridium coccoïdes* et apparentés représentaient la composante majeure de la flore fécale, leurs ARNr 16S représentant de façon cumulée plus de 50 % de l'ARNr 16S bactérien total. Elle a également été appliquée avec succès au suivi moléculaire de l'évolution des populations lors de la prise de suppléments alimentaires à base de molécules fermentescibles pour la recherche d'effets bifidogènes.

Dans le même temps, s'est développée l'hybridation *in situ* sur suspensions fécales fixées. Cette méthode s'appuie sur la fixation, en présence d'aldéhydes, des structures de paroi bactériennes à partir d'échantillons fécaux, et ensuite l'hybridation des cellules après perméabilisation avec des sondes ribosomiques porteuses de fluorochromes. Lorsque les sondes pénètrent dans un corps bactérien et s'hybrident avec leur séquence cible, la cellule bactérienne est rendue fluorescente et peut alors être visualisée au microscope en épifluorescence ou confocal.

Il est également possible de compter les bactéries ainsi marquées avec un système d'analyse d'image ou à l'aide d'un cytomètre de flux. Cette dernière approche ouvre une perspective notable d'analyses à haut débit. L'hybridation *in situ* ne s'applique aux échantillons fécaux congelés que si ceux-ci ont été préalablement fixés, et les sondes d'hybridation ne sont pas toutes applicables *in situ* dans la mesure où certaines régions de l'ARN ribosomique sont inaccessibles dans les cellules entières fixées. Franks *et al.* [41] ont appliqué un panel de six sondes de groupes pour dénombrer les populations dominantes de la flore fécale de sujets adultes sains. Harmsen *et al.* [42] ont appliqué ces mêmes outils au suivi de la colonisation chez l'enfant. Grâce à cette méthode, Harmsen *et al.* [43] ont démontré l'importance occasionnelle des coriobacteriaceae, comprenant les genres *Atopobium*, *Collinsella* et *Eggerthella*, dans la microflore fécale de sujets très jeunes ou âgés. L'hybridation *in situ* s'applique également à l'étude de coupes de tissus digestifs [44], ce qui va permettre, à terme, l'analyse des relations topologiques entre les bactéries et les cellules de l'épithélium intestinal de l'hôte (**Figure 4**).

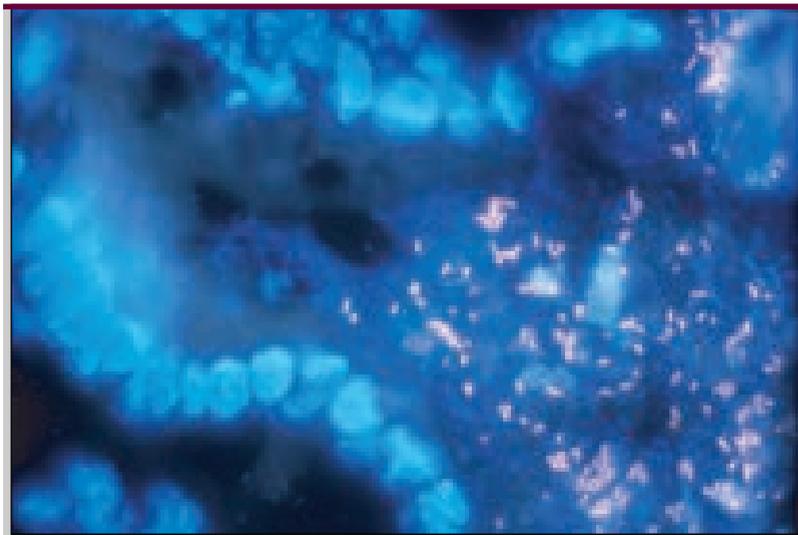


Figure 4.
 Visualisation de la coloration au DAPI et de la fluorescence de la sonde Bif 164 – Cy3 : coupe de caecum de souris avec marquage fluorescent des bactéries totales (bleu) et des bifidobactéries (rose)
 (cliché V. Rochet, INRA-UEPSD)

Nous avons récemment réalisé une comparaison entre l'hybridation *in situ* sur bactéries entières et l'hybridation en dot-blot des ARNr totaux sur les échantillons fécaux d'individus, en utilisant un panel de sondes similaires ciblant six groupes phylogénétiques (Tableau IV).

Groupe phylogénétique cible	[Sonde]	Inventaire moléculaire [25] (% espèces)	Hybridation quantitative	
			[39] (% rRNA)	[41] (% bactéries)
		(n = 1)	(n = 27)	(n = 10)
Groupe Bacteroidés	[Bacto-1080]	23,8	36,8	
Sous-groupe Bacteroidés	[Bfra-0602] + [Bdis-]			20,0
Entérobactéries ¹	[Enter-1432]	ND	0,7	
Genre Bifidobacterium	[Bif-1278]	ND	0,7	3,0
Groupe Lactobacillus	[Lacb-0722]	2,4	0,6	
Sous-groupe Strepto	[Str-]			< 0,3
Groupe C. leptum	[Clept-1089]	23,8	16,3	
Sous-groupe de C. leptum	[LowGC2P]			12,0
Groupe C. coccoidés	[Erec-0482]	36,9	14,5	29,0
Groupe C. histolyticum	[Chis-]			< 0,3
Groupe C. lituseburendi	[Lit-]			< 0,3
Autres		13,0	30,0	

1. Voir le tableau III pour des précisions sur les genres appartenant aux groupes cibles.
 ND : non détecté

Tableau IV.
 Comparaison des distributions de populations microbiennes fécales observées par différentes méthodes moléculaires

Nous avons mis en évidence, quelle que soit la méthode, que les proportions pour les groupes *Clostridium coccoïdes*, *Faecalibacterium prausnitzii* (apparentés à *Clostridium leptum*), *Bifidobacterium* et les entériques n'étaient pas significativement différentes. En revanche, les proportions étaient significativement différentes pour les groupes *Bacteroides* et *Atopobium* ($p < 0,05$). L'activité métabolique de ces bactéries dans le côlon serait à l'origine de la disproportion entre la quantité relative d'ARNr et le nombre réel de cellules bactériennes [45].

Le panel de sondes applicable en hybridation *in situ* est en permanente amélioration. Dans le cadre d'un travail sur la détection de cinq espèces du groupe *Bacteroides* dans les fèces, nous avons défini un protocole de validation de sondes pour l'hybridation *in situ* combinée à la cytométrie [46]. Des nouvelles sondes détectant des représentants du groupe *Clostridium leptum* ainsi que des sondes récemment publiées ont été validées *in vitro* sur des souches de collection en appliquant le protocole précédemment défini. Ce travail a permis de définir un panel de dix-huit sondes phylogénétiques offrant une meilleure représentation de la composition de la microflore chez l'adulte sain (Rigottier-Gois, non publié).

Conclusions et perspectives

D'énormes avancées ont été et sont encore réalisées dans la connaissance de la flore intestinale dominante de l'Homme. En soustrayant de la dépendance vis-à-vis de la culture anaérobie, l'application d'outils moléculaires contribue à améliorer la prise en compte de l'écologie microbienne intestinale dans le contexte de la nutrition et de la santé. Aujourd'hui, les progrès les plus significatifs sont ceux permettant d'avancer vers une analyse à haut débit de la microflore intestinale, comme le permet l'hybridation *in situ* couplée à la cytométrie. Dans ce sens, la valorisation des séquences d'ADNr 16S clonées à partir de flores fécales humaines nous permet de mettre au point des réseaux d'ADN (macro-arrays et biopuces) applicables à la détection simultanée de centaines d'espèces bactériennes dans un échantillon fécal.

Même si les techniques présentées ici permettent une description plus juste de l'écosystème microbien intestinal, elles ne s'appuient que sur une molécule (l'ARN ribosomique 16S) qui ne peut, à elle seule, couvrir tous les aspects de l'écologie. Les fonctions exercées dans un écosystème sont exprimées *via* les ARN messagers par les protéines et les métabolites. On peut gager que la décennie à venir apportera d'autres gains très significatifs dans notre vision de la microflore colique par l'élargissement de l'approche moléculaire aux outils de la biologie intégrative. Le génome complet de l'écosystème microbien intestinal humain, ou métagénome, sera ainsi étudié ; les gènes de centaines d'espèces bactériennes encore incultivables seront identifiés et les mécanismes de régulation de leur expression pourront être mis à jour.

La flore colique interagit avec les cellules de l'hôte, notamment par le biais des mécanismes immunitaires et *via* les métabolites produits par la fermentation. Ces interactions peuvent être bénéfiques ou néfastes à la santé et au statut nutritionnel, mais leurs mécanismes restent très mal connus à ce

jour. Le vaste réseau d'interactions métaboliques, y compris celles qui s'établissent entre l'hôte et sa flore, ne pourra être précisé que si l'on sait faire les retours nécessaires à l'écosystème et mettre à profit des modèles simplifiés à partir de souches bactériennes nouvellement isolées. Des travaux sont déjà en cours qui visent à mettre en interface les génomes de bactéries intestinales et ceux d'animaux modèles gnotobiotiques qui les hébergent [47-52]. L'application au contexte intestinal humain ne tardera pas à venir.

À terme, il est également important que toutes ces avancées méthodologiques conduisent à affiner et réviser les concepts actuels sur la colonisation du tube digestif et sur l'adaptation de la flore à l'écosystème intestinal, comme par exemple :

- l'importance relative de la génétique et de l'écologie dans le déterminisme de cette diversité d'espèces bactériennes dominantes, spécifique et stable, qui semble propre à chaque individu ;
- le paradoxe entre des différences marquées de composition de la microflore intestinale, d'une part, et une forte homogénéité dans ses activités globales, d'autre part, activités qui s'expriment au bénéfice de l'hôte en situation normale.

Remerciements

Le travail de l'INRA rapporté ici a été en partie financé par le Bureau des Ressources Génétiques et l'Union Européenne dans le cadre des projets n° CT-97-3035 et CT-97-3181, QLK1-2000-00067 et QLK1-2000-00108.

Points clés

- Plus de 50 % de la flore microbienne intestinale dominante de l'Homme sain adulte (représentant 10^8 à 10^{11} bactéries par gramme de fèces) n'est pas cultivable à ce jour en conditions classiques d'anaérobiose.
- Les méthodes d'étude moléculaires, notamment celles basées sur l'ADN ribosomique 16S comme marqueur phylogénétique, permettent une prise en compte exhaustive de la flore microbienne intestinale dominante.
- Quatre-vingt pour cent des espèces bactériennes qui composent la flore microbienne intestinale dominante de l'Homme sain ne sont pas répertoriées dans les collections de souches actuelles.
- Les méthodes moléculaires d'écologie microbienne (électrophorèse en milieu dénaturant de l'ARNr 16S, hybridation *in situ* couplée à la cytométrie, PCR quantitative) permettent aujourd'hui une analyse à haut débit de la composition de la microflore intestinale.
- L'élargissement aux outils de la biologie intégrative de l'approche descriptive moléculaire de la flore intestinale donnera accès aux fonctions de cette flore nouvelle non cultivable.

Références

1. Mai V, Morris JG Jr. Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age. *J Nutr* 2004 ; 134 : 459-64.
2. Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr* 2004 ; 134 : 465-72.
3. Hungate RE. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes In : Norris JR, Ribbons DW, eds. *Methods in microbiology*, Vol. 3B. New York : Academic Press, 1969 : 117.
4. Freter R. Interactions between mechanisms controlling the intestinal microflora. *Am J Clin Nutr* 1974 ; 27 : 1409-16.
5. McCartney AL, Wenzhi W, Tannock GW. Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. *Appl Environ Microbiol* 1996 ; 62 : 4608-13.
6. Mitsuoka T, Ohno K, Benno Y, Suzuki K, Namba K. The fecal flora of man. IV. Communication: comparison of the newly developed method with the old conventional method for the analysis of intestinal flora. *Zentralbl Bakteriol [Orig A]* 1976 ; 234 : 219-33.
7. Moore WE, Holdeman LV. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol* 1974 ; 27 : 961-79.

8. Finegold SM, Sutter VL, Mathisen GE. Normal indigenous intestinal flora. In : Hentges DJ, ed. *Human intestinal microflora in health and disease*. New York : Academic Press, 1983 : 3-31.
9. Moore WE, Cato EP, Holdeman LV. Some current concepts in intestinal bacteriology. *Am J Clin Nutr* 1978 ; 31 : S33-42.
10. Good IJ. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 1953 ; 40 : 237-64.
11. Benno Y, Endo K, Mizutani T, Namba Y, Komori T, Mitsuoka T. Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan. *Appl Environ Microbiol* 1989 ; 55 : 1100-5.
12. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Ann Rev Microbiol* 1977 ; 31 : 107-33.
13. Balch WE, Fox GE, Magrum LJ, Woese CR, Wolfe RS. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev* 1979 ; 43 : 260-6.
14. Nottingham PM, Hungate RE. Isolation of methanogenic bacteria from feces of man. *J Bacteriol* 1968 ; 96 : 2178-9.
15. Miller TL, Wolin MJ, de Macario EC, Macario AJ. Isolation of *Methanobrevibacter smithii* from human feces. *Appl Environ Microbiol* 1982 ; 43 : 227-32.
16. Pochart P, Doré J, Lemann F, Goderel I, Rambaud JC. Interrelations between populations of methanogenic archaea and sulfate-reducing bacteria in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 1992 ; 77 : 225-8.
17. Doré J, Morvan B, Rieu-Lesme F, Goderel I, Gouet P, Pochart P. Most probable number enumeration of H₂-utilizing acetogenic bacteria from the digestive tract of animals and man. *FEMS Microbiol Lett* 1995 ; 130 : 7-12.
18. Bernalier A, Rochet V, Leclerc M, Doré J, Pochart P. Diversity of H₂/CO₂-utilizing acetogenic bacteria from feces of non-methane-producing humans. *Curr Microbiol* 1996 ; 33 : 94-9.
19. Simmering R, Kleessen B, Blaut M. Quantification of the flavonoid-degrading bacterium *Eubacterium ramulus* in human fecal samples with a species-specific oligonucleotide hybridization probe. *Appl Environ Microbiol* 1999 ; 65 : 3705-9.
20. Hur HG, Beger RD, Heinze TM, et al. Isolation of an anaerobic intestinal bacterium capable of cleaving the C-ring of the isoflavonoid daidzein. *Arch Microbiol* 2002 ; 178 : 8-12.
21. Holdeman LV, Good IJ, Moore WEC. Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl Environ Microbiol* 1976 ; 31 : 359-75.
22. Mitsuoka T, Ono K. Fecal flora of man. The fluctuation of the fecal flora of the healthy adult. *Zentralbl Bakteriol [Orig A]* 1977 ; 238 : 228-36.
23. Wilson KH, Blichington RB. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 1996 ; 62 : 2273-8.
24. Suau A, Bonnet R, Sutren M, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 1999 ; 65 : 4799-807.
25. Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, et al. Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 1995 ; 61 : 3069-75.
26. Olsen GJ, Woese CR. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J* 1993 ; 7 : 113-23.
27. Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR, Stahl DA. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol* 1986 ; 40 : 337-65.
28. Pace NR. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News* 1996 ; 62 : 463-70.
29. Stahl DA, Flesher B, Mansfield HR, Montgomery L. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 1988 ; 54 : 1079-84.
30. Bonnet R, Suau A, Doré J, Gibson GR, Collins MD. Differences in rDNA libraries of faecal bacteria derived from 10- and 25-cycle PCRs. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002 ; 52 : 757-63.
31. Ohkuma M, Kudo T. Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. *Appl Environ Microbiol* 1996 ; 62 : 461-8.
32. Whitford MF, Forster RF, Beard CE, Gong J, Teather RM. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. *Anaerobe* 1998 ; 4 : 153-63.
33. Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, Lindcorna RH, Boye M, Moller K. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl Environ Microbiol* 2002 ; 68 : 673-90.

34. Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998 ; 64 : 3854-9.
35. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, *et al.* Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003 ; 52 : 237-42.
36. Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, *et al.* Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 1998 ; 64 : 795-9.
37. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 4576-9.
38. Amann R. Who is out there? Microbial aspects of biodiversity. *Syst Appl Microbiol* 2000 ; 23 : 1-8.
39. Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Doré J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2000 ; 66 : 2263-6.
40. Doré J, Gramet G, Goderel I, Pochart P. Culture-independent characterization of human fecal flora using rRNA-targeted hybridization probes. *Genet Sel Evol* 1998 ; 30S : S287-96.
41. Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 1998 ; 64 : 3336-45.
42. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, *et al.* Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000 ; 30 : 61-7.
43. Harmsen HJM, Wildeboer-Veloo ACM, Grijpstra J, Knol J, Degener JE, Welling GW. Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of coriobacteriaceae in human feces from volunteers of different age groups. *Appl Environ Microbiol* 2000 ; 66 : 4523-7.
44. Thomas V, Rochet V, Boureau H, *et al.* Molecular characterization and spatial analysis of a simplified gut microbiota displaying colonization resistance against *Clostridium difficile*. *Microb Ecol Health Dis* 2002 ; 14 : 203-10.
45. Rigottier-Gois L, Le Bourhis AG, Gramet G, Rochet V, Doré J. Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *FEMS Microbiol Ecol* 2003 ; 43 : 237-45.
46. Rigottier-Gois L, Rochet V, Garrec N, Suau A, Doré J. Enumeration of *Bacteroides species* in human faeces by fluorescent *in situ* hybridisation combined with flow cytometry using 16S rRNA probes. *Syst Appl Microbiol* 2003 ; 26 : 110-8.
47. Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* 2002 ; 22 : 283-307.
48. Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JI. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol* 2003 ; 4 : 269-73.
49. Xu J, Bjursell MK, Himrod J, *et al.* A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science* 2003 ; 299 : 2074-6.
50. Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001 ; 292 : 1115-8.
51. Hooper LV, Gordon JI. Glycans as legislators of host-microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiology* 2001 ; 11 : 1R-10R.
52. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001 ; 291 : 881-4.
53. Zheng D, Alm EW, Stahl DA, Raskin L. Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol* 1996 ; 62 : 4504-13.
54. Amann RI, Krumholz L, Stahl DA. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* 1990 ; 172 : 762-70.
55. Doré J, Sghir A, Hannequart-Gramet G, Corthier G, Pochart P. Design and evaluation of a 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe for specific detection and quantitation of human faecal *Bacteroides* populations. *Syst Appl Microbiol* 1998 ; 21 : 65-71.
56. Sghir A, Chow JM, Mackie RI. Continuous culture selection of bifidobacteria and lactobacilli from human faecal samples using fructooligosaccharide as selective substrate. *J Appl Microbiol* 1998 ; 85 : 769-77.



Établissement et composition de la flore microbienne intestinale

La flore microbienne digestive se caractérise par sa complexité et sa diversité. Des variations dans le temps et l'espace caractérisent la composition de la flore digestive d'un individu. Ainsi, les flores digestives du nouveau-né, du nourrisson puis de l'adulte sont différentes. De même, la composition de la flore varie selon les segments du tube digestif avec un gradient croissant dans le sens oral-anal. En revanche, une fois établie, la flore intestinale est relativement stable chez un même individu dans des conditions normales, bien qu'elle puisse être influencée par les facteurs environnementaux tels que l'alimentation et les traitements antibiotiques [1, 2].

Chez l'homme, la microflore intestinale renferme environ 10^{14} bactéries, soit plus de dix fois le nombre de cellules de l'organisme. Les espèces bactériennes composant cette flore appartiennent à plus de quatre cents espèces différentes [1-4]. Il s'agit d'une biomasse considérable dont les activités sont multiples. L'analyse bactériologique de la flore intestinale totale, comprenant plus de 99 % de bactéries anaérobies strictes et des espèces variées, correspond à un travail énorme et difficile par les techniques classiques de culture. Par ailleurs, plus de 50 % des espèces observables ne sont pas cultivables. Actuellement, des méthodes moléculaires fondées sur l'étude des ARN ribosomiaux (ARNr) et des gènes correspondants (ADNr) montrent l'existence de nombreuses espèces jamais cultivées à ce jour [5, 6].

On ne peut pas séparer l'étude de la microflore intestinale de son contexte environnemental, c'est-à-dire l'hôte et les aliments. L'ensemble constitue l'écosystème microbien digestif qui assure l'homéostasie et la santé de l'hôte. Toute modification de l'un ou de l'autre de ses constituants est susceptible de perturber l'équilibre et le fonctionnement de l'ensemble.

Colonisation digestive : interactions flore-hôte et bactérie-bactérie

On peut définir de façon simplifiée une flore normale par l'ensemble des espèces présentes dans l'écosystème et assurant des relations symbiotiques avec l'hôte [7-9].

Dans la flore digestive colique, on distingue une flore endogène résidente ou autochtone et une flore de transit ou allochtone. La flore endogène résidente ou autochtone comprend l'ensemble des espèces microbiennes

présentes de façon permanente dans l'écosystème du tube digestif. Ces espèces ont colonisé un site spécifique et sont capables de se multiplier dans cet environnement ; ces souches présentant un tropisme cellulaire et tissulaire spécifique sont isolées de façon répétée dans la flore sur une longue période de temps et sont caractéristiques d'un individu. En revanche, les espèces bactériennes en transit ou à pouvoir d'implantation transitoire correspondent à la flore allochtone ou flore de passage ; ces souches ne sont retrouvées que dans un laps de temps court dans le tube digestif. Ces espèces bactériennes proviennent de l'alimentation et appartiennent à différents genres bactériens. Chez l'adulte, certaines souches d'*Escherichia coli* persistent de façon prolongée (mois, voire année) dans la microflore colique, alors que d'autres souches d'*Escherichia coli* disparaissent entre deux prélèvements différents. De même, certains ribotypes de bifidobactéries sont retrouvés de façon constante dans le tube digestif alors que d'autres sont transitoires [9]. Parmi ces espèces en transit, figurent les probiotiques qui, pour la plupart, ne colonisent pas le tractus digestif mais survivent au cours du transit [7, 8].

La capacité d'une espèce bactérienne à coloniser et persister dans le milieu colique est la conséquence d'interactions complexes bactérie-hôte et bactérie-bactérie. Les capacités à adhérer au mucus intestinal et aux cellules entérocytaires, de même que les capacités à dégrader des substrats, peuvent influencer la capacité colonisatrice et la persistance d'une souche dans cet écosystème [9-11]. Étudiant la flore digestive de dix paires de jumeaux âgés de 2 à 18 ans, sur la base d'une classification en sept morphotypes et de la coloration de Gram, Van de Merwe *et al.* [12] ont proposé l'existence d'un facteur génétique déterminant dans la composition de la flore *via* les récepteurs et substrats endogènes. Ainsi, les flores fécales de jumeaux monozygotes sont plus proches que celles de jumeaux dizygotes, elles mêmes plus proches que celles de sujets non apparentés. Une influence génétique avait été rapportée pour la flore nasale [13]. Un lien avec le groupe sanguin avait également été suggéré par Hoskins et Boulding [14].

La première souche qui s'implante a un avantage écologique car il n'y a aucune compétition vis-à-vis d'autres souches bactériennes pour une niche écologique, des nutriments et des facteurs de croissance. Puis une barrière s'installe contre l'implantation de nouvelles souches. Des travaux récents ont montré que les bactéries colonisatrices sont capables de dialoguer avec l'hôte et d'adresser des signaux capables de moduler l'expression des gènes de l'hôte afin de créer un environnement favorable à leur implantation [15]. Ainsi, chez l'animal gnotoxénique, *Bacteroides thetaiotaomicron* est capable de modifier le profil de glycosylation de l'épithélium digestif en régulant les glycosyltransférases de l'hôte. Cette espèce est responsable de la fucosylation de la surface intestinale, créant ainsi sa niche écologique spécifique. Par ailleurs, il a été montré que d'autres bactéries ou leurs surnageants de culture pouvaient modifier les profils de glycosylation de la muqueuse intestinale [16]. Ainsi, le dialogue bactérie-hôte et les interactions bactérie-bactérie sont à l'origine de vagues successives de colonisation, avec création de niches écologiques spécifiques et apport de nutriments appropriés pour les différentes espèces bactériennes colonisant le tube digestif.

Composition et répartition topographique de la flore intestinale de l'homme adulte

La flore intestinale varie longitudinalement tout au long de l'intestin, mais aussi transversalement entre lumière et muqueuse intestinale. En fonction des niveaux de l'intestin, une flore différente est retrouvée, correspondant à des habitats différents ou niches écologiques spécifiques.

Données de l'analyse bactériologique par les méthodes de culture

Les méthodes classiques de culture ont montré que la flore bactérienne se densifie de l'intestin grêle à motricité importante au côlon à motricité réduite.

Intestin grêle

Après le passage de l'estomac à pH acide, le pH redevient neutre, l'oxygène se raréfie et la flore bactérienne qui a survécu au passage gastrique va augmenter progressivement du duodénum à l'iléon. La flore du duodénum-jéjunum n'excède pas 10^4 à 10^6 UFC/g de contenu intestinal et est composée d'espèces aérobie-anaérobie facultatives (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*) appartenant à la flore de passage. La flore iléale est plus importante, atteignant 10^5 à 10^7 UFC/g de contenu intestinal avec une flore anaérobie stricte prédominante appartenant au genre *Bacteroides* associée à une flore anaérobie facultative. Cette flore bactérienne ne dépassant pas 10^7 UFC/g n'assurerait pas de fonctions majeures en dehors de situations pathologiques [1-4].

Côlon

Le côlon est le segment le plus riche en bactéries. Les taux atteignent 10^9 à 10^{11} UFC/g de contenu. Dans le côlon, le transit, très fortement ralenti et associé à un très bas potentiel d'oxydoréduction, est à l'origine de l'augmentation importante de la population bactérienne anaérobie. Le côlon, où la compétition pour l'espace et les nutriments contribue à maintenir l'intégralité de la microflore, est la seule zone colonisée de façon permanente par une flore résidente [1-4].

La flore microbienne essentiellement anaérobie, véritable organe microbien, assure de multiples fonctions bénéfiques pour l'hôte :

- fonctions métaboliques telles que fermentation des résidus alimentaires non digestibles, des constituants endogènes de l'hôte avec production d'acides gras à chaînes courtes source d'énergie, de vitamines ;
- fonction trophique sur la muqueuse intestinale, développement de l'angiogenèse intestinale *via* les cellules de Paneth, développement du système immunitaire local ;
- fonction de barrière contre l'implantation de bactéries pathogènes [7, 8]

L'étude de la flore colique droite est rendue difficile par les conditions de prélèvements. L'analyse du contenu colique nécessite, chez l'homme, des techniques spéciales de prélèvement telles que pyxigraphie et intubation. Une étude utilisant la technique de pyxigraphie pour réaliser des prélèvements du contenu colique a montré que la flore anaérobie stricte du cæcum est cent fois inférieure à celle des fèces [17], au profit de bactéries aéro-anaérobies

facultatives. De même, la concentration en méthanogènes est basse, par comparaison avec celle des fèces.

ces

La flore fécale a été la plus étudiée et contient 10^9 à 10^{11} UFC/g de fèces. Quarante pour cent du poids des selles correspond à des micro-organismes [1-4].

À côté de la flore résidente ou autochtone, comprenant la flore dominante et la flore sous-dominante, on trouve aussi une flore de passage ou allochtone (Figure 1).

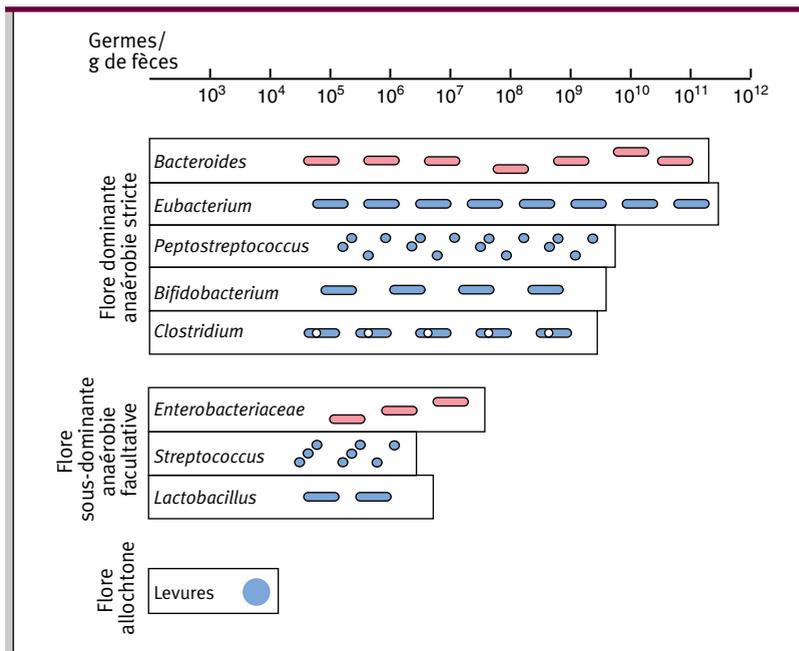


Figure 1.
Représentation schématique de la flore fécale cultivable (d'après [3])

La flore dominante, présente à des taux de 10^9 à 10^{11} UFC/g, est essentiellement composée de bactéries anaérobies strictes, parmi lesquelles des bacilles à Gram négatif du genre *Bacteroides* en nombre important, des bacilles à Gram positif des genres *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, ainsi que des cocci à Gram positif comme des *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*.

La flore sous-dominante, présente à des taux de 10^6 à 10^8 UFC/g, se compose de bactéries aéro-anaérobies facultatives. Ces bactéries appartiennent à différentes espèces de la famille de *Enterobacteriaceae* (surtout *Escherichia coli*) et aux genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, etc. Une multiplication exagérée et non contrôlée des bactéries de cette flore, appelée pullulation bactérienne, peut être à l'origine d'effets pathogènes [8].

La flore de passage est variable et ne s'implante pas au sein du tube digestif, sauf lors de circonstances pathologiques. Cette flore se trouve à des taux inférieurs à 10^6 UFC/g. Très polymorphe, elle est représentée par des

entérobactéries du genre *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* ou *Enterobacter* mais aussi par des *Pseudomonas*, des staphylocoques et des levures essentiellement du genre *Candida*.

Apport des méthodes moléculaires

La biodiversité de la flore fécale est en fait beaucoup plus importante que ne le laissent présager les méthodes classiques de culture. Selon les auteurs, 15 % à 85 % de la flore anaérobie totale est analysable par les techniques de culture classique [5, 6]. Actuellement, des méthodes moléculaires fondées sur le clonage et le séquençage des ADNr 16S montrent que plus de 50 % des espèces dominantes ne sont pas identifiées par culture anaérobie [5, 6].

Par clonage et séquençage d'ADNr 16S à partir de l'ADN fécal d'un adulte sain, Suau *et al.* [6] ont caractérisé la flore fécale. Trois lignées phylogénétiques majeures représentent 95 % des clones étudiés et composent la flore fécale : le groupe *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella* [18], le sous-groupe *Clostridium coccoïdes* (*Clostridium* cluster XIV selon Collins) et le groupe *Clostridium leptum* (*Clostridium* cluster IV selon Collins) [19]. De nombreux autres clones représentant une espèce moléculaire sont uniques, reflétant la diversité de la flore. Environ 75 % des séquences étudiées ne correspondent pas à une espèce connue cultivable.

La connaissance de séquences correspondant à des groupes bactériens ou à des espèces moléculaires a permis le développement de sondes spécifiques ciblant les ARNr 16S. Ces sondes sont ainsi spécifiques de domaines (sonde *Bacteria*), de grands groupes bactériens (groupe *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella*, groupe *Clostridium coccoïdes*, sous-groupe *Clostridium leptum*, groupe *Bifidobacterium*, groupe *Lactobacillus*, groupe *Enterobacteriaceae*) ou d'espèces [20]. Ces sondes marquées par un radio-isotope peuvent être utilisées en hybridation quantitative de type dot-blot après extraction des ARN totaux fécaux ; marquées par un fluorochrome, elles peuvent être utilisées en hybridation *in situ* (FISH pour *Fluorescence In Situ Hybridization*), directement sur les suspensions de selles sur des bactéries entières perméabilisées (Figure 2).

Ainsi, Sghir *et al.* [21] ont utilisé une sonde de domaine *Bacteria* et six sondes de groupes (*Bacteroides*, *Clostridium leptum*, *Clostridium coccoïdes*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus-Streptococcus-Enterococcus*, *Bifidobacterium*) en hybridation dot-blot pour étudier la flore fécale de vingt-sept adultes sains. Les six sondes permettent de caractériser plus de 70 % de la flore fécale totale marquée par la sonde de domaine *Bacteria*. Le groupe *Bacteroides* représente $37 \% \pm 16 \%$ de l'ARNr total ; les groupes *Clostridium leptum* et *Clostridium coccoïdes* représentent respectivement $16 \% \pm 7 \%$ et $14 \% \pm 6 \%$ et les groupes *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae* moins de 2 %.

Des travaux réalisés en hybridation *in situ* couplée à une numération microscopique (analyse d'image par microscopie à épi fluorescence) donnent des résultats similaires. Ainsi, Rochet *et al.* [22] détectent, avec une sonde de domaine *Bacteria*, $80 \% \pm 11 \%$ de la flore bactérienne totale dont l'ADN est marqué (coloration au DAPI). Le groupe *Clostridium coccoïdes-Eubacterium rectale* est le plus représenté ($36 \% \pm 7 \%$) suivi des groupes *Bacteroides* ($17 \% \pm 5 \%$), *Bifidobacterium* ($15 \% \pm 9 \%$) et *Fusobacterium prausnitzii*

(23 % ± 5 %). Cette dernière espèce appartient au sous-groupe *Clostridium leptum* et représenterait un tiers des ARNr de ce groupe [23].

L'utilisation de sondes plus spécifiques reconnaissant des espèces au sein des groupes ou sous-groupes permet d'augmenter le pourcentage de détection. Ainsi, Franks *et al.* [24] ont mis au point plusieurs sondes spécifiques d'espèces. En associant six sondes de groupes et d'espèces utilisées en hybridation *in situ* couplée à l'analyse d'image, ils détectent deux tiers de la flore fécale. Associées, la sonde *Bacteroides fragilis* et la sonde *Bacteroides distasonis* détectent 20 % de la flore. La sonde de groupe *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale* révèle 29 % de la flore. Ces deux groupes représentent la moitié de la flore et en sont donc les constituants majeurs. La sonde *Bifidobacterium* ne révèle que 3 % de la flore. Les sondes de groupe lactocoques-streptocoques, *Clostridium lituseburense* et *Clostridium histolyticum* détectent moins de 1 % de la flore normale et en reflètent la diversité.

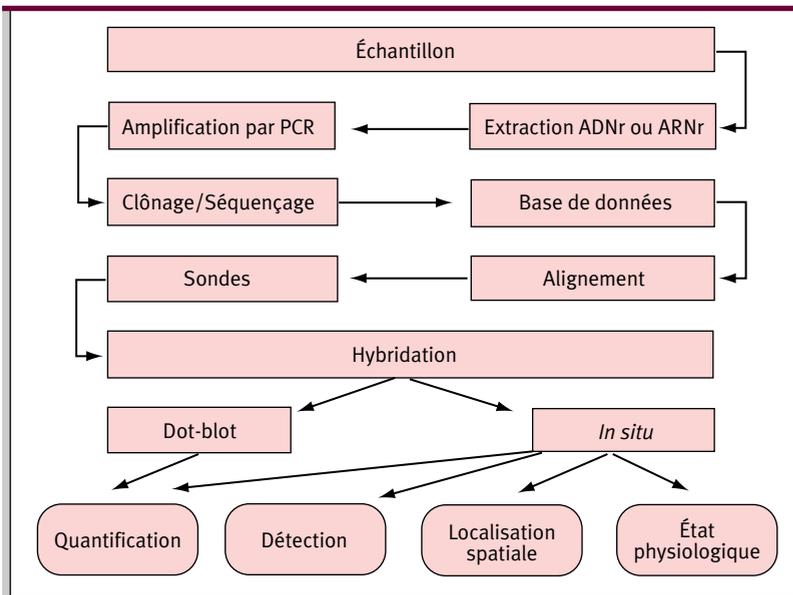


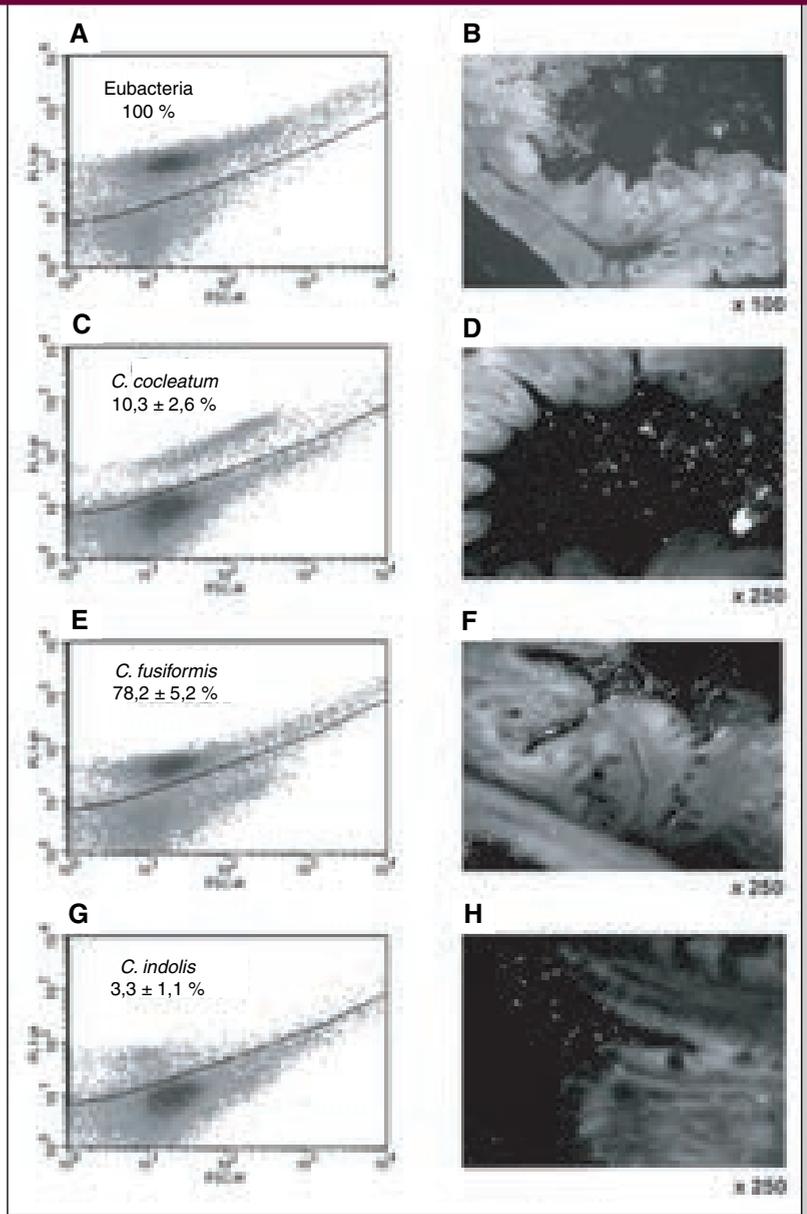
Figure 2.
Méthodes moléculaires
d'étude de la flore
digestive

L'hybridation *in situ* couplée à la numération microscopique est fastidieuse, bien que la numération soit automatisable [21]. Le couplage à la cytométrie en flux pour la numération permet de faciliter la lecture et d'augmenter son rendement pour être applicable à des études en série (Figure 3) [11, 25]. De même, les analyses fondées sur l'étude des profils électrophorétiques en gradient dénaturant après amplification des ARNr semblent plus facilement adaptables aux études en série [26].

Les méthodes moléculaires confirment les résultats obtenus précédemment par culture sur les variations longitudinales et transversales de la composition de la flore. Marteau *et al.* [27], utilisant des sondes ARNr 16S, montrent que les groupes *Bacteroides* (*Bacteroides*-*Porphyromonas*-*Prevotella*), *Clostridium* (groupe *Clostridium coccoides* et sous-groupe

Figure 3.

Analyse d'une flore trixénique chez la souris par hybridation *in situ* couplée à la cytométrie en flux (A, C, E, G) et à l'analyse d'image (B, D, F, H).
 A, B : sonde Bacteria
 C, D : sonde *Clostridium cocleatum*
 E, F : sonde *Clostridium fusiformis*
 G, H : sonde *Clostridium indolis* (d'après [22])



Clostridium leptum) représentent 44 % de l'ARNr bactérien fécal et seulement 13 % de l'ARNr bactérien cæcal. Les bactéries anaérobies facultatives (sondes *Lactobacillus-Enterococcus* et *Escherichia coli*) représentent 50 % de la flore cæcale contre seulement 7 % de la flore fécale et jouent sans doute un rôle important dans les fermentations caecales. La distribution verticale de la microflore a été étudiée par Zoetendal *et al.* [28] sur des biopsies réalisées chez dix volontaires avec ou sans pathologie intestinale à différents niveaux coliques (côlon ascendant, transverse et

descendant) et dans les fèces par une approche moléculaire. Les biopsies effectuées après évacuation du contenu colique semblent être un bon reflet de la flore associée au mucus et à la muqueuse ; cette localisation reflète une liaison intime avec les cellules de l'hôte. Les analyses en cytométrie de flux après coloration à l'iodure de propidium ont montré que 10^5 à 10^6 bactéries étaient détectées dans les biopsies et donc probablement associées à la muqueuse. Les analyses par électrophorèse en gradient dénaturant (DGGE) ont montré des profils particuliers pour chaque individu. Pour un individu donné, les profils obtenus à différents niveaux coliques étaient similaires. En revanche, les profils fécaux étaient dans l'ensemble différents de ceux obtenus avec les biopsies. La spécificité des communautés bactériennes associées à la muqueuse suggère que des facteurs liés à l'hôte sont impliqués dans la détermination de la composition de cette microflore [28].

L'hybridation *in situ* sur coupes de tissus couplée à l'analyse d'image permet aussi de visualiser la distribution horizontale des espèces de la lumière intestinale aux cellules intestinales en passant par la couche de mucus. La **Figure 4** montre la distribution horizontale sur une coupe de cæcum de souris à flore humaine des bactéries révélées respectivement par les sondes de domaine *Bacteria*, de groupe *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* et *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale* (données personnelles).

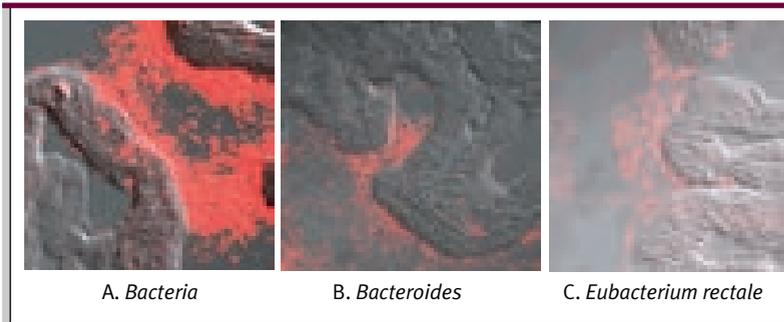


Figure 4.
Hybridation *in situ* couplée à l'analyse d'image sur coupes de caecum de souris à flore humaine à l'aide de sondes marquées par un fluorochrome.
A : sonde domaine *Bacteria*
B : sonde groupe *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella*
C : sonde groupe *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale*

Variation de la flore intestinale au cours du temps

La composition de la flore microbienne peut varier en fonction de l'individu et des conditions physiologiques et pathologiques.

Zoetendal *et al.* [26] estiment que la DGGE donne un profil représentant 90 % à 99 % des bactéries d'un écosystème. Ces auteurs ont ainsi mis en évidence, parmi seize individus adultes, des profils de flore fécale très différents d'un individu à l'autre, avec des différences dans le nombre et la

position des bandes. En revanche, le profil obtenu pour un individu donné était très stable au cours du temps. Cela suggère que chaque individu sain possède une microflore fécale spécifique dont la composition est stable au cours du temps. Parmi les différents profils analysés, quelques bandes étaient présentes chez tous les sujets. Les séquences correspondant à ces bandes ont été analysées et montraient de fortes homologues avec *Ruminococcus obeum*, *Eubacterium hallii* et *Fusobacterium prausnitzii* ; ces espèces sont fréquemment retrouvées dans la flore humaine et ont sans doute un rôle fonctionnel important [6, 25].

Franks *et al.* ont étudié, par hybridation *in situ* couplée à l'analyse d'image, la variation de la flore fécale dans le temps chez neuf volontaires sur soixante-dix-huit échantillons successifs. La variation du groupe *Bacteroides* est plus importante que celle du groupe *Clostridium coccoïdes*. Cependant, pour chaque volontaire, c'est le groupe *Bifidobacterium* qui est le plus variable [24]. D'autres auteurs ont étudié la variation dans le temps des *Bifidobacterium* chez cinq adultes ; cette population s'est montrée caractéristique de l'hôte et stable sur quatre semaines d'étude [29]. L'analyse par DGGE a montré que la population de *Lactobacillus* serait plus stable chez l'adulte que chez le nourrisson [30].

Enfin, quelques études ont porté sur la flore fécale de la personne âgée. Mitsuoka [31] a mis en évidence une augmentation des clostridies, des entérobactéries et des entérocoques. De même, plus récemment, une étude associant les méthodes d'étude moléculaire par Dot-blot et l'analyse des acides gras, a montré, chez le vieillard, une diminution de la flore anaérobie associée à une augmentation des entérobactéries [32]. D'autres travaux montrent que la diversité de la flore augmente avec l'âge et que l'utilisation de sondes usuelles ne détecte que 50 % de la flore chez le sujet âgé comparativement à une détection de 80 % chez l'adulte, suggérant que de nombreuses espèces ne sont pas encore identifiées [33].

Développement de la flore intestinale chez le nouveau-né

À la naissance, le tractus intestinal est stérile et ce n'est que quelques années plus tard que l'écosystème microbien digestif devient identique à celui de l'adulte.

Acquisition de la flore et cinétique d'implantation

La cinétique d'établissement de la flore à la naissance est relativement bien connue, mais c'est un phénomène qui reste complexe et loin d'être maîtrisé. *In utero*, dans des conditions normales, le tractus digestif est stérile. La colonisation commence après la rupture des membranes fœtales puis le nouveau-né se trouve brutalement plongé dans un univers bactérien riche et varié et va se coloniser rapidement avec une flore simple à partir des flores maternelles vaginales, intestinales et cutanées et des flores de l'environnement. Continuellement exposé à de nouvelles bactéries, sa flore va ensuite se diversifier. On considère qu'une flore identique à celle de l'adulte est atteinte vers l'âge de 2 ans [34].

Bien que l'enfant soit exposé à de nombreuses espèces bactériennes, toutes ne colonisent pas son tube digestif. En effet, des interactions bactérie-hôte et bactérie-bactérie interviennent dans l'établissement de la flore. Dans des conditions normales, les premières bactéries à s'implanter sont les bactéries aérobies-anaérobies facultatives (staphylocoques, entérocoques, entérobactéries). À ce stade, le potentiel d'oxydoréduction colique est élevé et ne permet pas le développement des bactéries anaérobies strictes. Ces bactéries aérobies-anaérobies facultatives dont le taux atteint rapidement 10^{10} à 10^{11} UFC/g de contenu colique consomment de l'oxygène, entraînant ainsi une diminution du potentiel redox, ce qui permet l'implantation, dès la première semaine de vie, des genres anaérobies stricts tels que *Bifidobacterium*, *Bacteroides* et *Clostridium*. Inversement, l'oxygène diminuant, le niveau d'implantation des genres aérobies régresse [34, 35].

Si le nouveau-né se colonise rapidement, toutes les bactéries qu'il rencontre ne s'implantent pas. La transmission des bactéries des flores vaginale et fécale de la mère a été clairement montrée et la flore fécale apparaît être le déterminant essentiel, les nouveau-nés étant colonisés plutôt par les entérobactéries et bifidobactéries d'origine fécale que par les lactobacilles d'origine vaginale [36]. À côté de cette origine maternelle, la transmission manuportée par le personnel hospitalier n'est pas négligeable, les conditions d'hygiène ayant une influence sur la colonisation digestive du nouveau-né.

Les facteurs bactériens permettant l'implantation d'une souche donnée restent peu connus. Une étude sur le suivi de l'implantation d'*Escherichia coli* a montré que certaines souches ont persisté dans la flore intestinale du nouveau-né pendant plusieurs mois, voire plus d'un an (souches résidentes), alors que d'autres ont disparu en quelques semaines (souches transitoires) [37]. Les souches résidentes avaient certaines caractéristiques comme des gènes codant pour des *fimbriae* ou des hémolysines, facteurs pouvant favoriser la colonisation.

L'impact sur la santé de l'enfant des différences d'implantation de sa flore est encore aussi peu connu. Certains genres bactériens, dont le genre *Bifidobacterium* dominant chez l'enfant né à terme et allaité, sont considérés comme bénéfiques. Par ailleurs, la flore digestive est reconnue depuis longtemps comme participant aux effets de barrière responsables de la résistance à la colonisation par des bactéries à potentialité pathogène [38] ainsi qu'à la maturation du système immunitaire intestinal [39].

Facteurs exogènes intervenant sur la colonisation

De nombreux facteurs sont connus pour modifier cette cinétique d'implantation, parmi lesquels le mode d'accouchement, l'âge gestationnel de naissance, le type d'alimentation, l'environnement, ainsi que l'antibiothérapie administrée à la mère en *per partum* et/ou à l'enfant après la naissance.

Influence du mode d'accouchement

Les premières bactéries que les enfants nés par césarienne rencontrent sont majoritairement celles de leur environnement : air et personnel soignant. Cela se traduit par une modification de la cinétique d'implantation. Les premières bactéries implantées sont toujours les espèces anaérobies facultatives (entérobactéries, entérocoques, staphylocoques). En revanche, la flore

anaérobie stricte s'implante beaucoup plus tardivement, ce retard portant principalement sur les genres *Bifidobacterium* et *Bacteroides* (bactéries d'origine entérique). Cependant, les bactéries anaérobies capables de sporuler et donc présentes dans l'environnement comme les *Clostridium* peuvent s'implanter rapidement [40]. Ce retard d'implantation peut persister plusieurs mois [41].

Influence du terme de naissance

Relativement peu d'études portent sur l'implantation de la flore digestive du prématuré, individu pourtant particulièrement à risque quant aux infections d'origine gastro-intestinale. Les faits notables de l'implantation de la microflore digestive chez ces nouveau-nés sont, d'une part, un retard de colonisation important par rapport aux enfants nés à terme et, d'autre part, une colonisation par un nombre plus réduit d'espèces bactériennes. Si la flore aérobie colonise assez rapidement le prématuré, l'implantation de la flore anaérobie, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, est très retardée, et ce d'autant plus que l'âge gestationnel est bas. Les bifidobactéries apparaissent à un âge moyen de 10 jours et ne deviennent dominantes que vers 2 à 3 semaines de vie [42]. Cette séquence d'implantation peut s'expliquer par le fait que ces enfants sont plus fréquemment nés par césarienne, se retrouvent séparés de leur mère, sont placés dans un environnement de soins intensifs très aseptisé et éventuellement soumis à une antibiothérapie à large spectre. Ainsi, la colonisation par la flore entérique d'origine maternelle est moins fréquente que par la flore de leur environnement

Influence de l'alimentation

Le mode d'alimentation du nouveau-né est le facteur le plus étudié. La microflore du nouveau-né allaité est moins diversifiée que celle du nouveau-né nourri au lait artificiel, l'allaitement favorisant l'implantation en flore dominante du genre *Bifidobacterium*. Parallèlement, l'implantation des entérobactéries, et surtout celle des *Clostridium* et des *Bacteroides* est retardée et/ou se fait à un niveau moins élevé [35, 43-45]. Dès qu'une alimentation mixte est introduite, la flore prend rapidement un profil de flore de nouveau-né nourri au lait artificiel. Cette différence de colonisation s'expliquerait par l'absence de pouvoir tampon du lait maternel, entraînant un pH colique faible (5 à 6) favorable à l'implantation des bifidobactéries et lactobacilles et défavorable aux autres genres bactériens. Certaines études montrent une implantation à haut niveau par les bifidobactéries chez les enfants nourris avec un lait adapté, mais les espèces dominantes les colonisant semblent être différentes. De nos jours, les différences entre les deux populations semblent s'atténuer, d'une part, par l'amélioration des formules de laits adaptés pouvant contenir des facteurs bifidogènes comme les oligosaccharides et, d'autre part, en raison des modifications des autres conditions d'implantation de flore observées [34].

Au moment du sevrage, les différences de flore s'atténuent entre les deux groupes qui hébergent une flore proche de la flore adulte vers l'âge de 2 ans [34].

Influence de l'antibiothérapie

Les effets de l'antibiothérapie vont être, soit une sélection de germes résistants à l'antibiotique, soit une modification de la flore de barrière,

diminuant ainsi la résistance à la colonisation par des bactéries pathogènes. La plupart des études n'analysant pas la totalité de la flore, entre autre la flore anaérobie, le rôle exact de l'antibiothérapie est difficile à évaluer. La majorité des études ont été effectuées dans des unités de soins intensifs, montrant qu'une antibiothérapie prolongée et à large spectre est un facteur de risque de colonisation par des entérobactéries résistantes [46]. D'autres études n'ont pas montré de relation aussi évidente entre antibiothérapie et sélection de bactéries résistantes, mais au cours d'épidémies à bactéries multi-résistantes, une politique de restriction des antibiotiques a souvent permis de stopper l'épidémie. La colonisation par des bactéries résistantes est également corrélée à la longueur de l'hospitalisation, au faible âge gestationnel et au faible poids de naissance [47, 48].

L'influence de l'antibiothérapie sur l'implantation globale de la flore n'a été que très peu étudiée. Goldman *et al.* [49] n'ont pas observé de modification de l'implantation de la flore chez le nouveau-né même avec une antibiothérapie de plus de trois jours, mais seule la flore aérobie a été étudiée. Dans l'étude de Bennet [50], 60 % à 80 % des enfants ayant reçu une antibiothérapie ont été colonisés par une flore anaérobie à un niveau n'excédant pas 10^6 bactéries/g fèces, alors que 100 % des enfants non traités ont été colonisés à un niveau de 10^7 /g.

Influence de l'environnement et des conditions d'hygiène

L'environnement peut influencer la colonisation intestinale. Ainsi, la flore intestinale des enfants nés dans les pays en développement diffère de celle des enfants nés dans des pays développés. D'autres études ont relevé des différences entre la flore intestinale des enfants nés en milieu rural et celle des enfants nés en milieu urbain, et entre celle des enfants nés à domicile et celle des enfants nés à l'hôpital [51, 52].

Depuis une dizaine d'années, les études montrent une évolution de l'implantation de la flore avec un retard d'implantation des bactéries de la flore normale. La colonisation bactérienne par les bactéries d'origine entérique (entérobactéries, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*) à une semaine de vie n'est plus une constante [42, 53]. Dans une étude comparant des nouveau-nés suédois et estoniens [53], nés à terme, par voie basse et allaités, seulement 50 % des nouveau-nés suédois étaient colonisés à un mois de vie par le genre *Bifidobacterium* à un taux médian de 10^3 /g de fèces. Ce retard serait expliqué par des conditions d'hygiène plus strictes entourant les accouchements en Suède, réduisant l'exposition de l'enfant à la flore microbienne de sa mère et favorisant l'acquisition de souches provenant de l'environnement. Ces modifications ont été également observées chez les nouveau-nés prématurés pour lesquels le retard d'implantation est aujourd'hui beaucoup plus important que celui décrit auparavant. Deux études récentes montrent que, à plus d'un mois de vie, leur colonisation digestive est limitée à deux à quatre espèces bactériennes avec un retard très important de colonisation par les bactéries d'origine entérique [54, 55]. Là encore, ce retard est très important pour la colonisation par le genre *Bifidobacterium* [54].

Cette modification de flore se traduit essentiellement par un retard d'implantation des bactéries d'origine entérique de la flore maternelle, dont le genre *Bifidobacterium*, au bénéfice des bactéries de l'environnement.

L'explication la plus probable est l'hygiène de plus en plus stricte entourant les accouchements avec l'utilisation large de l'antiseptique de la sphère vaginale, ainsi que l'usage plus large de l'antibioprophylaxie. Par exemple, une étude a montré que cette antibioprophylaxie modifiait l'implantation de la flore du nouveau-né en diminuant la colonisation par les genres sensibles à l'antibiotique : *Bifidobacterium* et *Clostridium* [56]. Cette modification de flore pourrait altérer l'effet barrière favorisant la colonisation par des germes résistants et, ainsi, être responsable de l'augmentation observée des infections néonatales à germes résistants à l'antibiotique administré en *per partum* [57]. Par ailleurs, les conséquences à long terme de ces modifications ne sont pas connues ; elles pourraient être un facteur clé dans l'augmentation des allergies dans nos pays, par une mauvaise orientation du système immunitaire intestinal [58].

Apport des méthodes moléculaires

Ces méthodes ont confirmé les données de l'implantation de la microflore. Ainsi, l'utilisation de méthodes d'hybridation *in situ* (FISH) utilisant des sondes ciblant des groupes bactériens variés a confirmé l'implantation dominante du genre *Bifidobacterium* chez des nouveau-nés allaités, contrairement au nouveau-nés nourris avec un lait adapté [59].

Elles ont permis de compléter les données, d'une part, sur les bactéries jusqu'alors difficilement ou non cultivables, d'autre part, sur la cinétique d'implantation de la flore. Ainsi, Harmsen *et al.* [60], après mise au point de sondes spécifiques respectivement du groupe *Coriobacterium* et du cluster *Atopobium*, ont étudié la flore fécale d'enfants en fonction de l'âge. Les enfants nourris au lait artificiel avaient un taux plus élevé de bactéries du groupe *Coriobacterium* que ceux nourris au sein et la diversité du cluster *Atopobium* augmentait avec l'âge.

L'analyse par DGGE a aussi été appliquée à l'étude de la flore intestinale de deux enfants de la naissance à dix mois de vie. Parallèlement, une banque d'ADNr 16S a été construite à partir des échantillons fécaux afin d'identifier les espèces dominantes [61]. Les résultats confirment en partie ceux obtenus précédemment par culture : pendant les premiers jours après la naissance, les profils de DGGE sont simples, reflétant une flore simplifiée, puis ils deviennent plus complexes au fur et à mesure que la flore s'installe. De même, un changement de profil est observé au moment du sevrage. Les bactéries identifiées alors par clonage et séquençage incluent des membres des genres *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium* et *Enterobacteriaceae*. Les espèces appartenant aux genres *Bifidobacterium* et *Ruminococcus* sont dominantes en nombre et dans le temps chez les deux enfants. En revanche, les *Bacteroides* n'ont pas été retrouvés en dominance dans cette étude. Cette même technique, appliquée à des nouveau-nés prématurés, a montré que, chez ces nouveau-nés hospitalisés, la diversité de la flore d'un enfant à un autre décroissait au cours de leur hospitalisation, montrant la prééminence de l'influence de l'environnement sur les autres facteurs sur l'implantation de leur flore, fait qui ne se retrouve pas chez les nouveau-nés à terme [62].

Points clés

- Chez l'homme, la flore intestinale renferme environ 10^{14} bactéries soit dix à vingt fois le nombre de cellules de l'organisme. La flore intestinale varie d'un site à l'autre du tube digestif et se densifie de l'intestin grêle au côlon, où des taux de bactéries de l'ordre de 10^9 à 10^{11} UFC/g de contenu sont retrouvés.
- La flore fécale est un reflet imparfait de la flore colique. Cette flore comprend : la flore autochtone dominante composée de bactéries anaérobies strictes ; la flore autochtone sous-dominante composée de bactéries aéro-anaérobies facultatives ; la flore allochtone de passage. Plus de 50 % de la flore dominante n'est pas cultivable.
- Chaque individu possède une microflore fécale caractéristique dont la composition est stable au cours du temps. En revanche, d'un individu à l'autre, la flore est très diverse. La biodiversité de la microflore digestive est beaucoup plus importante que ne le laissent présager les méthodes de culture. La diversité de la flore augmente avec l'âge.
- La colonisation du tube digestif commence dès la rupture des membranes fœtales. Le nouveau-né se colonise principalement à partir des flores maternelles (vaginale et fécale), avec une flore simple qui atteint en une dizaine de jours des niveaux de 10^{10} à 10^{11} UFC/g.
- Différents facteurs comme le mode d'accouchement, le type d'alimentation (allaitement ou lait artificiel) ou l'âge gestationnel de naissance modifient la cinétique d'implantation de la flore. L'hygiène de plus en plus stricte entourant les accouchements dans les pays industrialisés est responsable d'un retard de colonisation par les bactéries de la flore maternelle au profit des bactéries de l'environnement.

Références

1. Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 1984 ; 86 : 174-93.
2. Moore WE, Holdeman LV. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Environ Microbiol* 1974 ; 27 : 961-79.
3. Ducluzeau R, Raibaud P. Écologie microbienne du tube digestif. In : *Actualités scientifiques de l'INRA*. Paris : Masson, 1979.
4. Finegold SM, Sutter VL, Mathisen GE. Normal indigenous intestinal microflora. In : Hentges DJ, ed. *Human intestinal microflora in health and disease*. New-York : Academic Press, 1983 : 3-31.
5. Wilson KH, Blitchington RB. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 1996 ; 62 : 2273-8.
6. Suau A, Bonnet R, Sutren M, *et al.* Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 1999 ; 65 : 4799-807.
7. Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, Braesco V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone symposium « The intelligent intestine ». *Am J Clin Nutr* 2003 ; 78 : 675-83.
8. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003 ; 360 : 512-9.
9. Adlerberth I, Cerqueti M, Poilane I, Wold A, Collignon A. Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract. Part 1. Bacteria/Host interactions. *Microbial Ecol Health Dis* 2000 ; suppl 2 : 223-39.
10. Fons M, Gomez A, Karjalainen T. Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract. Part 2. Bacteria/Bacteria interactions. *Microbial Ecol Health Dis* 2000 ; suppl 2 : 240-6.
11. Thomas V, Rochet V, Boureau H, *et al.* Molecular characterization and spatial analysis of a simplified microbiota displaying colonization resistance against *Clostridium difficile*. *Microbial Ecol Health Dis* 2002 ; 14 : 203-10
12. Van de Merwe JP, Stegeman JH, Hazenberg MP. The resident faecal flora is determined by genetic characteristics of the host. Implications for Crohn's disease? *Antonie Van Leeuwenhoek* 1983 ; 49 : 119-24.
13. Hoeksma A, Winkler KC. The normal flora of the nose in twins. *Acta Leiden* 1963 ; 32 : 123-33.
14. Hoskins LC, Boulding ET. Degradation of blood group antigens in human colon ecosystems. II. A gene interaction in man that affects the fecal population density of certain enteric bacteria. *J Clin Invest* 1976 ; 57 : 74-82.
15. Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001 ; 292 : 1115-8.
16. Freitas M, Axelsson LG, Cayuela C, Midtvedt T, Trugnan G. Microbial-host interactions specifically control the glycosylation pattern in intestinal mouse mucosa. *Histochem Cell Biol* 2002 ; 118 : 149-61.
17. Pochard P, Léman F, Flourié B, Pellier P, Goderel I, Rambaud JC. Pyxigraphic sampling to enumerate methanogens and anaerobes in the right colon of healthy humans. *Gastroenterology* 1993 ; 108 : 1281-5
18. Paster BJ, Dewhirst FE, Olsen I, Fraser GJ. Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* spp. and related bacteria. *J Bacteriol* 1994 ; 176 : 725-32.
19. Collins MD, Lawson PA, Willems A, *et al.* The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* 1994 ; 44 : 812-26.
20. Vaughan EE, Schut F, Heilig H GHJ, Zoetendal EG, De Vos WM, Akkermans ADL. A molecular view of the intestinal ecosystem. *Curr Issues Intest Microbiol* 2000 ; 1 : 1-12.
21. Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochard P, Doré J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2000 ; 66 : 2263-6.
22. Rochet V, Rigottier-Gois L, Béguet F, Doré J. Composition of human intestinal flora analysed by fluorescent *in situ* hybridisation using group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Genet Sel Evol* 2001 ; 33 : S339-52.
23. Suau A, Rochet V, Sghir A, *et al.* *Fusobacterium prausnitzii* and related species. *Syst Appl Microbiol* 2001 ; 24 : 139-45.

24. Franks AH, Harmsen HJM, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 1998 ; 64 : 3336-45.
25. Zoetendal EG, Ben-Amor K, Harmsen HJM, Schut F, Akkermans ADL, De Vos WM. Quantification of uncultured *Ruminococcus obeum*-like bacteria in human fecal samples by fluorescent *in situ* hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes. *Appl Environ Microbiol* 2002 ; 68 : 4225-32.
26. Zoetendal EG, Akkermans ADL, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998 ; 64 : 3854-9.
27. Marteau P, Pochard P, Doré J, Béra-Maillet C, Bernalier A, Corthier G. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2001 ; 67 : 4939-42.
28. Zoetendal EG, Von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans ADL, De Vos WM. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol* 2002 ; 68 : 3401-7.
29. Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans ADL, Saarela M, De Vos WM. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2001 ; 67 : 504-13.
30. Heilig HG, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans ADL, De Vos WM. Molecular diversity of *Lactobacillus spp.* and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 2002 ; 68 : 114-23.
31. Mitsuoka T. Intestinal flora and aging. *Nutr Rev* 1992 ; 50 : 438-46.
32. Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance and community cellular fatty acid profiles. *Gut* 2001 ; 48 : 198-205.
33. Saunier K, Doré J. Gastrointestinal tract and the elderly: functional foods, gut microflora and healthy ageing. *Dig Liver Dis* 2002 ; 34 Suppl 2 : S19-24.
34. Mackie R, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999 ; 69 : 1035S-45S.
35. Heavey PM, Rowland IR. The gut microflora of the developing infant: microbiology and metabolism. *Microbial Ecol Health Dis* 1999 ; 11 : 75-83.
36. Tannock GW, Fuller R, Smith SL, Hall MA. Plasmid profiling of members of the family Enterobacteriaceae, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *J Clin Microbiol* 1990 ; 28 : 1225-8.
37. Nowrouzian F, Hesselmar B, Saalman R, *et al.* *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatr Res* 2003 ; 54 : 8-14.
38. Ducluzeau R. L'établissement de la flore du tractus gastro-intestinal chez le nouveau-né humain. *Rech Gynecol* 1990 ; 2 : 71-5.
39. Moreau MC, Gaboriau-Routhiau V. Influence of resident intestinal microflora on the development and functions of the Gut-Associated Lymphoid Tissue. *Microbiol Ecol Health Dis* 2001 ; 13 : 65-86.
40. Bezirtzoglou E, Romond C. Occurrence of *Bifidobacterium* in the feces of newborns delivered by cesarean section. *Biol Neonate* 1990 ; 58 : 247-51.
41. Grönlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999 ; 28 : 19-25.
42. Sakata H, Yoshioka H, Fujita K. Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *Eur J Pediatr* 1985 ; 144 : 186-90.
43. Ducluzeau R. Installation, équilibre et rôle de la flore microbienne chez le nouveau-né. *Ann Pédiatr* 1993 ; 40 : 13-22.
44. Hudault S. Microbial colonization of the intestine of the newborn. In : Bindels JG, Goedhart AC, Visser HKA, eds. *Recent developments in infant nutrition*. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 1996 : 307-17.
45. Gothefors L. Effects of diet on intestinal flora. *Acta Poediatr Scand* 1989 ; Suppl 351 : 118-21.

46. de Man P, Verhoeven BA, Verbrugh HA, Vos MC, van den Anker JN. An antibiotic policy to prevent emergence of resistant bacilli. *Lancet* 2000 ; 355 : 973-8.
47. Toltzis P, Dul MJ, Huyen C, *et al.* Molecular epidemiology of antibiotic-resistant gram-negative bacilli in a neonatal intensive care unit during a nonoutbreak period. *Pediatrics* 2001 ; 108 : 1143-8.
48. Almuneef MA, Baltimore RS, Farrel PA, Reagan-Cirincione P, Dembry LM. Molecular typing demonstrating transmission of gram-negative rods in a neonatal intensive care unit in the absence of a recognized epidemic. *Clin Infect Dis* 2001 ; 32 : 220-7.
49. Goldmann DA, Leclair J, Macone A. Bacterial colonization of neonates admitted to an intensive care environment. *J Pediatr* 1978 ; 93 : 288-93.
50. Bennet R, Eriksson M, Nord CE, Zetterstrom R. Fecal bacterial microflora of newborn infants during intensive care management and treatment with five antibiotic regimens. *Pediatr Infect Dis* 1986 ; 5 : 533-9.
51. Adlerberth I, Carlsson B, de Man P, *et al.* Intestinal colonization with *enterobacteriaceae* in Pakistani and Swedish hospital-delivered infants. *Acta Paediat Scand* 1991 ; 80 : 602-10.
52. Simhon A, Douglas JR, Drasar BS, Soothill JF. Effect of feeding on infants' faecal flora. *Arch Dis Child* 1982 ; 57 : 54-8.
53. Sepp E, Naaber P, Voor T, Mikelsaar M, Björkstén B. Development of intestinal microflora during the first month of life in Estonian and Swedish infants. *Microbiol Ecol Health Dis* 2000 ; 12 : 22-6.
54. Butel MJ. La flore du prématuré. In : Dupont C, Gauthier F, Goulet O, Moktari M, Vodovar M, eds. 16^e séminaire Guigoz, Deauville 14-16 octobre 2001. Noisiel : Guigoz Editions, Groupe d'Études en Néonatalogie - Ile de France, 2001 : 111-42.
55. Gewolb IH, Schwalbe RS, Taciak VL, Harrison TS, Panigrahi P. Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 1999 ; 80 : F167-73.
56. Jaureguy F, Doucet-Populaire F, Panel P, Butel MJ, Ghnassia JC. *Conséquences de l'antibioprophylaxie per partum à l'amoxicilline sur la flore intestinale du nouveau-né.* 20^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 7-8 décembre 2000.
57. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, *et al.* Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med* 2002 ; 347 : 240-7.
58. Björkstén B. Allergy priming early in life. *Lancet* 1999 ; 353 : 167-8.
59. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, *et al.* Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000 ; 30 : 61-7.
60. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Grijpstra J, Knol J, Degener JE, Welling GW. Development of 16s rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human feces from volunteers of different age groups. *Appl Environ Microbiol* 2000 ; 66 : 4523-7.
61. Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans ADL. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* 2002 ; 68 : 219-26.
62. Schwiertz A, Gruhl B, Lobnitz M, Michel P, Radke M, Blaut M. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res* 2003 ; 54 : 393-9.



Facteurs de contrôle de la flore. Définitions et mode d'action des probiotiques et prébiotiques

**Philippe
Marteau**

Service
de Gastro-entérologie,
Hôpital Européen
Georges Pompidou,
et Université Paris-V,
Paris, France.

La flore intestinale exerce de nombreuses fonctions physiologiques, notamment la fermentation et l'effet « de barrière » (terme désignant la capacité physiologique de la flore endogène à s'opposer à la colonisation de l'intestin par des micro-organismes pathogènes). Ces fonctions sont souvent bénéfiques pour l'hôte, mais parfois néfastes : ainsi, un rôle délétère de la flore (qu'on dit alors déséquilibrée) est-il suspecté dans la pathogénie d'affections intestinales aiguës ou chroniques telles que des diarrhées, le syndrome de l'intestin irritable, la maladie de Crohn et les cancers coliques. Contrôler la flore devient alors un objectif.

Les écologistes du tube digestif humain ont, ces quinze dernières années, énormément appris à partir d'observations faites sur d'autres écosystèmes comme ceux des fonds marins, des ensilages, du sol ou du tractus digestif d'autres animaux (rumen notamment). Pour comprendre et tenter d'influencer l'équilibre d'un écosystème, la vision de l'écologiste ne doit pas se restreindre à celle des seuls êtres vivants (éléments biotiques) mais doit aussi embrasser celle de leur milieu (éléments abiotiques). Dans l'intestin, les principaux facteurs écologiques abiotiques sont le pH, le degré d'anaérobiose, les acides biliaires, les enzymes pancréatiques, la disponibilité de substrats endogènes ou exogènes d'origine alimentaire, les sites d'adhérence potentiels des micro-organismes à l'épithélium ou au mucus et la « vitesse du courant » (le transit intestinal). Ces facteurs n'étant stables ni le long du tube digestif ni dans le temps, chaque partie du tube digestif doit être analysée comme un écosystème original. Par exemple, le côlon droit, qui reçoit plus de substrats et bactéries alimentaires que le côlon gauche, est plus acide, contient des quantités plus importantes d'acides gras à courte chaîne... et il n'est donc pas surprenant que sa flore diffère de celle du côlon gauche [1].

L'idée de modifier l'écosystème colique à des fins médicales, notamment préventives, est ancienne. L'équilibre de l'écosystème intestinal peut être influencé en agissant primitivement, soit sur ses éléments biotiques, soit sur des facteurs abiotiques (Figure 1). La modulation des facteurs biotiques peut se faire en ajoutant de nouveaux micro-organismes (probiotiques, voir plus loin) ou en retirant (par l'utilisation d'antibiotiques) ; elle peut aussi se faire en changeant l'apport de facteurs nutritionnels aux micro-organismes endogènes (fibres alimentaires, amidons résistants ou prébiotiques, voir plus loin). Si la pratique large systématique de lavements et purges n'est plus répandue en Europe ou en Amérique du Nord, elle l'est encore dans de nombreux pays du tiers-monde. Dès leur apparition, les antibiotiques ont été largement employés pour traiter des maladies infectieuses intestinales, mais



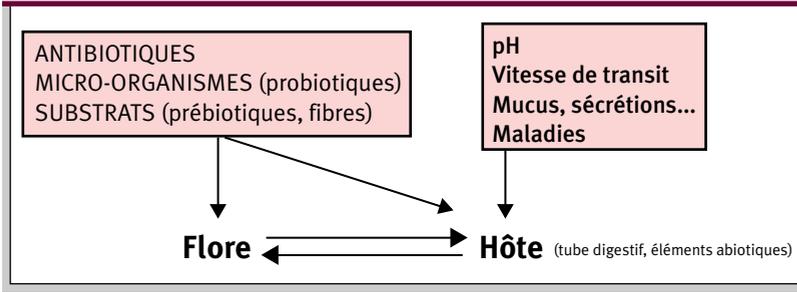


Figure 1.
Modulation de l'écologie intestinale

aussi pour influencer sur la flore autochtone et diminuer le risque de maladies [2]. Chez l'animal d'élevage, l'antibiothérapie systématique a ainsi diminué la mortalité des animaux au moment du sevrage et favorisé leur croissance... L'envers de cette médaille a néanmoins été la diffusion de résistances aux antibiotiques et cette pratique est désormais rejetée du fait de ce risque écologique [2]. Si on excepte les traitements curatifs des infections intestinales, les indications des antibiotiques pour moduler la flore intestinale chez l'homme sont de nos jours assez restreintes (Tableau I).

- Prévention de la diarrhée du voyageur chez les sujets à risque
- Prophylaxie de l'infection du liquide d'ascite en cas de cirrhose grave avec facteurs de risque
- Décontamination intestinale chez les sujets aplasiques ou immunodéprimés dans la phase initiale après greffe de moelle
- Décontamination avant certaines interventions sur le tube digestif
- Antibio prophylaxie de gestes endoscopiques du tube digestif chez des sujets à risque
- Maladie de Crohn

Tableau I.
Utilisations de l'antibiothérapie pour moduler la flore intestinale chez l'homme en dehors du traitement d'infections intestinales déclarées ou du syndrome de l'anse stagnante

L'idée d'administrer des micro-organismes originaux afin de moduler la flore endogène est aussi ancienne. Elie Metchnikoff (Figure 2), qui obtint le prix Nobel en 1908 pour ses travaux sur la phagocytose, avait publié une thèse sur l'influence supposée des bactéries lactiques de l'ancêtre du yaourt sur la flore intestinale et la longévité des Bulgares [3].



Figure 2.
Elie Metchnikoff

Le concept de probiotique était né et de nombreux médicaments ont été développés dans les années 1950-1960. Quelques années plus tard néanmoins, l'absence de données rigoureuses sur l'efficacité clinique de beaucoup d'entre eux conduisait à leur disparition progressive, à l'exception de quelques-uns dont les propriétés furent confirmées. Les scientifiques dénonçaient aussi des insuffisances parfois majeures dans la qualité microbiologique ou la

stabilité de certains produits alimentaires, et certains doutaient même de la possibilité d'effets en raison de la probabilité (non étudiée jusque-là) que ces micro-organismes et leurs principes actifs soient détruits dès leur passage dans l'estomac. Au même moment, s'accumulaient les résultats d'études témoignant de la stabilité de la flore fécale chez un individu donné et de l'impossibilité apparente de modifier cet équilibre par l'alimentation ou l'administration de micro-organismes. Ces résultats conduisaient à l'élaboration du concept « d'effet de barrière » proposé en France par Raibaud et Ducluzeau et de « colonisation résistance » proposé simultanément au Pays-Bas par van der Waaij. La recherche d'alternatives à l'antibiothérapie dans l'élevage animal et l'amélioration des connaissances sur les relations mutuelles entre la flore intestinale et l'hôte qui l'héberge ont relancé l'intérêt porté aux probiotiques. Le concept de prébiotiques, plus récent, exploite l'idée de moduler la flore en lui apportant de nouveaux substrats nutritionnels capables de stimuler sélectivement des bactéries endogènes jugées bénéfiques.

Le but de ce chapitre est de décrire les facteurs de contrôle de la flore digestive, ce qu'on sait ou ne sait pas (encore) de leurs modes d'action et de leurs effets indésirables éventuels. Les applications thérapeutiques, désormais pour certaines démontrées dans des essais randomisés contrôlés menés en double aveugle (et avec donc un haut niveau de preuve), sont traitées dans le chapitre « Probiotiques et affections digestives ». Les données pharmacologiques et cliniques concernant *Saccharomyces boulardii* sont détaillées dans le chapitre « Exemple d'un médicament probiotique : *Saccharomyces boulardii* lyophilisé ».

Facteurs abiotiques de contrôle de la flore

Acidité, sécrétions biliopancréatiques et intestinales, mucus, défensines

La sécrétion acide gastrique constitue un facteur de défense majeur contre la colonisation du tube digestif d'aval par des pathogènes [4]. Le risque d'infections intestinales est, modérément mais significativement, augmenté en cas d'achlorhydrie ou de traitements antisécrétoires, car le nombre de bactéries nécessaires pour déclencher une infection est alors aussi réduit [5]. Le fait que le risque ne soit que discret en clinique usuelle témoigne de la présence d'autres facteurs antimicrobiens dans le tractus digestif et du rôle de la motricité. La résistance à l'acide diffère fortement entre micro-organismes et certains (parmi lesquels les probiotiques sont sélectionnés) survivent totalement ou partiellement à leur passage dans l'estomac [4]. Les acides biliaires ont aussi des propriétés antimicrobiennes importantes, exercées sur les membranes bactériennes [6]. Des variations assez faibles de ces acides dans l'intestin influencent, par exemple, significativement la survie de lactobacilles ou bifidobactéries ingérés [6]. Des résultats expérimentaux suggèrent que le suc pancréatique puisse aussi exercer un effet antimicrobien [7]. Les conséquences cliniques de cette observation sont néanmoins encore incertaines.

L'influence d'autres sécrétions digestives, comme celle du mucus ou des défensines, n'est que partiellement connue. Le mucus forme une barrière physique entre la lumière et les cellules épithéliales de l'estomac, de l'intestin grêle et du côlon. Ce gel translucide de 50 à 450 μM d'épaisseur, adhérent à la muqueuse et filant, est formé de polymères de mucoglycoprotéines sécrétés par les cellules caliciformes de l'épithélium [8]. Sa composition et ses propriétés varient d'un site à l'autre du tube digestif et sont sous la dépendance de neuf gènes au moins (gènes $\text{MUC}_{1,2,3,4,5\text{AC},5\text{B},6,7,8}$). MUC_2 est la mucine prédominante du côlon et MUC_5 et MUC_6 celles de l'estomac. La sécrétion de mucus est diminuée par le jeûne et l'alimentation parentérale totale [7, 8]. La flore peut en modifier la composition et les propriétés, non seulement en le dégradant partiellement, ce qui est établi depuis longtemps, mais aussi, découverte récente et passionnante, en influant sur sa synthèse (cette constatation a été le premier exemple de l'existence d'un *cross-talk*-échange d'informations entre la flore et la muqueuse) [9]. Le mucus, non seulement forme une barrière physique à la surface de l'épithélium, mais aussi concentre dans son réseau de mailles de nombreuses substances antimicrobiennes comme les immunoglobulines A (IgA) sécrétoires, la lactoferrine, la lactoperoxydase et le lysozyme. Il a aussi la capacité de fixer divers micro-organismes grâce à certains de ses sucres qui miment des récepteurs bactériens. Les défensines sont des peptides antimicrobiens sécrétés dans les cryptes intestinales par les cellules de Paneth qui en colonisent la partie basale. Ils agissent par destruction de la membrane bactérienne et sont actifs notamment contre *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* et *Candida albicans* [10]. Leur action éventuelle sur la flore saprophyte n'est pas connue.

Système immunitaire

Le rôle du système immunitaire intestinal dans le contrôle de la flore intestinale pathogène est étayé par la constatation de perturbations de cette dernière au cours de déficits immunitaires. Ainsi, au cours des déficits sélectifs en IgA ou des hypogammaglobulinémies communes variables, on observe un risque accru d'infections intestinales récurrentes, particulièrement la giardiase (parasitose aussi dénommée lambliaise). En fonction de la profondeur du déficit immunitaire au cours du syndrome d'immunodéficience acquise (sida) non traité, on observe un risque accru des colites bactériennes (*Campylobacter jejuni* et *coli*, Salmonelles, *Clostridium difficile*), puis (déficit plus sévère) d'infections à cytomégalovirus, à divers protozoaires, à mycobactéries ou à champignons. Les riches interactions entre flore résidente et immunité intestinale et systémique sont décrites dans les chapitres « Influence de la microflore intestinale sur l'immunité de l'hôte ».

Motricité intestinale et potentiel redox

Les différences de motricité de l'intestin grêle et du côlon expliquent la localisation essentiellement colique de la flore intestinale (voir le chapitre « Flore et motricité coliques. Données physiologiques et au cours du syndrome de l'intestin irritable »). En particulier, les complexes moteurs migrants interdigestifs jouent dans le grêle le rôle d'*housekeeper* [11] et expliquent la pauvreté de la flore dans cet organe, à l'exception de l'iléon terminal [12]. Tout facteur de stase dans l'intestin grêle entraîne une riche

colonisation bactérienne par une flore intermédiaire entre celle de l'oropharynx et celle du côlon [12].

Enfin, le potentiel d'oxydo-réduction très bas régnant dans le côlon explique la dominance de la flore anaérobie à son niveau.

Facteurs alimentaires

L'écosystème du côlon distal de l'homme et la flore fécale sont longtemps apparus comme très stables dans les conditions physiologiques et apparemment indépendants de fluctuations alimentaires (*voir le chapitre « Établissement et composition de la flore microbienne intestinale »*). Les éléments de stabilité sont la température stable et l'anaérobiose stricte ainsi que la grande biodiversité de la flore endogène et les fortes concentrations des micro-organismes qui la composent, mais aussi le peu de substrats exogènes disponibles (résidus alimentaires non fermentés dans le côlon proximal) au regard des substrats endogènes beaucoup plus constants dans le temps. Il est difficile de faire parvenir des substrats alimentaires fermentescibles dans le côlon distal, car beaucoup d'hydrates de carbones non digestibles sont, soit, à faibles doses, fermentés en amont (dans le côlon droit), soit, à fortes doses, responsables jusque dans le côlon distal d'un effet osmotique, c'est-à-dire d'un risque de diarrhée [13].

Vers les années 1980, de multiples travaux ont montré que, si l'équilibre de la flore fécale semblait inchangé par l'alimentation, certaines activités enzymatiques de la flore fécale telles que la β -glucuronidase ou la 7α -deshydroxylase pouvaient être significativement influencées, ce qui reflète sans doute l'activité de la flore du côlon droit [1].

L'écosystème du côlon proximal (côlon droit) a été nettement moins étudié chez l'homme du fait de son accessibilité difficile ; il se distingue de l'écosystème distal car il reçoit encore de l'oxygène et surtout des quantités de substrats exogènes variés beaucoup plus importantes. Des travaux ont ainsi montré son originalité et son instabilité d'un jour à l'autre [1].

Purges, clystères et antibiotiques

L'idée de « désintoxiquer » l'organisme par l'administration intrarectale directe de substances variées allant de l'eau (« hydrothérapie », « irrigations rectales », « jardinage intestinal », etc.) à d'autres agents liquides, solides, voire gazeux, remonte à la nuit des temps et faisait l'objet de représentations artistiques sur des poteries mayas [14] et des fresques égyptiennes. Les partisans de telles pratiques ont naturellement pris en compte dans leurs théories l'existence d'une flore intestinale quand cette dernière a été découverte. Mais leur capacité à modifier la flore ne dépasse pas (au vu des informations que nous avons pu obtenir, notamment sur internet) celui des hypothèses. De même, la réduction de la flore fécale lors de la préparation colique au polyéthylène-glycol est transitoire, comme en atteste le test respiratoire à l'hydrogène utilisant le lactulose comme substrat.

De nombreux antibiotiques parviennent au niveau du côlon, directement et/ou après cycle entéro-hépatique, où ils influencent la flore. Cette influence

dépend du spectre antibactérien et de la pharmacocinétique de l'antibiotique (qui conditionne les concentrations obtenues dans le côlon). Des effets indésirables peuvent en résulter, notamment une diminution de la capacité de fermentation (responsable d'un risque accru de diarrhée), une diminution de l'effet de barrière (responsable d'un risque accru d'émergence de pathogènes, au premier rang desquels *Clostridium difficile*), mais aussi l'apparition puis la dissémination d'une résistance aux antibiotiques (voir le chapitre « Flore et diarrhées : diarrhées associées aux antibiotiques »). Plusieurs antibiotiques et notamment ceux utilisés à doses assez faibles ont démontré une capacité à diminuer la mortalité de divers animaux d'élevage et à en améliorer la croissance (c'est-à-dire le « rendement zootechnologique ») au prix de risques écologiques qui les ont fait condamner [2]. Chez l'homme, l'utilisation d'antibiotiques visant à moduler la flore endogène est essentiellement destinée à réduire le risque d'infections à point de départ intestinal chez des sujets « à risque » (Tableau I). Les quinolones sont les plus utilisées dans la prévention de la diarrhée du voyageur et la prophylaxie de l'infection du liquide d'ascite en cas de cirrhose avec facteurs de risque. L'antibioprophylaxie de gestes endoscopiques du tube digestif chez des sujets à risque et celle réalisée au cours de certaines interventions sur le tube digestif utilise en général la céfazoline [15]. Le métronidazole est recommandé au cours des gestes médicaux proctologiques.

Probiotiques

Définitions

La définition du terme probiotique a évolué avec le temps et la réflexion des chercheurs, des industriels et des spécialistes de la communication au grand public. Lilly et Stillwell furent apparemment les premiers, en 1965, à utiliser le terme pour désigner des « facteurs promoteurs de croissance produits par des micro-organismes » [16]. Parker, en 1974 [17], proposa d'élargir la définition à des « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore ». Cependant, en 1991, Fuller reprocha à la définition de Parker d'être trop large et d'inclure potentiellement les antibiotiques et proposa alors : « des micro-organismes ajoutés à l'alimentation et influençant de manière bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale » [18]. Trois éléments ont depuis contribué à modifier encore la définition. Le premier était que certains micro-organismes pouvaient avoir des effets sur l'hôte sans nécessairement modifier sa flore (effets directs enzymatiques ou par une immunomodulation). Les termes de « micro-organismes en transit » [19] et « d'agents biothérapeutiques » [20] ont été alors proposés et apparaissaient plus « factuels » puisqu'ils ne préjugeaient pas du mécanisme d'action. Le second élément était l'intérêt de certains industriels à ne pas labelliser « probiotique » des micro-organismes « génériques », tout particulièrement ceux du yaourt standard, pour réserver ce label à des produits d'apparence et goûts voisins, mais contenant des micro-organismes dont la valeur ajoutée justifiait un coût supérieur. Le troisième élément était le désir de certains chercheurs et de nombreux industriels d'exclure de la définition les micro-organismes tués. En effet, si certains micro-organismes morts

(notamment tués par la chaleur) peuvent exercer certains effets bénéfiques pour l'hôte, des travaux ont montré que ces effets étaient souvent moins marqués que ceux des micro-organismes ingérés vivants. La *Food and Agriculture Organization* des Nations-Unies et l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) ont établi, en 2001, des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotique » dans les aliments [21] et formulé la définition : « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte ».

Composition

Les probiotiques sont le plus souvent des bactéries ou des levures vivantes, bien que quelques parasites aient été étudiés chez l'animal. Ils sont présents dans certains aliments, notamment les produits laitiers fermentés, qu'ils participent à leur fabrication ou leur aient été ajoutés, dans des compléments alimentaires ou encore dans des médicaments et volontiers alors sous une forme lyophilisée (Tableau II).

<p style="color: #e91e63; margin: 0;">Tableau II.</p> <p style="margin: 0;"><i>Exemples de souches probiotiques disponibles, sous forme de compléments alimentaires ou de médicaments</i></p>	<p>Bactéries lactiques et bifidobactéries</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Bifidobacterium</td> <td style="width: 50%;">Bifidobacterium lactis Bb12</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Bifidobacterium animalis DN 114</td> </tr> <tr> <td>O10</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Lactobacillus</td> <td>Lactobacillus rhamnosus souche GG</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Lactobacillus johnsonii bati</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Lactobacillus casei DN 114 001</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Lactobacillus casei shirota ACC118</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Lactobacillus salivarius UCC118</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Lactobacillus reuteri</td> </tr> <tr> <td>Enterococcus</td> <td>Enterococcus faecium SF 568</td> </tr> <tr> <td>Escherichia coli</td> <td>Escherichia coli Nissle 1917</td> </tr> </table>	Bifidobacterium	Bifidobacterium lactis Bb12		Bifidobacterium animalis DN 114	O10		Lactobacillus	Lactobacillus rhamnosus souche GG		Lactobacillus johnsonii bati		Lactobacillus casei DN 114 001		Lactobacillus casei shirota ACC118		Lactobacillus salivarius UCC118		Lactobacillus reuteri	Enterococcus	Enterococcus faecium SF 568	Escherichia coli	Escherichia coli Nissle 1917
Bifidobacterium	Bifidobacterium lactis Bb12																						
	Bifidobacterium animalis DN 114																						
O10																							
Lactobacillus	Lactobacillus rhamnosus souche GG																						
	Lactobacillus johnsonii bati																						
	Lactobacillus casei DN 114 001																						
	Lactobacillus casei shirota ACC118																						
	Lactobacillus salivarius UCC118																						
	Lactobacillus reuteri																						
Enterococcus	Enterococcus faecium SF 568																						
Escherichia coli	Escherichia coli Nissle 1917																						

La réglementation applicable à chacune de ces présentations est très différente, notamment en ce qui concerne l'étiquetage et le niveau de preuve à apporter pour autoriser certaines allégations. Le nombre de micro-organismes vivants présents dans chaque produit est souvent supérieur à 10⁷/g. La qualité microbiologique de chaque produit est une caractéristique indispensable. Plusieurs travaux récents (troisième millénaire) ont encore dénoncé la qualité microbiologique insuffisante et l'étiquetage impropre de plusieurs produits commerciaux, mais ces reproches ne s'appliquent pas, heureusement, à de nombreux produits dont la qualité est régulièrement vérifiée [22], ni bien sûr, aux médicaments.

Pharmacocinétique

Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de véhiculer des principes actifs (enzymes, composants de paroi, peptides ou nucléotides immunomodulateurs, protéines antibactériennes, etc.) jusqu'à leurs cibles d'action dans le tractus digestif. La plupart des études de pharmacocinétique ont décrit le devenir des probiotiques eux-mêmes, c'est-à-dire leur survie dans

le tractus intestinal. En effet, les principes actifs sont encore rarement connus (*voir plus loin*), à l'exception de la lactase contenue dans les bactéries du yaourt [23, 24].

Survie des probiotiques

La majorité des études *in vivo* ont étudié la survie des probiotiques dans les selles [24]. Les chercheurs intéressés par les effets des probiotiques dans l'intestin grêle ont également, grâce à une intubation, étudié la pharmacocinétique de probiotiques au niveau du duodénum et de l'iléon terminal. La survie du probiotique est comparée à celle d'un marqueur inerte ingéré en même temps que lui. Les spores de *Bacillus stearothermophilus* sont souvent utilisées comme marqueurs de transit parce qu'elles ne se multiplient pas et ne sont pas détruites dans le tractus gastro-intestinal [24]. Après leur ingestion, elles sont éliminées dans les selles suivant une courbe exponentielle et deviennent indétectables en cinq à neuf jours. La sensibilité des méthodes bactériologiques pour détecter, identifier un probiotique au sein de l'écosystème endogène est aussi un point critique dans les études de survie. Le recours à des traits spécifiques est souvent nécessaire. Le mode d'expression des résultats est aussi un point important. Le critère habituel est la concentration du probiotique ou de ses principes actifs au niveau de la cible supposée de l'effet. Il est souvent considéré, mais rarement observé, que les concentrations de probiotiques doivent être au-dessus de 10^5 unités formant colonie (UFC)/mL dans l'intestin grêle et de 10^7 UFC/g dans les selles. De telles concentrations dans l'intestin grêle ont été proposées, car ce sont celles que l'on observe chez les patients présentant une colonisation chronique pathologique de l'intestin grêle avec expression clinique [12, 19]. Les concentrations dans les selles qui ont été proposées sont celles des bactéries de la flore dominante. L'expression des résultats de survie en pourcentage de l'ingesta est souvent utilisée car elle permet la comparaison de différents probiotiques.

L'adhérence à la paroi colique (mucus, épithélium) des probiotiques a été bien étudiée par cultures de biopsies et techniques ultrastructurales. Certaines bactéries pourraient y survivre bien au-delà de leur disparition des selles.

Survie de probiotiques ingérés dans le tube digestif et colonisation

La survie de micro-organismes ingérés diffère entre genres microbiens, espèces et même souches (*in vivo* [24]). Certains micro-organismes sont détruits dès leur passage dans l'estomac alors que d'autres ont une haute capacité de survie jusque dans les selles. Les bactéries du yaourt, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, ont une résistance faible à l'acide et sont rapidement détruites, en quelques minutes, à des pH proches de 1. Pochart *et al.* ont observé que les concentrations duodénales de bactéries viables du yaourt chez des sujets sains ayant ingéré 430 g de yaourt contenant 10^7 UFC/mL étaient d'environ 10^5 UFC/mL au moment du pic du passage [25]. Certains auteurs ont observé la survie de quelques bactéries du yaourt jusqu'à la fin de l'iléon terminal chez une partie des volontaires étudiés. *Lactococcus lactis* a aussi une survie faible dans l'intestin, du fait de sa sensibilité à l'acide et à la bile. Cette sensibilité a été mise à profit pour l'utiliser comme vecteur d'activité dans l'intestin grêle [26].

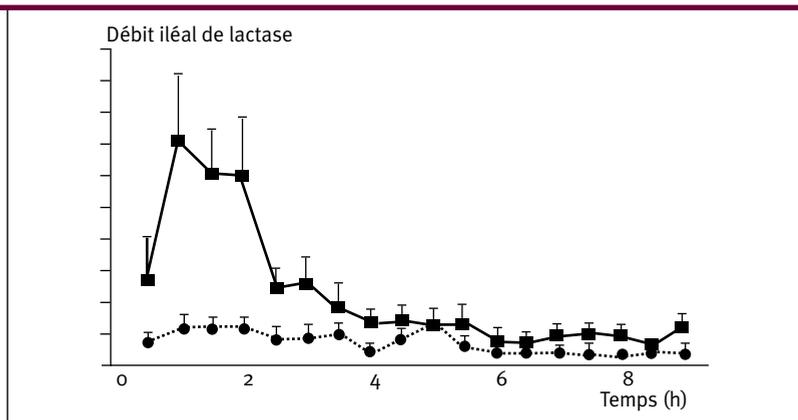
Certaines bifidobactéries, ingérées dans des produits laitiers fermentés, ainsi que *Lactobacillus plantarum* NCIB 8826 ont une survie très importante dans les selles, avec des concentrations fécales observées supérieures à 10^8 UFC/g [24]. Des survies significatives, bien que plus faibles et donnant des concentrations de 10^6 UFC/g, ont été observées avec des *Lactobacillus acidophilus*, *reuteri* et *rhamnosus*, particulièrement la souche GG [24]. Chez l'homme, après administration orale de 1 g/jour de *Saccharomyces boulardii* lyophilisé, un état d'équilibre d'élimination fécale s'établit autour de 10^7 à 10^8 cellules vivantes par jour, soit 10^5 à 10^6 cellules par gramme de selles [27].

Les probiotiques sont habituellement excrétés en quelques jours après leur ingestion dans les selles, de manière parallèle, voire plus rapide, que celle d'un marqueur du transit, ce qui témoigne de l'absence habituelle de colonisation durable. Cependant, certains auteurs ont observé la persistance prolongée, chez quelques sujets, de souches probiotiques dans les selles ou surtout sur la muqueuse intestinale [28]. Johanson *et al.* ont fait ingérer à des sujets volontaires sains une soupe contenant dix-neuf différents lactobacilles et observé que, onze jours après l'arrêt de la consommation de ce produit, deux souches de *Lactobacillus plantarum* (Lp299 et Lp299v) étaient toujours présentes sur des biopsies prélevées au niveau du jéjunum ou du rectum [29]. Alander *et al.* ont montré, chez des sujets sains ingérant un produit laitier fermenté contenant *Lactobacillus rhamnosus* GG, la possibilité de retrouver cette souche sur des biopsies coliques réalisées douze jours plus tard [30].

Peu de travaux sont à ce jour disponibles sur la pharmacocinétique de principes actifs véhiculés par les probiotiques [24]. La pharmacocinétique de la lactase contenue par les bactéries du yaourt a été étudiée chez des sujets déficients en lactase grâce à la méthode de perfusion intestinale [23]. Comme le montre la **Figure 3**, l'ingestion de yaourt augmentait l'activité lactase dans l'intestin pendant plus de 2 heures. Environ 1/5^e de la lactase présente dans le yaourt au moment de l'ingestion, était récupéré dans l'iléon terminal et la quantité de lactose qui restait non digérée après ingestion de yaourt était significativement plus faible qu'après ingestion du yaourt pasteurisé.

Figure 3.

Débit iléal de lactase à la fin de l'intestin grêle chez huit sujets ayant ingéré du yaourt (carrés) ou du yaourt pasteurisé sans lactase (ronds)



Modes d'action démontrés ou supposés des probiotiques

S'ils ont en commun d'être des micro-organismes non pathogènes, les probiotiques diffèrent considérablement les uns des autres. La diversité des situations cliniques dans lesquelles une efficacité a été montrée est elle aussi très importante. Cela suggère qu'un mécanisme d'action unique est improbable et que, au contraire, de multiples modes d'action sont impliqués. Les probiotiques peuvent exercer des effets directs sur le chyme, la flore, ou la muqueuse intestinale (entérocytes ou cellules immunocompétentes.) Ils peuvent aussi avoir des effets indirects liés aux modifications de l'écosystème microbien (Figure 4).

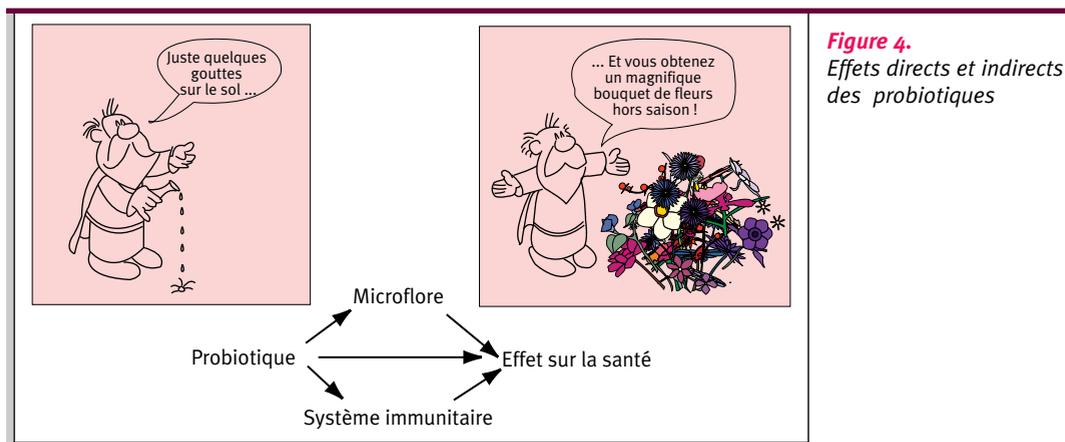


Figure 4.
Effets directs et indirects des probiotiques

Effets directs

Les effets directs des probiotiques dans la lumière ou sur la paroi intestinale sont les plus faciles à étudier et prédire. Comme mentionné plus haut, la lactase des bactéries du yaourt participe à la digestion du lactose dans l'intestin et cela explique l'excellente digestion du lactose du yaourt chez les sujets déficients en lactase [23]. Dans le même ordre d'idées, un travail a montré que l'ingestion de *Saccharomyces cerevisiae* (qui contient une saccharase) aidait à la digestion du saccharose chez des enfants déficients en saccharase [31]. Des bactéries sensibles à la bile ont été utilisées afin de délivrer leur contenu enzymatique dans le duodénum [24]. Drouault *et al.* ont ainsi montré que des lactocoques génétiquement modifiés pour contenir de fortes quantités de lipase intra-cellulaire (par l'insertion du gène de la lipase de *Staphylococcus hiicus*) aidaient à la digestion des lipides sur un modèle d'insuffisance pancréatique obtenu chez le porc par ligature du canal pancréatique [26]. Sidhu *et al.* [32] ont montré que le gavage de rats par *Oxalobacter formigenes* (une bactérie capable de dégrader l'oxalate) diminuait l'excrétion urinaire d'oxalate et il s'en est suivi des essais de prévention de la lithiase rénale oxalique chez l'homme. Des bactéries lactiques, génétiquement modifiées pour renfermer des épitopes vaccinaux afin de libérer ceux-ci dans l'intestin, font l'objet de travaux. Steidler *et al.*

[33] ont construit un lactocoque génétiquement modifié capable de sécréter de l'interleukine 10 (IL-10). Cette cytokine a des propriétés anti-inflammatoires dans l'intestin et suscite un intérêt thérapeutique dans certaines affections telles que la maladie de Crohn. Les auteurs ont montré que l'administration orale de *Lactococcus lactis* génétiquement modifié pour sécréter de l'IL-10, améliorait des colites expérimentales induites chez l'animal par le dextran-sulfate ou l'inactivation du gène de l'IL-10. Une étude clinique chez l'homme est en cours aux Pays-Bas (utilisant une souche génétiquement modifiée et construite avec des systèmes de confinement évitant sa dissémination dans l'environnement grâce à l'addition notamment de gènes suicide). D'autres probiotiques porteurs d'autres activités thérapeutiques sont actuellement testés sur des modèles de maladies inflammatoires de l'intestin, tels que des lactocoques et *Lactobacillus plantarum* génétiquement modifiés pour produire de la super-oxyde dysmutase ou des peptides en feuille de trèfle.

Plusieurs probiotiques, et particulièrement *Saccharomyces boulardii*, ont des effets directs sur la muqueuse du grêle, sa trophicité et son capital enzymatique [34, 35]. L'un des (ou le) principes actifs semble être à ce niveau les polyamines contenues dans cette levure (voir le chapitre « Exemple d'un médicament probiotique : *Saccharomyces boulardii* lyophilisé »).

Effets indirects

Les effets de probiotiques sur la composition de la flore colique sont paradoxalement assez mal connus, si l'on excepte la survie du probiotique lui-même. Il a été montré que l'ingestion de certaines souches de lactobacilles ou de bifidobactéries pouvait modifier de manière reproductible certaines activités enzymatiques bactériennes fécales, telles que la β -glucuronidase, l'azoréductase ou la nitroréductase [4]. Les tentatives de modulation de la production d'acides gras à courte chaîne ou du pH intracolique par des probiotiques sont, en revanche, restées jusqu'ici infructueuses, mais les études ont porté sur des selles et non sur le contenu du côlon droit, accessible chez l'homme par intubation ou pixigraphie.

De nombreuses études réalisées chez l'animal ont montré que l'administration orale de divers probiotiques pouvait moduler la barrière immunitaire muqueuse et/ou systémique ([36], voir le chapitre « Influence de la microflore intestinale sur l'immunité de l'hôte : conditions physiologiques »). Les travaux pionniers ont montré que l'ingestion de très fortes quantités de bactéries du yaourt augmentait la capacité des lymphocytes du sang circulant à sécréter diverses cytokines, notamment l'interféron γ . Les conséquences cliniques de cet effet biologique sont douteuses et les tentatives de démonstration d'une diminution d'infections ou d'une augmentation de l'efficacité de vaccins oraux sous l'effet du yaourt ont en fait jusqu'ici échoué. Un travail a montré que la souche de *Lactobacillus rhamnosus* GG, administrée à des enfants atteints de gastro-entérite à rotavirus, augmentait les cellules circulantes capables de sécréter des immunoglobulines [37]. Au moment de la convalescence, 90 % des nourrissons du groupe recevant le probiotique contre seulement 46 % des enfants recevant le placebo avaient développé une réponse anticorps spécifique IgA contre les rotavirus. Les mêmes auteurs ont rapporté que l'immunogénicité d'un vaccin oral anti-rotavirus pouvait être très discrètement augmentée par l'administration simultanée de *Lactobacillus rhamnosus* GG [38]. Cet effet n'est pas observé

avec une souche de *Lactobacillus reuteri*, ce qui ne l'empêche pas de raccourcir lui aussi significativement la diarrhée infantile à rotavirus. L'administration orale de *Lactobacillus johnsonii* souche LA1 a augmenté la réponse anticorps lors d'une vaccination orale par *Salmonella typhi* Ty 21a chez l'homme [39]. Ce même probiotique était également responsable d'une stimulation du pouvoir phagocytaire des granulocytes sanguins et, dans deux travaux indépendants, d'une augmentation discrète des IgA plasmatiques [39]. Plusieurs équipes travaillent sur l'utilisation de probiotiques génétiquement modifiés, permettant de les utiliser comme vecteurs chargés d'antigènes aux propriétés adjuvantes et aux propriétés immunogènes intrinsèques faibles.

Les principes actifs des probiotiques et détails moléculaires des interactions hôte-flore sont encore mal connus. Les signaux microbiens identifiés jusqu'ici incluent des peptides formylés, des lipo-polysaccharides, des peptidoglycane composants de la paroi cellulaire et des nucléotides (*in* [24]). L'hôte distingue les signaux émis par les micro-organismes grâce à des récepteurs dits *Toll-like* récepteurs (TLR) présents sur les cellules épithéliales intestinales et sur les cellules présentatrices d'antigènes périphériques [40]. Les cellules utilisent plusieurs TLR pour détecter simultanément différents signaux d'un même micro-organisme. TLR 2 reconnaît les lipoprotéines et peptidoglycane et déclenche la réponse vis-à-vis de bactéries Gram positives et des levures. TLR 4 médie la réponse aux lipopolysaccharides des bactéries Gram négatives, mais est peu exprimé dans le côlon. TLR 1 et TLR 6 participent à l'activation des macrophages par les bactéries Gram positives alors que TLR 5 et TLR 9 reconnaissent respectivement la flagelline et de l'ADN CpG (*cytosine phosphoryl guanine*) bactérien [41]. L'ADN bactérien et des oligo-nucléotides contenant des CpG non méthylés stimulent les lymphocytes alors que l'ADN eucaryote et les oligo-nucléotides méthylés ne le font pas [41-43]. La stimulation des cellules dendritiques par l'ADN CpG est associée à la production de cytokines de type Th1. Rachmilevitz *et al.* ont montré récemment que l'administration d'ADN CpG bactérien avait une efficacité thérapeutique sur des modèles de colite expérimentale [42, 43]. Ils ont montré que les effets bénéfiques d'un mélange probiotique VSL#3 sur ce modèle étaient dus à de l'ADN non méthylé, alors que l'ADN méthylé du probiotique et des ADN contrôles de thymus de veau étaient inefficaces. Des études réalisées *in vitro* ont montré que la réponse des cellules immunocompétentes à différents micro-organismes pathogènes ou probiotiques n'était pas la même et que divers probiotiques étaient capables d'inhiber la production de TNF α sur des biopsies *ex vivo* provenant de muqueuse de sujets atteints de maladie de Crohn [44, 45]. Les probiotiques pourraient également influencer le développement des cellules T régulatrices, ce qui permettrait d'expliquer leur efficacité clinique apparente dans des maladies immunologiques impliquant la réponse immunologique TH2 et TH1 et d'espérer leur bénéfice dans le cadre de l'atopie.

Effets indésirables observés ou théoriques des probiotiques

La sécurité d'emploi des probiotiques développés jusqu'ici est excellente [24]. Cependant, quatre types d'effets indésirables potentiels méritent d'être envisagés : infections, activités métaboliques délétères, immunomodulation excessive et transfert de gène.

Infections

Les probiotiques ne sont pas sélectionnés parmi des pathogènes, aussi le risque d'infection est-il particulièrement bas. De rares cas d'infections locales ou systémiques incluant des septicémies ou des endocardites, dues à des lactobacilles, des bifidobactéries ou d'autres bactéries lactiques, ont été rapportés. *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* sont plus souvent impliqués et suscitent une attention très particulière du fait de l'émergence de souches résistantes à la vancomycine. Dans la plupart des cas, il était difficile de faire la part d'une infection d'origine endogène. Cependant, dans quelques cas, la responsabilité du probiotique lui-même a été incriminée. Ainsi, une trentaine de cas de fongémie ont été rapportés chez des malades traités par *Saccharomyces boulardii* [46-48] et deux cas d'infection ont été imputés à *Lactobacillus rhamnosus* [49, 50]. Le nombre des fongémies survenues au cours d'un traitement par *Saccharomyces boulardii* doit être rapporté à sa large utilisation dans le monde, notamment en milieu hospitalier, et à son statut de médicament qui s'accompagne d'une utilisation chez des patients souvent fragilisés et présentant un large éventail de facteurs de risque. Tous les sujets qui avaient une fongémie à *Saccharomyces boulardii* étaient porteurs d'un cathéter veineux central [46]. Une colonisation manuportée des cathéters, à la suite de l'ouverture de sachets de probiotiques, a été mise en évidence. Un autre mécanisme aurait pu être la translocation de la levure ; cependant, cela n'a pas été observé, y compris chez des patients porteurs d'ulcérations intestinales recevant la levure dans des essais cliniques.

Le risque des probiotiques chez les patients immunodéprimés est mal établi. Au contraire, *Saccharomyces boulardii* a démontré un effet protecteur contre des pathogènes intestinaux chez des souris immunodéprimées [51]. Il est, en revanche, probable que des infections à *Lactobacillus rhamnosus* aient été la conséquence d'une translocation. La translocation est définie comme le passage de micro-organismes ou de leurs produits, endotoxines et exotoxines, à partir du tractus gastro-intestinal jusqu'à des sites extra-intestinaux comme les ganglions mésentériques, le foie, la rate ou le sang. Les bactéries endogènes transloquent de manière continue en très faible quantité, y compris chez des sujets immunocompétents, mais ces bactéries sont très rapidement détruites dans les organes lymphoïdes. La translocation bactérienne peut résulter d'une pullulation microbienne intestinale, d'une perméabilité muqueuse accrue ou d'un déficit immunitaire. Une femme de 74 ans, porteuse d'un diabète non insulino-dépendant et consommant régulièrement le probiotique *Lactobacillus rhamnosus* GG a souffert d'un abcès du foie à lactobacilles impossible à distinguer de la souche du probiotique [49]. L'autre cas d'infection probablement dû à *Lactobacillus rhamnosus* ingéré sous forme de probiotique a été observé chez un homme de 67 ans porteur d'une insuffisance mitrale minime et qui avait pour habitude de mâcher un mélange de probiotiques contenant *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* et *Streptococcus faecalis* [50]. Quelques jours après une extraction dentaire associée à une antibiothérapie par amoxicilline, survenait une endocardite à *Lactobacillus rhamnosus*. Le lactobacille isolé à partir du sang était en tout point similaire à l'un des micro-organismes présents dans la préparation probiotique. Cependant, des infections à lactobacilles endogènes sans rapport avec le probiotique sont aussi possibles et un cas a notamment

été publié d'infection à *Lactobacillus rhamnosus* chez un sujet atteint de rectocolite hémorragique [52]. Saxelin *et al.* ont étudié la prévalence des bactériémies liées à des lactobacilles en Finlande du Sud pendant deux périodes consécutives de quatre et six ans et comparé les caractéristiques des hémocultures positives (vingt sur les dix ans) aux souches de probiotiques des produits laitiers du commerce. En aucun cas n'existait de similarité entre les souches infectieuses et les souches de probiotiques [53].

Pour résumer, le risque d'infection est très bas et il n'y a pas d'évidence que les probiotiques posent un risque d'infection plus important que les souches commensales. Pratiquement, toutes les infections ont été observées chez des sujets ayant des conditions prédisposantes, tout particulièrement des anomalies valvulaires en cas d'endocardite ou la présence de cathéters pour ce qui est des septicémies. Les données sont encore insuffisantes sur les risques ou bénéfiques des probiotiques en cas de déficit immunitaire.

Effets indésirables métaboliques

S'il on admet que les probiotiques peuvent véhiculer ou promouvoir des activités bénéfiques dans le tractus gastro-intestinal, ils pourraient aussi avoir des effets négatifs sur la santé par le même mécanisme [24]. Les concentrations de micro-organismes transitant dans l'intestin grêle après l'ingestion de probiotiques sont souvent du même ordre de grandeur que ce qui est observé au cours de la colonisation bactérienne chronique du grêle. Une étude a attiré l'attention sur un risque potentiel d'une déconjugaison excessive ou d'une déshydroxylation des acides biliaires dans l'intestin grêle par des probiotiques [54]. En effet, elle montrait, chez des sujets porteurs d'une iléostomie qui ingéraient *Lactobacillus acidophilus* et un *Bifidobacterium*, que ces deux micro-organismes transformaient significativement les acides biliaires primaires dans l'intestin grêle en acides biliaires secondaires libres. Une dégradation excessive du mucus intestinal pourrait également être un effet indésirable de certains probiotiques. Ruseler van Embden a étudié les effets de trois souches probiotiques *in vitro* et *in vivo* chez des rats gnotobiotiques. Dans ce travail, les trois souches de *Lactobacillus acidophilus*, *bifidobacterium* et *Lactobacillus rhamnosus* ne dégradaient pas le mucus [55].

Effets indésirables immunologiques

L'administration parentérale de composants de parois bactériennes tels les peptidoglycanes peut induire de la fièvre, des arthrites et des maladies auto-immunes [24]. Ces effets sont médiés par les cytokines et il est désormais bien établi que la sécrétion de cytokines est induite par de nombreux probiotiques. L'administration orale de fortes doses de probiotiques n'a pas induit d'effets indésirables immunologiques chez la souris, mais un passage systémique accru de polymères de parois bactériennes a été observé chez le rat porteur de lésions coliques ou en cas de colonisation bactérienne chronique de l'intestin grêle. À notre connaissance, un seul effet immunologique indésirable a été observé chez l'homme sous la forme d'une observation anecdotique et non détaillée d'hépatite auto-immune qui aurait été aggravée par l'ingestion de très fortes quantités de yaourt. La modulation potentielle de maladies auto-immunes par ingestion de probiotiques suscite des travaux plus approfondis.

Transfert de gènes

Certains gènes microbiens, tout particulièrement des gènes de résistance aux antibiotiques codés par des plasmides, peuvent être transférés entre micro-organismes. La probabilité de transfert de gènes dépend de la nature du matériel génétique à transférer (plasmide, transposons, etc.), de la nature des souches donneuses et receveuses, de leurs concentrations respectives et de la pression de sélection dans le milieu (tout particulièrement la présence d'antibiotiques) favorisant la pousse des transconjugants. La résistance des probiotiques aux antibiotiques n'est pas en elle-même un risque, sauf si elle rend le probiotique intraitable en cas d'infection systémique par celui-ci ou si elle peut être transmise à des pathogènes. Les infections causées par des entérocoques résistants à la vancomycine posent un problème clinique grave. En conséquence, la sécurité de souches d'*Enterococcus faecium* utilisées comme probiotiques doit faire l'objet de travaux extrêmement attentifs.

Prébiotiques et symbiotiques

Définitions, composition

Les prébiotiques ont été définis comme des « ingrédients alimentaires non digestibles qui stimulent de manière sélective, au niveau du côlon, la multiplication ou l'activité d'un ou d'un nombre limité de groupes bactériens susceptibles d'améliorer la physiologie de l'hôte » [56-58]. À ce jour, les groupes bactériens concernés sont essentiellement les bifidobactéries (on parle alors d'effet bifidogène) et les autres bactéries lactiques. Le niveau de preuve que ces groupes soient des indicateurs d'une flore bénéfique est discutable, car il repose essentiellement sur l'opinion d'experts. Leurs arguments sont que les bifidobactéries sont dominantes dans la flore du nourrisson nourri au sein, qu'elles sont moins nombreuses chez les sujets âgés et que des études randomisées contrôlées utilisant des bifidobactéries ou des lactobacilles comme probiotiques ont rapporté des effets bénéfiques pour la santé [56-61]. Les prébiotiques les plus connus et déjà utilisés sont les fructanes – fructo-oligosaccharides (FOS), oligofructose, inuline – et d'autres oligosides de galactose et transgalactose (GOS et TOS). De nombreux autres glucides pourraient revendiquer l'appellation de prébiotiques (xylo-oligosaccharides, isomalto-oligosaccharides, gluco-oligosaccharides, etc.). Des sucres alcools pourraient aussi avoir des propriétés prébiotiques. Le lactulose est également un prébiotique, et même le lactose chez les sujets déficients en lactase (soit plus de 50 % des adultes en France) [60]. Certains prébiotiques sont naturellement présents dans des aliments et d'autres ajoutés dans des aliments à visée fonctionnelle ou dans des suppléments alimentaires [59].

Les symbiotiques se définissent comme l'association d'un probiotique et d'un prébiotique dont l'ingestion concomitante pourrait favoriser la multiplication du premier dans le tractus digestif (par exemple, une association de bifidobactéries ou de lactobacilles et de fructo-oligosaccharides) [57]. La démonstration d'un effet synergique des pré- et probiotiques n'est pas requise par la définition et, de fait, manque en général à ce jour. La consommation simultanée d'inuline et de bifidobactéries n'augmente pas l'excrétion fécale de bifidobactéries constatée avec l'ingestion de bifidobactéries seules [62].

Modes d'action démontrés ou supposés des prébiotiques

La plupart des prébiotiques augmentent les concentrations fécales des bifidobactéries [56-61]. Des études dose-réponse ont suggéré que l'obtention d'un effet « bifidogène » nécessitait une dose minimale de 5 g/jour de fructo-oligosaccharides et que cet effet était d'autant plus net que les concentrations fécales de bifidobactéries étaient initialement basses chez le sujet étudié [60]. Mais les changements écologiques qu'induisent les prébiotiques sont larges et ne se cantonnent pas à un effet de stimulation de tel ou tel groupe de bactéries qui les métabolisent. La diminution importante du pH intracolique, due à la stimulation des bactéries lactiques, a un effet négatif sur d'autres groupes bactériens tels les *Bacteroides*. L'acidification du pH est aussi responsable d'une inhibition de certaines activités enzymatiques telles que la 7- α -deshydroxylase. Les AGCC ont de nombreux effets physiologiques au niveau colique (tout particulièrement pour le butyrate) et dans l'organisme (propionate et acétate). Les principaux effets sont résumés sur la Figure 5. Le profil de fermentation variant en fonction du substrat, certains prébiotiques tels les FOS et certains amidons résistants, semblent plus « butyrogènes » que d'autres.

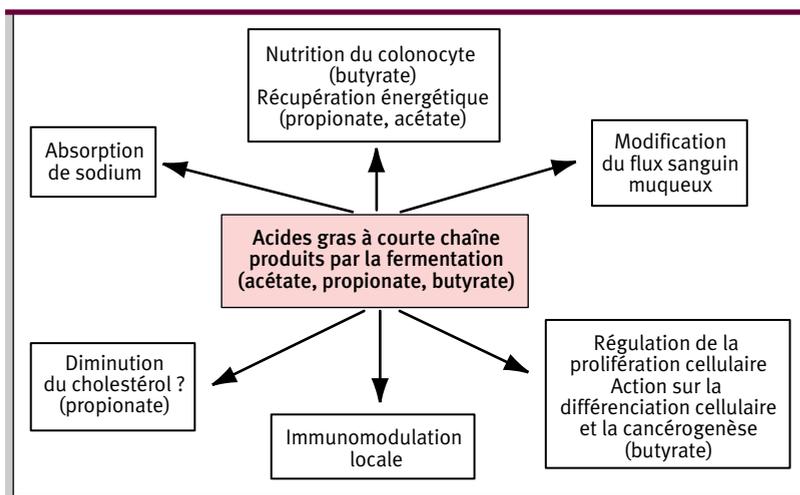


Figure 5.
Effets physiologiques des acides gras à courte chaîne produits lors de la fermentation colique

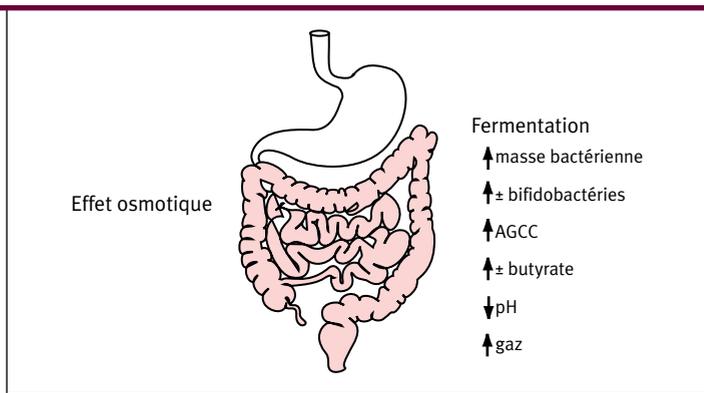
Effets cliniques

Les prébiotiques font l'objet de travaux cliniques dans divers domaines incluant la constipation, divers autres troubles digestifs fonctionnels, l'encéphalopathie hépatique et la prévention du cancer colorectal [62, 63]. Le niveau de preuve pour une efficacité clinique est satisfaisant pour le lactulose et le lactitol dans le traitement de la constipation et celui de l'encéphalopathie hépatique et progresse au rythme des études dans les autres thèmes. Les effets métaboliques des prébiotiques ouvrent aussi des voies de recherche dans les domaines de l'augmentation de l'absorption du calcium dans le grêle ou le côlon (d'où le maintien du capital osseux) et de la diminution de l'hypercholestérolémie, mais le niveau de preuve est encore à ce jour assez bas faute d'études randomisées contrôlées [64, 65].

Effets indésirables observés ou théoriques des prébiotiques

Les prébiotiques sont habituellement bien tolérés mais peuvent aussi avoir des effets indésirables. Ceux-ci sont liés à la dose et consistent essentiellement en un excès de gaz rectaux et de borborygmes, des douleurs abdominales et de la diarrhée. Les symptômes d'intolérance peuvent être dus à l'effet osmotique ou à la fermentation et prendre leur origine dans l'intestin grêle ou dans le côlon (Figure 6).

Figure 6.
Prébiotiques : physiopathologie des effets indésirables



Tant qu'ils n'ont pas été métabolisés, les prébiotiques exercent un effet osmotique dans la lumière intestinale, négativement corrélé à leur poids moléculaire. Cet effet augmente le débit d'eau dans l'intestin et peut induire des borborygmes, des douleurs abdominales et éventuellement une diarrhée si la capacité de réabsorption colique de l'eau et des électrolytes est dépassée [13].

La fermentation produit des gaz qui peuvent eux aussi induire borborygmes, douleurs abdominales et émissions excessives de gaz rectaux. En revanche, elle diminue et peut même supprimer la diarrhée par baisse de l'effet osmotique. Le rôle protecteur de la flore colique pour réduire la sévérité de la diarrhée induite par les probiotiques a été démontré dans des études comparant le débit fécal en réponse à une dose de sucres indigestes fermentescibles, au débit fécal observé en réponse à des substances osmotiques non fermentescibles comme le polyéthylène-glycol ou le sulfate de magnésie. Hammer *et al.* [13] ont ainsi comparé la diarrhée résultant de doses iso-osmolaires croissantes de polyéthylène-glycol et de lactulose. Le lactulose induisait moins de diarrhée que le polyéthylène-glycol pour les doses inférieures à 45 g/jour. Saunders et Wiggins [13] ont montré que, alors que l'augmentation de doses de sulfate de magnésie augmentait le débit fécal dès les petites doses, cela n'était pas observé avec le lactulose ou d'autres sucres indigestes (mannitol, raffinose) et que la diarrhée ne se manifestait que lorsque le sucre apparaissait dans les selles, fait traduisant la saturation des capacités de fermentation colique pour des doses atteignant jusqu'à 40 à 80 g de prébiotiques. Dans une autre étude [13], le lactulose à forte dose induisait une diarrhée d'intensité variable d'un sujet à l'autre. Ainsi, après ingestion de 80 g de lactulose, quatre sujets sur douze avaient un volume de selles excédant un litre par jour, alors que quatre autres avaient un poids de selles

inférieur à 280 g/jour. Il est probable que les variations entre individus sont liées à des différences de capacité à fermenter les hydrates de carbone puisque, quand des échantillons fécaux provenant de différents sujets sont incubés avec le même sucre, la production de gaz peut varier d'un facteur 10 [66].

Le risque d'intolérance et la sévérité des symptômes, chez un individu donné et dans une population, apparaissent plus ou moins dose-dépendants [13]. Un seuil est trouvé dans tous les cas en ce qui concerne la diarrhée, mais pas toujours pour ce qui est des borborygmes et des excès de gaz rectaux dans la mesure où ces symptômes sont fréquents dans la population témoin (Figure 7).

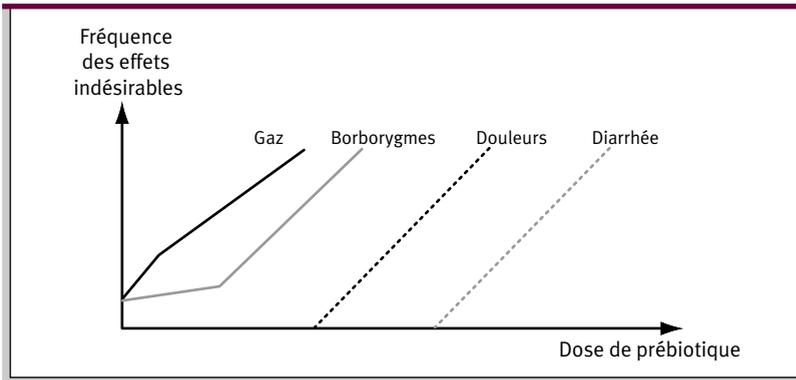


Figure 7.

Effets indésirables des prébiotiques.

L'intolérance dépend :

- de la dose,
- du mode de consommation
- du sujet (trouble fonctionnel intestinal...)
- de l'adaptation de la flore ?

L'existence d'un syndrome de l'intestin irritable augmente le risque d'intolérance aux prébiotiques [13, 67-69]. De plus, le mode de consommation de sucres peut influencer leur absorption intestinale et donc moduler leur arrivée dans le côlon et leur effet diarrhéogène. Par exemple, l'absorption du lactose chez le sujet hypolactasique est augmentée quand ce sucre est consommé sous forme de lait entier par comparaison avec une consommation sous forme de lait écrémé, les graisses ralentissant la vidange gastrique. L'absorption est également accrue si le lactose est ingéré en même temps que des fibres, un repas, du cacao ou du loperamide qui ralentissent la motricité gastrique et/ou intestinale (*in* [13]).

Enfin, une consommation régulière de certains prébiotiques comme le lactose ou le lactulose induit des changements de l'activité métabolique de la flore intestinale (adaptation bactérienne), qui augmente sa capacité à fermenter le sucre indigeste et diminue l'excrétion d'hydrogène [70, 71]. On peut en espérer un moindre effet diarrhéogène et moins de flatulences quand les sucres indigestes sont consommés régulièrement (adaptation clinique). Cela a été confirmé dans certains travaux réalisés chez des sujets volontaires sains, ingérant régulièrement une faible dose de lactulose [72]. Cependant, Briet *et al.* [73] ont rapporté que les symptômes et le seuil laxatif étaient similaires pour une prise occasionnelle ou régulière de fructo-oligosaccharides. Enfin, un travail récent a montré que la consommation de

6,6 g de fructo-oligosaccharides trois fois par jour augmentait les relaxations transitoires du sphincter inférieur de l'œsophage et le reflux gastro-œsophagien chez des sujets souffrant de cette affection [74].

Conclusion

Les connaissances acquises depuis une vingtaine d'années sur la pharmacocinétique, le spectre clinique et parfois le mécanisme d'action des probiotiques, font que le scepticisme qui les entourait dans les milieux scientifiques a disparu et a fait place à un véritable engouement.

De leur côté, les prébiotiques ont été beaucoup moins étudiés, et la stimulation plus ou moins ciblée d'espèces bactériennes coliques endogènes a pour rançon les effets secondaires liés à leur fermentation et à leur pouvoir osmotique.

Points clés

- Chez un individu donné, la flore colique gauche est très stable, alors que celle du côlon droit, qui reçoit beaucoup plus de substrats, s'est révélée plus variable dans le temps.
- Les facteurs abiotiques de contrôle de la flore intestinale sont le pH, le potentiel redox, les sels biliaires et, peut-être, les enzymes pancréatiques, le mucus, les défensines, le tissu immunitaire associé aux muqueuses et la motricité conditionnant la vitesse de transit.
- L'usage des antibiotiques pour influencer la flore intestinale n'a que de rares indications en pathologie non infectieuse humaine.
- Les probiotiques transitent vivants dans le tube digestif sans le coloniser. Ils peuvent exercer des effets directs dans sa lumière, comme l'apport d'enzymes digestives. Des études sont en cours évaluant la possibilité de délivrer des épitopes vaccinaux ou des substances anti-inflammatoires après manipulation génétique. Les probiotiques modulent le système immunitaire muqueux et systémique et les propriétés des cellules épithéliales par l'intermédiaire des récepteurs toll-like. Leur influence sur la flore intestinale endogène est mal connue mais ils peuvent interférer avec la production d'enzymes activant les procarcinogènes.
- Les prébiotiques peuvent stimuler plus ou moins sélectivement des éléments de la flore colique, comme les bifidobactéries. Leur action est liée à la dose, mais de trop fortes doses entraînent une diarrhée osmotique.

Références

1. Marteau P, Pochart P, Doré J, *et al.* Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2001 ; 67 : 4939-42.
2. Chaslus-Dancla E. Les antibiotiques en élevage : état des lieux et problèmes posés <http://www.tours.inra.fr/tours/pap/articles/antibio.htm>.
3. Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora and gastrointestinal function. In : Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. New York : Raven Press, 1987 : 1729-47.
4. Cook GC. Hypochlorhydria and vulnerability to intestinal infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994 ; 6 : 693-5.
5. Marteau P, Minekus M, Havenaar R, *et al.* Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J Dairy Sci* 1997 ; 80 : 1031-7.
6. Drouault S, Corthier G, Ehrlich SD, *et al.* Survival, physiology, and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. *Appl Environ Microbiol* 1999 ; 65 : 4881-6.
7. Pasquier MC, Vatie J. Mucus gastro-intestinal : une barrière protectrice complexe. Première partie. Structure et propriétés physicochimiques. *Gastroenterol Clin Biol* 1990 ; 14 : 352-8.
8. Khan J, Iiboshi Y, Cui L, *et al.* Alanyl-glutamine-supplemented parenteral nutrition increases luminal mucus gel and decreases permeability in the rat small intestine. *J Parenter Enteral Nutr* 1999 ; 23 : 24-31.
9. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, *et al.* Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001 ; 291 : 881-4.
10. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003 ; 3 : 710-20.
11. Coffin B. Troubles moteurs intestinaux. In : Rambaud JC, ed. *Traité de gastro-entérologie*. Paris : Flammarion, 2000 : 483-93.
12. Flourié B. Colonisation bactérienne chronique du grêle. In : Rambaud JC, ed. *Traité de Gastro-entérologie*. Paris : Flammarion, 2000 : 459-66.
13. Marteau P, Flourié B. Tolerance to low-digestible carbohydrates: symptomatology and methods. *Br J Nutr* 2001 ; 85, Suppl 1 : S17-21.
14. de Smet PA, Hellmuth NM. A multidisciplinary approach to ritual enema scenes on ancient Maya pottery. *J Ethnopharmacol* 1986 ; 16 : 213-62.
15. Greff M. Recommandations de la Société Française d'Endoscopie Digestive : prophylaxie antibiotique en endoscopie digestive. *Endoscopy* 1998 ; 30 : 873-5.
16. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 1965 ; 147 : 747-8.
17. Parker RB. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health* 1974 ; 29 : 4-8.
18. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* 1991 ; 32 : 439-42.
19. Marteau P. *Survie et effets de micro-organismes alimentaires non pathogènes dans le tube digestif de l'homme*. Thèse de Doctorat de l'Université Paris Sud, 1994.
20. Elmer GW, Surawicz CM, McFarland LV. Biotherapeutic agents: a neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *JAMA* 1996 ; 275 : 870-6.
21. FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Argentina, October 2001. <http://www.fao.org/es/esn/Probio/report.pdf>
22. Fasoli S, Marzotto M, Rizzotti L, *et al.* Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *Int J Food Microbiol* 2003 ; 82 : 59-70.
23. Marteau P, Flourié B, Pochart P, *et al.* Role of the microbial lactase (EC 3.2.123) activity from yogurt on the intestinal absorption of lactose: an *in vivo* study in lactase deficient humans. *Br J Nutr* 1990 ; 64 : 71-9.
24. Marteau P, Shanahan F. Basic aspects and pharmacology of probiotics – an overview on pharmacokinetics, mechanisms of action and side effects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003 ; 17 (5) : 725-40.
25. Pochart P, Dewit O, Desjeux JF, *et al.* Viable starter culture, β -galactosidase activity and lactose in duodenum after yogurt ingestion in lactase-deficient humans. *Am J Clin Nutr* 1989 ; 49 : 828-31.

26. Drouault S, Juste C, Marteau P, *et al.* Oral treatment with *Lactococcus lactis* expressing *Staphylococcus hyicus* lipase enhances lipid digestion in pigs with induced pancreatic insufficiency. *Appl Environment Microbiol* 2002 ; 68 : 3166-8.
27. Blehaut H, Massot J, Elmer G, *et al.* Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat. *Biopharm Drug Dispos* 1989 ; 10 : 353-64.
28. Goldin BR, Gorbach S, Saxelin M, *et al.* Survival of *Lactobacillus species* (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 1992 ; 37 : 121-8.
29. Johansson M., Molin G, Jeppsson B, *et al.* Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: *in vivo* colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Appl Environment Microbiol* 1993 ; 59 : 15-20.
30. Alander M, Satokari R, Korpela R, *et al.* Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl Environment Microbiol* 1999 ; 65 : 351-4.
31. Harms HK, Bertele-Harms RM, Bruer-Kleis D. Enzyme substitution therapy with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in congenital sucrase-isomaltase deficiency. *N Engl J Med* 1987 ; 316 : 1306-9.
32. Sidhu H, Allison MJ, Chow JM, *et al.* Rapid reversal of hyperoxaluria in a rat model after probiotic administration of *Oxalobacter formigenes*. *J Urol* 2001 ; 166 : 1487-91.
33. Steidler L, Hans W, Schotte L, *et al.* Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000 ; 289 : 1352-5.
34. Buts JP, De Keyser N, De Raedemaeker L. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. *Pediatr Res* 1994 ; 36 : 522-7.
35. Jahn HU, Ullrich R, Schneider T, *et al.* Immunological and trophical effects of *Saccharomyces boulardii* on the small intestine in healthy human volunteers. *Digestion* 1996 ; 57 : 95-104.
36. Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpaa P, *et al.* Probiotics : effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 2001 ; 73 (2 Suppl) : 444S-50S.
37. Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T, *et al.* A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 1991 ; 88 : 90-7.
38. Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, *et al.* Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* 1995 ; 13 : 310-2.
39. Blum S, Haller D, Pfeifer A, *et al.* Probiotics and immune response. *Clin Rev Allerg Immunol* 2002 ; 22 : 287-309.
40. Underhill DM. Toll-like receptors: networking for success. *Eur J Immunol* 2003 ; 33 : 1767-75.
41. Krieg AM. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nature Med* 2003 ; 9 : 831-5.
42. Rachmilewitz D, Karmeli F, Takabayashi K, *et al.* Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis. *Gastroenterology* 2002 ; 122 : 1428-41.
43. Rachmilewitz D, Karmeli F, Takabayashi K, *et al.* Amelioration of experimental colitis by probiotics is due to the immunostimulatory effect of its DNA. *Gastroenterology* 2002 ; 122 : T1004 abstract.
44. Haller D, Bode C, Hammes WP, *et al.* Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 2000 ; 47 : 79-87.
45. Borrueal N, Carol M, Casellas F, *et al.* Increased mucosal tumour necrosis factor a production in Crohn's disease can be downregulated *ex vivo* by probiotic bacteria. *Gut* 2002 ; 51 : 659-64.
46. Hennequin C, Kauffmann-Lacroix C, Jobert A, *et al.* Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000 ; 19 : 16-20.
47. Lherm T, Monet C, Nougier B, *et al.* Seven cases of fungemia with *Saccharomyces boulardii* in critically ill patients. *Intens Care Med* 2002 ; 28 : 797-801.
48. Riquelme AJ, Calvo MA, Guzman AM, *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* fungemia after *Saccharomyces boulardii* treatment in immunocompromised patients. *J Clin Gastroenterol* 2003 ; 36 : 41-4.
49. Rautio M, Jousimies-Somer H, Kauma H, *et al.* Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clin Infect Dis* 1999 ; 28 : 1159-60.
50. MacKay A, Taylor M, Kibbler C, Hamilton Miller J. *Lactobacillus endocarditis* caused by a probiotic microorganism. *Clin Microbiol Infect* 1999 ; 5 : 290-2.

51. Peret Filho LA, Penna FJ, Bambilra EA, *et al.* Dose effect of oral *Saccharomyces boulardii* treatments on morbidity and mortality in immunosuppressed mice. *J Med Microbiol* 1998 ; 47 : 111-6.
52. Farina C, Arosio M, Mangia M, *et al.* *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* sepsis in a patient with ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol* 2001 ; 33 : 251-2.
53. Salminen MK, Tynkkynen S, Rautelin H, *et al.* *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin Infect Dis* 2002 ; 35 : 1155-60.
54. Marteau P, Gerhardt MF, Myara A, *et al.* Metabolism of bile salts by alimentary bacteria during transit in human small intestine. *Microbiol Ecol Health Dis* 1995 ; 8 : 151-7.
55. Ruseler-van Embden JG, van Lieshout LM, Gosselink MJ, *et al.* Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *L. acidophilus*, and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. *Scand J Gastroenterol* 1995 ; 30 : 675-80.
56. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995 ; 125 : 1401-12.
57. Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001 ; 73 (2 Suppl) : 361s-4s.
58. MacFarlane GT, Cummings JH. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *Br Med J* 1999 ; 318 : 999-1003.
59. Van Loo J, Cummings J, Delzenne N, *et al.* Functional food properties of non-digestible oligosaccharides : a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *Brit J Nutr* 1999 ; 81 : 121-32.
60. Szilagyí A. Lactose - a potential prebiotic. *Aliment Pharmacol Ther* 2002 ; 16 : 1591-602.
61. Bounhik Y, Vahedi K, Achour L, *et al.* Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. *J Nutr* 1999 ; 129 : 113-6.
62. Bounhik Y, Flourié B, Andrieux C. Effects of *Bifidobacterium sp* fermented milk ingested with or without inulin on colonic bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans. *Eur J Clin Nutr* 1996 ; 50 : 269-73.
63. Cummings JH, Macfarlane GT. Gastrointestinal effects of prebiotics. *Br J Nutr* 2002 ; 87 Suppl 2 : S145-51.
64. Nyman M. Fermentation and bulking capacity of indigestible carbohydrates: the case of inulin and oligofructose. *Br J Nutr* 2002 ; 87 Suppl 2 : S163-8.
65. Scholz-Ahrens KE, Schrezenmeir J. Inulin, oligofructose and mineral metabolism - experimental data and mechanism. *Br J Nutr* 2002 ; 87 Suppl 2 : S179-86.
66. Williams CM, Jackson KG. Inulin and oligofructose: effects on lipid metabolism from human studies. *Br J Nutr* 2002 ; 87 Suppl 2 : S261-4.
67. Hartemink R, Alles MS, Rombouts FM. Fermentation of selected carbohydrates by faecal inocula from volunteers on a controlled diet low in fibre. In : Hartemink R, ed. *Prebiotic effects of non-digestible oligo- and polysaccharides*. Thesis. Landbouwniversiteit Wageningen, 1999.
68. Rumessen JJ, Gudmand-Hoyer E. Functional bowel disease: malabsorption and abdominal distress after ingestion of fructose, sorbitol, and fructose-sorbitol mixtures. *Gastroenterology* 1988 ; 95 : 694-700.
69. Vesa TH, Seppo LM, Marteau PR, *et al.* Role of irritable bowel syndrome in subjective lactose intolerance. *Am J Clin Nutr* 1998 ; 67 : 710-5.
70. Florent C, Flourié B, Leblond A, *et al.* Influence of chronic lactulose ingestion on the colonic metabolism of lactulose in man (an *in vivo* study). *J Clin Invest* 1985 ; 75 : 608-13.
71. Briet F, Pochart P, Marteau P, *et al.* Improved clinical tolerance to chronic lactose ingestion in subjects with lactose intolerance: a placebo effect? *Gut* 1997 ; 41 : 632-5.
72. Flourié B, Briet F, Florent C, *et al.* Can diarrhea induced by lactulose be reduced by prolonged ingestion of lactulose? *Am J Clin Nutr* 1993 ; 58 : 369-75.
73. Briet F, Achour L, Flourié B, *et al.* Symptomatic response to varying levels of fructo-oligosaccharides consumed occasionally or regularly. *Eur J Clin Nutr* 1995 ; 49 : 501-7.
74. Piche T, Bruley des Varannes S, Sacher-Huvelin S, *et al.* Colonic fermentation influences lower esophageal sphincter function in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 2003 ; 124 : 894-902.



**Rôles
physiologique et
physiopathologique
de la flore**



Principales fonctions métaboliques de la flore intestinale de l'homme

Annick Bernalier-Donadille

Unité de Microbiologie
INRA
Centre de Recherches de
Clermont-Ferrand/Theix
Saint-Genès-Champagnelle,
France.

Le côlon de l'homme héberge une communauté bactérienne extrêmement dense et diversifiée, composée en majorité de micro-organismes anaérobies stricts. Les principales sources de carbone et d'énergie de cette microflore sont représentées par les glucides et les protéines non digérés dans la partie supérieure du tractus digestif, ainsi que par les sécrétions endogènes (mucopolysaccharides, débris cellulaires, enzymes...). Une grande diversité de substrats est ainsi disponible pour la flore colique, la nature et la quantité de ces différentes sources carbonées variant, pour une large part, en fonction du régime alimentaire. La quantité totale de glucides fermentescibles varie ainsi de 10 à 60 g par jour, alors que celle des composés azotés, dont 1 à 2 g proviennent de l'effluent iléal [1], est estimée entre 6 et 18 g/jour [2]. Le métabolisme des glucides est ainsi quantitativement plus important que celui des protéines, en particulier dans le côlon proximal où la disponibilité en substrats fermentescibles est importante.

Les activités métaboliques de la microflore colique sont très nombreuses et diversifiées. Les polymères complexes sont dégradés par une grande variété d'hydrolases (polysaccharidases, glycosidases, protéases, peptidases) en fragments plus petits (oses, acides aminés) assimilables par les bactéries. La fermentation de ces substrats par la microflore conduit ensuite à la production de divers métabolites comme les acides gras à chaîne courte (AGCC), les gaz et l'ammoniaque. L'ensemble de ces réactions de fermentation permet aux bactéries d'obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance et au maintien de leurs fonctions cellulaires. Ces activités microbiennes sont également importantes pour l'hôte puisque les métabolites formés sont, pour la plupart, absorbés et utilisés dans l'organisme.

Substrats disponibles pour la microflore colique

L'importante diversité des sources de carbone et d'énergie disponibles pour les micro-organismes dans le côlon expliquerait, pour une large part, la grande diversité microbienne rencontrée au sein de l'écosystème. Les substrats fermentés par la microflore colique sont à la fois d'origine exogène (apportés par l'alimentation) et endogène (synthétisés par l'hôte) (Figure 1).

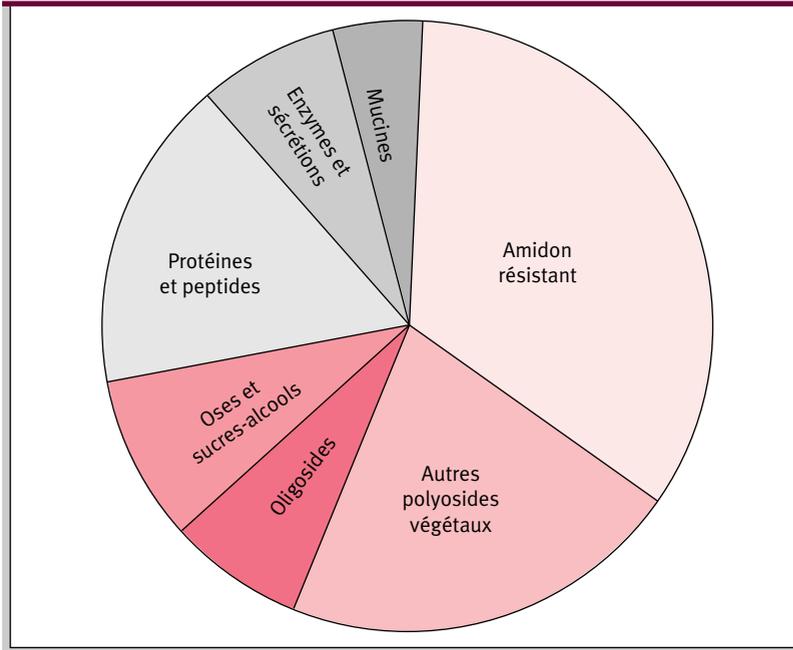


Figure 1.
Différents substrats
exogènes et endogènes
disponibles pour
la microflore du côlon

Substrats exogènes

Les substrats d'origine alimentaire sont essentiellement constitués par les glucides non digérés dans la partie supérieure du tube digestif, les lipides et les protéines ingérés étant presque totalement absorbés dans l'intestin grêle [3]. Ces glucides sont principalement représentés par l'amidon résistant, les polysides végétaux (paroi cellulaire et réserve) et certains oligosides et oses. L'amidon résistant à l'action des amylases pancréatiques ainsi que les polysides constituant la paroi des végétaux sont quantitativement les plus importants (Figure 1). Environ 10 % de l'amidon consommé échappent à la digestion dans l'intestin grêle et constituent le substrat exogène majeur parvenant au côlon (8 à 40 g par jour). Les polysides de la paroi des végétaux sont principalement constitués par des glucides insolubles comme la cellulose et les hémicelluloses, ainsi que par les pectines. D'autres polysides végétaux comme l'inuline, les gommages ou les mucilages, sont également fermentescibles. Certains de ces polymères étant, de plus, utilisés comme émulsifiant ou agent de texture par l'industrie agroalimentaire, l'apport exogène total de ces polysides végétaux est estimé à 8-20 g par jour. Enfin, certains oses, oligosides et sucre-alcools non digestibles parviennent aussi au côlon, tels que le raffinose et le stachyose contenus dans les haricots ou les fructo-oligosaccharides présents dans l'artichaut, l'oignon ainsi que certains édulcorants.

Substrats endogènes

Les substrats endogènes proviennent de l'intestin grêle (enzymes pancréatiques, stérols biliaires, cellules épithéliales desquamées, mucines...) et de la paroi colique elle-même (mucopolysaccharides, mucines...). Les

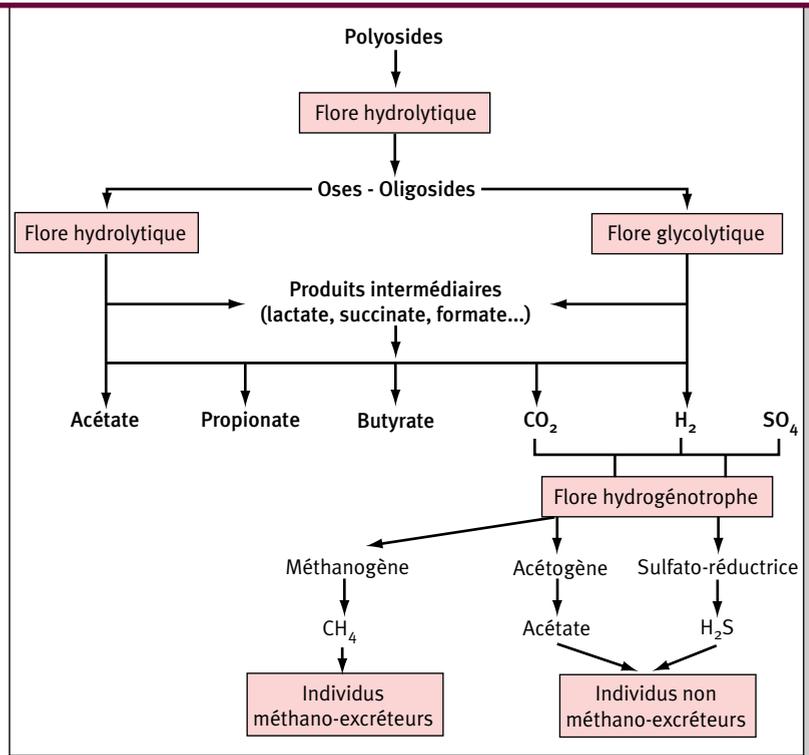
mucines, sécrétées tout le long du tractus digestif, sont des glycoprotéines composées d'une structure peptidique sur laquelle sont branchées des chaînes latérales de teneur variable en fucose, galactose, hexosamines, acide sialique et acides uroniques [3]. Les mucopolysaccharides, comme l'acide hyaluronique et les sulfates de chondroïtine, sont constitués d'un enchaînement linéaire d'acides glucuroniques liés latéralement à des unités N-acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine. Les chondroïtines possèdent de plus des groupements sulfate substitués sur les résidus N-acétylgalactosamine. Les cellules épithéliales desquamées sont également un substrat endogène important, le renouvellement de l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon étant très rapide. Les sécrétions pancréatiques, contenant une grande variété d'enzymes hydrolytiques, représentent une des sources importante d'azote organique pour la microflore colique. Enfin, divers stérols (cholestérol, acides biliaires...) et la bilirubine provenant des sécrétions biliaires parviennent également au côlon.

Métabolisme des glucides

Chaîne trophique de fermentation des glucides

La dégradation anaérobie des polysides dans le côlon est un processus complexe qui implique la contribution de plusieurs groupes bactériens possédant des activités métaboliques variées et complémentaires (Figure 2).

Figure 2.
Schéma global de la chaîne trophique de dégradation et de fermentation des glucides par la microflore colique



Ces micro-organismes interagissent entre eux pour former une chaîne trophique, assurant la transformation des macromolécules glucidiques en AGCC (principalement acétate, propionate et butyrate) et en gaz (hydrogène, dioxyde de carbone et méthane chez certains individus). La première étape de la chaîne est représentée par l'hydrolyse des polysides par les bactéries hydrolytiques, aboutissant à la libération de fragments osidiques plus petits. Les produits de la fermentation des oses par les micro-organismes hydrolytiques et glycolytiques incluent certains intermédiaires comme le formate, l'éthanol, le succinate et le lactate, qui ne s'accumulent pas dans l'écosystème mais sont métabolisés par d'autres espèces bactériennes en produits finaux. L'hydrogène formé lors de ces processus fermentaires est en majeure partie réutilisé *in situ* par les micro-organismes hydrogénotrophes [4]. La microflore hydrogénotrophe joue ainsi un rôle fondamental au sein de l'écosystème car elle maintient la pression partielle en hydrogène à un niveau faible, ce qui assure l'efficacité de la dégradation de la matière organique dans le côlon (oxydation plus complète des substrats et augmentation du gain total d'ATP pour la microflore). La production de méthane (CH₄) lors du métabolisme de l'H₂ par les archaea méthanogènes dans le côlon, sépare l'humanité en deux groupes, selon que les individus qui les composent excrètent ou non ce gaz (sujets méthano-excréteurs et non méthano-excréteurs).

Dégradation des polysides

La microflore colique humaine est particulièrement bien adaptée à l'utilisation des différents polysides complexes. Les principales espèces bactériennes, pour lesquelles une activité hydrolytique à l'égard des polymères glucidiques a été démontrée, appartiennent aux genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium* et *Ruminococcus* ainsi qu'à quelques espèces des genres *Clostridium* et *Eubacterium*. Ces bactéries sont capables de synthétiser différents types de polysaccharidases et/ou de glucosidases, enzymes non produites par l'hôte, qui leur permettent d'hydrolyser les polysides et d'utiliser les fragments osidiques libérés comme source de carbone et d'énergie. Les activités de ces différentes hydrolases sont trouvées principalement associées à la fraction bactérienne des échantillons fécaux, en particulier pour celles impliquées dans la dégradation des polysides insolubles comme la cellulose ou les hémicelluloses [5]. Dans ce cas, les plus fortes activités hydrolytiques sont mesurées dans la fraction bactérienne associée aux particules alimentaires.

Bacteroides étant un des micro-organismes anaérobies les moins difficiles à cultiver, ces espèces sont, à ce jour, les bactéries hydrolytiques les plus étudiées. Les espèces présentant la plus grande capacité hydrolytique appartiennent au genre *Bacteroides*, en particulier *Bacteroides ovatus* et *Bacteroides thetaiotaomicron*. Ces espèces sont capables de dégrader une grande variété de polysides d'origine exogène et endogène [6]. Elles apparaissent toutefois spécialisées dans la dégradation des polysides solubles. Les différentes hydrolases qu'elles synthétisent sont inductibles et sont, de plus, toujours associées à la cellule bactérienne [6].

Esp ces amylyolytiques

La plupart des espèces majeures du côlon humain sont capables d'utiliser l'amidon comme source d'énergie. Toutefois, *Bacteroides* est considéré

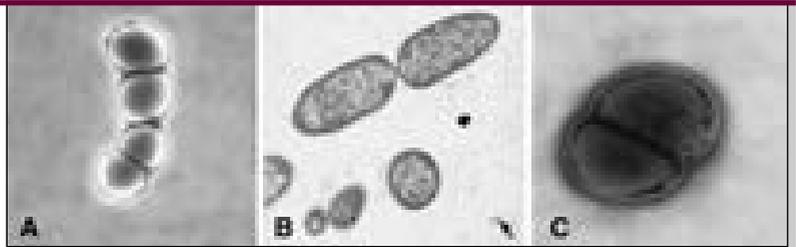
comme le genre amylolytique dominant. Ainsi, l'espèce *Bacteroides thetaiotaomicron* a la capacité de lier le polymère d'amidon à la surface de ses cellules afin de le digérer plus efficacement, les fragments glucanes étant ensuite transportés à travers la membrane externe jusque dans le périplasma [7]. Outre les *Bacteroides*, d'autres espèces appartenant aux genres *Bifidobacterium*, *Eubacterium* et *Clostridium* s'avèrent également capables de dégrader l'amidon. La contribution de ces bactéries à Gram positif à l'hydrolyse de ce polymère est encore considérée comme mineure par rapport à celle des *Bacteroides*, bien que de fortes activités amylase et polygalacturonase différentes de celles exprimées par *Bacteroides* aient été mesurées dans la fraction bactérienne de selles humaines [8].

Esp ces hydrolytiques

Bien que les polysides pariétaux (cellulose, hémicelluloses...) soient largement dégradés dans le côlon, la flore hydrolytique impliquée dans la dégradation de ces polysides insolubles n'a été que peu étudiée chez l'homme.

La microflore capable d'hydrolyser la cellulose n'a ainsi été détectée que chez un nombre restreint de sujets [9]. La plupart des espèces cellulolytiques isolées à ce jour sont à Gram positif et seraient apparentées aux genres *Ruminococcus* (Figure 3A), *Clostridium* et *Eubacterium*, à l'exception de celle identifiée par Betian *et al.* [10] assimilée à une espèce de *Bacteroides* (Figure 3B). Plus récemment, Bernalier *et al.* [11] ont mis en évidence que seuls les individus méthano-excréteurs possédaient une flore cellulolytique capable d'hydrolyser la cellulose cristalline, à un niveau de population de l'ordre de 10^7 à 10^8 bactéries/g de selles. Parmi les espèces cellulolytiques prédominantes isolées, certaines correspondent à des espèces nouvelles du genre *Ruminococcus* et sont phylogénétiquement proches de *Ruminococcus flavefaciens*, bactérie cellulolytique majeure du rumen. D'autres isolats ont été identifiés comme des espèces appartenant aux genres *Enterococcus* (Figure 3C) et *Propionibacterium* [11].

Figure 3.
Espèces cellulolytiques
isolées du côlon de
l'Homme, observées en
microscopie électronique
à transmission
(clichés B. Gaillard-
Martinie, Atelier de
Microscopie, INRA
Clermont-Ferrand/Theix)



A : *Ruminococcus* sp. nov. (coloration négative, x 25 000)

B : *Bacteroides* sp. (coloration positive, x 25 000)

C : *Enterococcus* sp. (coloration négative, x 43 000)

L'utilisation de cellulose moins cristalline et d'une fraction cellulosique non purifiée extraite d'épinard a, en revanche, permis de mettre en évidence l'existence d'une microflore cellulolytique chez tous les individus, excréteurs

ou non de CH_4 . La microflore cellulolytique des sujets non méthano-excréteurs s'est avérée composée d'espèces nouvelles du genre *Bacteroides* (Figure 3B) (résultats non publiés). La structure de la microflore impliquée dans la dégradation de la cellulose semble donc différente selon que les sujets hébergent ou non des archaea méthanogènes.

La microflore hémicellulolytique semble quantitativement plus importante que la flore cellulolytique [9]. Les espèces xylanolytiques isolées sont apparentées aux genres *Clostridium*, *Butyrivibrio* et *Bacteroides*. L'activité hydrolytique de *Bacteroides sp.* à l'égard de certains xylanes et arabinogalactanes solubles, a, de plus, été largement étudiée [6, 12].

La microflore pectinolytique est également composée d'espèces du genre *Bacteroides*, en particulier *Bacteroides thetaiotaomicron* [13], la pectine étant également dégradée par certains *Bifidobacterium*, *Eubacterium* et *Clostridium*.

Parmi les polyosides de réserve des végétaux, les gommés (gomme arabique, gomme guar) sont dégradées par *Bacteroides ovatus* et certaines espèces de *Ruminococcus* et de *Bifidobacterium*. L'espèce *Bifidobacterium sp.* utilise également l'inuline.

La dégradation des polyosides végétaux implique ainsi de nombreuses activités enzymatiques différentes. Certaines espèces bactériennes sont capables de produire différents types d'hydrolases. Toutefois, la dégradation d'une structure aussi complexe que la paroi végétale nécessite vraisemblablement la contribution de plusieurs espèces bactériennes aux activités complémentaires.

Espèces mucolytiques

Les espèces capables de dégrader les mucines et les mucopolysaccharides appartiennent aux genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium* et *Ruminococcus*. La dégradation des mucines requiert la contribution de différentes enzymes comme une sialidase, une α -glucosidase spécifique ainsi qu'une β -D-galactosidase. Certaines espèces de *Ruminococcus* possèdent l'ensemble de ces enzymes et peuvent ainsi dégrader la quasi-totalité des mucines gastriques. D'autres espèces de *Bifidobacterium* ne produisent que quelques-unes de ces enzymes. Les mucopolysaccharides comme les sulfates de chondroïtines et les acides hyaluroniques, sont principalement dégradés par les espèces de *Bacteroides* [14], en particulier *Bacteroides thetaiotaomicron*, actives à l'égard de ces substrats grâce à la synthèse de différentes catégories d'hydrolases comme des lyases, des sulfatases et des β -glucuronidases.

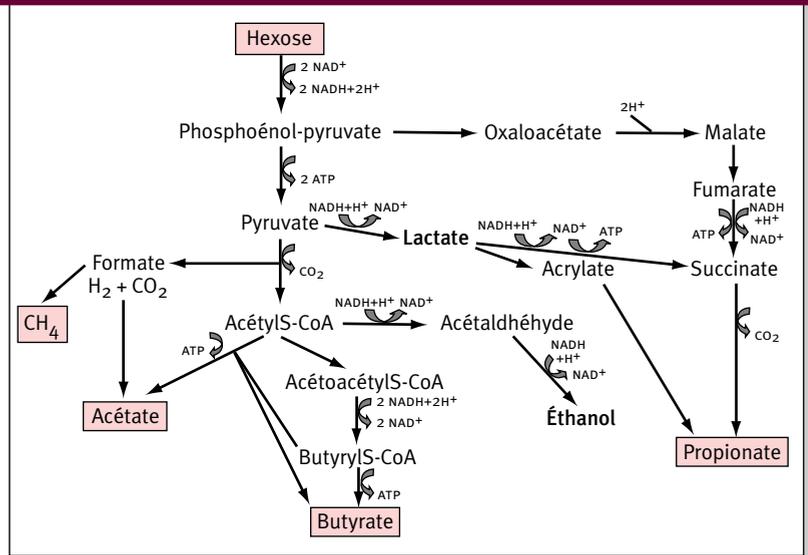
Dégradation des oligosides

La microflore glycolytique du côlon humain comporte un nombre important d'espèces bactériennes incapables d'hydrolyser les polymères complexes et utilisant pour leur croissance les fragments oligosidiques libérés par les espèces hydrolytiques. La croissance de ces micro-organismes glycolytiques est donc en grande partie contrôlée par l'activité des espèces hydrolytiques et par la compétition entre ces différentes espèces pour les substrats libérés. La grande variété de polyosides dégradés dans le côlon génère un nombre important d'oses de natures différentes, contribuant ainsi au maintien de la diversité microbienne au sein du groupe fonctionnel formé par les micro-organismes glycolytiques.

Fermentation des glucides

Malgré la diversité des glucides disponibles et des espèces susceptibles de les fermenter, les substrats glucidiques sont catabolisés par la microflore selon un nombre relativement restreint de voies métaboliques (Figure 4).

Figure 4.
Principales voies métaboliques de fermentation des glucides par la microflore colique



La majorité des espèces, à l'exception des bifidobactéries, utilise la glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas pour convertir les glucides en pyruvate. La voie des pentoses-phosphates est également empruntée par certaines bactéries coliques, notamment lors du métabolisme des pentoses, et conduit aussi à la synthèse de pyruvate. Le pyruvate, métabolite central de ces processus fermentaires, est ensuite transformé selon différentes voies en produits terminaux de fermentation qui constituent les accepteurs finaux d'électrons. Ces métabolites sont majoritairement l'acétate, le propionate et le butyrate. Toutefois, un certain nombre d'espèces produisent également des métabolites intermédiaires comme le succinate, le lactate, l'acrylate, l'éthanol, le formate ainsi que de l' H_2 et du CO_2 , afin d'assurer la réoxydation de leurs cofacteurs réduits, comme le $NADH + H^+$ produit lors de la glycolyse. Ces produits intermédiaires ne s'accumulent pas dans l'écosystème car ils sont rapidement métabolisés *in situ* par d'autres espèces bactériennes en métabolites terminaux. La synthèse de ces composés intermédiaires contribue également au maintien de la diversité de la flore colique.

La plupart des espèces présentes dans le côlon se caractérisent *in vitro* par une fermentation de type acide-mixte et produisent donc plusieurs métabolites lors de l'utilisation d'un substrat. L'acétate est synthétisé lors de la fermentation des glucides par la majorité des espèces prédominantes du côlon (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*...). La voie majeure de biosynthèse de ce métabolite est la décarboxylation oxydative du pyruvate, qui conduit à la synthèse d'une molécule d'ATP (Figure 4).

Le propionate est principalement synthétisé par les espèces du genre dominant *Bacteroides* ainsi que par les *Propionibacterium* et *Veillonella*. Dans le côlon humain, les deux voies possibles de biosynthèse du propionate (voie du succinate et voie de l'acrylate) pourraient exister (Figure 4). La formation du propionate par décarboxylation du succinate serait la voie majoritairement empruntée, en particulier chez les espèces prédominantes de *Bacteroides* [15]. Cependant, la voie de l'acrylate, correspondant à la synthèse de propionate à partir du lactate, pourrait également être importante, notamment dans le cas de régimes riches en oligosides non digestibles.

Les espèces productrices de butyrate dans le côlon n'ont été étudiées et identifiées que très récemment [16]. En effet, bien que ce métabolite soit majoritairement produit dans le côlon, seules quelques espèces de cet écosystème (*Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* et *Butyrivibrio*) s'avéraient capables de produire *in vitro* du butyrate par fermentation des glucides. Pryde *et al.* [16] ont montré que la flore productrice de butyrate se compose d'espèces nouvelles appartenant principalement aux genres *Eubacterium* et *Coproccoccus*, ainsi qu'aux genres récemment identifiés *Roseburia* et *Faecalibacterium*. La voie principale de biosynthèse du butyrate passe par la condensation de deux molécules d'acétylS-CoA et s'accompagne de la synthèse d'une molécule d'ATP (Figure 4).

Les espèces produisant majoritairement du lactate par fermentation des oses sont communément appelées bactéries lactiques. Dans le côlon humain, les bactéries lactiques appartiennent principalement aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* ainsi que *Streptococcus* et *Enterococcus*. La voie de formation du lactate correspond à l'oxydation du pyruvate par la lactate déshydrogénase (Figure 4).

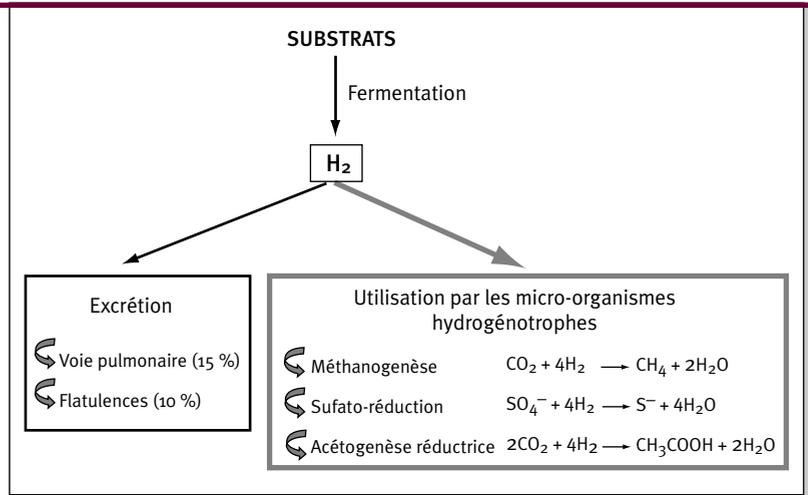
Le lactate produit par fermentation dans le côlon est, pour une large part, réutilisé *in situ*. Les espèces coliques appartenant aux genres *Veillonella* et *Propionibacterium* ont la capacité, *in vitro*, de métaboliser le lactate en propionate, en empruntant la voie de décarboxylation du succinate. Toutefois, certaines espèces de *Clostridium* ainsi que l'espèce *Megasphaera elsdenii* présente dans le tractus digestif des herbivores, utilisent la voie de l'acrylate pour métaboliser le lactate en propionate [17]. Cette voie de synthèse du propionate pourrait exister dans le côlon humain, les espèces responsables étant toutefois encore mal identifiées.

Métabolisme des gaz par les micro-organismes hydrogénotrophes

Alors que des quantités importantes de H₂ sont produites chaque jour dans le côlon [1, 2, 21] (environ 300 mL/g de substrat fermenté), la microflore impliquée dans la production de ce gaz reste encore mal connue. Les espèces produisant de l'H₂ *in vitro* lors de la fermentation des oses ou des polyosides appartiennent principalement aux genres *Clostridium*, *Ruminococcus* et *Eubacterium*. L'H₂ produit est en partie excrété par voie pulmonaire et anale, mais la plus grande part est réutilisée *in situ* par les micro-organismes hydrogénotrophes [4] (Figure 5).

Trois mécanismes hydrogénotrophes ont été décrits dans le côlon humain : la méthanogenèse, la sulfato-réduction et l'acétogenèse réductrice.

Figure 5.
Devenir de l'hydrogène dans le côlon



Méthanogenèse

La méthanogenèse conduit à la formation d'un autre gaz, le CH₄, à partir de l'H₂ et du CO₂ (Figure 5). Seules deux espèces d'archaea méthanogènes ont été décrites dans le côlon humain. L'espèce méthanogène prédominante, *Methanobrevibacter smithii*, tire son énergie de la production de CH₄ par réduction du CO₂ par l'H₂. L'autre espèce, *Methanosphaera stadmansiae*, est observée à des niveaux de population plus faibles que *Methanosphaera smithii*, et produit du CH₄ uniquement par la réduction du méthanol par l'H₂. Cette spécificité métabolique est vraisemblablement associée à l'utilisation du méthanol libéré lors de l'hydrolyse des pectines par les micro-organismes pectinolytiques [18]. Le CH₄ produit est excrété par voie pulmonaire et dans les flatulences. Miller et Wolin [18] ont établi qu'une concentration seuil de 10⁸ méthanogènes/g de selles était nécessaire pour que la production de CH₄ soit suffisante pour être détectée dans les gaz expirés. Le niveau de la population méthanogène varie ainsi de l'indétectable à 10⁷/g chez les sujets non-méthano-excréteurs et est supérieure à 10⁷/g chez les méthano-excréteurs. La proportion d'individus méthano-excréteurs dans la population occidentale varie de 30 % à 50 % [19].

Sulfato-réduction

La sulfato-réduction correspond à la réduction du sulfate en H₂S, cette réaction étant couplée à la génération d'ATP (Figure 5). Outre l'H₂ et le formate, les autres donneurs d'électrons utilisables par les bactéries sulfato-réductrices sont principalement le lactate, le pyruvate et l'éthanol, qu'elles métabolisent en acétate. La réduction du sulfate par l'H₂ conduit à la formation de sulfures, composés potentiellement toxiques pour les cellules eucaryotes [20]. Les espèces sulfato-réductrices du côlon humain appartiennent à différents genres bactériens, le genre prédominant étant

Desulfovibrio [21]. Les genres *Desulfobacter*, *Desulfomonas*, *Desulfobulbus* et *Desulfatamaculum* sont également rencontrés à des niveaux de population plus faibles. Le genre *Desulfovibrio*, comme *Desulfobulbus*, est capable d'utiliser l' H_2 fermentaire et représente donc un des composants importants de cette microflore hydrogénotrophe. L'activité hydrogénotrophe de la flore sulfato-réductrice est dépendante de la quantité de sulfate disponible dans l'écosystème provenant, soit de substrats alimentaires sulfatés, soit de sécrétions endogènes. La disponibilité en sulfate étant vraisemblablement différente en fonction du régime alimentaire et des sécrétions de mucus, la flore sulfato-réductrice doit donc être capable de s'adapter à des variations importantes de concentration en sulfate dans l'écosystème.

Acétogénèse réductrice

L'acétogénèse réductrice est une voie particulière de biosynthèse de l'acétate par réduction de deux moles de CO_2 par quatre moles d' H_2 [22] (Figures 4 et 5). L'un des CO_2 subit une série de réductions successives par l'intermédiaire de dérivés tétrahydrofolates et forme le groupement méthyl de l'acétate. Le second CO_2 est réduit en CO par la carbone-monooxyde déshydrogénase et formera le groupement carboxyl de l'acétate. Les deux groupements sont ensuite condensés en acétylS-CoA et la synthèse finale d'acétate s'effectue avec formation d'un ATP. Les micro-organismes acétogènes hydrogénotrophes sont donc capables de croissance autotrophe à partir d' H_2 et de CO_2 , mais cette voie métabolique est également fonctionnelle lors du métabolisme hétérotrophe chez ces espèces. Dans ce cas, une mole d'héxose est métabolisée en trois moles d'acétate. Deux acétates sont formés par décarboxylation oxydative du pyruvate, libérant deux moles de CO_2 . Les bactéries acétogènes hydrogénotrophes ont la capacité de réutiliser ces deux CO_2 pour former un troisième acétate par la voie réductrice. La contribution de l'acétogène réductrice à l'élimination de l' H_2 est particulièrement importante chez les individus n'hébergeant pas ou peu d'archaea méthanogènes. Chez ces sujets, 35 % de l'acétate produit dans le côlon seraient synthétisés par voie réductrice. En revanche, la flore acétogène ne semble pas capable d'exprimer son potentiel hydrogénotrophe en présence d'archaea méthanogènes [23]. Les espèces acétogènes hydrogénotrophes isolées des selles de sujets non-méthano-excréteurs appartiennent à des genres variés comme *Clostridium*, *Ruminococcus* et *Streptococcus* [24-26] (Figure 6).



Figure 6.
Observations
microscopiques
d'espèces acétogènes
hydrogénotrophes
isolées de selles
humaines (clichés
B. Gaillard-Martinie,
Atelier de Microscopie,
INRA Clermont-Ferrand/
Theix).

A : *Clostridium sp. nov.*, microscopie photonique (coloration de Gram, x 2 000).

B : *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, microscopie électronique (coloration négative, x 34 000)

Ces espèces présentent toutes une grande capacité nutritionnelle [27, 28], leur permettant de s'adapter aux variations de conditions nutritionnelles dans l'écosystème. L'aptitude de certaines espèces à co-métaboliser un substrat organique et l' H_2 leur confère aussi un avantage écologique par rapport aux autres micro-organismes hydrogénotrophes puisqu'elle leur permet d'obtenir une quantité plus importante d'énergie par unité de temps et par mole de substrat fermenté.

Métabolisme des protéines

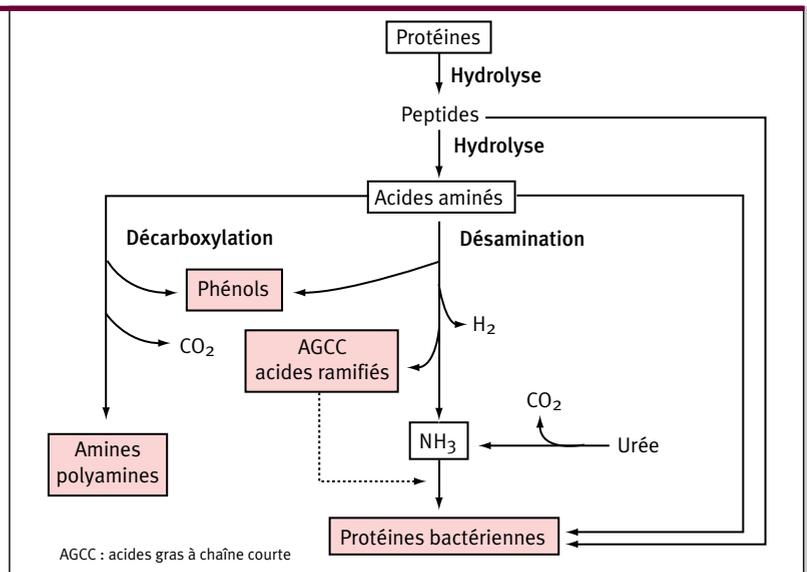
À l'opposé de la fermentation des glucides, la dégradation des protéines dans le côlon génère de nombreux métabolites potentiellement toxiques pour l'hôte (phénols, indoles, ammoniaque, amines).

Protéolyse

Les protéines et les peptides étant la principale source azotée dans le côlon, les bactéries doivent hydrolyser ces polymères pour disposer des carbones et de l'azote qui les composent. La protéolyse est ainsi un processus fondamental dans le côlon. Les mécanismes régulant ce processus sont encore mal connus [1]. La structure et la solubilité des protéines ainsi que leur temps de transit représentent vraisemblablement des facteurs importants. Le pH intraluminal joue également un rôle, les protéases possédant un pH optimal voisin de la neutralité. Les facteurs influençant le pH colique, comme la production d'acides lors de la fermentation des glucides, sont donc susceptibles de moduler l'activité protéolytique au sein de l'écosystème. Ainsi, les protéases bactériennes seraient particulièrement actives dans la partie distale du côlon où le pH est plus élevé [21].

L'hydrolyse des protéines par les enzymes protéolytiques (protéases) conduit à la libération de peptides plus petits (Figure 7).

Figure 7.
Principales voies
du métabolisme
des protéines
dans le côlon



Certaines espèces sont capables d'assimiler l'azote peptidique alors que d'autres n'utilisent que les acides aminés libres issus de la dégradation des peptides [1]. Les protéases bactériennes sont des sérine-, cystéine- ou métallo-protéases [21].

Un grand nombre d'espèces bactériennes coliques possèdent une activité protéolytique. Les bactéries protéolytiques prédominantes appartiennent aux genres *Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus* [1]. Les protéases bactériennes sont, soit extra-cellulaires (*Clostridium* ou *Propionibacterium*), soit associées à la cellule (*Lactobacillus*), les mécanismes régulant cette activité variant considérablement d'une espèce à l'autre.

Métabolisme des peptides et des acides aminés

Bien que très peu étudiés, les peptides ont un rôle important au sein de l'écosystème colique. Ils sont, en effet, capables de stimuler *in vitro* la croissance de nombreuses espèces bactériennes intestinales. Leur utilisation s'accompagne fréquemment de l'excrétion d'acides aminés non nécessaires à la croissance de la bactérie (Figure 7). Ces acides aminés libres deviennent alors potentiellement disponibles pour d'autres espèces coliques n'assimilant pas les peptides [21].

Un nombre important d'espèces coliques est capable d'utiliser les acides aminés. Parmi celles-ci, certaines espèces des genres *Veillonella*, *Peptococcus*, *Fusobacterium*, *Acidaminococcus*, *Clostridium* et *Eubacterium* utilisent les acides aminés comme source principale d'énergie, ces bactéries ne fermentant pas les glucides. Toutefois, de nombreuses espèces glycolytiques utilisent aussi les acides aminés et les peptides uniquement comme source d'azote [1]. La fermentation des acides aminés implique une variété de réactions d'oxydation et de réduction dont les accepteurs finaux d'électrons sont divers (acides gras insaturés, autres acides aminés, H₂...). Parmi ces différentes réactions (désaminations, réaction de Stickland...), la voie réductrice de désamination des acides aminés, conduisant à la formation AGCC et d'ammoniaque, apparaît comme celle majoritairement empruntée par les espèces coliques [21]. L'acétate, le propionate et le butyrate sont les principaux métabolites produits. Ainsi, certains *Clostridium* fermentent la thréonine en propionate, *Fusobacterium nucleatum* produit de l'acétate et du butyrate lors de la fermentation de la lysine et *Bacteroides sp.* métabolise l'aspartate en acétate et succinate. Toutefois, une variété d'autres composés est également formée lors du métabolisme des acides aminés, comme des phénols, des acides di-carboxyliques et des acides gras ramifiés (isobutyrate, 2-méthylbutyrate, isovalérate formés respectivement à partir de la valine, de l'isoleucine et de la leucine). Les acides gras ramifiés constituent des marqueurs de la protéolyse dans le côlon, puisque ces composés sont exclusivement formés lors du métabolisme des acides aminés. La concentration de ces métabolites augmente significativement du côlon proximal au côlon distal [1]. Les composés phénoliques et indoliques sont issus de la dégradation des acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane et phénylalanine) par certaines espèces de *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et d'entérobactéries. Ces métabolites sont absorbés et détoxifiés par la muqueuse colique, puis excrétés dans les urines. Cependant, une augmentation de la formation des phénols et des indoles a été trouvée associée à diverses pathologies chez l'homme, en particulier dans le cas de cancer colique

[21]. Enfin, la fermentation de certains acides aminés (valine, alanine, glutamate, leucine) peut également contribuer à la production d' H_2 dans l'écosystème. Les micro-organismes hydrogénotrophes (méthanogènes, acétogènes ou sulfitoréducteurs) pourraient ainsi potentiellement influencer le métabolisme des acides aminés par l'intermédiaire de transferts interspèces d' H_2 .

Ammoniaque

La majeure partie de l'ammoniaque produite dans le côlon provient de la désamination des acides aminés, l'urée ne contribuant que faiblement à cette production [1, 21] (Figure 7). L'ammoniaque formée par la flore intestinale est absorbée par la muqueuse colique et transportée jusqu'au foie par la veine porte, où elle est convertie en urée qui est excrétée dans les urines. L'ammoniaque représente également la source d'azote préférentielle d'un grand nombre d'espèces coliques. Celles-ci assimilent l'ammoniaque selon deux voies métaboliques : l'une impliquant la glutamine synthétase et l'autre la glutamate déshydrogénase. L'importance relative de ces deux voies dans le côlon reste mal définie. À l'intérieur de la cellule bactérienne, des aminotransférases permettent la synthèse des acides aminés nécessaires à la bactérie par transfert d'ammoniaque sur les structures carbonées [1, 21].

L'ammoniaque est un composé potentiellement toxique pour l'hôte. En effet, ce métabolite peut, à faible concentration (5 à 10 mM), altérer la morphologie et le métabolisme intermédiaire des cellules intestinales et augmenter la synthèse d'ADN [21]. L'ammoniaque pourrait ainsi être impliquée dans les mécanismes d'initiation du cancer colique. La concentration en ammoniaque dans le côlon résulte d'un équilibre entre la désamination des acides aminés par les bactéries et l'utilisation de l'ammoniaque libérée par les cellules pour leurs biosynthèses. La fermentation des glucides, en stimulant la protéosynthèse bactérienne, contribue, avec l'absorption par la muqueuse, à la diminution de la concentration intraluminaire d'ammoniaque.

Amines et polyamines

Les amines sont des produits majeurs du métabolisme des acides aminés par la flore colique. Elles sont principalement issues de la décarboxylation des acides aminés (Figure 7) et, pour une faible part, de réactions de désalkylation et de transamination. Elles proviennent également de la dégradation des polyamines [21]. Une grande variété d'aminés est produite dans le côlon, comme l'histamine, la tyramine, la piperidine... ainsi que des polyamines comme la cadavérine ou la putrescine (Tableau I). Différentes espèces coliques possèdent la capacité de produire des aminés. Elles appartiennent aux genres *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Streptococcus* et incluent aussi certaines entérobactéries [21]. La synthèse de polyamines (diaminés à hexaminés et aminés tertiaires et quaternaires branchés) dépend majoritairement de la présence de décarboxylases spécifiques bactériennes : l'arginine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase, la lysine décarboxylase et l'acide diaminobutyrique décarboxylase [29]. Les précurseurs de ces molécules incluent l'arginine, la lysine, la phénylalanine... (Tableau I). De nombreuses espèces (*Bacteroides*, *Prevotella*, *Veillonella*) nécessitent la présence de polyamines dans le milieu extracellulaire pour une croissance optimale, les mécanismes physiologiques impliqués restant encore mal connus.

Amines	Précurseurs	Réactions impliquées
Méthylamine	Glycine	Décarboxylation
Diméthylamine	Choline	N-Désalkylation
Propylamine	Acide amino-butyrique	Décarboxylation
Pyrrolidine	Putrescine	Désamination oxydative
Piperidine	Cadavérine	Désamination oxydative
2-méthylbutylamine	Valine	Décarboxylation
Putrescine	Ornithine	Décarboxylation
	Arginine	Décarboxylation et hydrolyse
Cadavérine	L-lysine	Décarboxylation
Agmatine	Arginine	Décarboxylation
Phényléthylamine	Phénylalanine	Décarboxylation
Tyramine	Tyrosine	Décarboxylation
Ethylamine	Alanine	Décarboxylation

Tableau 1.
Principales amines formées par la microflore colique [1]

Les amines sont vraisemblablement rapidement absorbées et oxydées au niveau de la muqueuse colique. Certaines sont excrétées dans les urines et constituent des marqueurs de la digestion bactérienne des protéines. Les amines produites par la flore colique sont reconnues comme potentiellement toxiques pour l'hôte et pourraient jouer un rôle important dans diverses affections (migraine, schizophrénie, gastro-entérites infantiles...) [1, 21]. Les amines sont, en effet, susceptibles d'affecter un grand nombre de fonctions chez l'homme. Malgré ce rôle délétère potentiel, les espèces et les voies de production des amines dans le côlon n'ont été que très peu étudiées. Le rôle des polyamines dans la physiologie de l'épithélium colique et dans la cancérogenèse colique est envisagé au chapitre « Flore intestinale et épithélium colique ».

Métabolisme des stérols

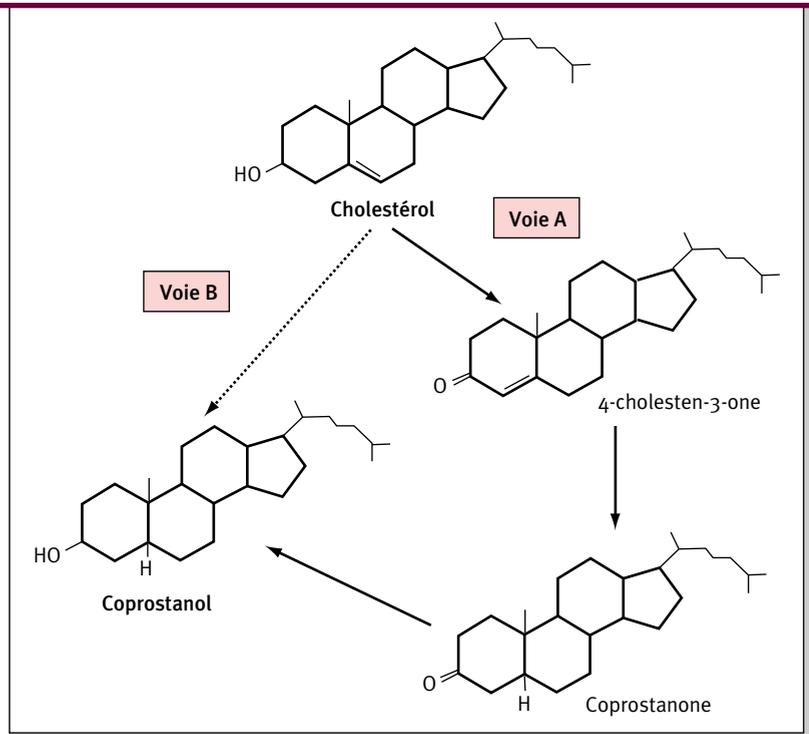
Les stérols endogènes parviennent principalement au côlon par la bile, et représentent, à côté des stérols exogènes, une source potentielle de substrats pour la microflore. Les stérols biliaires sont principalement (composition en g/g poids sec) : les acides biliaires (67 %), le cholestérol (4 %) et les hormones stéroïdiennes [30]. L'activité de la microflore colique à l'égard de ces différentes substances est aujourd'hui reconnue, et un certain nombre d'espèces capables de les métaboliser ont été identifiées. Les voies enzymatiques empruntées restent cependant encore mal définies. De même, l'importance physiologique de la transformation microbienne de ces substrats sur la santé de l'homme n'est pas complètement déterminée.

Métabolisme microbien du cholestérol

Bien que le cholestérol soit majoritairement absorbé dans l'intestin grêle, une fraction (environ 1 g par jour) parvient au côlon, en provenance de l'alimentation, de la bile ou des muqueuses digestives.

Le métabolisme du cholestérol par la microflore colique conduit principalement à la synthèse de coprostanol et de faibles quantités de coprostanone (Figure 8).

Figure 8.
Métabolisme
du cholestérol par la
microflore intestinale



Ces produits de la biotransformation du cholestérol sont retrouvés dans les selles. Chez le rat, la transformation bactérienne du cholestérol semble principalement localisée dans le caecum [30]. Chez l'homme, la transformation colique du cholestérol en coprostanol et/ou coprostanone n'est observée que chez une fraction de la population, avec de fortes variations interindividuelles. Ainsi, Wilkins et Hackman [31] ont montré que l'excrétion fécale de ces métabolites n'était notable que chez vingt-trois sujets nord-américains sur les trente-et-un étudiés.

Plusieurs espèces bactériennes capables de métaboliser le cholestérol ont été isolées à partir de fèces humaines ou animales. La plupart de ces espèces appartiennent au genre *Eubacterium*, la capacité de réduire le cholestérol en coprostanol ayant également été rapportée chez différentes souches de *Clostridium*, *Bifidobacterium* et *Bacteroides* [30]. Plus récemment, Pereira et Gibson [32] ont montré que l'espèce *Lactobacillus fermentum* KC5b, isolée de selles humaines, était capable de métaboliser de grande quantité de cholestérol. Le(s) mécanisme(s) enzymatique(s) impliqué(s) dans la réduction du cholestérol chez ces espèces coliques n'a (ont) été que très peu étudié(s). Seules quelques études ont concerné une espèce d'*Eubacterium* isolée de fèces de rat [30]. La réaction consisterait en une série d'oxydation du groupe 3β -hydroxyde et une isomérisation conduisant à la formation de 4-cholesten-

3-one. Le coprostanone serait alors formé par réduction du 4-cholesten-3-one. Enfin, la réduction du groupement 3-oxo de la coprostanone permettrait la synthèse de coprostanol. Toutefois, une deuxième voie de synthèse du coprostanol par réduction du cholestérol serait également possible (Figure 8).

Métabolisme microbien des acides biliaires

Les acides biliaires sont synthétisés dans le foie, à partir du cholestérol, et conjugués à la glycine ou la taurine par une liaison amide. Chez l'homme, les principaux acides biliaires primaires sont l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique. Les acides biliaires sont activement absorbés au niveau de l'iléon terminal et sont transportés par la veine porte au foie où ils sont à nouveau excrétés dans la bile (cycle entérohépatique). Environ 5 % des sels biliaires (0,2 à 0,3 g par jour) échappent à ce cycle et parviennent au côlon où ils sont déconjugués et métabolisés par la flore. La majorité des produits issus de ces transformations est excrétée dans les selles. Le reste est absorbé, transporté au foie par la veine porte, reconjugué et ré-excrété dans la bile, constituant les sels biliaires secondaires. Plus de vingt acides biliaires secondaires différents ont été mis en évidence dans les selles, témoignant de la grande variété des voies de transformation des sels biliaires primaires par la flore intestinale [30] (Tableau II).

Réactions	Genres bactériens	Tableau II. <i>Métabolisme des acides biliaires par la flore colique [30]</i>
Hydrolyse de la glycine et de la taurine Fusobacterium Streptococcus	Bacteroides, Bifidobacterium, Clostridium, Lactobacillus,	
Oxydation et épimérisation	Clostridium, Eubacterium, Fusobacterium, Ruminococcus (R. productus)	
7-déshydroxylation	Clostridium, Eubacterium	
Estérification	Bacteroides, Eubacterium, Citrobacter,	

L'hydrolyse de la liaison amide entre la glycine ou la taurine et les acides biliaires est catalysée par une hydrolase spécifique, rencontrée chez des espèces appartenant à divers genres bactériens (Tableau II). La contribution de chacune de ces espèces semble dépendre de l'hôte. Tannock *et al.* [33] ont ainsi montré que, chez la souris, cette transformation était principalement réalisée par les lactobacilles. Les autres transformations possibles des acides biliaires par la flore intestinale incluent l'oxydation des différents groupes hydroxyles présents sur la molécule en groupes oxo, et l'épimérisation des groupements α -hydroxyle en β -hydroxyle [30]. Ces réactions impliquent une déshydrogénase spécifique présente chez certaines espèces de *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* et *Ruminococcus*. D'un point de vue physiologique, la biotransformation bactérienne la plus significative chez l'homme est la 7-déshydroxylation des acides cholique et chénodésoxycholique, respectivement en acides désoxycholique et lithocholique. L'acide

désoxycholique est absorbé par voie passive au niveau de la muqueuse colique et représente 25 % du pool des acides biliaires circulants chez l'homme [30]. En revanche, l'acide lithocholique est fortement insoluble et est donc majoritairement excrété dans les selles. La microflore responsable de la 7-déshydroxylation des acides biliaires n'est détectée qu'à un faible niveau de population dans les selles humaines (10^3 à 10^5 par g de selles) et est principalement composée d'espèces de *Clostridium* et d'*Eubacterium* [30, 34]. La présence d'esters d'acides biliaires a également été détectée dans les selles humaines, les voies de production de ces métabolites restant cependant mal connues. Certaines espèces de la flore colique (*Bacteroides*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* et *Ruminococcus*) se sont toutefois avérées capables, *in vitro*, de saponifier l'acide cholique ou l'acide chénodésoxycholique. Une désulfatation des acides biliaires par l'intermédiaire d'une sulfatase spécifique a également été décrite. Cette réaction n'est observée que pour le groupement sulfate en position C-3 des molécules et est stéréospécifique. La configuration α ou β de ce groupement détermine la nature du composé synthétisé. Certaines espèces de *Clostridium*, *Fusobacterium* et *Peptococcus* ont la capacité de désulfater les acides biliaires.

Métabolisme microbien des hormones stéroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes présentes dans les sécrétions biliaires sont sous forme conjuguées (glucuronide ou sulfate). La concentration totale de ces molécules dans la bile reste faible, des variations importantes étant toutefois observées en fonction du sexe (approximativement 13 mg/jour chez un homme contre 6 mg/jour chez une femme). Une partie de ces hormones stéroïdiennes (2 mg par jour) serait, après déconjugaison, métabolisée par la flore intestinale. Les métabolites formés sont principalement réabsorbés et transportés au foie où ils sont de nouveau conjugués et excrétés dans la bile [30].

Différentes voies de biotransformation des hormones stéroïdiennes par la flore colique ont été décrites. Une hydrolyse des groupements sulfate et/ou glucuronide de ces structures, grâce à des sulfatases et/ou des glucuronidases bactériennes, a été mise en évidence [30]. Ces activités enzymatiques ont été détectées chez certaines espèces des genres *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Bacteroides* et *Peptococcus* [35]. Différentes biotransformations bactériennes ont été démontrées, principalement chez des espèces d'*Eubacterium* et de *Clostridium* [30]. *Eubacterium lentum* est aussi capable de déshydroxyler le groupement en position 21 des molécules de corticostéroïdes. Deux espèces isolées de selles humaines, *Eubacterium desmolans* et *Clostridium scindens*, possèdent une activité desmolase permettant le clivage des chaînes latérales des glucocorticoïdes. Des activités réductases, permettant la réduction du premier cycle (A) de la structure des hormones stéroïdiennes, ont également été observées chez d'autres espèces d'*Eubacterium* et de *Clostridium*. Différentes réactions d'oxydoréduction, transformant les groupements hydroxyle ou oxo en position 16, 17 ou 20 des stéroïdes, ont été mises en évidence chez certaines espèces des genres *Clostridium* et *Eubacterium*, ainsi que chez les espèces *Bacteroides fragilis* et *Bifidobacterium adolescentis*. Ces biotransformations impliquent que les différentes espèces possèdent les enzymes spécifiques pour catalyser ces réactions, comme des réductases, des deshydratases et/ou des deshydrogénases.

Conclusion

La grande variété des substrats carbonés et azotés disponibles dans le côlon contribue largement au maintien de la diversité des espèces bactériennes et des activités métaboliques rencontrées au sein de cet écosystème. Les nombreuses fonctions métaboliques de la flore colique génèrent une diversité de métabolites ayant des répercussions majeures sur la physiologie et la santé de l'homme.

Points clés

- Les fonctions métaboliques de la microflore intestinale sont nombreuses et diversifiées. Ces activités microbiennes ont des répercussions importantes sur la santé de l'hôte, les métabolites produits par la flore étant majoritairement absorbés et métabolisés dans l'organisme.
- La nature des substrats disponibles pour la flore intestinale est extrêmement variée (glucides alimentaires indigestibles, sécrétions endogènes riches en protéines et stérols, corps cellulaires desquamés...), ce qui explique la diversité des espèces bactériennes et des activités métaboliques rencontrées au sein de l'écosystème colique.
- Les produits principaux de la fermentation des glucides dans le côlon sont les acides gras à chaîne courte (principalement acétate, propionate et butyrate) et les gaz (H_2 , CO_2 et, dans 30 % à 50 % des cas, CH_4). Les acides gras à chaîne courte sont rapidement absorbés alors que les gaz sont, soit excrétés (voies pulmonaire et anale), soit réutilisés *in situ* (H_2 et CO_2) par la flore hydrogénotrophe.
- La dégradation des protéines par la flore intestinale génère de nombreux métabolites potentiellement toxiques pour l'hôte (ammoniaque, phénols, indoles...). Toutefois, la fermentation des glucides, en stimulant la protéosynthèse microbienne, contribue largement à diminuer la disponibilité de ces composés.
- La flore intestinale métabolise les stérols parvenant au côlon en divers composés. Ces derniers sont principalement absorbés puis, soit re-excrétés dans l'intestin, soit excrétés dans les urines. Ils peuvent également être éliminés dans les selles. Les voies de biotransformation des stérols empruntées par les bactéries restent encore mal connues.

Références

1. Macfarlane GT, Cummings JH. The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. In : Phillips SF, Pemberton JH, Shorter RG, eds. *The large intestine: physiology, pathophysiology and disease*. New York : Raven Press, 1991 : 51-92.
2. Cummings JH, Macfarlane GT. The control and consequence of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* 1991 ; 70 : 443-59.
3. Flourié B, Florent C, Etanchaud F. Fonction digestive du caecum chez l'homme normal. *Cah Nut Diét* 1988 ; 23 : 111-5.
4. Christl SU, Murgatroyd PR, Gibson GR, et al. Production, metabolism and excretion of H₂ in the large intestine. *Gastroenterology* 1992 ; 102 : 1269-77.
5. Englyst HN, Hay S, Macfarlane GT. Polysaccharides breakdown by mixed populations of human faecal bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 1987 ; 95 : 163-71.
6. Salyers AA. Fermentation of polysaccharides by human colonic anaerobes. In : Cherbut C, Barry JL, Lairon D, Durand M, eds. *Dietary fibre*. Paris : John Libbey Eurotext, 1995 : 29-35.
7. Tancula E, Feldhaus MJ, Bedzyk LA, et al. Location and characterization of genes involved in binding of starch to the surface of *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J Bacteriol* 1992 ; 174 : 5609-16.
8. McCarthy RE, Salyers AA. Evidence that polygalacturonic acid is not an important substrate for *Bacteroides* species in the colon. *Appl Environ Microbiol* 1986 ; 52 : 9-16.
9. Wedeking KJ, Mansfield HR, Montgomery L. Enumeration and isolation of cellulolytic and hemicellulolytic bacteria from human feces. *Appl Environ Microbiol* 1988 ; 54 : 1530-5.
10. Betian HG, Linehan BA, Bryant MP, et al. Isolation of a cellulolytic *Bacteroides* sp. from human feces. *Appl Environ Microbiol* 1977 ; 33 : 1009-10.
11. Robert C, Bernalier-Donadille A. The cellulolytic microflora of the human colon: evidence of microcrystalline cellulose-degrading bacteria in methane-excreting subjects. *FEMS Microbiol Ecol* 2003 ; 46 : 81-9.
12. Salyers AA, Gherardini F, O'Brien M. Utilization of xylan by two species of human colonic *Bacteroides*. *Appl Environ Microbiol* 1981 ; 41 : 1065-8.
13. McCarthy RE, Kotarski SF, Salyers AA. Location and characteristics of enzymes involved in the breakdown of polygalacturonic acid by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J Bacteriol* 1985 ; 161 : 493-9.
14. Salyers AA, O'Brien M, Kotarski SF. Utilization of chondroitin sulfate by *Bacteroides thetaiotaomicron* growing in carbohydrate-limited continuous culture. *J Bacteriol* 1982 ; 150 : 1008-15.
15. Miller TL, Wolin MJ. Fermentation by saccharolytic intestinal bacteria. *Am J Clin Nutr* 1979 ; 32 : 164-72.
16. Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, et al. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 2002 ; 217 : 133-9.
17. Counotte GH, Prins RA, Janssen RHA, et al. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL- [2-13C] lactate in the rumen of dairy cattle. *Appl Environ Microbiol* 1981 ; 42 : 649-55.
18. Miller TL, Wolin MJ. Methanogens in human and animal intestinal tracts. *System Appl Microbiol* 1986 ; 7 : 223-9.
19. Colombel JF, Flourié B, Neut C, et al. La méthanogenèse chez l'homme. *Gastroenterol Clin Biol* 1987 ; 11 : 694-700.
20. Roediger WEW, Duncan A, Kapaniris O, et al. Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition: implication for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1993 ; 104 : 802-9.
21. Macfarlane GT, Gibson GR. Metabolic activities of the normal colonic flora. In : Gibson SAW, ed. *Human health. The contribution of microorganisms*. Londres : Springer-Verlag, 1994 : 17-52.
22. Wood HG, Ljungdahl LG. Autotrophic character of the acetogenic bacteria. In : Shively JM, Barton LL, eds. *Variations in autotrophic life*. San Diego : Academic Press, 1991 : 201-50.
23. Bernalier A, Lelait M, Rochet V, et al. Acetogenesis from H₂ and CO₂ by methane- and non-methane-producing human colonic bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol* 1996 ; 19 : 193-202.
24. Bernalier A, Rochet V, Leclerc M, et al. Diversity of H₂/CO₂-utilizing acetogenic bacteria from feces of non-methane-producing humans. *Curr Microbiol* 1996 ; 33 : 94-9.

25. Bernalier A, Willems A, Leclerc M, *et al.* *Ruminococcus hydrogenotrophicus* sp. nov, a new H₂/CO₂-utilizing acetogenic bacterium isolated from human feces. *Arch Microbiol* 1996 ; 166 : 176-83.
26. Kamlage B, Gruhl B, Blaut M. Isolation and characterization of two new homoacetogenic hydrogen-utilizing bacteria from the human intestinal tract that are closely related to *Clostridium coccoides*. *Appl Environ Microbiol* 1997 ; 63 : 1732-8.
27. Leclerc M, Bernalier A, Donadille G, *et al.* H₂/CO₂ metabolism in acetogenic bacteria isolated from the human colon. *Anaerobe* 1997 ; 3 : 307-15.
28. Leclerc M, Bernalier A, Lelait M, *et al.* ¹³C-NMR study of glucose and pyruvate catabolism in four acetogenic species isolated from the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 1997 ; 146 : 199-204.
29. Morrison M, Mackie RI. Biosynthesis of nitrogen-containing compounds. In : Mackie RI, White BA, eds. *Gastrointestinal microbiology, gastrointestinal ecosystems and fermentations*. New York : Chapman & Hall, 1997 : 424-69.
30. Baron SF, Hylemon PB. Biotransformation of bile acids, cholesterol and steroid hormones. In : Mackie RI, White BA, eds. *Gastrointestinal microbiology, gastrointestinal ecosystems and fermentations*. New York : Chapman & Hall, 1997 : 470-510.
31. Wilkins TD, Hackman AS. Two patterns of neutral steroid conversion in the feces of North Americans. *Cancer Res* 1974 ; 34 : 2250-4.
32. Pereira DIA, Gibson GR. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 2002 ; 68 : 4689-93.
33. Tannock GW, Dashkevich MP, Feighner SD. Lactobacilli and bile salt hydrolase in the murine intestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 1989 ; 55 : 1848-51.
34. White BA, Lipsky RL, Fricke RJ, *et al.* Bile acid induction specificity of 7 α - dehydroxylase activity in an intestinal *Eubacterium* sp. *Steroids* 1980 ; 35 : 103-9.
35. Van Eldere J, Robben J, De Prauw G, *et al.* Isolation and identification of intestinal steroid-desulfating bacteria from rats and humans. *Appl Environ Microbiol* 1988 ; 54 : 2112-7.



Flore intestinale et gaz intestinaux

Les bactéries du côlon produisent et consomment de larges quantités de gaz. La flore intestinale joue ainsi un rôle majeur dans l'homéostasie des gaz intestinaux, mais de nombreux aspects de la relation flore-gaz intestinaux demeurent inconnus. Ce chapitre traitera des aspects physiologiques de celle-ci, puis de son rôle dans la physiopathologie des symptômes attribuables aux gaz et de la pneumatose kystique intestinale. Deux excellentes revues consacrées à ce sujet pourront compléter cette lecture [1, 2].

Aspects physiologiques

On connaît peu de chose sur l'homéostasie des gaz intestinaux ; toutefois, ce phénomène semble être un processus finement régulé puisque différentes études menées avec différentes techniques et sur des populations variées ont montré que, malgré la très grande contenance du tractus gastro-intestinal, le volume total des gaz intraluminaux s'élève à seulement 100-200 mL [3-5]. La constance de ce volume à un niveau relativement bas est d'autant plus surprenante lorsque l'on tient compte des processus dynamiques et compliqués d'entrée et de sortie des gaz du tube digestif [1, 2]. L'entrée des gaz s'effectue lors de la déglutition, de réactions chimiques, de la diffusion à partir du sang et de la fermentation bactérienne. La sortie des gaz résulte de l'absorption et de l'excrétion respiratoire, de la consommation bactérienne et de l'évacuation anale (Figures 1 et 2).

Métabolisme des gaz

La déglutition introduit une petite quantité d'air dans l'estomac, qui est plus importante en cas d'absorption de boissons gazeuses (Figure 1). Contrairement à d'autres espèces, comme par exemple le chien, l'homme a invariablement dans l'estomac une petite poche d'air, d'environ 20 mL. On ne sait pas si cette poche d'air gastrique exerce ou non une fonction physiologique, comme par exemple un rôle de coussin pendant le processus d'accommodation gastrique. L'air en excès est éliminé de l'estomac par éructation, absorption ou vidange dans l'intestin. Les réactions chimiques de neutralisation des acides (HCl et acides gras) et des bases (HCO_3^-) se déroulant dans l'intestin proximal, produisent d'énormes quantités de gaz carbonique (CO_2) [6]. Les gaz intraluminaux tendent à s'équilibrer avec les gaz du sang veineux selon trois facteurs : la pression partielle de chaque gaz

des deux côtés de la barrière intestinale, sa capacité de diffusion et le temps d'exposition du gaz à la surface de diffusion, qui dépend de la vitesse de son transit [1, 7, 8]. Ainsi, des gaz fortement diffusibles présents en grandes quantités dans le tube digestif, tel que le dioxyde de carbone (CO_2), sont facilement absorbés. L'oxygène (O_2) provenant de l'air dégluti est également absorbé pour s'équilibrer avec sa pression partielle dans le sang. L'azote (N_2), provenant lui aussi de l'air dégluti, a une capacité de diffusion beaucoup plus faible.

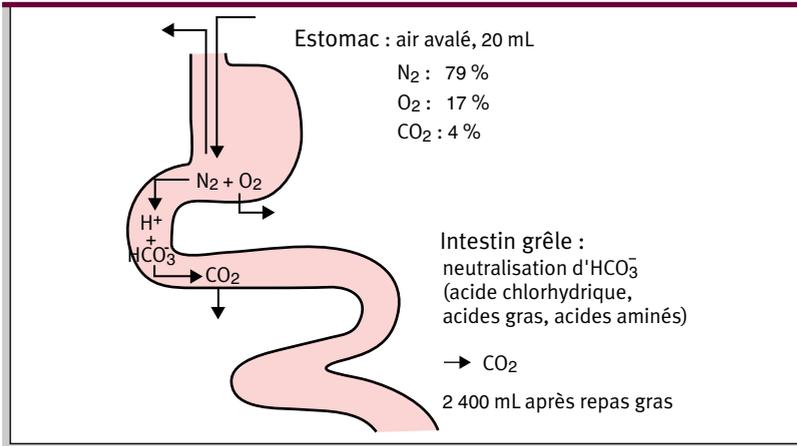


Figure 1.
Origine et devenir des gaz dans le tractus digestif supérieur

À la différence des processus précédents, le rôle de la microflore sur le métabolisme des gaz varie de façon très importante d'un individu à l'autre et constitue, par conséquent, le facteur déterminant du devenir des gaz intraluminaux. Deux types de flore sont importants : les micro-organismes qui produisent des gaz et ceux qui en consomment [1, 2] (Figure 2). La quantité et la composition des gaz produits et consommés par la flore dépendent de la répartition des micro-organismes selon les individus et les segments digestifs, coliques surtout.

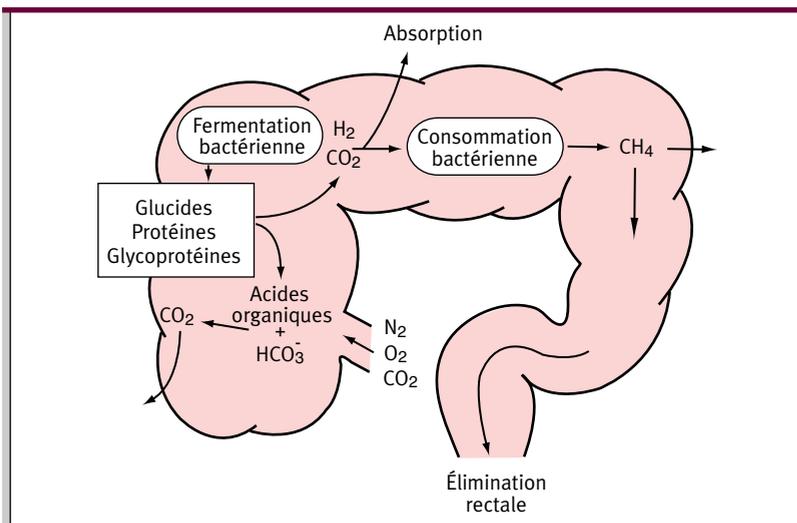
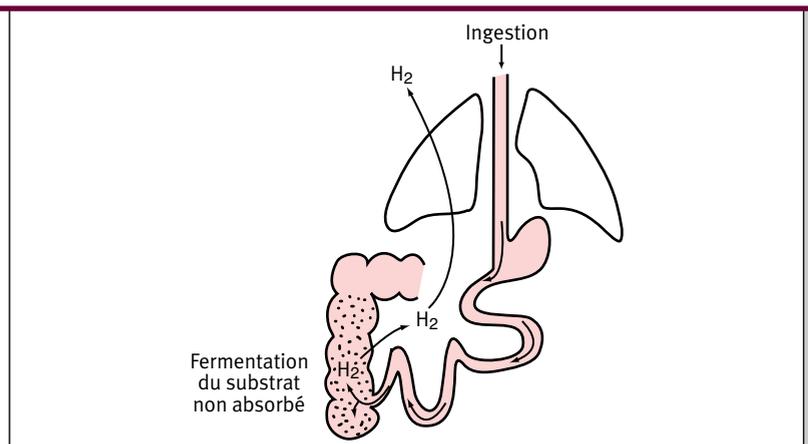


Figure 2.
Origine et devenir des gaz dans le côlon

La composition de la microflore colique est variable selon les individus et cette variabilité dépend des conditions d'environnement présentes précocement au cours de la vie. Par la suite, il semble également se produire des réactions adaptatives beaucoup plus limitées aux habitudes alimentaires [9, 10]. Ainsi, avec le même type de substrats, la quantité nette produite et la composition des gaz varient énormément selon les individus. Chez près de 90 % de l'ensemble de la population occidentale, la flore contient des bactéries qui fermentent différents substrats, particulièrement les glucides, en libérant de l'hydrogène (H_2) et du CO_2 [11-13]. La plupart des individus possèdent également des bactéries sulfato-réductrices [13]. Ces bactéries produisent de très petites quantités de gaz contenant du soufre (H_2S , méthaneitol, diméthyl-sulfure), qui sont fortement odorants. Il existe, chez environ 30 % à 50 % des individus, des bactéries méthanogènes qui ne se rencontrent à des concentrations élevées que dans le côlon gauche [13-16]. Les bactéries méthanogènes et sulfato-réductrices sont mutuellement exclusives, ce qui fait que ces dernières sont circonscrites au côlon droit chez les sujets possédant une flore méthanogène [13]. Une partie de la flore colique consomme les gaz intraluminaux, ce qui peut expliquer une grande partie de la disparition des gaz intraluminaux [13, 14, 17]. De fait, une partie de l'oxygène (O_2) atteignant le côlon est consommée par les bactéries aérobies coliques, réduisant ainsi le contenu intraluminal en O_2 dans le côlon et maintenant l'anaérobiose. L' H_2 , ainsi que le CO_2 , sont consommés en grandes quantités. Les bactéries acétogènes, méthanogènes et sulfato-réductrices sont en compétition vis-à-vis de l' H_2 [18]. Une fraction des gaz produits par les bactéries coliques diffuse dans le sang et est excrétée dans la respiration où elle peut être détectée par chromatographie en phase gazeuse [1]. Ce phénomène constitue la base des tests respiratoires à l' H_2 et au méthane (CH_4) (Figure 3). Les gaz restants sont éliminés par voie rectale. La composition des gaz intraluminaux varie beaucoup tout au long de l'intestin, et la composition des gaz évacués par voie rectale traduit l'équilibre entre les multiples processus se déroulant à l'intérieur de la lumière intestinale. Ainsi, l'étude de la composition des gaz rectaux permettrait de mieux comprendre la physiologie de la flore colique à différents niveaux de l'intestin [13].

Figure 3.
Principe
du test respiratoire
à l'hydrogène



Substrats à l'origine des gaz

La quantité totale de gaz à l'intérieur de l'intestin est assez constante et ne représente qu'une petite fraction des volumes réellement produits. L'homéostasie des gaz est finalement régulée par le transit et l'évacuation anale des gaz en excès. Chez différents sujets recevant la même alimentation, l'évacuation des gaz dépend de la composition de la microflore colique. Cependant, les différences intra-individuelles dépendent aussi de l'alimentation, en particulier des résidus alimentaires arrivant dans le côlon qui servent de substrats à la flore colique pour la production des gaz. Il est surprenant de voir la pauvreté des informations concernant les relations entre le métabolisme des gaz issus des résidus alimentaires et leur évacuation. Des études relativement anciennes [19, 20] ont mesuré l'évacuation anale de gaz après la consommation de différents types de repas et ont montré les valeurs suivantes : 15 mL par heure sous une alimentation pauvre en fibres, 93 mL par heure sous une alimentation normale, 140 mL par heure après consommation de choux de Bruxelles et 176 mL par heure en cas d'alimentation à base de porc et de haricots secs. Une étude plus récente a mesuré l'évacuation anale des gaz pendant 24 heures et a montré qu'une alimentation normale contenant 200 g de haricots secs entraînait une évacuation de 705 mL de gaz, dont 50 % sous forme d' H_2 , tandis qu'un régime sans fibres était associé à une évacuation de 214 mL de gaz, avec une très faible teneur en H_2 [21].

L'observation systématique et méthodique d'un patient produisant de grandes quantités de gaz rectaux a permis d'élaborer une classification des aliments en fonction de leur capacité à produire des gaz [22]. Très peu d'autres études contrôlées sur des aliments spécifiques sont apparues par la suite pour compléter ces informations [23-25]. Les aliments fortement flatogéniques comprennent les haricots secs, les choux de Bruxelles, les oignons, le céleri, les carottes, les raisins secs, les bananes, le jus de pruneau, les abricots, le germe de blé et les beignets. Parmi les aliments modérément flatogéniques, citons les pommes de terre, les aubergines, les agrumes, les pommes, les pâtes et le pain. En revanche, la viande, la volaille, le poisson, les œufs, le riz, les frites de maïs, le pop-corn, certains légumes comme la laitue, la tomate, l'avocat, le brocoli, le chou-fleur, l'asperge, certains fruits comme les cerises, le raisin, le cantaloup, les noisettes et, enfin, le chocolat produisent peu de gaz.

Le dosage de l' H_2 dans les gaz expirés est une autre façon d'étudier la capacité des aliments à produire des gaz. La teneur en H_2 des gaz expirés reste extrêmement stable durant le jeûne, mais augmente quand la microflore colique fermente des substrats libérant de l' H_2 , facilement absorbé et excrété par la respiration. La chromatographie en phase gazeuse permet d'analyser de faibles augmentations (en partie par million) de la concentration en H_2 . Cette méthode a permis de démontrer que, dans les conditions normales, il existe une absorption incomplète de certains composants alimentaires qui passent dans le côlon où ils sont fermentés, le volume de gaz produit dépendant de la microflore individuelle [26-28].

Les aliments glucidiques conduisant à la production de gaz dans le côlon peuvent être classés de la façon suivante :

- certaines fibres alimentaires, telles que les xylanes et la pectine, sont fermentescibles et produisent des gaz, tandis que des fibres non fermentables, telles que la cellulose et le son de maïs, n'en produisent pas [24, 29] ;
- une proportion significative (10 % à 30 %) de l'amidon ingéré échappe à l'absorption dans l'intestin grêle et contribue à la production de gaz dans le côlon ; par exemple, l'amidon des macaronis et du pain blanc est incomplètement absorbé, tandis que l'absorption de l'amidon du pain à base de farine pauvre en gluten ou de farine de riz est complète dans l'intestin grêle [26] ;
- certains oligosaccharides, tels que le raffinose et le stachyose, semblent être la source de gaz la plus importante des haricots secs car ils ne sont pas absorbés dans l'intestin grêle [20, 25, 30] ;
- certains sucres, tels que le sorbitol et le fructose, sont également incomplètement absorbés et fermentent dans le côlon [31, 32] ;
- d'autres composants d'un repas normal exercent un rôle modulateur sur l'absorption ; par exemple, les haricots secs contiennent une protéine qui inhibe l'amylase pancréatique et contribue ainsi à la malabsorption des glucides [33-36]. Enfin, on a décrit des interactions entre les différents composants alimentaires ; par exemple, les fibres majorent la malabsorption de l'amidon [37].

Transit et tolérance des gaz intestinaux

Malgré des variations inter- et intra-individuelles dans la production de gaz, la quantité totale de gaz dans l'intestin reste constante et basse, grâce à des processus régulés de propulsion et d'évacuation. Il est important de garder à l'esprit que le transit gazeux détermine le temps d'exposition pour la diffusion des gaz intraluminaux à travers la barrière intestinale, aussi bien que pour la consommation bactérienne, et peut donc influencer la composition finale des gaz évacués par voie rectale [38]. Nous avons mesuré le transit et la tolérance des gaz intestinaux au moyen d'une épreuve de provocation gazeuse qui consiste à perfuser dans le jéjunum un mélange de gaz dont les proportions sont les mêmes que celles du sang veineux afin de minimiser l'absorption, et à mesurer leur évacuation anale [39] (Figure 4).

Une étude dose-réponse a montré que la plupart des sujets sains propulsent et évacuent sans symptôme la quantité de gaz perfusée jusqu'à 30 mL/min [39]. Le transit gazeux est donc finement adapté à toute charge de gaz intestinaux. Ce transit résulte de l'activité motrice de l'intestin : le glucagon, qui inhibe l'activité motrice, produit une rétention gazeuse [40], alors qu'il a été démontré que la néostigmine, dotée de puissants effets prokinétiques, permet l'élimination des gaz en cas de rétention [41]. Toutefois, le type d'activité motrice qui détermine le transit gazeux n'est pas connu. La perfusion de gaz n'induit pas de modifications détectables de la motricité de l'intestin grêle enregisttable par manométrie [42]. À l'opposé, les expériences préliminaires menées au moyen d'un barostat suggèrent que la perfusion de gaz induit des modifications du tonus : une contraction en amont du site d'administration et une relaxation en aval [43]. Il se peut ainsi que des variations de l'activité tonique et de la capacitance de l'intestin soient responsables de mouvements et de déplacements de larges masses de gaz de faible résistance.

Le transit des gaz est régulé par différents réflexes intestinaux [44]. Les lipides intraluminaux retardent de façon dose-dépendante le transit des gaz et entraînent la rétention des gaz exogènes [45]. Les lipides semblent plus efficaces lorsqu'ils sont perfusés dans l'iléon plutôt que dans le duodénum, ce qui est en accord avec le mécanisme du frein iléal qui régule le transit du chyme solide/liquide [46]. À l'opposé, d'autres réflexes accélèrent la vitesse du transit des gaz. Par exemple, la distension gastrique produit une évacuation immédiate des gaz endogènes présents dans le tube digestif et accélère le transit des gaz exogènes, ce qui suggère la mise en jeu de réflexes gastrocoliques [44]. Ce phénomène semble toutefois généralisé au tube digestif, car la distension à différents niveaux de l'intestin, tels que le duodénum ou le rectum, produit le même effet stimulateur [43]. De plus, la distension focale de l'intestin prévient l'effet inhibiteur des lipides [43]. On peut supposer que, dans des conditions physiologiques, différents types de réflexes interagissent pour produire un effet final net. Grâce à ses effets sur la motilité intestinale, la microflore colique pourrait jouer un rôle important dans cette régulation (*voir le chapitre « Flore et motricité coliques »*) ; cependant, l'effet intime de la microflore sur la propulsion des gaz demeure inconnu à ce jour.

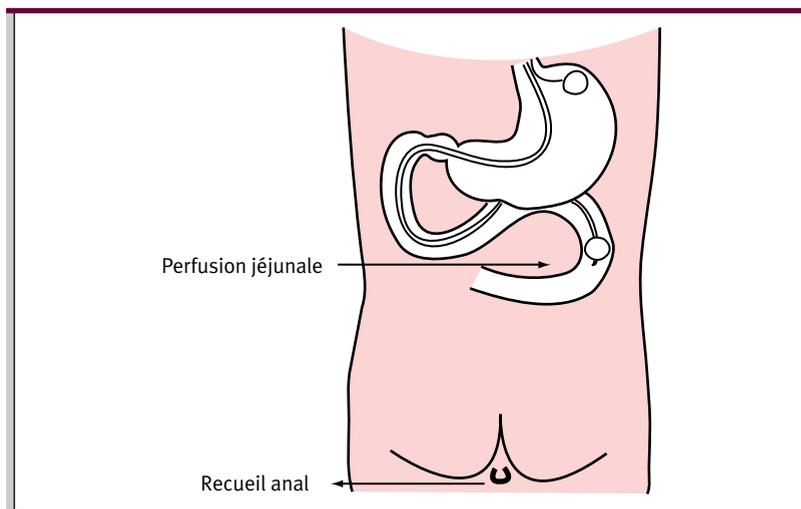


Figure 4.
*Épreuve
de provocation gazeuse*

Symptômes attribuables aux gaz

Les symptômes reliés aux gaz (« gazeux ») peuvent être associés à différentes pathologies, telles que la malabsorption globale ou sélective (lactose surtout) au cours de laquelle des quantités excessives de substrats échappent à l'absorption dans l'intestin grêle et sont fermentés dans le côlon, ou la colonisation bactérienne du grêle dans laquelle les bactéries colonisent des territoires où les nutriments sont normalement digérés. Dans ces conditions, les symptômes gazeux constituent seulement une manifestation latérale et, de ce fait, n'ont qu'un intérêt limité. Le véritable problème, en

pratique clinique, est représenté par les patients sans anomalies détectables de l'absorption par les tests conventionnels et qui se plaignent de symptômes gazeux. Ces symptômes entrent dans la catégorie des troubles fonctionnels gastro-intestinaux et constituent le sujet principal de ce chapitre [47].

Manifestations cliniques

Les symptômes gazeux peuvent être observés dans différentes situations au cours desquelles le patient considère que ce qu'il ressent est imputable aux gaz.

ructation

Dans la partie supérieure des voies digestives, les troubles attribués aux gaz sont habituellement des symptômes dyspeptiques qui induisent des efforts d'éructation. Au cours de ceux-ci, le patient avale de l'air et, de ce fait, accentue le désagrément qui est finalement atténué par l'éructation, ce qui confirme la fausse impression du patient que ses symptômes sont liés à la présence de gaz en excès dans l'estomac [1, 48]. On peut habituellement soulager ces patients en leur apprenant à contrôler la déglutition d'air, mais les symptômes dyspeptiques de base peuvent persister. Ce type de symptôme gazeux n'est en aucun cas lié à la microflore digestive.

vacuation excessive ou malodorante de gaz

Les symptômes généralement liés aux gaz produits par la microflore concernent habituellement la partie basse de l'intestin. Certains patients signalent une mauvaise odeur de leurs gaz, ce qui peut devenir handicapant sur le plan social. Comme indiqué plus haut, l'odeur dépend d'éléments-traces, comme les gaz contenant du soufre et d'autres composants non encore identifiés [13, 49]. D'autres patients se plaignent d'une évacuation excessive de gaz. Le nombre normal d'évacuations gazeuses par jour chez le sujet sain varie en fonction des facteurs décrits plus haut, mais se situe habituellement autour d'une vingtaine par jour [50]. L'épreuve de provocation gazeuse a montré que le nombre d'évacuations dépend du débit gazeux, tandis que le volume par évacuation reste assez constant, autour de 50 mL [40]. L'évacuation excessive de gaz, associée ou non à une mauvaise odeur, est liée à l'interaction entre les substrats atteignant le côlon et la microflore. L'évacuation excessive pourrait aussi être liée à un défaut de l'absorption des gaz dans le sang [22, 51].

Les patients se plaignent de mauvaise odeur et/ou d'évacuation excessive de gaz bénéficient habituellement d'un régime excluant les aliments producteurs de gaz. Après une semaine de « régime sans gaz », ils présentent habituellement une nette amélioration. Une réintroduction méthodique des aliments peut leur apprendre ultérieurement à identifier les composants alimentaires en cause. Ces patients doivent connaître le prix à payer pour chaque type de repas et décider si le jeu en vaut la chandelle. Il ne faut pas non plus méconnaître une phobie des gaz, bien plus fréquente que leur anomalie, et qui ne doit pas être traitée par des régimes d'exclusion abusifs.

Retention de gaz, ballonnement et distension abdominale

Il s'agit là d'un problème plus compliqué, d'origine obscure, mais probablement lié à la motricité digestive et à la perception intestinale. Les

plaintes de rétention gazeuse et de distension abdominale sont habituellement associées au syndrome de l'intestin irritable (SII) ou à un ballonnement fonctionnel [47]. En dehors de rares cas d'aérophagie vraie, déglutition excessive d'air se traduisant par la prédominance de N₂ dans les gaz anaux, deux mécanismes physiopathologiques ont été proposés pour expliquer cette symptomatologie : une production gazeuse excessive, due à une malabsorption ou à une fermentation colique anormale, et une altération dans la disponibilité (« *handling* ») intestinale des gaz. Un diagnostic différentiel est celui de la protrusion abdominale par insuffisance pariétale ou hyperlordose.

Production excessive de gaz

Dans ce contexte, le rôle de la malabsorption de nutriments demeure incertain car, bien que certaines études aient montré que les patients atteints de SII pouvaient présenter une capacité réduite à absorber certains substrats (par exemple le lactose) [52-54], d'autres études n'ont pas confirmé ces résultats [55, 56]. Les tests respiratoires peuvent alors fournir des informations intéressantes. L'effet des régimes d'exclusion a aussi été apprécié et les résultats ne sont pas non plus unanimes [57]. De plus, l'effet délétère des aliments en cause pourrait ne pas être nécessairement lié à leur fermentation, mais plutôt à d'autres mécanismes physiopathologiques. L'effet des fibres alimentaires est un bon exemple dans ce contexte. Certains patients atteints du SII ont un apport important en fibres alimentaires qui peut augmenter les fermentations coliques d'autres substrats et la production de gaz. Il a été confirmé que les fibres pouvaient avoir des effets délétères sur les symptômes du SII [58] et il est clair que la réduction de l'apport en fibres entraîne un réel bénéfice en cas de surcharge. Une étude intéressante a montré que, chez des sujets exposés aux mêmes substrats non absorbables, la production colique de gaz était plus importante chez les patients atteints du SII que chez les sujets sains, ce qui suggère la présence d'une dysbactériose colique chez les premiers [59]. Cependant, une production intestinale de gaz accrue, qu'elle soit due à une malabsorption ou à une dysbactériose, n'expliquerait pas les symptômes, car la plupart des sujets en bonne santé propulsent et évacuent de très grandes quantités de gaz sans en avoir conscience [39].

Altération dans la disponibilité intestinale des gaz

Les données ci-dessus suggèrent qu'une altération dans la disponibilité des gaz et une tolérance diminuée à ceux-ci sont les mécanismes clefs sous-tendant les symptômes attribuables aux gaz. Ces mécanismes pourraient être associés ou non à une production accrue de gaz. Il est intéressant de noter qu'une petite proportion des sujets sains présente une altération de la disponibilité des gaz et une perception accrue de ces derniers [39]. Si cette proportion de sujets sains était soumise à une surcharge gazeuse, des symptômes seraient alors ressentis [39]. Ainsi, l'augmentation de la production de gaz coliques, expérimentalement induite par une perfusion directe d'amidon dans le côlon, entraîne des symptômes abdominaux chez seulement une fraction des sujets sains [60]. Un effet similaire peut être observé dans le cas d'une malabsorption expérimentale induite par des inhibiteurs de l'amylase [34].

L'épreuve de provocation gazeuse a montré que, chez les patients se plaignant de ballonnement abdominal inexplicable accompagnant un SII ou un ballonnement fonctionnel, le transit et la tolérance des gaz intestinaux sont

altérés [44, 45]. Ces patients retiennent les gaz et/ou ressentent une gêne abdominale reproduisant leurs symptômes habituels en réponse à des charges intestinales de gaz bien tolérées par des sujets sains. Durant ces expériences, les patients présentent également une distension abdominale objective, corrélée avec le volume de gaz retenu. Toutefois, le mécanisme de la distension n'est pas clair et, bien que le fait ne soit pas démontré, il pourrait mettre en jeu des réflexes viscéro-somatiques [61, 62].

Mécanisme de la rétention gazeuse

Chez la plupart des patients rapportant un ballonnement, la rétention de gaz ainsi que la symptomatologie ont été les mêmes au cours de l'épreuve de provocation gazeuse, que le gaz soit collecté par une canule externe ou par une canule intrarectale court-circuitant la barrière anale [4]. Toutefois, il existe vraisemblablement une petite fraction de patients chez lesquels le sphincter anal joue un rôle majeur dans la rétention gazeuse. L'évacuation rectale s'accomplit habituellement par une légère contraction abdominale associée à une relaxation anale. Chez certains patients, cette coordination ne se produit pas et le sphincter ne se relâche pas [63]. Il apparaît des symptômes abdominaux, probablement liés à une rétention fécale avec une durée de fermentation accrue, et peut-être également à une évacuation de gaz altérée. Cette incoordination anale peut être traitée par *biofeedback* et les symptômes abdominaux cèdent parfois à la suite de la correction de la rétention.

Le mécanisme de la rétention gazeuse dans les autres conditions pathologiques n'est pas connu mais, chez les sujets sains, deux mécanismes semblent intervenir : une résistance accrue au flux des gaz, modélisée par l'évacuation gazeuse anale autocontrainte, et une altération de la propulsion intestinale produite par une inhibition motrice induite par le glucagon [40]. En utilisant l'épreuve de provocation gazeuse, nous avons montré que la rétention gazeuse induite par une propulsion altérée était bien tolérée et n'entraînait pas de symptômes, alors que le même volume de rétention produit par une résistance accrue au flux de gaz était associé à des symptômes abdominaux significatifs. Une rétention gazeuse symptomatique dans des conditions pathologiques pourrait donc être liée à une incoordination de la motricité plutôt qu'à une réduction de la propulsion.

Des données supplémentaires indiquent qu'une altération du transit des gaz chez des patients présentant un météorisme inexpliqué est le résultat d'un contrôle réflexe anormal. Il a été montré que l'effet freinateur des lipides est exagéré chez ces patients, tandis que l'effet stimulant de la distension est nettement altéré [43, 45]. L'épreuve de provocation gazeuse, en conjonction avec l'administration intraluminaire de lipides, permet une distinction nette entre les patients et les sujets sains : les premiers retiennent de larges volumes de gaz et/ou rapportent des symptômes, indiquant que la propulsion gazeuse serait inefficace et/ou symptomatique [45]. En cas de troubles fonctionnels digestifs, les symptômes attribuables aux gaz sont traditionnellement traités par des antispasmodiques, avec des résultats inconsistants. La néostigmine a été récemment utilisée pour évaluer les effets potentiels d'une stimulation prokinétique sur la rétention intestinale de gaz et la symptomatologie chez des patients atteints du SII. L'épreuve de provocation gazeuse a montré que, chez des patients atteints du SII et de ballonnement fonctionnel, la rétention d'une surcharge de gaz était efficacement normalisée par l'administration de

néostigmine, cette diminution étant associée à une amélioration de la distension abdominale et de la perception des symptômes [41].

Distribution des gaz intestinaux

En opposition apparente avec les données présentées ci-dessus, Levitt *et al.* ont précédemment montré, au cours d'une série d'études réalisées dans les années 1970, que la quantité et la composition des gaz intestinaux chez les patients atteints du SII étaient identiques à celles de sujets sains [64]. Au cours de ces études, ces auteurs ont mesuré les gaz au moyen de techniques de lavage, en perfusant de l'argon dans l'intestin grêle à un débit relativement élevé, puis en récupérant les gaz au niveau rectal. Les études utilisant des techniques d'imagerie n'ont pas non plus montré d'accumulation importante de gaz intestinaux chez des patients souffrant du SII [62-66]. Certaines des études ont toutefois été réalisées pendant une période de jeûne alors que, chez ces patients, le météorisme abdominal et la distension s'aggravent habituellement dans le courant de la journée et avec la consommation des repas. De plus, les études avec épreuve de provocation gazeuse suggèrent que la quantité de gaz requise pour déclencher les symptômes chez ces patients pourrait être relativement faible, et donc indétectable par ces techniques [4]. Ce ne serait donc peut-être pas tant le surplus de gaz mais une distribution anormale des gaz qui serait responsable du météorisme abdominal.

Des études récentes ont montré que des volumes identiques de gaz induisaient des symptômes significatifs dans le grêle mais pas dans le côlon [67]. De plus, chez les patients atteints du SII, une rétention du gaz survient lorsqu'une surcharge est réalisée dans le jéjunum, mais pas dans l'iléon ni dans le cæcum, ce qui signifie que l'intestin grêle est le site de la rétention [68]. Une propulsion inefficace et une rétention jéjunale de gaz sont associées à la symptomatologie mais, fait intéressant, l'infusion distale de gaz entraîne une perception similaire, malgré l'absence de rétention, suggérant une propulsion mal coordonnée et symptomatique [68]. On peut concevoir que de petites bulles de gaz poussées contre des barrières de haute résistance puissent accroître la tension de la paroi intestinale et déclencher certains symptômes. De plus, si plusieurs bulles sont piégées à différents niveaux, des phénomènes de sommation spatiale pourraient majorer la perception [69]. De façon alternative, on peut aussi supposer que le facteur déclenchant du météorisme ne serait pas les gaz, mais un autre élément du contenu intestinal [70]. Néanmoins, les études sur le transit des gaz, chez les patients présentant un météorisme inexplicé, ont mis en évidence une altération de la motricité associée à une perception accrue qui, d'une façon ou d'une autre, joue probablement un rôle physiopathologique sur les symptômes abdominaux.

Pneumatose kystique intestinale

La pneumatose kystique de l'intestin se caractérise par la présence de bulles gazeuses dans la paroi intestinale [71, 72] (Figure 5). Cette affection peut concerner différents territoires du grêle et du côlon. Les patients sont habituellement asymptomatiques, mais il arrive qu'un kyste se rompe et provoque un pneumopéritoine spontané qui évolue généralement sans incident notable.

Le facteur initiateur de cette affection est l'apparition de petites bulles de gaz dans la paroi de l'intestin. Différents mécanismes ont été avancés, tels qu'une infiltration bactérienne de la paroi intestinale ou une dissection gazeuse de déchirures muqueuses [73]. Chez des sujets par ailleurs en bonne santé, une fois que le mécanisme initiateur disparaît, les gaz se trouvant dans le kyste sont lentement absorbés dans le sang pour équilibrer leurs pressions partielles. Cependant, chez les patients présentant une pneumatose kystique, il

Figure 5.
Aspect endoscopique d'une pneumatose kystique colique.
(cliché A. Bitoun, Hôpital Lariboisière, Paris.
Traité de Gastro-entérologie, 2000,
J.C. Rambaud, ed. Médecine-Sciences Flammarion)



existe un autre facteur responsable de la persistance et de l'augmentation de volume de ces bulles.

L'augmentation de la teneur en H_2 de la lumière intestinale, détectée par le test respiratoire, est une caractéristique fréquemment observée chez les patients présentant une pneumatose kystique [74]. La cause de cet excès d' H_2 est un déséquilibre entre la microflore produisant l' H_2 et celle consommant l' H_2 dans la région affectée. Par exemple, chez les patients présentant une pneumatose kystique du côlon, on a noté une diminution du nombre des bactéries consommant de l' H_2 , bactéries méthanogènes ou bactéries sulfato-réductrices [75]. Chez d'autres patients présentant une pneumatose kystique du grêle, il a été mis en évidence une colonisation de l'intestin grêle par une flore produisant de l' H_2 en l'absence du composant le consommant, alors que des bactéries méthanogènes consommant normalement de l' H_2 étaient présentes dans le côlon [73].

Le mécanisme par lequel l'augmentation de l' H_2 intraluminal entraîne la formation de la pneumatose kystique demeure flou, mais une hypothèse a été récemment proposée [73]. Si la teneur en H_2 est élevée dans l'intestin, la pression partielle d' H_2 dans la muqueuse sera aussi élevée et empêchera ainsi la réabsorption de l'hydrogène à partir du kyste. Pour équilibrer la pression partielle des gaz entre le sang et les kystes, le N_2 , le CO_2 et l' O_2 vont diffuser du sang vers les kystes, multipliant plusieurs fois le volume intrakystique. On a obtenu la disparition de kystes en faisant appel à des moyens qui diminuent la concentration intraluminaire d' H_2 , tels que des régimes pauvres en résidus ou des antibiotiques [71, 72]. On peut également utiliser l'inhalation d'air enrichi en oxygène, c'est-à-dire d'un air dont la pression partielle en oxygène est augmentée et la pression partielle en azote diminuée [71, 72]. Du fait de

Points clés

- La fermentation de résidus alimentaires dans le côlon par des bactéries coliques est une source majeure de production de gaz. Les gaz produits sont absorbés dans le sang ou consommés par les bactéries coliques, le reste étant évacué par voie rectale.
- L'évacuation excessive ou malodorante de gaz dépend des résidus alimentaires arrivant dans le côlon et de la composition de la flore colique. Étant donné que cette dernière est hautement individuelle, le traitement de ces symptômes repose sur une alimentation peu flatogénique.
- Chez certains patients se plaignant de ballonnement et de distension abdominale, la relaxation anale est déficiente pendant la tentative d'évacuation, ce qui peut entraîner une rétention gazeuse. La rétention fécale chez ces patients pourrait également contribuer à accroître la production de gaz, en raison d'une durée de fermentation prolongée.
- De récentes données indiquent que chez une large proportion des patients présentant un ballonnement, il existe des altérations du transit et de la tolérance des gaz intestinaux. Certaines données indiquent que ces altérations pourraient être imputables à un désordre sensori-moteur de l'intestin grêle.
- La pneumatose kystique se caractérise par la présence de bulles de gaz à l'intérieur de la paroi intestinale. Ce trouble semble lié à une altération de la dynamique de la diffusion des gaz entre la lumière intestinale et le sang. La résorption des kystes peut être obtenue par des mesures diététiques ou une antibiothérapie destinées à diminuer la teneur intestinale en H_2 ou par inhalation d'air enrichi en O_2 pour réduire la pression partielle de N_2 dans le sang.

sa pression partielle sanguine diminuée, le N₂, qui est le composant gazeux principal du kyste, est réabsorbé, le kyste rétrécit progressivement et disparaît en une période de quelques jours.

Références

1. Strocchi A, Levitt MD. Intestinal gas. In : Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH, eds. *Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology/diagnosis/management*, 6th ed. Philadelphia, PA : WB Saunders, 1998 : 153-60.
2. Cloarec D, Flourié B, Marteau P, *et al.* Les gaz digestifs : aspects physiopathologiques et thérapeutiques au cours des troubles fonctionnels. *Gastroenterol Clin Biol* 1990 ; 14 : 641-50.
3. Levitt MD. Volume and composition of human intestinal gas determined by means of an intestinal washout technic. *N Engl J Med* 1971 ; 284 : 1394-8.
4. Serra J, Azpiroz F, Malagelada JR. Impaired transit and tolerance of intestinal gas in the irritable bowel syndrome. *Gut* 2001 ; 48 : 14-9.
5. Bedell GN, Marshall R, Dubois AB, *et al.* Measurement of the volume of gas in the gastro-intestinal tract: values in normal subjects and ambulatory patients. *J Clin Invest* 1956 ; 35 : 336-45.
6. Fordtran JS, Morawski SG, Santa Ana CA, *et al.* Gas production after reaction of sodium bicarbonate and hypochloric acid. *Gastroenterology* 1984 ; 87 : 1014-21.
7. Foster RE. Physiological basis of gas exchange in the gut. *Ann N Y Acad Sci* 1968 ; 150 : 4-12.
8. Pogrand RS, Steggerda FR. Influence of gaseous transfer between the colon and blood stream on percentage gas compositions of intestinal flatus in man. *Am J Physiol* 1948 ; 153 : 475-82.
9. Scheppach W, Fabian C, Ahrens F. Effect of starch malabsorption on colonic function and metabolism in humans. *Gastroenterology* 1988 ; 1549-55.
10. Stephen AM, Cummings JH. Mechanism of action of dietary fibre in the human colon. *Nature* 1980 ; 284 : 283-4.
11. Levitt MD, Bond JH. Volume, composition, and source of intestinal gas. *Gastroenterology* 1970 ; 59 : 921-9.
12. Levitt MD. Intestinal gas production - recent advances in flatology. *N Engl J Med* 1980 ; 302 : 1474-5.
13. Suarez F, Furne J, Springfield J, *et al.* Insights into human colonic physiology obtained from the study of flatus composition. *Am J Physiol* 1997 ; G1028-33.
14. Strocchi A, Levitt MD. Factors affecting hydrogen production and consumption by human fecal flora. The critical roles of hydrogen tension and methanogenesis. *J Clin Invest* 1992 ; 89 : 1304-11.
15. Flourié B, Pellier P, Florent C, *et al.* Site and substrates for methane production in human colon. *Am J Physiol* 1991 ; 260 : G752-7.
16. Kajs TM, Fitzgerald JA, Buckner RY, *et al.* Influence of a methanogenic flora on the breath H₂ and symptom response to ingestion of sorbitol or oat fiber. *Am J Gastroenterol* 1997 ; 92 : 89-94.
17. Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT, *et al.* Alternative pathways for hydrogen disposal during fermentation in the human colon. *Gut* 1990 ; 31 : 679-83.
18. Strocchi A, Furne J, Ellis C, *et al.* Methanogens outcompete sulphate reducing bacteria for H₂ in the human colon. *Gut* 1994 ; 35 : 1098-101.
19. Kirk E. The quantity and composition of human colonic flatus. *Gastroenterology* 1949 ; 12 : 782-94.
20. Steggerda FR. Gastrointestinal gas following food consumption. *Ann N Y Acad Sci* 1968 ; 150 : 57-66.
21. Tomlin J, Lowis C, Read NW. Investigation of normal flatus production in healthy volunteers. *Gut* 1991 ; 32 : 665-9.
22. Sutalf LO, Levitt MD. Follow-up of a flatulent patient. *Dig Dis Sci* 1979 ; 24 : 652-4.
23. Hickey C, Calloway D, Murphy E. Intestinal gas production following ingestion of fruits and fruit juice. *Am J Dig Dis* 1972 ; 17 : 383-9.
24. Wolever TM, Robb PA. Effect of guar, pectin, psyllium, soy polysaccharide, and cellulose on breath hydrogen and methane in healthy subjects. *Am J Gastroenterol* 1992 ; 87 : 305-10.

25. Wagner JR, Carson JF, Becker R, *et al.* Comparative flatulence activity of beans and bean fractions for man and the rat. *J Nutr* 1977 ; 107 : 680-9.
26. Anderson IH, Levine AS, Levitt MD. Incomplete absorption of the carbohydrate in all-purpose wheat flour. *N Engl J Med* 1981 ; 304 : 891-2.
27. Levitt MD, Hirsh P, Fetzer CA, *et al.* H₂ excretion after ingestion of complex carbohydrates. *Gastroenterology* 1987 ; 92 : 383-9.
28. Flourie B, Leblond A, Florent C, *et al.* Starch malabsorption and breath gas excretion in healthy humans consuming low- and high-starch diets. *Gastroenterology* 1988 ; 95 : 356-63.
29. Grimble G. Fibre, fermentation, flora, and flatus. *Gut* 1989 ; 30 : 6-13.
30. Steggerda FR, Dimmick JF. Effects of bean diets on concentration of carbon dioxide in flatus. *Am J Clin Nutr* 1966 ; 19 : 120-4.
31. Stone-Dorshow T, Levitt MD. Gaseous response to ingestion of a poorly absorbed fructo-oligosaccharide sweetener. *Am J Clin Nutr* 1987 ; 46 : 61-5.
32. Wursch P, Koellreutter B, Schweizer TF. Hydrogen excretion after ingestion of five different sugar alcohols and lactulose. *Eur J Clin Nutr* 1989 ; 43 : 819-25.
33. Brugge WR, Rosenfeld MS. Impairment of starch absorption by a potent amylase inhibitor. *Am J Gastroenterol* 1987 ; 82 : 718-22.
34. Boibin M, Flourié B, Rizza RA, *et al.* Gastrointestinal and metabolic effects of amylase inhibition in diabetics. *Gastroenterology* 1998 ; 1988 :387-94.
35. Taylor RH, Barker HM, Bowey EA, *et al.* Regulation of the absorption of dietary carbohydrate in man by two new glycosidase inhibitors. *Gut* 1986 ; 27 : 1471-8.
36. Layer P, Zinsmeister AR, DiMagno EP. Effects of decreasing intraluminal amylase activity on starch digestion and postprandial gastrointestinal function in humans. *Gastroenterology* 1986 ; 91 : 41-8.
37. Hamberg O, Rumessen JJ, Gudmand-Hoyer E. Inhibition of starch absorption by dietary fibre. A comparative study of wheat bran, sugar-beet fibre, and pea fibre. *Scand J Gastroenterol* 1989 ; 24 : 103-9.
38. El Oufir L, Flourie B, Bruley des Varannes S, *et al.* Relations between transit time, fermentation products, and hydrogen consuming flora in healthy humans. *Gut* 1996 ; 30 : 870-7.
39. Serra J, Azpiroz F, Malagelada JR. Intestinal gas dynamics and tolerance in humans. *Gastroenterology* 1998 ; 115 : 542-50.
40. Serra J, Azpiroz F, Malagelada JR. Mechanisms of intestinal gas retention in humans: impaired propulsion *versus* obstructed evacuation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001 ; 281 : G138-43.
41. Caldarella MP, Serra J, Azpiroz F, Malagelada JR. Prokinetic effects of neostigmine in patients with intestinal gas retention. *Gastroenterology* 2002 ; 122 : 1748-55.
42. Galati JS, McKee DP, Quigley EM. Response to intraluminal gas in irritable bowel syndrome. Motility *versus* perception. *Dig Dis Sci* 1995 ; 40 : 1381-7.
43. Harder H, Serra J, Azpiroz F, *et al.* Reflex control of intestinal gas dynamics and tolerance. *Gastroenterology* 2000 ; 118 : A689.
44. Serra J, Azpiroz F, Malagelada JR. Gastric distension and duodenal lipid infusion modulate intestinal gas transit and tolerance in humans. *Am J Gastroenterol* 2002 ; 97 : 2225-30.
45. Serra J, Salvioli B, Azpiroz F, *et al.* Lipid-induced intestinal gas retention in the irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002 ; 123 : 700-6.
46. Passos MC, Serra J, Azpiroz F, *et al.* Impaired reflex control of intestinal gas propulsion in patients with abdominal bloating. *Gastroenterology* 2002 ; 122 : A549.
47. Thompson WG, Longstreth G, Drossman DA, *et al.* Functional bowel disorders. Functional abdominal pain. In : Drossman DA, Corazziari E, Talley NJ, Thompson WG, Whitehead WE, eds. *The functional gastrointestinal disorders*. 2nd ed. Mc Lean, VA : Degnon Associates, 2000 : 351-432.
48. Bond JH, Levitt MD. Gaseousness and intestinal gas. *Med Clin North Am* 1978 ; 62 : 155-64.
49. Suarez FL, Springfield J, Levitt MD. Identification of gases responsible for the odour of human flatus and evaluation of a device purported to reduce this odour. *Gut* 1998 ; 43 : 100-4.
50. Furne JK, Levitt MD. Factors influencing frequency of flatus emission by healthy subjects. *Dig Dis Sci* 1996 ; 41 : 1631-5.

51. Levitt MD, Lasser RB, Schwartz JS, *et al.* Studies of a flatulent patient. *N Engl J Med* 1976 ; 295 : 260-2.
52. Rumessen JJ, Gudmand-Hoyer E. Functional bowel disease: malabsorption and abdominal distress after ingestion of fructose, sorbitol, and fructose-sorbitol mixtures. *Gastroenterology* 1988 ; 95 : 694-700.
53. Fernandez-Banares F, Esteve-Pardo M, de Leon R, *et al.* Sugar malabsorption in functional bowel disease: clinical implications. *Am J Gastroenterol* 1993 ; 88 : 2044-50.
54. Symons P, Jones MP, Kellow JE. Symptom provocation in irritable bowel syndrome. Effects of differing doses of fructose-sorbitol. *Scand J Gastroenterol* 1992 ; 27 : 940-4.
55. Afdhal NH, Piggott C, Long AA, *et al.* Carbohydrate handling by colonic flora - is it pathogenic in the irritable bowel syndrome? *Ir J Med Sci* 1986 ; 155 : 197-201.
56. Nelis GF, Vermeeren MA, Jansen W. Role of fructose-sorbitol malabsorption in the irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1990 ; 99 : 1016-20.
57. McKee AM, Prior A, Whorwell PJ. Exclusion diets in irritable bowel syndrome: are they worthwhile? *J Clin Gastroenterol* 1987 ; 9 : 526-8.
58. Francis CY, Whorwell PJ. Bran and irritable bowel syndrome: time for reappraisal. *Lancet* 1994 ; 344 : 39-40.
59. King TS, Elia M, Hunter JO. Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome. *Lancet* 1998 ; 352 : 1187-9.
60. Flourie B, Florent C, Jouany JP, *et al.* Colonic metabolism of wheat starch in healthy humans. Effects on fecal outputs and clinical symptoms. *Gastroenterology* 1986 ; 90 : 111-9.
61. McManis PG, Newall D, Talley NJ. Abdominal wall muscle activity in irritable bowel syndrome with bloating. *Am J Gastroenterol* 2001 ; 96 : 1139-42.
62. Maxton DG, Martin DF, Whorwell P, *et al.* Abdominal distension in female patients with irritable bowel syndrome: exploration of possible mechanisms. *Gut* 1991 ; 32 : 662-4.
63. Azpiroz F, Enck P, Whitehead WE. Anorectal functional testing. Review of a collective experience. *Am J Gastroenterol* 2002 ; 97 : 232-40.
64. Lasser RB, Bond JH, Levitt MD. The role of intestinal gas in functional abdominal pain. *N Engl J Med* 1975 ; 293 : 524-6.
65. Chami TN, Schuster MM, Bohlman ME, *et al.* A simple radiologic method to estimate the quantity of bowel gas. *Am J Gastroenterol* 1991 ; 86 : 599-602.
66. Poynard T, Hernandez M, Xu P, *et al.* Visible abdominal distension and gas surface: description of an automatic method of evaluation and application to patients with irritable bowel syndrome and dyspepsia. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1992 ; 4 : 831-6.
67. Harder H, Serra J, Azpiroz F, *et al.* Intestinal gas distribution determines abdominal symptoms. *Gastroenterology* 2001 ; 120 : A72.
68. Salvioli B, Serra J, Azpiroz F, *et al.* Tolerance of ileal and colonic gas loads in patients with irritable bowel syndrome and functional bloating. *Gastroenterology* 2001 ; 120 : A755.
69. Serra J, Azpiroz F, Malagelada JR. Modulation of gut perception in humans by spatial summation phenomena. *J Physiol* 1998 ; 506 : 579-87.
70. Levitt MD, Furne J, Olsson S. The relation of passage of gas and abdominal bloating to colonic gas production. *Ann Intern Med* 1996 ; 124 : 422-4.
71. Jouët P, Marteau P. Pneumatose kystique intestinale. *Hepato-Gastro* 1994 ; 1 : 563-8.
72. Heng Y, Schuffler MD, Rodger MD HMRC. Pneumatosis intestinalis: a review. *Am J Gastroenterol* 1995 ; 90 : 1747-58.
73. Levitt M, Olsson S. Pneumatosis cystoides intestinalis and high breath H₂ excretion: insights into the role of H₂ in this condition. *Gastroenterology* 1995 ; 108 : 1560-5.
74. Gillon J, Tadesse K, Logan RFA, *et al.* Breath hydrogen in pneumatosis cystoides intestinalis. *Gut* 1979 ; 20 : 1008-11.
75. Christi SU, Gibson GR, Murgatroyd PR, *et al.* Impaired hydrogen metabolism in pneumatosis cystoides intestinalis. *Gastroenterology* 1993 ; 104 : 392-7.



Flore et motricité coliques. Données physiologiques et au cours du syndrome de l'intestin irritable

**Benoit Coffin,
Jean-Marc
Sabaté**

Service d'Hépatogastro-entérologie,
Hôpital Louis-Mourier,
Colombes, France.

La motricité gastro-intestinale normale de jeûne est caractérisée par une activité cyclique et propagée, le complexe moteur migrant, dont les fonctions supposées sont de propulser les résidus non-digestibles du repas d'une part, et de s'opposer à la prolifération des bactéries dans la lumière intestinale, d'autre part. À l'inverse, la motricité colique normale est pauvre, hormis certains moments du nyctémère, ce qui favorise le brassage et la progression lente du contenu colique. Du fait de cette motricité particulière, une flore bactérienne riche et polymorphe va pouvoir s'implanter dès les premiers jours de la vie, puis se développer et assurer différentes fonctions essentielles, notamment la fermentation des résidus glucidiques et protéiques d'origine exogène (repas) et endogène. En retour, la présence de la flore, avec ses différentes fonctions, va influencer la motricité. Les rapports entre fermentation et motricité colique sont donc étroits mais encore très mal connus, car peu étudiés chez l'animal et difficiles à explorer chez l'homme.

Motricité colique pariétale normale chez l'homme

Les cellules musculaires lisses coliques, comme les autres segments du tube digestif, génèrent deux types d'activité motrice. L'activité phasique se mesure par électromyographie ou par manométrie selon la technique des cathéters perfusés [1]. Chez le volontaire sain, les enregistrements électromyographiques et manométriques sur 24 heures ont montré que la majeure partie de l'activité motrice colique phasique était irrégulière, avait une faible amplitude (contractions < 60 mmHg) et n'était pas propagée [2]. À jeun et durant le sommeil, cette activité est faible, favorisant la stagnation et le brassage du contenu colique. Le réveil matinal et les repas entraînent une augmentation de l'activité phasique, davantage marquée au niveau du côlon distal que du côlon proximal [2-4]. Des contractions phasiques de grande amplitude (CPGA) (≥ 100 mmHg en manométrie, ou *Long Spike Bursts* en électromyographie), rapidement propagées sur de longues distances dans un sens oral-aboral, sont essentiellement enregistrées au réveil ou en période postprandiale (Figure 1) [2, 4]. L'activité tonique se mesure par la technique du barostat électronique [1]. Le tonus colique est très mal connu. Il a été montré essentiellement que le repas entraînait également une contraction tonique diffuse [3] et que, en période nocturne, le tonus diminuait.

De même, les relations entre l'activité motrice et les mouvements intraluminaux sont mal connus. Les CPGA pourraient expliquer certains mouvements de masse. Les variations du tonus colique pourraient expliquer la fonction réservoir du côlon proximal et certains déplacements du contenu non expliqués par des variations de l'activité phasique [1].

Dans tous les cas, l'activité motrice est plus faible dans le côlon proximal que dans le côlon distal. Ces variations locales sont multifactorielles et reposent sans doute sur une origine embryologique et une innervation différentes, mais peut-être aussi sur un effet local du contenu endoluminal. Cause ou conséquence, il faut noter que les flores bactériennes droite et gauche ne sont pas superposables, la flore méthanogène, par exemple, siégeant essentiellement dans le côlon gauche [5].



Figure 1.
Enregistrement manométrique de contractions coliques de grande amplitude rapidement propagée du cadre colique (ileum : iléon, R : côlon droit, T : côlon transverse, D : côlon gauche, S : sigmoïde) (d'après [4])

Chez l'homme, la plupart des données électromyographiques et manométriques ont été obtenues dans des conditions peu physiologiques ne permettant pas d'étudier correctement les relations avec la flore colique ; la sonde d'enregistrement était posée lors d'une coloscopie après une préparation colique altérant transitoirement, mais de manière drastique, la flore colique. Ces dernières années, l'équipe de l'hôpital Saint-Lazare (Paris) a mis au point une méthode originale permettant de mesurer la motricité colique tout en respectant le contenu colique. La sonde, introduite par voie orale, progresse lentement le long du tube digestif jusqu'à l'expulsion de son extrémité distale à l'anus. Par différents artifices techniques, il est possible, soit d'explorer préférentiellement l'activité tonique et phasique de certains segments, par exemple côlon proximal ou côlon distal [3, 6], soit d'étudier la totalité de la motricité colique [4, 7]. Longue, chaque expérimentation pour

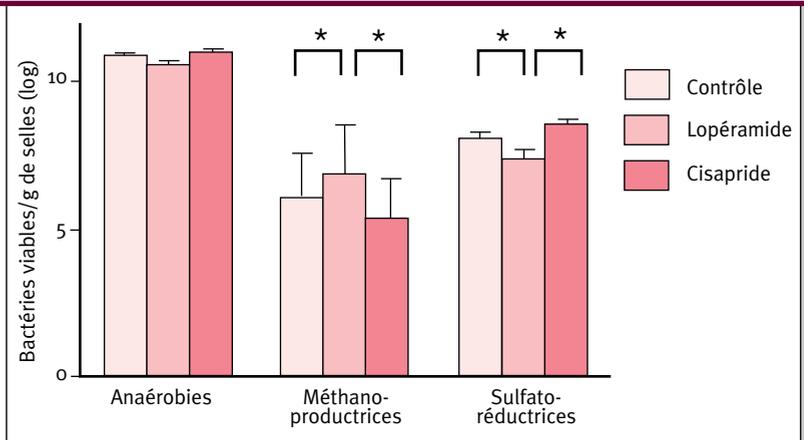
un volontaire représentant quatre à cinq jours d'immobilisation, avec un taux d'échec non négligeable, cette méthode nous a permis d'étudier différents aspects de la motricité colique chez le volontaire sain, tout en respectant la flore colique physiologique et d'étudier ainsi certaines relations entre flore et motricité colique, en particulier au cours des réactions de fermentation. Compte tenu de ses contraintes, il n'est pas possible d'utiliser cette méthode chez des patients. En revanche, la mesure des mouvements intra-coliques par différentes techniques, comme la progression des pellets radio-opaques ou la scintigraphie segmentaire, est possible sans perturber la flore colique.

Effets de la motricité colique sur la flore

Aucune étude n'a montré qu'une modification, par un agent pharmacologique, de la motricité colique pariétale mesurée par les techniques habituelles, pouvait entraîner une modification de la flore. Cependant, le ralentissement du transit digestif par le lopéramide ou, à l'inverse, son accélération par le cisapride, modifie l'écosystème bactérien chez le volontaire sain, mais on ignore le siège et le type des modifications de la motricité pariétale responsables de ces changements [8]. Par rapport à la période contrôle, bien que le nombre absolu de bactéries anaérobies ne soit pas augmenté, l'accélération du transit par le cisapride entraîne une diminution des concentrations fécales des bactéries méthanoproductrices et une augmentation de celles des bactéries sulfato-réductrices ; un effet en miroir est obtenu après la prise de lopéramide (Figure 2). De plus, le cisapride augmente significativement les concentrations fécales de propionate et de butyrate, diminue le pH fécal et accroît l'excrétion d'hydrogène dans les gaz expirés. Les effets du lopéramide sur ces différents paramètres sont également rigoureusement opposés [8].

Figure 2.

Variations de la flore colique après modifications du temps de transit colique. Un ralentissement du transit par le lopéramide augmente le nombre des bactéries méthanoproductrices et diminue celui des bactéries sulfato-réductrices sans modifier de manière significative le nombre total de bactéries anaérobies. Un effet en miroir est obtenu après accélération du transit par le cisapride
 (* $P < 0,05$)
 (D'après El Oufir et al.)



Effets de la flore colique sur la motricité pariétale et le transit colique

Les effets éventuels de la flore bactérienne colique sur la motricité pariétale colique sont particulièrement difficiles à étudier chez l'homme compte tenu, d'une part, de la diversité de la flore et de la difficulté d'identifier les espèces bactériennes présentes et, d'autre part, de la quasi-impossibilité d'implanter durablement une souche bactérienne aisément identifiable. Cependant, globalement, Lémann *et al.* [4] ont montré, chez le volontaire sain, que la préparation colique par le polyéthylène glycol (PEG), qui diminue de manière temporaire la flore colique, modifiait certains paramètres de la motricité pariétale phasique. L'analyse des résultats montrait que les index moteurs (reflet de l'activité motrice globale) ou la réponse motrice au repas n'étaient pas modifiés par la prise de PEG. En revanche, le nombre de CPGA était significativement augmenté après prise de PEG par rapport à la période sans préparation ($8,6 \pm 2,8$ versus $5,4 \pm 1,8$ /sujets/9 h, respectivement ; $p < 0,05$). Ces données suggèrent que la flore colique pourrait intervenir directement ou indirectement sur la motricité colique, suite aux réactions de fermentation. Plusieurs travaux ont montré que des probiotiques comme les lactobacilles ou les bifidobactéries parviennent vivantes dans le côlon, s'y multiplient [9], mais ne parviennent pas à s'implanter durablement car elles ne sont plus détectables dans les jours suivant l'arrêt de la prise [10]. Les données concernant les effets de probiotiques sur le temps de transit colique sont discordantes. Dans une étude, il a été montré que la prise de yaourts enrichis en *Bifidobacterium longum* ne modifiait pas le temps de transit oro-anal [11]. Un autre travail a montré que la prise de *Propionibacterium freudenreichii*, une bactérie retrouvée dans certains fromages, ne modifiait pas le temps de transit colique total, ni le temps de transit colique droit mais augmentait significativement le temps de transit dans le côlon gauche par rapport au placebo (respectivement $11,9 \pm 9,4$ h versus $7,0 \pm 5,0$ h, $p < 0,05$) [12]. Enfin, une étude plus récente, menée chez des femmes, a montré que, par rapport à la période contrôle, la souche DN-173 010 de *Bifidobacterium animalis* diminuait le temps de transit colique global ($51,5 \pm 30,2$ h versus $60,7 \pm 27,1$, respectivement, $p < 0,05$) et le temps de transit sigmoïdien ($21,6 \pm 14,9$ versus $26,8 \pm 14,2$, respectivement, $p < 0,05$) [13]. Cet effet était plus marqué chez les femmes ayant un temps de transit colique basal long, supérieur à 40 heures. Le poids des selles, le pH fécal, la masse bactérienne fécale et les acides biliaires fécaux n'étaient pas différents entre les deux périodes. Même si elles sont significatives, ces variations du transit colique restent très modestes et sans conséquences évidentes pour la prise en charge des patients ayant un ralentissement du transit. La prise à petites doses d'un prébiotique, comme l'oligofructose ou l'inuline, dont l'arrivée dans le côlon va favoriser la croissance des bifidobactéries, ne modifiait pas le temps de transit colique [14].

Les fibres non ou complètement digestibles comme la cellulose, les mucilages tels que l'ispaghule, sont utilisées depuis longtemps pour leurs vertus laxatives dans le traitement de la constipation chronique idiopathique. Elles agissent, d'une part, par un effet de lest et, d'autre part, en augmentant la masse bactérienne fécale qui représente près de la moitié du poids de la selle normale. Chez le volontaire sain, une supplémentation en fibres ne

modifie pas la motricité colique phasique, quelles que soient leurs propriétés fermentescibles [15]. Les fibres de pois, peu fermentescibles, ou les fibres de carottes, davantage fermentescibles et plus hydrosolubles, ne modifient aucun des paramètres moteurs.

L'étude des effets moteurs du lactulose, un sucre fermentescible non absorbable utilisé de longue date comme traitement de la constipation idiopathique, suggère que les métabolites bactériens libérés lors des réactions fermentaires participent à la régulation de la motricité colique. En effet, une fois arrivé dans le côlon, le lactulose est rapidement fermenté, libérant principalement du lactate et des acides gras à chaîne courte (AGCC). En scintigraphie, le lactulose accélère le transit colique, principalement par une accélération de la vidange du côlon droit [16, 17]. Sur le plan moteur, la prise de 15 g de lactulose entraîne, d'une part, une contraction tonique du côlon droit [18] et, d'autre part, l'apparition d'ondes de contractions irrégulières peu ou pas propagées [7]. Cet effet moteur aurait pu être lié à l'osmolarité du produit. Cette hypothèse peut être éliminée car une prise de macrogol, de même osmolarité mais non fermentescible, n'a aucun effet sur la motricité colique [19]. Au contraire, la rapidité d'apparition des événements moteurs, dès le début de la fermentation comme le montre la réalisation concomitante d'un test respiratoire à l'hydrogène, suggère fortement le rôle des métabolites de la fermentation dans la régulation de la motricité colique. Par ailleurs, la perfusion intracolique de 15 g d'amidon, quantité physiologiquement malabsorbée par 24 heures dans l'intestin grêle (amidon résistant), ne modifie pas significativement le tonus colique, mais augmente significativement le nombre de CPGA [20]. Cet effet moteur différent de l'amidon pourrait s'expliquer par un profil de fermentation distinct de celui du lactulose, aboutissant préférentiellement à la formation de propionate et de butyrate.

Les mécanismes responsables de ces effets sur la motricité et le transit coliques des glucides fermentescibles restent incomplètement compris. Chez le volontaire sain, la perfusion intracolique d'une quantité d'AGCC équivalente à celle produite par la fermentation de 15 g d'amidon ne modifie ni le tonus ni l'activité phasique [21]. L'acidification du contenu colique par une solution à pH 4,5, comme lors d'une fermentation rapide, ne modifie ni la motricité colique phasique ni le tonus colique. Cependant, chez le rat, la perfusion intracolique de fortes doses d'AGCC diminue la motricité colique, accélère le temps de transit et provoque une augmentation des concentrations circulantes du neuropeptide YY [22]. Cet effet est aboli par une anesthésie locale préalable, ce qui témoigne d'une stimulation de récepteurs nerveux sensibles aux variations de concentrations en AGCC.

Les AGCC interviennent également dans la régulation de la motricité œso-gastro-intestinale d'amont. Au niveau de l'iléon terminal, une perfusion locale d'un mélange d'AGCC provoque une contraction tonique et phasique [23]. Cet effet moteur pourrait s'opposer à la colonisation bactérienne de l'intestin terminal lors de reflux physiologiques caeco-iléaux. À l'inverse, la fermentation colique du lactulose entraîne une relaxation tonique au niveau de l'estomac proximal [24]. Ce mécanisme régulateur, connu sous le nom de frein colique, passe probablement par une libération hormonale. Il pourrait avoir un rôle dans certaines situations pathologiques, notamment chez les patients ayant un syndrome du grêle court [25]. Enfin, chez le volontaire sain, la fermentation colique du lactulose entraîne l'apparition de relaxations

Le rôle de la flore colique dans la genèse des symptômes de SII n'est pas une hypothèse récente. En 1983, Newcomer *et al.* ont montré que la prise de *Lactobacillus acidophilus* ne modifiait pas les différents symptômes fonctionnels, y compris dans le sous-groupe de patients ayant par ailleurs un déficit en lactase [35]. D'autres études de ce type ont été réalisées depuis, dont les résultats sont discordants et inconstamment convaincants. Chez vingt patients ayant un SII défini selon les critères de Rome, il a été montré, au cours d'une étude randomisée en *cross-over* contre placebo, que la prise de la souche 299V *Lactobacillus plantarum* ne modifiait aucun des symptômes habituels du SII [36] alors que, dans une autre étude contre placebo utilisant la même souche de *Lactobacillus plantarum*, on notait une diminution significative de l'intensité de la douleur abdominale [37]. Une étude contre placebo portant sur l'efficacité d'une souche de *Lactobacillus acidophilus* stabilisée par la chaleur a montré un effet positif sur les symptômes chez la moitié des patients, mais seuls dix-huit patients avaient été inclus [38]. Une étude contrôlée contre placebo a montré un bénéfice de l'administration de *Saccharomyces boulardii* sur le transit intestinal de patients présentant un côlon irritable avec diarrhée prédominante [39]. Enfin, une souche de *Lactobacillus casei* GG n'entraînait pas d'amélioration des symptômes par rapport au placebo [40]. Les mêmes problèmes méthodologiques que ceux récemment rencontrés pour le développement de molécules ayant une action potentielle au cours du SII, comme la taille de l'effectif, les critères d'inclusion, les critères d'efficacité, l'importance de la réponse au placebo risquent de se présenter dans le cadre du développement des probiotiques dans le traitement du SII.

En ce qui concerne les métabolites de la fermentation, les productions d'AGCC n'ont pas été étudiées au cours du SII. Le rôle des gaz libérés au cours des réactions de fermentation n'est pas parfaitement clair dans la physiopathologie des symptômes à type de ballonnement, si fréquent au cours du SII. Pendant longtemps, il a été considéré que les productions gazeuses étaient normales chez ces patients. Les sensations de gaz ou de ballonnement abdominal seraient alors secondaires aux troubles de la sensibilité viscérale [41] ou à une anomalie de la motricité [42]. Une étude contrôlée, menée chez six patients se plaignant de ballonnements, a cependant montré qu'il existait une production gazeuse anormalement élevée lors d'un régime standardisé avec une correction des anomalies après un régime d'exclusion [43]. Cette étude, bien menée sur le plan méthodologique, suggère qu'il existe un groupe de patients ayant un SII dont les symptômes seraient en partie expliqués par une anomalie de la flore aboutissant à une production gazeuse anormale. Une étude clinique, chez soixante patients ayant un SII, a montré que la souche DSM9483 de *Lactobacillus plantarum* diminuait l'intensité du ballonnement [44]. Cette voie de recherche intéressante visant à corriger les productions gazeuses pourrait éventuellement déboucher sur une modification de la prise en charge thérapeutique du SII. À l'inverse, pendant longtemps, une supplémentation en son a été proposée pour réguler le transit des patients ayant un SII avec une constipation prédominante. Si les effets du son sur le transit ont été confirmés, il a malheureusement été clairement montré que la prise de son majorait les symptômes de ballonnement chez ces patients et avait donc un effet délétère [45, 46].

Conclusion

La flore colique peut se développer parce que la motricité colique l'y autorise. Les relations entre ces deux partenaires sont certainement multiples, complexes, sans doute indirectes *via* les réactions de fermentation, mais restent extrêmement mal connues, essentiellement à cause de difficultés méthodologiques (Figure 3). Dans certains processus pathologiques, comme le SII, une modification transitoire de la flore lors d'un épisode infectieux aigu intestinal pourrait intervenir dans le déclenchement des troubles. Des modifications de la flore colique par la prise d'antibiotiques ou d'antiseptiques intestinaux ne sont pas recommandables dans la pratique clinique quotidienne chez des patients ayant un SII, les antibiotiques pouvant même avoir un effet délétère. Plusieurs essais ont montré l'intérêt de certains probiotiques sur les symptômes de l'intestin irritable (*voir le chapitre « Probiotiques et affections digestives »*).

Points clés

- La motricité pariétale colique est caractérisée, à jeun et pendant le sommeil, par une activité phasique irrégulière de faible amplitude et non propagée, favorisant la colonisation par une riche flore saprophyte. Au réveil et après les repas, apparaissent des contractions phasiques de grande amplitude (CPGA), propagées dans le sens aboral et propulsives. Les repas augmentent aussi le tonus colique.
- Le cisapride, qui accélère le transit colique, augmente les concentrations fécales de propionate et butyrate, et diminue le pH fécal et l'excrétion d'hydrogène dans l'air expiré. Le loperamide, qui ralentit le transit colique, a les effets inverses.
- Le lavage du contenu colique, et donc de sa flore, augmente le nombre des CPGA. Plusieurs probiotiques peuvent accélérer le transit colique global et segmentaire.
- L'effet de glucides non absorbés et fermentescibles (lactulose, amidon résistant) sur l'activité motrice phasique et tonique du côlon est bien établi, mais leur mécanisme d'action reste incertain.
- Dans le syndrome de l'intestin irritable, le rôle de la flore colique, notamment par un excès de production gazeuse, est très probable chez certains malades, et certains probiotiques se sont révélés efficaces sur tout ou partie des symptômes.

Références

1. Jouet P, Coffin B, Cuillerier E, *et al.* Colonic motility in humans. Recent physiological, pathophysiological and pharmacological data. *Gastroenterol Clin Biol* 2000; 24 : 284-98.
2. Narducci F, Bassotti G, Gaburri M, *et al.* Twenty four hour manometric recording of colonic motor activity in healthy man. *Gut* 1987 ; 28 : 17-25.
3. Jouet P, Coffin B, Lemann M, *et al.* Tonic and phasic motor activity in the proximal and distal colon of healthy humans. *Am J Physiol* 1998; 274 : G459-64.
4. Lemann M, Flourie B, Picon L, *et al.* Motor activity recorded in the unprepared colon of healthy humans. *Gut* 1995; 37 : 649-53.
5. Flourie B, Pellier P, Florent P, *et al.* Site and substrates for methane production in human colon. *Am J Physiol* 1991 ; 260 : G752-7.
6. Coffin B, Fossati S, Flourie B, *et al.* Regional effects of cholecystokinin octapeptide on colonic phasic and tonic motility in healthy humans. *Am J Physiol* 1999 ; 276 : G767-72.
7. Jouet P, Sabate JM, Coffin B, *et al.* Sugar intolerance: origin and mechanisms of symptoms? *Dig Dis Sci* 2002 ; 47 : 886-93.
8. El Oufir L, Flourie B, Bruley des Varannes S, *et al.* Relations between transit time, fermentation products, and hydrogen consuming flora in healthy humans. *Gut* 1996 ; 38 : 870-7.
9. Rambaud JC, Bouhnik Y, Marteau P, *et al.* Manipulation of the human gut microflora. *Proc Nutr Soc* 1993 ; 52 : 357-66.
10. Bouhnik Y, Pochart P, Marteau P, *et al.* Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium sp* ingested in fermented milk. *Gastroenterology* 1992; 102 : 875-8.
11. Bartram HP, Scheppach W, Gerlach S, *et al.* Does yogurt enriched with *Bifidobacterium longum* affect colonic microbiology and fecal metabolites in health subjects? *Am J Clin Nutr* 1994 ; 59 : 428-32.
12. Bougle D, Roland N, Lebeurrier F, *et al.* Effect of propionibacteria supplementation on fecal bifidobacteria and segmental colonic transit time in healthy human subjects. *Scand J Gastroenterol* 1999 ; 34 : 144-8.
13. Marteau P, Cuillerier E, Meance S, *et al.* *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2002 ; 16 : 587-93.
14. Gibson GR, Beatty ER, Wang X, *et al.* Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 1995 ; 108 : 975-82.
15. Guedon C, Ducrotte P, Antoine JM, *et al.* Does chronic supplementation of the diet with dietary fibre extracted from pea or carrot affect colonic motility in man? *Br J Nutr* 1996 ; 76 : 51-61.
16. Barrow L, Steed KP, Spiller RC, *et al.* Scintigraphic demonstration of lactulose-induced accelerated proximal colon transit. *Gastroenterology* 1992 ; 103 : 1167-73.
17. Cuillerier E, Coffin B, Lémann M, *et al.* Comparaison de l'effet du lactulose et du polyéthylène glycol sur le transit colique isotopique. *Gastroenterol Clin Biol* 1999, 23 : A157.
18. Jouët P, Gorbatchef C, Flourié B, *et al.* Colonic fermentation of lactulose produces a tonic contraction in the human colon. *Gastroenterology* 1998, 114 : A 773.
19. Herve S, Leroi AM, Mathiex-Fortunet H, *et al.* Effects of polyethylene glycol 4000 on 24-h manometric recordings of left colonic motor activity. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001 ; 13(6) : 647-54.
20. Jouët P, Gorbatchef C, Flourié B, *et al.* Colonic fermentation of starch increases propulsive activity in the human colon. *Gastroenterology* 1997 ; 112 : A756 (résumé).
21. Gorbatchef C, Jouët P, Flourié B, *et al.* Effects of short-chain fatty acids on the phasic and tonic motor activity in the unprepared colon of healthy humans. *Gastroenterology* 1998, 114 : A 756 (résumé).
22. Cherbut C, Ferrier L, Roze C, *et al.* Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat. *Am J Physiol* 1998 ; 275 : G1415-22.
23. Coffin B, Lemann M, Flourie B, *et al.* Local regulation of ileal tone in healthy humans. *Am J Physiol* 1997 ; 272 : G147-53.
24. Ropert A, Cherbut C, Roze C, *et al.* Colonic fermentation and proximal gastric tone in humans. *Gastroenterology* 1996 ; 111 : 289-96.

25. Nightingale JM, Kamm MA, van der Sijp Jr, *et al.* Disturbed gastric emptying in the short bowel syndrome. Evidence for a « colonic brake ». *Gut* 1993 ; 34 : 1171-6.
26. Piche T, Zerbib F, Bruley des Varannes S, *et al.* Modulation by colonic fermentation of LES function in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000 ; 278 : G578-84.
27. Piche T, Bruley des Varannes S, Sacher-Huvelin S, *et al.* Colonic fermentation influences lower esophageal sphincter function in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology*. 2003 ;124 : 894-902.
28. Drossman DA, Camilleri M, Mayer EA, *et al.* AGA technical review on irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002 ; 123 : 2108-31.
29. Neal KR, Hebden J, Spiller R. Prevalence of gastrointestinal symptoms six months after bacterial gastroenteritis and risk factors for development of the irritable bowel syndrome: postal survey of patients. *Br Med J* 1997 ; 314 : 779-82.
30. Rodriguez LA, Ruigomez A. Increased risk of irritable bowel syndrome after bacterial gastroenteritis: cohort study. *Br Med J* 1999 ; 318 : 565-6.
31. Bergin AJ, Donnelly TC, McKendrick MW, *et al.* Changes in anorectal function in persistent bowel disturbances following salmonella gastroenteritis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1993 ; 5 : 617-20.
32. Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, *et al.* Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 2000 ; 47 : 804-11.
33. O'Sullivan M, Clayton N, Breslin NP, *et al.* Increased mast cells in the irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2000 ; 12 : 449-57.
34. Tornblom H, Lindberg G, Nyberg B, *et al.* Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002; 123 : 1972-9.
35. Newcomer AD, Park HS, O'Brien PC, *et al.* Response of patients with irritable bowel syndrome and lactase deficiency using unfermented acidophilus milk. *Am J Clin Nutr* 1983; 38 : 257-63.
36. Di Baise JK, Lof J, Taylor K, *et al.* *Lactobacillus plantarum* 299v in the irritable bowel syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover study. *Gastroenterology* 2000 ; 118 : A615 (résumé).
37. Niedzielin K, Kordecki H, Birkenfeld B. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001 ; 13 : 1143-7.
38. Halpern GM, Prindiville T, Blankenburg M, *et al.* Treatment of irritable bowel syndrome with Lacteol Fort: a randomized, double-blind, cross-over trial. *Am J Gastroenterol* 1996; 91 : 1579-85.
39. Maupas JL, Champemont P, Delforge M. Traitement des colopathies fonctionnelles. Essais en double aveugle de l'Ultra-levure. *Méd Chir Dig* 1983 : 77-9.
40. O'Sullivan MA, O'Morain CA. Bacterial supplementation in the irritable bowel syndrome. A randomised double-blind placebo-controlled crossover study. *Dig Liver Dis* 2000; 32 : 294-301.
41. Lasser RB, Bond JH, Levitt MD. The role of intestinal gas in functional abdominal pain. *N Engl J Med* 1975 ; 293 : 524-6.
42. Serra J, Azpiroz F, Malagelada JR. Impaired transit and tolerance of intestinal gas in the irritable bowel syndrome. *Gut* 2001; 48 : 14-9.
43. King TS, Elia M, Hunter JO. Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome. *Lancet* 1998 ; 352 : 1187-9.
44. Nobaek S, Johansson ML, Molin G, *et al.* Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000 ; 95 : 1231-8.
45. Hebden JM, Blackshaw E, D'Amato M, *et al.* Abnormalities of GI transit in bloated irritable bowel syndrome: effect of bran on transit and symptoms. *Am J Gastroenterol* 2002 ; 97 : 2315-20.
46. Francis CY, Whorwell PJ. Bran and irritable bowel syndrome: time for reappraisal. *Lancet* 1994 ; 344 : 39-40.

Flore intestinale et épithélium colique

Claire Cherbuy,
Hervé Blottière,
Pierre-Henri Duée

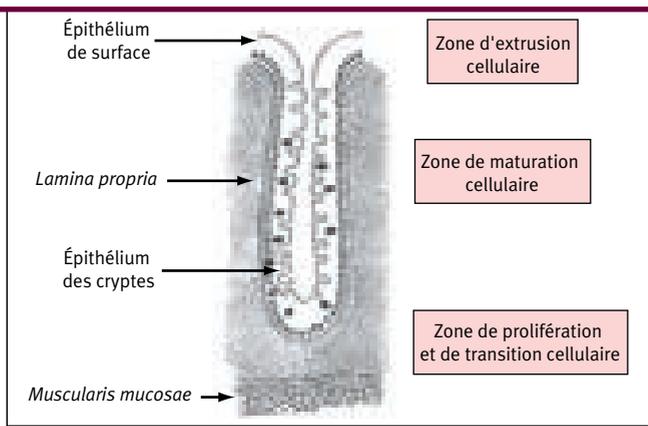
Institut National de la
Recherche Agronomique
Unité de Nutrition
et Sécurité Alimentaire
Domaine de Vilvert
CRJ
Jouy-en-Josas, France.

L'épithélium colique est une structure dynamique et son renouvellement, l'un des plus élevés de l'organisme. La présence d'une flore bactérienne complexe dans le gros intestin est une composante déterminante de son environnement. En effet, l'une des fonctions principales de la flore est la dégradation des aliments qui échappent à la digestion dans l'intestin grêle et des substrats endogènes : ces fermentations par les bactéries engendrent de nombreux métabolites parmi lesquels, le butyrate, acide gras à chaîne courte (AGCC), représente le substrat énergétique majeur de l'épithélium colique. Par sa diversité, liée en grande partie à celle de ses substrats, la flore colique est une source riche en signaux qui influencent la physiologie de l'hôte : en découle ainsi une relation s'apparentant à une symbiose mais dont l'altération pourrait constituer un facteur favorisant l'installation de situations pathologiques.

Structure et renouvellement de l'épithélium colique

- L'organisation de l'épithélium colique est très structurée et hiérarchisée :
- épithélium des cryptes, en profondeur, sorte de dépression par laquelle l'épithélium plonge dans le tissu sous-jacent (*lamina propria*) ;
 - épithélium de surface qui borde la partie plane de la muqueuse du côté luminal (Figure 1).

Figure 1.
Représentation schématique d'une crypte colique.
La zone de prolifération est localisée dans la partie basale des cryptes. Les cellules en division sont issues de la prolifération de cellules souches. Les cellules, qui cessent de se diviser dans la partie supérieure de la crypte colique, migrent vers l'épithélium de surface où elles sont éliminées. Lors de la migration, la cellule se différencie et acquiert des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles



Des études de marquage à la thymidine tritiée, qui s'incorpore dans les cellules en prolifération, ont montré que la zone inférieure des cryptes est constituée de cellules en division, issues de cellules souches et se multipliant au cours de cinq à neuf cycles. Chez la souris, il a été estimé que chaque crypte colique contient une centaine de cellules en prolifération et produit une dizaine de cellules par heure.

Les cellules migrent rapidement de la base des cryptes vers l'épithélium de surface. Elles cessent de se diviser dans la partie supérieure de la crypte et sont exfoliées dans la lumière colique. Cette migration le long de l'axe de la crypte est couplée au processus de différenciation des cellules, caractérisé par des modifications morphologiques et fonctionnelles. Chez la souris, la durée de vie des cellules matures absorbantes est de trois jours. Le **Tableau I** résume la dynamique du renouvellement de l'épithélium colique chez la souris et chez l'homme, montrant que, dans ces deux espèces, la capacité proliférative est élevée [1].

	Souris	Homme
Cellules par crypte	300-450	2 250
Durée du cycle cellulaire	15-36 h	36-96 h
Nombre de cellules souches par crypte	1-4	?

Tableau I.
Dynamique du renouvellement cellulaire de l'épithélium colique chez la souris et chez l'homme (d'après [1])

Chez un adulte sain, le maintien de l'homéostasie de l'épithélium repose sur l'équilibre, finement régulé, entre le nombre de cellules produites, d'une part, et celles éliminées, d'autre part. Lorsque cet équilibre est rompu, l'intégrité de l'épithélium colique est alors perdue.

Cellules différenciées de l'épithélium colique

Dans l'épithélium colique, sont présents les trois principaux types cellulaires différenciés suivants :

- les cellules absorbantes ou colonocytes : elles sont majoritaires (environ 80 % des cellules). Ces cellules sont principalement responsables du transport des électrolytes et des AGCC, produits des fermentations coliques. Ce sont des cellules polarisées. Elles présentent, en effet, une organisation cellulaire asymétrique, avec des domaines membranaires, apical et basolatéral, distincts. Les deux pôles diffèrent, en particulier, par leur contenu en protéines spécifiques, comme les transporteurs ioniques ;
- les cellules à mucus : elles synthétisent et sécrètent le mucus qui tapisse la paroi du côlon et protège l'épithélium d'agressions physiques et chimiques ;
- les cellules entéro-endocrines : elles représentent moins de 3 % des cellules de l'épithélium. Ces cellules sont spécialisées dans la sécrétion de peptides gastro-intestinaux (somatostatine, entéroglucagon, peptide YY, etc.).

Cellules souches de la crypte colique

Il est maintenant établi que les types cellulaires différenciés de l'épithélium colique dérivent d'un même précurseur cellulaire, les cellules

souches de la crypte colique [2, 3]. L'absence de marqueurs spécifiques de ces cellules limite actuellement leur étude. La localisation des cellules souches a été déterminée par l'équipe de Potten à Manchester (Grande-Bretagne) à partir de résultats d'incorporation de la thymidine tritiée [2]. D'après les données obtenues, les cellules souches seraient confinées à la base des cryptes. Les cellules souches correspondent à une population restreinte de cellules, définies par l'ensemble des critères suivants :

- cellules indifférenciées ayant la capacité de proliférer ;
- cellules capables de se maintenir en nombre constant ;
- cellules pluripotentes pouvant donner naissance aux différents types cellulaires différenciés de l'épithélium ;
- cellules susceptibles de régénérer le tissu lorsque l'épithélium a été agressé.

Le nombre de cellules souches par crypte est mal connu (Tableau I). Dans un épithélium sain, ce nombre est maintenu stationnaire, probablement par un processus de division asymétrique, c'est-à-dire que l'une des deux cellules filles s'engage vers la voie de la différenciation, tandis que l'autre est conservée comme cellule souche. Cependant, cette capacité des cellules à entrer dans une division asymétrique, c'est-à-dire à restaurer le stock de cellules souches, disparaît précocement lors de la migration vers l'épithélium de surface.

En tout état de cause, une connaissance approfondie des cellules à l'origine de la population cellulaire cryptique est essentielle, car d'éventuelles altérations génétiques touchant ces cellules souches sont transmises aux cellules filles.

Dans ce sens, l'équipe de Gordon à l'université de Saint-Louis (États-Unis) a travaillé sur des animaux chimériques dont les cellules contiennent, ou non, un gène codant un marqueur facilement identifiable (la β -galactosidase) [4, 5]. Après marquage histochimique, les données obtenues ont montré que les cryptes coliques sont exclusivement composées, soit de cellules positives pour l'expression de la β -galactosidase, soit de cellules négatives. En aucun cas, les cryptes coliques ne sont « métissées », c'est-à-dire composées des deux populations de cellules. Ces résultats ont donc suggéré, dans un premier temps, que l'ensemble de la population cellulaire de la crypte colique serait dérivé d'une cellule souche unique [4, 5]. Toutefois, cette hypothèse est encore discutée aujourd'hui et d'autres pistes sont avancées et, en particulier, celle de l'existence d'une compétition entre cellules souches [2].

Régulation du nombre de cellules par l'apoptose

La perte cellulaire est également un facteur clé du maintien de l'homéostasie tissulaire. L'apoptose est une forme active de mort cellulaire qui met en jeu un ensemble de mécanismes agissant en cascade et conduisant à l'élimination des cellules endommagées.

Un tel processus, préprogrammé ou mis en place sous l'influence de facteurs spécifiques, pourrait être impliqué dans la perte des cellules de l'épithélium de surface. En effet, l'analyse des cellules apoptotiques par l'étude de la fragmentation de l'ADN (méthode TUNEL) montre l'existence d'une apoptose à ce site. Par ailleurs, l'expression de *bax*, gène pro-apoptotique, dans la région de l'épithélium de surface est également en faveur d'une forme d'apoptose à ce site (Figure 2) [2].

Toutefois, ces résultats ne sont pas corroborés par des clichés en microscopie électronique, sur lesquels on n'identifie que de très rares cellules apoptotiques [2]. Les mécanismes conduisant à l'élimination physiologique des cellules de surface restent donc encore débattus.

Un processus d'apoptose spontanée a également été décrit dans la partie basale des cryptes [6]. Il pourrait être lié à la régulation du nombre des cellules en division. Cependant, dans cette zone de prolifération cellulaire, l'apoptose spontanée semble fortement contrôlée, en particulier par le gène anti-apoptotique *bcl-2* (Figure 2). En effet, l'expression de ce gène y est élevée. De plus, chez des souris dont le gène *bcl-2* a été invalidé, on note une fréquence d'apoptose spontanée plus élevée que celle observée chez les souris sauvages [6]. Ainsi, le produit du gène *bcl-2* pourrait contribuer à protéger les cellules souches du côlon d'une apoptose excessive induite, par exemple, par des toxines présentes dans cette région du tractus gastro-intestinal ou dérivées de la flore bactérienne [2]. Toutefois, il pourrait permettre à des cellules dont certains gènes sont mutés de survivre, pouvant conduire, dans ce cas, à un processus de tumorigénèse.

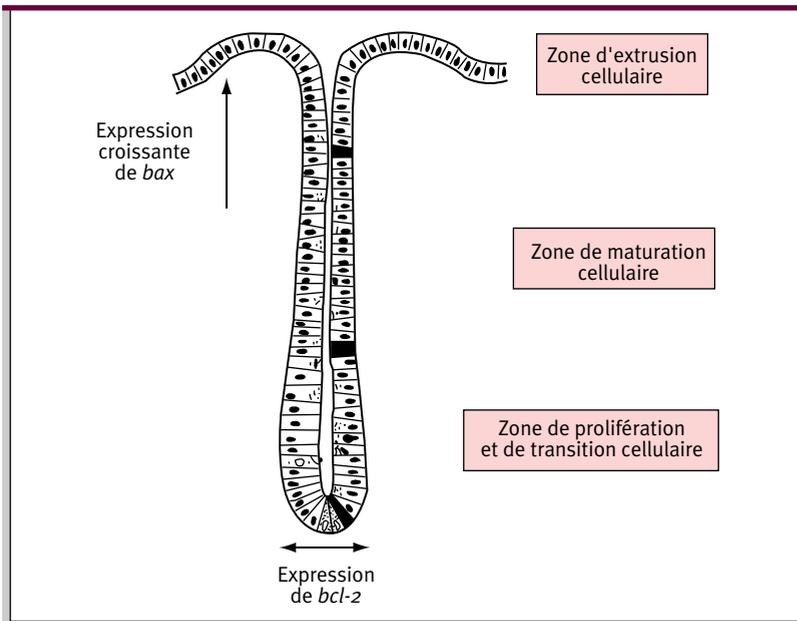


Figure 2. Expression de gènes pro- et anti-apoptotique le long de l'épithélium colique. L'expression de *bax*, gène pro-apoptotique, suit un gradient croissant vers le haut des cryptes. L'expression de *bcl-2*, gène anti-apoptotique, est élevée dans la partie basale des cryptes coliques (d'après [2]).

Différenciation des cellules absorbantes

L'une des fonctions principales du gros intestin est de réguler le volume et la composition en électrolytes des fèces [7]. À ce site, en effet, on observe une absorption d'eau et d'électrolytes (sodium, chlore), ainsi qu'une sécrétion de potassium et de bicarbonates. Ces mouvements ioniques impliquent, pour la plupart, des systèmes de transport actif dépendants de l'énergie [7] (Figure 3).

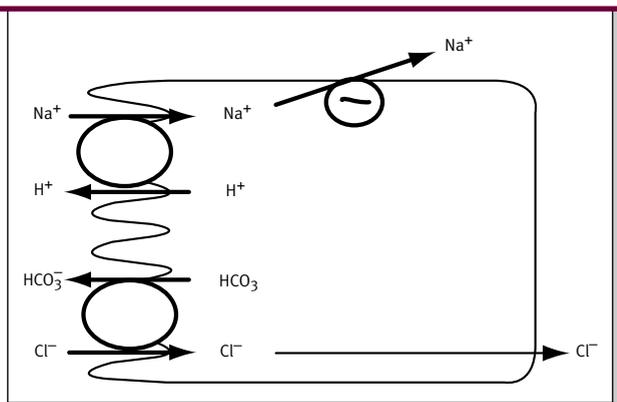
Au fur et à mesure que les cellules migrent vers l'épithélium de surface, elles s'engagent dans un processus de différenciation cellulaire. Cette maturation se traduit par des modifications morphologiques (présence de microvillosités à la membrane apicale, apparition de la forme rectangulaire des cellules, perte des vacuoles présentes dans les cellules des cryptes) et fonctionnelles (mise en place de transporteurs à l'origine des mouvements transépithéliaux des électrolytes, polarisation cellulaire présentant des domaines apical et basolatéral distincts). Ainsi, il existe une distribution spatiale des transporteurs le long de l'axe des cryptes.

Les échangeurs Na^+/H^+ (NHE) sont des protéines impliquées dans l'absorption transépithéliale de sodium, mais également dans la régulation du pH et du volume cellulaire [8]. Parmi les différentes isoformes identifiées, clonées et séquencées à ce jour, certaines (NHE1, NHE2 et NHE3) sont exprimées dans les cellules épithéliales du côlon [8]. On notera que NHE3, qui joue un rôle majeur dans l'absorption du sodium, est abondamment présent dans la membrane apicale des cellules épithéliales de surface. Toutefois, des résultats récents suggèrent que l'absorption de sodium n'est pas exclusivement localisée dans les cellules de surface, puisqu'un nouveau membre de la famille des échangeurs NHE vient d'être identifié dans les cellules en profondeur des cryptes.

D'autres transporteurs ont également une expression qui suit le gradient de différenciation cellulaire, qu'ils soient exprimés au pôle apical (transporteurs responsables de l'absorption du chlore ou de celle des AGCC) [9] ou au pôle basolatéral (transport de potassium) [7].

Figure 3.

Système de transport exprimé dans les cellules coliques différenciées : exemple des transporteurs impliqués dans l'absorption de Na^+ et de Cl^- . L'absorption de Na^+ et de Cl^- est couplée grâce à deux transporteurs : un échangeur Na^+/H^+ et un échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Ces deux transporteurs sont localisés dans la membrane apicale du colonocyte. Le transport des électrolytes à travers la membrane basolatérale implique d'autres transporteurs (d'après [7]).



Mécanismes moléculaires et cellulaires contrôlant le renouvellement de l'épithélium colique

L'homéostasie de l'épithélium colique est contrôlée par des mécanismes cellulaires et moléculaires complexes, impliquant des facteurs de croissance, des facteurs de transcription et des molécules présentes dans la matrice extracellulaire. De nombreuses interactions entre ces différentes protéines participent à la régulation de la population de cellules dans la crypte.

La complexité des mécanismes mis en jeu, clairement illustrée dans [10], pourrait également conduire à distinguer des facteurs spécifiques variant selon la position occupée par les cellules dans la crypte. En particulier, les facteurs contrôlant le devenir des cellules souches pourraient être différents de ceux identifiés dans la régulation des cellules filles [2].

Des anomalies touchant ces mécanismes ont pour conséquence de rompre l'équilibre existant entre prolifération, différenciation et élimination cellulaires. La perte de fonction portée par des gènes clés conduit à une désorganisation de l'épithélium ou, dans les situations les plus sévères, à une situation pathologique. Ainsi, parmi ces mécanismes, les « acteurs » intervenant dans la voie de transmission du signal Wnt jouent un rôle clé : l'inactivation des effecteurs de cette voie, consécutive à des mutations de leur gène, est un événement précoce apparaissant dans le développement des cancers colorectaux et notamment dans la majorité des cancers héréditaires liés à la polypose adénomateuse familiale due à la mutation du gène *APC* [11].

Cette voie de signalisation cellulaire Wnt, remarquablement conservée au cours de l'évolution, est impliquée dans le développement embryonnaire, de la drosophile aux vertébrés. La stimulation de la voie de transmission du signal Wnt aboutit à la formation d'un complexe de transcription, comprenant la β -caténine et le facteur de transcription nucléaire Tcf-4 (Figure 4), dont les gènes cibles sont impliqués dans la prolifération cellulaire.

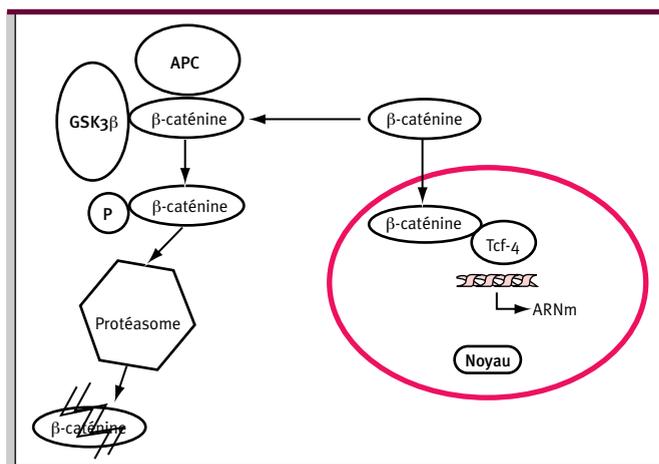


Figure 4.

Voie de transmission du signal Wnt. La concentration intracellulaire de β -caténine, partenaire du facteur de transcription Tcf-4, est étroitement contrôlée par un complexe protéique cytoplasmique, comprenant, en particulier, la protéine APC (adenomatous polyposis coli) et la GSK3 β (glycogen synthase kinase-3 β). La phosphorylation de la β -caténine par la GSK3 β dirige la β -caténine vers la voie de dégradation par le protéasome. Dans des conditions de stimulation de la voie de transmission du signal Wnt, ce complexe protéique est déstabilisé. La β -caténine s'associe alors au facteur de transcription Tcf-4.

Ainsi, chez des souris dont le gène codant Tcf-4 a été invalidé, l'épithélium intestinal est dépourvu de compartiment prolifératif et n'est constitué que de cellules différenciées non proliférantes [12]. Ces souris meurent peu après leur naissance. La concentration intracellulaire de la β -caténine, partenaire du facteur Tcf-4, est elle-même étroitement régulée par un complexe protéique cytoplasmique impliquant, en particulier, la protéine APC (*adenomatous polyposis coli*) et la GSK3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*). La phosphorylation par la GSK3 β de la β -caténine la dirige vers la voie de

dégradation par le protéasome (Figure 4). En « séquestrant » la β -caténine au sein de ce complexe et, par conséquent, en empêchant cette dernière de s'associer à Tcf-4, la protéine APC agit comme un régulateur négatif de la prolifération cellulaire.

Le rôle du complexe de transcription β -caténine/Tcf-4 a été précisé dans des lignées de cellules coliques tumorales où le complexe β -caténine/Tcf-4 est constitutif [13]. L'activité du complexe de transcription (analysée par l'expression et la localisation des gènes sous son contrôle) peut y être inhibée par l'introduction de dominants négatifs. Dans ce cas, les gènes surexprimés révèlent la levée de l'inhibition par le complexe β -caténine/Tcf-4 ; à l'inverse, ceux dont l'expression est alors inhibée représentent les gènes stimulés par le complexe de transcription. Ces études élégantes ont montré que les gènes stimulés par le complexe β -caténine/Tcf-4 sont impliqués dans la prolifération cellulaire, et sont précisément exprimés dans le compartiment prolifératif cryptique de l'épithélium. Inversement, les gènes réprimés par le complexe β -caténine/Tcf-4 sont impliqués dans la différenciation cellulaire et exprimés dans les cellules du haut des cryptes. Ainsi, ce complexe de transcription β -caténine/Tcf-4 orchestre la transition entre prolifération et différenciation des cellules épithéliales coliques.

En complément, on rappellera aussi le rôle des gènes homéotiques. Chez les vertébrés, ces gènes, qui codent des facteurs de transcription, sont apparentés à ceux qui déterminent la mise en place de l'axe antéropostérieur au cours du développement embryonnaire chez la drosophile. Ils ont en commun une séquence codant un domaine de liaison à l'ADN (homéodomaine) et sont impliqués dans le développement embryonnaire intestinal. L'expression de certains gènes homéotiques persiste au niveau intestinal chez l'adulte. Ainsi, le gène *cdx2* est exprimé dans le côlon adulte, principalement dans la région proximale. Le rôle de *cdx2* dans le côlon adulte n'est pas clairement élucidé. Il pourrait jouer un rôle dans la différenciation des cellules épithéliales intestinales [14]. Chez des souris dont l'un des allèles du gène *cdx2* a été invalidé, l'injection d'azoxyméthane induit, principalement dans la région distale du côlon, une fréquence plus élevée de tumeurs que celle observée chez des souris sauvages [15] : le gène *cdx2* pourrait donc agir comme gène suppresseur de tumeurs.

Effets des métabolites bactériens sur l'épithélium colique

Dans le côlon, les résidus alimentaires et les constituants d'origine endogène représentent le matériau disponible pour les fermentations bactériennes (rappelons que la masse bactérienne s'élève jusqu'à 10^{11} bactéries par gramme de contenu). Que représentent quantitativement ces substrats ?

Pour une alimentation normale, on admet que la quantité de lipides accédant chaque jour au côlon est très faible (de l'ordre de quelques grammes). Concernant les fractions protéique et surtout glucidique des aliments, la digestion intestinale est variable, assujettie, en particulier, à la nature des aliments ingérés (composition, structure physicochimique,

traitements technologiques, etc.). Ainsi, les composés de nature protéique peuvent représenter jusqu'à une vingtaine de grammes par jour (dont la moitié d'origine alimentaire, le reste correspondant aux enzymes pancréatiques et aux sécrétions gastro-intestinales). Quant aux composés de nature glucidique, l'amidon dit « résistant » représente quotidiennement de 10 à 40 g et les parois et autres polyosides végétaux, de 10 à 20 g. Bien que d'autres molécules soient présentes dans le cæcum et le côlon, telles que minéraux, vitamines, microconstituants d'origine alimentaire ou les mucines, glycoprotéines constitutives du mucus et les cellules épithéliales desquamées, on voit que la masse bactérienne tire des glucides alimentaires la majeure part des substrats pour son métabolisme.

La fermentation de l'amidon résistant et des polyosides végétaux conduit à la production de gaz et des AGCC (acétate, propionate, butyrate). Les protéines engendrent également, dans la partie distale du côlon, une production d'AGCC, ainsi que des acides gras à chaîne ramifiée (isobutyrate, isovalérate), en plus de molécules azotées (ammoniaque, amines, polyamines, composés phénoliques). Peu d'acides gras arrivent au côlon ; une fraction est métabolisée par la flore pour former des métabolites toxiques (acides gras hydroxylés).

On notera que la flore colique développe d'autres voies métaboliques, telles que le métabolisme des acides biliaires (conduisant à la production des acides biliaires secondaires après déconjugaison et déshydroxylation), les transformations de xénobiotiques et la production de composés mutagènes, secondaires à la transformation des nitrates en nitrites : l'importance de ces voies métaboliques conditionne aussi l'intégrité de l'épithélium de l'hôte.

En définitive, la concentration finale des métabolites bactériens dépendra, en grande partie, de la composition de l'alimentation et de celle de la flore colique. Par exemple, la présence d'une teneur élevée en fibres non fermentescibles augmente le volume fécal et la vitesse de transit, ce qui abaissera la concentration en métabolites, y compris les métabolites toxiques, réduisant ainsi l'exposition de l'épithélium colique à ces produits. Par ailleurs, la désamination des acides aminés conduit, en particulier, à la production d'ammoniaque, dont la concentration luminale résultera de l'équilibre entre cette synthèse par la flore, la captation par la muqueuse et l'importance de la masse bactérienne qui utilise l'ammoniaque pour la synthèse de protéines. Enfin, on rappellera que des différences régionales existent dans les fermentations bactériennes : le cæcum, côlon droit ou ascendant présentant des activités maximales associées à une forte croissance bactérienne ; le pH luminal y est bas. Le côlon gauche, descendant et sigmoïde, présente une activité fermentaire de nature protéolytique avec des flux élevés de production d'amines et de phénols ; le pH luminal y est voisin de la neutralité.

En raison de son renouvellement rapide et de ses fonctions d'absorption, l'épithélium colique a une demande énergétique élevée. Pour couvrir leurs besoins, les cellules épithéliales coliques ont accès aux AGCC et aux nutriments d'origine plasmatique, tels que le glucose et la glutamine.

Le butyrate : substrat énergétique majeur de la cellule épithéliale colique

Au pH de la lumière colique, le butyrate se trouve sous forme dissociée, anionique, forme qui l'empêche de passer librement la membrane cellulaire.

Son transport requiert donc un transporteur spécifique, MCT1, caractérisé récemment, et membre de la famille des transporteurs des monocarboxylates. MCT1 est abondamment présent dans les cellules de l'épithélium de surface, mais absent dans celles du fond des cryptes. Son expression est régulée positivement par le butyrate lui-même [16].

Des études menées sur cellules épithéliales isolées ont évalué la contribution des substrats énergétiques au métabolisme cellulaire. Elles ont mis en évidence une capacité élevée des colonocytes à métaboliser les AGCC et, en particulier, le butyrate [17, 18]. Le métabolisme de ce substrat rend compte de 70 % à 80 % de la consommation d'oxygène, suggérant qu'il puisse représenter le substrat oxydatif majeur de ces cellules. Les 20 % à 30 % restants sont fournis par les autres AGCC et par le glucose et la glutamine d'origine sanguine. La présence de butyrate diminue l'oxydation du glucose, de la glutamine et des autres AGCC [18]. En revanche, la production de $^{14}\text{CO}_2$ au départ de [1- ^{14}C] butyrate, ainsi que la consommation d'oxygène due au métabolisme de ce substrat dans les colonocytes, n'est pas affectée par la présence des autres nutriments [17, 18]. Ces résultats indiquent que le butyrate est utilisé à des fins énergétiques de façon privilégiée par les colonocytes.

Le métabolisme du butyrate dans les colonocytes se déroule dans le compartiment mitochondrial. L'utilisation privilégiée du butyrate par rapport aux deux autres AGCC pourrait résulter de cette activation préférentielle dans la mitochondrie. En effet, il existerait, à ce niveau, deux enzymes activant les AGCC : une enzyme spécifique du butyrate et une enzyme commune aux principaux AGCC.

Les carbones du butyrate sont majoritairement retrouvés sous forme de CO_2 , mais également sous forme de corps cétoniques, l'acétoacétate et le β -hydroxybutyrate [17]. En d'autres termes, le butyrate représente le principal précurseur de la cétogenèse dans les colonocytes, puisque celle-ci est faible à partir d'autres substrats potentiels, tels que les acides gras à longue chaîne ou les autres AGCC.

Les voies impliquées dans l'utilisation colique de butyrate sont résumées dans la [Figure 5](#).

L'activation mitochondriale du butyrate engendre du butyryl-CoA qui rejoint les dernières étapes de la voie de la β -oxydation. L'acétoacétyl-CoA produit de l'acétyl-CoA qui peut être utilisé dans le cycle de Krebs ou dans la voie de la cétogenèse. La voie métabolique impliquée dans la production de corps cétoniques au départ de butyrate semble être la même que dans le foie, c'est-à-dire la voie impliquant la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) synthase mitochondriale [19].

La signification physiologique d'une production de corps cétoniques à partir de butyrate n'est pas connue, quoiqu'ils puissent être utilisés comme précurseurs dans la voie de la lipogenèse.

De nombreux travaux ont abordé le rôle des AGCC, et plus spécifiquement celui du butyrate, dans la prolifération des colonocytes [20]. Deux grandes lignes de résultats semblaient s'opposer : d'une part, le butyrate exerce, *in vivo*, un effet trophique sur la muqueuse colique ; d'autre part, il inhibe la prolifération des cellules coliques tumorales. Ainsi, un régime alimentaire dépourvu de fibres, ou une nutrition parentérale, provoquent une atrophie de la muqueuse colique du rat. Inversement, des infusions

intracoliques de butyrate, ou d'autres AGCC, corrigent, à des doses physiologiques ou supraphysiologiques (20-100 mM), l'atrophie de la muqueuse colique. Sakata et von Engelhardt [21] ont montré que l'augmentation des index mitotiques et de la synthèse d'ADN dans le côlon concerne non seulement l'épithélium colique exposé à l'infusion des AGCC, mais également la partie non exposée du côlon. En complément, ils démontraient ainsi l'implication du système nerveux autonome. Par la suite, Hass *et al.* [22] ont montré que l'absence de butyrate induisait l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax, et l'apoptose dans l'épithélium colique du cobaye ; cet effet était supprimé en présence d'une concentration physiologique de butyrate (10 mM). En revanche, d'autres travaux conduits *in vivo* ont abouti à des résultats contradictoires et l'on s'accorde maintenant à considérer que le butyrate, source énergétique privilégiée de l'épithélium colique, n'augmente la prolifération cellulaire que dans les situations où un déficit énergétique prévaut. Par ailleurs, certaines recherches ont mis en évidence le rôle stimulateur du butyrate dans la libération de peptides gastro-intestinaux ou de facteurs de croissance. Il augmente également l'expression colique des récepteurs de ces facteurs trophiques (c'est le cas pour les récepteurs de l'EGF), et active les voies impliquées dans leur transduction (c'est le cas pour les protéines G). Cet effet indirect du butyrate peut, dans certaines conditions, moduler le renouvellement de l'épithélium colique.

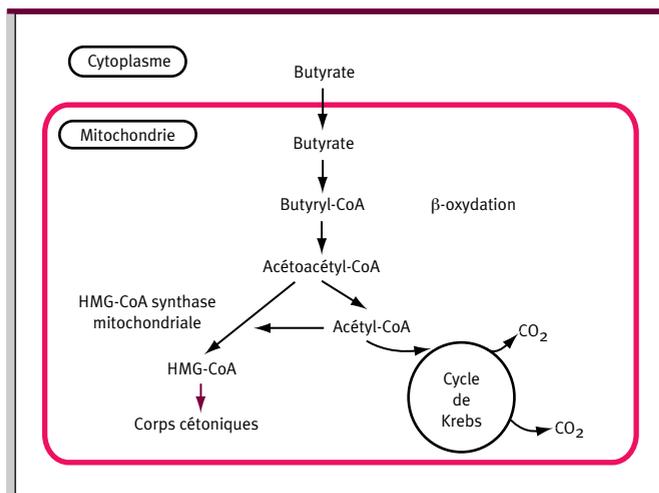


Figure 5.

Voies d'utilisation du butyrate dans les colonocytes.

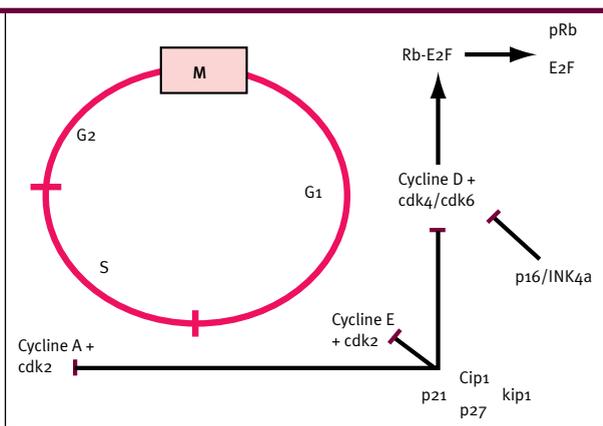
L'activation mitochondriale du butyrate engendre du butyryl-CoA qui rejoint les dernières étapes de la voie de la β-oxydation des acides gras. L'acétyl-CoA est utilisé dans le cycle de Krebs ou dans la voie de la cétogenèse. La voie métabolique de production de corps cétoniques implique la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) synthase mitochondriale

En définitive, dans des conditions où l'apport énergétique à la cellule n'est pas limitant, l'action du butyrate *in vivo* et *in vitro* est d'inhiber la prolifération cellulaire [20]. Cette inhibition de la prolifération a été étudiée sur lignées tumorales coliques d'origine humaine. Elle apparaît associée à un blocage des cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire, phase du cycle régulée par les cyclines D et leurs partenaires, les kinases dépendantes des cyclines (cdk-4 et cdk-6) (Figure 6). Ces enzymes vont phosphoryler la protéine Rb, libérant ainsi le facteur de transcription E2F impliqué dans le déroulement du cycle cellulaire. Le butyrate induit l'expression de la p21^{Cip1},

un inhibiteur des complexes cycline-cdk, et stimule fortement l'expression de la cycline D3, protéine partenaire des cdk-4 et 6. Le rôle clé joué par la p21^{Cip1} a été démontré. Ainsi, en absence de cette protéine (cellules dépourvues de p21^{Cip1} par recombinaison homologue), les cellules s'accumulent en G2/M (et non plus en G1), et l'apoptose est alors importante. Le mécanisme conduisant à cette apoptose a été bien caractérisé. Il met en jeu la voie mitochondriale impliquant le cytochrome c, et la surexpression de la protéine pro-apoptotique Bax [23, 24]. Le butyrate, en inhibant les histones déacétylases de classe I et II, stimule la transcription de nombreux gènes, comme p21^{Cip1}, *bax* ou *c-fos*, agissant sur leur promoteur, en particulier au niveau de la région riche en guanine/cytosine (GC). Les enzymes qui modulent l'acétylation des histones (histone acétyl transférase et déacétylase) jouent un rôle comme facteurs de régulation de l'expression de gènes. Les mécanismes mis en jeu sont complexes et impliqueraient également l'action de kinases et de phosphatases [25]. De plus, il semble que l'acétylation de certains gènes soit nécessaire pour induire la fixation des facteurs de transcription. Ainsi, les AGCC et, notamment, le butyrate sont des molécules essentielles pour l'homéostasie colique : sources énergétiques des colonocytes, mais également modulateurs de l'expression de nombreux gènes.

Figure 6.

Contrôle de la transition entre la phase G1 et la phase S du cycle cellulaire. La transition entre la phase G1 et la phase S du cycle cellulaire met en jeu un ensemble de protéines régulatrices. Elle est régulée par les cyclines D et leurs partenaires, les kinases dépendantes des cyclines (cdk-4 et cdk-6). Les kinases phosphorylent la protéine Rb, ce qui libère le facteur de transcription E2F, impliqué dans le déroulement du cycle cellulaire. La p21^{Cip1} est un inhibiteur des complexes cycline - cdk. Le butyrate stimule l'expression de la protéine p21^{Cip1}, arrêtant ainsi la prolifération cellulaire en phase G1



Devenir de l'ammoniaque bactérien

La concentration d'ammoniaque, principalement issu de la fermentation cœcale et colique des acides aminés et des acides nucléiques, peut atteindre des valeurs élevées (jusqu'à 60-70 mM). Son absorption, à travers l'épithélium colique, est couplée à un flux de protons, et il est converti en urée dans le foie. L'ammoniaque est potentiellement toxique pour l'épithélium colique : il modifie la synthèse d'ADN et réduit la demi-vie des cellules. En effet, un travail de l'équipe de Sakata au Japon [26], réalisé chez le rat, montre que l'infusion *in situ* d'ammoniaque augmente la prolifération cellulaire, sans modifier la taille des cryptes, ce qui suggère que l'ammoniaque stimulerait également l'élimination des colonocytes.

Dans des colonocytes isolés, l'addition d'ammoniaque, à la concentration de 10 mM, réduit l'utilisation cellulaire de butyrate, à une étape en amont de la génération d'acétyl-CoA. Dans le même temps, la glycolyse est accrue [27]. Peut-on relier ces modifications métaboliques à celles concernant le renouvellement de l'épithélium colique ? Les données actuelles ne permettent pas de répondre à cette question.

Le sulfure d'hydrogène est potentiellement toxique

Le sulfure d'hydrogène (H_2S) est une molécule que l'on peut trouver en concentration élevée dans la lumière colique (0,2 à 2 mM). Son origine est liée à la réduction des sulfates par les bactéries sulfato-réductrices, réaction qui utilise l'hydrogène produit dans la fermentation des glucides. Les acides aminés soufrés et certains additifs, peuvent également conduire à la formation d' H_2S . Enfin, le soufre des mucines (une fraction de ces mucines correspond à des protéines sulfatées) peut s'incorporer dans H_2S . H_2S est un agent potentiellement toxique pour l'épithélium colique, car cette molécule agit sur la respiration cellulaire (c'est un inhibiteur puissant de la cytochrome c-oxydase, enzyme de la chaîne de transfert des électrons).

L'une des conséquences métaboliques de cet effet a été illustrée par l'équipe de Roediger, en Australie, qui a mis en évidence, une inhibition de la voie de la β -oxydation mitochondriale, à la suite de l'addition de H_2S . En conséquence, l'oxydation du butyrate est réduite et il en résulte une accumulation de dérivés acyl-CoA [28]. D'ailleurs, même si des voies de détoxication de H_2S existent dans l'épithélium colique (méthylation d' H_2S), l'équipe de Roediger a défendu l'hypothèse que les effets métaboliques engendrés par H_2S expliqueraient, en partie, la rectocolite hémorragique. Cependant, les tentatives de traitement de cette maladie par des lavements de butyrate ont donné des résultats négatifs.

Polyamines et épithélium colique

Les polyamines (putrescine, spermine, spermidine) jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie colique [29]. En effet, la concentration intracellulaire en polyamines est étroitement liée à l'état de croissance des cellules épithéliales. Une diminution des concentrations intracellulaires inhibe la croissance *in vivo* et *in vitro*. La concentration intracellulaire en polyamines est assujettie aux apports alimentaires et bactériens et au flux de synthèse endogène. Ainsi, il a été démontré, lorsque l'apport alimentaire en polyamines est pauvre, que l'effet cytostatique d'un inhibiteur de la synthèse des polyamines, l' α -difluorométhylornithine (DFMO), dépendait de l'activité de la flore colique. La présence d'une flore colique, engendrant une synthèse de polyamines, abolissait l'effet du DFMO [30]. Les polyamines stimulent la prolifération en agissant sur le déroulement du cycle cellulaire. La concentration intracellulaire en polyamines s'accroît pendant les phases G1 et S du cycle cellulaire et la déplétion en polyamines induit un blocage en phase G1. Par ailleurs, une forte concentration en polyamines conduit les cellules vers l'apoptose. En revanche, la susceptibilité des cellules à entrer en apoptose est modulée à la suite d'une forte diminution des concentrations en polyamines.

L'un des mécanismes mis en jeu impliquerait le facteur de transcription NFκB. D'autres mécanismes moléculaires peuvent rendre compte des effets des polyamines. À cet égard, il a été montré que les polyamines, par leur interaction avec l'ADN, stabilisent ce dernier, induisent sa condensation, permettant des changements conformationnels de certaines séquences. Les polyamines peuvent également moduler les interactions entre l'ADN et certaines protéines, dont des polymérase et des facteurs de transcription [31]. Enfin, les polyamines stabiliseraient les membranes des cellules en diminuant leur fluidité et agiraient aussi comme des antioxydants.

En conclusion, ces différents exemples soulignent que les métabolites bactériens agissent sur de nombreuses cibles de l'épithélium colique, engendrant parfois des effets contraires. Ce constat suggère que les interrelations qui existent entre ces différents métabolites bactériens doivent être prises en compte dans l'analyse des paramètres modulant le renouvellement de l'épithélium colique.

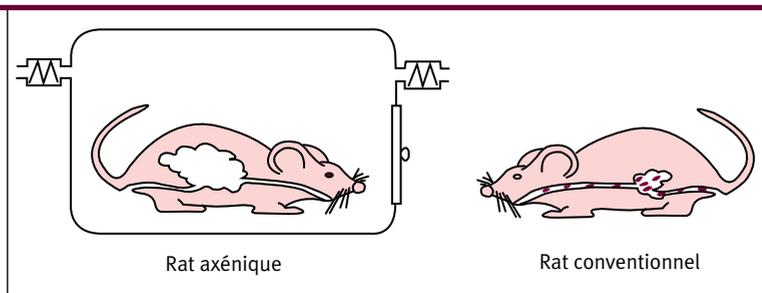
Flore microbienne : effet sur l'épithélium colique

Peut-on étudier l'effet d'une modulation de la flore microbienne sur le métabolisme et le renouvellement de l'épithélium colique ? Cet axe de recherches nécessite la maîtrise d'un modèle d'étude pour étudier directement les interactions entre la flore complexe ou simplifiée et l'hôte.

Des modèles adaptés à l'étude des interactions entre la flore bactérienne et l'hôte : les animaux élevés en isolateurs

Les modèles animaux à flore contrôlée, élevés dans des enceintes stériles (isolateurs), représentent des modèles pertinents pour étudier les interactions entre la flore et l'hôte (Figure 7).

Figure 7.
Modèles animaux à flore contrôlée. L'élevage débute par la collecte et l'introduction dans les isolateurs d'utérus de femelles gravides. La descendance, axénique (dépourvue de flore) est élevée en isolateur, sur plusieurs générations. Ces conditions d'élevage, en atmosphère contrôlée, permettent également, par inoculation d'une ou plusieurs souches bactériennes, de manipuler la flore



L'élevage débute par la collecte et l'introduction dans les isolateurs d'utérus de femelles gravides. La descendance, axénique (dépourvue de flore) est élevée en isolateur, sur plusieurs générations. Ces conditions d'élevage, en atmosphère contrôlée, permettent également, par inoculation d'une ou plusieurs souches bactériennes, de manipuler la flore (animaux gnotoxéniques). Les animaux axéniques peuvent également être inoculés par la flore de leurs contemporains conventionnels, et devenir donc conventionnels.

Cette stratégie, reposant sur l'étude d'animaux à flore contrôlée, a permis de mieux comprendre les interactions entre la flore bactérienne et l'épithélium intestinal de l'hôte, ainsi que certains des mécanismes mis en jeu.

Adaptations de l'épithélium colique en absence de flore et implications des acides gras à chaîne courte

La structure et le renouvellement de l'épithélium colique sont modifiés chez l'animal axénique (Figure 8).

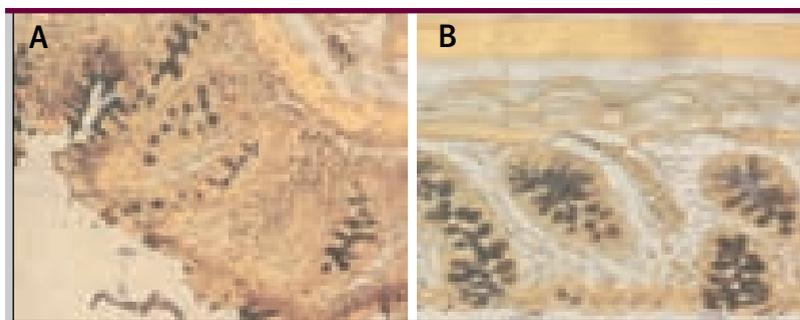


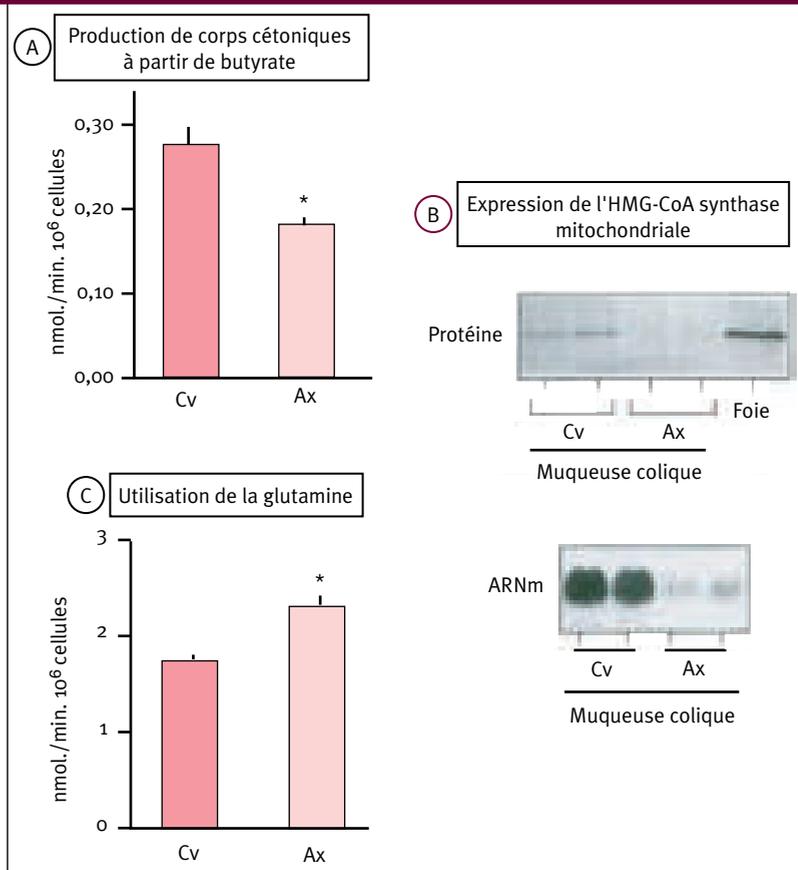
Figure 8.
Coupe transversale de muqueuse colique de rat conventionnel (A) et axénique (B)
(cliché J.-C. Meslin, INRA, Jouy-en-Josas)

En absence de flore, on constate une hypoplasie marquée de la muqueuse colique [32]. Le nombre de cellules par crypte est diminué d'environ 20 % chez l'animal axénique par rapport aux animaux conventionnels. La vitesse de production de cellules par crypte est ralentie et peut conduire à une différence de production journalière d'environ cinquante cellules. Enfin, la durée du cycle cellulaire est plus longue chez l'animal axénique (66 *versus* 50 h chez l'animal conventionnel) et le nombre de cellules des cryptes d'animaux axéniques est plus faible [32]. Le renouvellement de l'épithélium apparaît donc ralenti en absence de flore. Des études d'administration des trois AGCC ont été conduites chez l'animal axénique [33] et les résultats indiquent que les AGCC stimulent la prolifération des cellules des cryptes coliques. L'effet du butyrate est prédominant par rapport aux deux autres AGCC. Comme cela a été rappelé plus haut, cette action des AGCC reflète l'effet d'un apport énergétique adapté, essentiel pour le renouvellement de l'épithélium colique.

On constate également des modifications des capacités métaboliques des colonocytes en absence de flore [19]. Les capacités métaboliques ont été étudiées sur colonocytes isolés d'animaux axéniques ou conventionnels, incubés *in vitro* en présence de différents substrats. Ces résultats montrent que la capacité à métaboliser le butyrate est conservée dans les colonocytes

d'animaux axéniques. Cependant, la production de corps cétoniques est diminuée dans ces cellules (Figure 9A). Cette capacité cétogénique réduite s'accompagne d'une plus faible expression de l'HMG-CoA synthase mitochondriale, enzyme mise en jeu dans la cétogénèse colique (Figure 9B). En revanche, la capacité à utiliser la glutamine est augmentée dans les colonocytes d'animaux axéniques (Figure 9C), ce qui peut s'expliquer par une activité plus élevée de la glutaminase (première étape enzymatique de l'utilisation de la glutamine) dans ces cellules. Des résultats récents suggèrent que l'activité plus élevée de la glutaminase dans les colonocytes d'animaux axéniques serait liée à une augmentation des ARN messagers codant cette enzyme [34].

Figure 9. Modifications des capacités métaboliques des colonocytes en absence de flore intestinale. A, C : les capacités métaboliques des colonocytes sont étudiées sur colonocytes isolés, incubés soit en présence de butyrate (A), soit en présence de glutamine (C). Après 30 minutes d'incubation à 37 °C, l'utilisation des substrats ainsi que les produits issus de leur métabolisme sont mesurés. B : expression de l'HMG-CoA synthase mitochondriale, enzyme de la cétogénèse, dans la muqueuse colique d'animaux axéniques ou conventionnels. Ax : rat axénique ; Cv : rat conventionnel (d'après [19])



Ces données montrent qu'en absence de flore, par conséquent en absence de métabolites bactériens, l'une des voies d'utilisation du butyrate est plus faible. En revanche, la capacité à utiliser la glutamine, nutriment d'origine vasculaire, est augmentée. Ces modifications des capacités des colonocytes à métaboliser les deux molécules passeraient par une modulation de l'expression de deux enzymes clés de leur métabolisme. On notera que ces

résultats suggèrent aussi que la glutamine puisse représenter pour le colonocyte un substrat énergétique compensateur en l'absence d'AGCC. Cependant, malgré cette capacité plus élevée à utiliser la glutamine, le renouvellement de l'épithélium est ralenti chez l'animal axénique, fait suggérant que la disponibilité en glutamine circulante n'est pas suffisante pour optimiser ce renouvellement [19].

D'autres données plus spécifiques renforcent le rôle du butyrate, dont la présence pourrait expliquer certains effets induits par l'inoculation de la flore microbienne [34].

En effet, des animaux axéniques ont été inoculés par *Clostridium paraputrificum*, une souche bactérienne produisant spécifiquement du butyrate. Chez les animaux colonisés, l'expression de l'HMG-CoA synthase mitochondriale s'établit à une valeur identique à celle observée chez l'animal conventionnel (Figure 10).

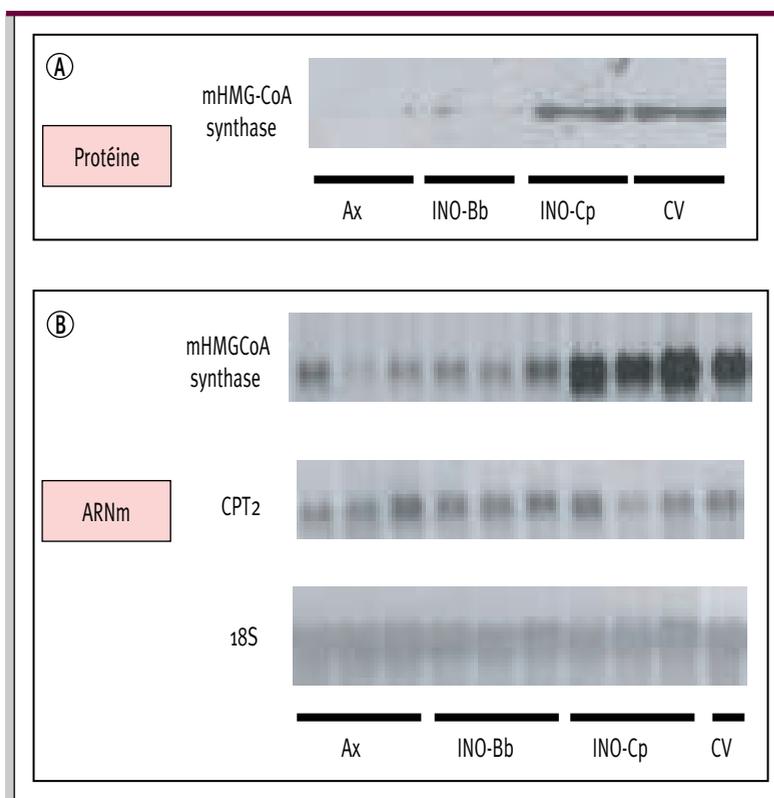


Figure 10. Contrôle de l'expression de l'HMG-CoA synthase mitochondriale dans la muqueuse colique : le butyrate est-il impliqué ? Les animaux, initialement axéniques, sont inoculés par *Clostridium paraputrificum*, souche bactérienne produisant du butyrate ou par *Bifidobacterium breve*, souche bactérienne ne produisant pas de butyrate. Ils sont sacrifiés trois semaines après inoculation. L'expression de l'HMG-CoA synthase mitochondriale est analysée par Western (A) et Northern (B) blotting. B : CPT2 et 18S sont utilisés comme témoins de dépôt. Ax : rat axénique ; CV : rat conventionnel ; INO-Cp : rat inoculé par *Clostridium paraputrificum* ; INO-Bb : rat inoculé par *Bifidobacterium breve* (d'après [34])

En revanche, lorsque les animaux sont inoculés par *Bifidobacterium breve*, une souche non productrice de butyrate, l'expression de l'HMG-CoA synthase mitochondriale reste identique à celle observée chez l'animal axénique (Figure 10). Le butyrate pourrait ainsi moduler l'expression d'une

enzyme impliquée dans son propre métabolisme et celle d'une enzyme impliquée dans le métabolisme d'un nutriment d'origine vasculaire. Cette double action du butyrate, mimant l'effet de l'inoculation d'une flore complexe, souligne l'importance du métabolisme bactérien dans le fonctionnement de l'épithélium colique.

Flore et modulation de l'expression génique

En étudiant les profils d'expression génique de l'intestin grêle distal de la souris axénique ou conventionnelle, à l'aide de puces à ADN, un travail récent a approfondi la compréhension du rôle de la flore colique dans le fonctionnement de l'épithélium intestinal [35]. Les données obtenues indiquent que la flore bactérienne est capable de moduler de nombreux aspects de la physiologie intestinale de l'hôte. Ce travail met en évidence que l'absence de flore s'accompagne d'une augmentation ou d'une diminution de l'expression d'environ une centaine de gènes. Ceux-ci codent pour des protéines impliquées :

- dans le transport de nutriments (par exemple, le transport des lipides, des glucides ou du fer) et le métabolisme des enzymes impliquées dans la production d'énergie cellulaire ;
- dans la fonction de barrière de l'épithélium ;
- dans la réponse aux hormones ;
- dans la composition de la matrice extracellulaire ;
- dans les voies de transduction du signal.

Les effets de différentes souches bactériennes vis-à-vis de l'expression des gènes cibles ont été testés et les profils d'expression génique diffèrent selon les souches bactériennes inoculées [35]. Ainsi, il existe des réponses spécifiques de l'intestin à un type de bactérie donné, soulignant la difficulté d'analyser le rôle d'une flore complexe dans le fonctionnement et le renouvellement de l'épithélium.

Mise en évidence d'un partenariat, s'apparentant à un système de symbiose, entre la flore bactérienne et l'épithélium intestinal de l'hôte

La production de glycoconjugués fucosylés dans les entérocytes est un marqueur de maturation intestinale au cours du développement. Ces glycoconjugués sont aussi utilisés par les bactéries intestinales comme source de nutriments ou comme récepteurs pour les adhésines microbiennes. Ils représentent donc une cible intéressante pour étudier les interactions entre la flore bactérienne et l'épithélium intestinal de l'hôte. Ces travaux, menés par l'équipe de Gordon à l'université de Saint-Louis (États-Unis) montrent, à travers l'exemple de la production de glycoconjugués, des interactions dynamiques entre les deux partenaires, flore et épithélium. Au final, ces interactions pourraient permettre à certaines bactéries de créer un environnement favorable à leur propre installation [1, 36, 37].

Dans la partie distale de l'intestin grêle de souris, les glycoconjugués fucosylés (Fuc α ₁,2Gal β) apparaissent dans les cryptes et dans les villosités, de façon éparse, entre le 17^e et le 21^e jour de vie postnatale. Au 21^e jour après la naissance, l'expression de ces composés glycoconjugués se généralise à l'ensemble des entérocytes iléaux et est maintenue pendant au moins la première année de vie [38].

Chez la souris axénique, les étapes précoces de la production de composés glycoconjugués ne sont pas affectées. En revanche, dès le 21^e jour postnatal, et contrairement à la souris conventionnelle, la production de glycoconjugués décroît pour s'éteindre totalement [38]. Lorsque les animaux axéniques sont inoculés par la flore de souris conventionnelle, la production de glycoconjugués est induite et atteint les valeurs observées chez l'animal conventionnel. Ces inductions sont associées à la stimulation de l'expression de α 1,2-fucosyltransférase, enzyme impliquée dans la synthèse des composés glycoconjugués fucosylés [38].

Le rôle de *Bacteroides thetaiotaomicron*, bactérie de la microflore intestinale de souris et de l'homme, dans la production de glycoconjugués a également été testé [38]. Une souche a été choisie dans la mesure où elle métabolise divers glucides dont le fucose provenant, soit de l'hôte, soit de sources alimentaires. Lorsque les animaux axéniques sont inoculés par cette souche *Bacteroides thetaiotaomicron*, le profil spatial et temporel de la production de glycoconjugués, et plus particulièrement (Fuc α 1,2Gal β), observé chez l'animal conventionnel est restauré. En revanche, lorsque les animaux sont inoculés par une souche de *Bacteroides thetaiotaomicron* incapable d'utiliser le fucose, il n'y a pas d'induction de la production de glycoconjugués. Ces dernières données suggèrent donc qu'il existe un lien entre la capacité des bactéries à utiliser le fucose et leur capacité à induire la production de glycoconjugués chez l'hôte.

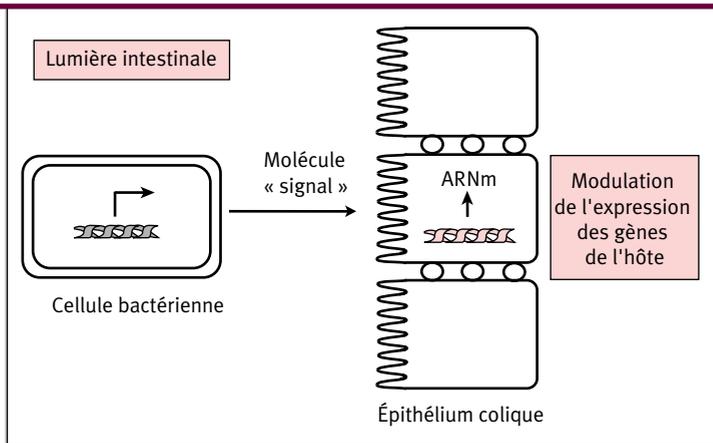
L'analyse de différents mutants de *Bacteroides thetaiotaomicron* a permis de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'action de cette bactérie vis-à-vis de la production de glycoconjugués chez l'hôte [39]. Cette étude a mis en évidence l'existence d'une protéine, appelée FucR, dont le rôle serait de coordonner à la fois les enzymes du métabolisme du fucose dans la bactérie et la molécule « signal » envoyée à l'hôte pour la production de glycoconjugués. L'activité de FucR est elle-même régulée par le fucose. En absence de fucose, FucR réprime la synthèse des enzymes du métabolisme du fucose et stimule la synthèse de la molécule « signal ». En présence de fucose, l'activité de FucR est inhibée : l'expression des enzymes du métabolisme du fucose est stimulée, alors que celle de la molécule « signal » est inhibée. Ainsi, en fonction de la disponibilité en fucose, initialement dérivé de l'hôte, FucR pourrait orchestrer le métabolisme bactérien tout autant que la production entérocytaire de glycoconjugués.

L'ensemble de ces données met en évidence des interactions entre les bactéries de la flore et les cellules épithéliales intestinales. Ces interactions impliqueraient – sous l'action de facteurs environnementaux – la sécrétion de molécule(s) « signal » par les bactéries, pouvant moduler l'expression de gènes cibles au niveau de l'épithélium intestinal (Figure 11). La nature des molécules « signal », l'existence de récepteurs spécifiques au niveau de l'épithélium, les voies de transduction du signal, restent largement à explorer.

Ainsi, la manipulation de la flore colique conduit à modifier le métabolisme de l'épithélium colique. L'application de ces résultats, dans une perspective de prévention de pathologies coliques, a été abordée depuis quelques années et sera illustrée ci-après.

Figure 11.

Modèle d'interactions mises en place entre la flore bactérienne et l'épithélium colique de l'hôte. Les interactions entre la flore bactérienne et l'épithélium colique de l'hôte pourraient impliquer la sécrétion de molécule(s) « signal » par les bactéries, envoyée(s) à l'hôte et qui pourrai(en)t moduler l'expression de gènes cibles. Ces interactions pourraient constituer une des bases moléculaires du partenariat existant entre la flore bactérienne et l'épithélium colique. La nature des molécules « signal », l'existence de récepteurs spécifiques au niveau de l'épithélium, les voies de transduction du signal, la nature des gènes cibles restent largement à explorer



La flore intestinale peut-elle moduler le risque de cancer colique ?

Le cancer colorectal représente, en France, l'une des affections les plus meurtrières. L'épithélium tumoral colique est caractérisé par des capacités prolifératives et métastatiques accrues, associées à une diminution des phénomènes apoptotiques. Ces changements reflètent des altérations successives de plusieurs gènes, suppresseurs de tumeurs et/ou activateurs d'oncogènes. Ces altérations pourraient être la conséquence d'une exposition élevée à des molécules cancérigènes. En effet, actuellement, seul un faible pourcentage des cancers colorectaux peuvent être considérés comme de vraies maladies génétiques, ayant des caractéristiques familiales et héréditaires précises (polypose adénomateuse familiale et autres cancers colorectaux héréditaires). Cependant, la cancérogenèse est parfois soumise à l'influence d'une prédisposition génétique qui, prise isolément, peut se révéler insuffisante pour permettre l'évolution complète du processus tumoral. Le développement d'un cancer, sous la dépendance des effets pro- et/ou anticancérigènes de nombreux facteurs environnementaux, est un processus complexe qui ne se résume pas à différentes mutations ou pertes de gènes. Les cellules néoplasiques sont soumises, en effet, aux actions opposées de différents facteurs, stimulant le processus de prolifération ou au contraire engageant les cellules dans la voie de l'apoptose. L'équilibre entre ces différents facteurs constitue aussi un paramètre clé dans la promotion et la progression tumorale.

Les données vues plus haut indiquent que la flore et la production de métabolites bactériens (sulfure d'hydrogène, ammoniac, polyamines, etc.)

peuvent jouer un rôle potentiel dans le développement des tumeurs coliques. L'activation de procarcinogènes en carcinogènes peut concerner des agents exogènes, d'origine alimentaire, ou endogènes. Parmi ceux-ci, les acides biliaires secondaires, engendrés dans la transformation colique des acides biliaires primaires par la 7 α -déhydroxylase bactérienne, semblent provoquer une hyperprolifération de l'épithélium colique et favorisent le développement de tumeurs coliques après chimio-induction chez l'animal [40]. La réduction du nitrobenzène, les produits d'hydrolyse des composés glucuronides, la transformation des nitrates en nitrites, dérivés du catabolisme bactérien des acides aminés ou la synthèse de métabolites puissants mutagènes (par exemple, les fécapentaènes) mettent en exergue un rôle actif de la flore dans la promotion de tumeurs [41]. En revanche, la synthèse bactérienne de facteurs protecteurs (notamment le butyrate), à partir des substrats glucidiques et/ou protéiques, contribue au rôle protecteur de la flore vis-à-vis de la cancérogénèse.

La colonisation bactérienne du côlon peut constituer un facteur de risque de cancer colique

Des rats exposés à différentes substances cancérogènes développent moins de foyers néoplasiques dans le côlon lorsqu'ils sont maintenus en situation d'axénie [40], ce qui reflète vraisemblablement le rôle de l'activité métabolique de la flore dans la genèse des métabolites toxiques. Par ailleurs, si l'on compare la composition de la flore fécale de populations ayant des risques différents de cancer colique, des risques élevés sont associés à la présence de certaines souches bactériennes (*Bacteroides vulgatus* et *Bacteroides stercoris*), des risques plus faibles à la présence de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus SO6* et *Eubacterium aerofaciens* [42].

Enfin, on sait que le contenu en polyamines des cancers colorectaux est augmenté par rapport au tissu sain et cela est à relier à l'activité accrue de l'ornithine décarboxylase (ODC) des cellules coliques. *In vitro*, l'inhibition de l'ODC par le DFMO conduisant à un arrêt de la croissance tumorale illustre clairement l'importance des polyamines dans les cancers coliques. Cependant, *in vivo*, l'utilisation du DFMO, seul, est sans effet et il s'avère nécessaire d'associer un traitement antibiotique, destiné à réduire la synthèse bactérienne de polyamines, et un régime alimentaire considérablement appauvri en polyamines [43]. Dans cette situation, la flore colique (ou certaines souches bactériennes) exerce ainsi des effets délétères sur l'épithélium colique.

Modulation bénéfique de la flore microbienne dans la prévention du cancer colorectal : rôle des probiotiques

La mise en évidence du rôle bénéfique de certaines souches bactériennes dans la diminution du risque de cancer colorectal [44] renforce les données taxonomiques évoquées plus haut. Ainsi, dans des modèles animaux où des foyers de cryptes aberrantes sont chimiquement induits, on a clairement montré que des souches de bactéries lactiques (*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve*) exercent un effet protecteur. Celui-ci est mis en évidence par la réduction des dommages à l'ADN ou par la diminution des foyers de cryptes aberrantes, c'est-à-dire des lésions néoplasiques à partir desquelles des adénomes peuvent se développer.

Les résultats obtenus sur modèles animaux sont-ils extrapolables à l'homme ? La prise de *Lactobacillus* par des volontaires sains semble réduire, sur le court terme, le caractère mutagène des fèces, déterminé en situation de fortes consommations de viande. Cependant, les données épidémiologiques portant sur la relation entre la consommation de produits laitiers fermentés et la prévalence du cancer colorectal sont contradictoires et nécessitent d'être encore consolidées.

En tout état de cause, les mécanismes par lesquels les bactéries lactiques pourraient réduire le risque du cancer du côlon restent, à l'heure actuelle, inconnus. Les pistes avancées concernent, soit un effet modulant des paramètres physicochimiques dans le côlon (diminution du pH qui limite la croissance bactérienne, neutralisation de composés mutagènes), soit une modulation des activités métaboliques de la flore intestinale et, plus précisément, celles qui libèrent des composés cancérigènes dans la lumière colique (par exemple, la β -glucuronidase capable d'hydrolyser les glucuronides) ou, inversement, celles qui libèrent des composés anticancérigènes. Enfin, le rôle immunomodulateur des bactéries lactiques, pouvant conduire à un effet antitumoral, est également évoqué.

Il est probable que l'effet bénéfique d'une consommation de probiotiques sera mieux analysé quand on prendra en compte le stade d'évolution tumorale durant lequel la prise de probiotiques a lieu, à l'instar des données recueillies dans les études sur les fibres alimentaires.

Faut-il inclure certains germes pathogènes parmi les bactéries à effet protecteur sur le cancer colorectal ?

Dans cette perspective, les données récentes de Pitari *et al.* [45], concernant l'action de la toxine ST sécrétée par des souches entérotoxigènes d'*Escherichia coli* (EPEC) sur la prolifération des cellules tumorales coliques, méritent une mention. L'entérotoxine se fixe aux récepteurs guanylyl cyclase C présents à la surface des microvillosités et cette fixation induit une forte augmentation de la concentration intracellulaire en GMPc. Jusqu'à présent, les conséquences physiologiques connues concernaient principalement la modification des flux ioniques et l'apparition de diarrhée, ou l'induction du GMPc intracellulaire (que l'on peut reproduire aussi avec des analogues de la guanylyl cyclase C) conduit également à l'arrêt de la prolifération cellulaire intestinale, ce qui pourrait, dans les pays à haute incidence d'infections entériques, contribuer à la faible fréquence du cancer colorectal.

Points clés

- L'homéostasie de l'épithélium colique, caractérisé par un renouvellement rapide, est contrôlée par des mécanismes cellulaires et moléculaires complexes. Des anomalies affectant ces mécanismes conduisent à une désorganisation de l'épithélium et, parfois, à une situation pathologique.
- Parmi les métabolites produits par la flore colique, le butyrate est une molécule essentielle pour l'homéostasie colique, constituant la source énergétique privilégiée des colonocytes et modulant l'expression de nombreux gènes.
- L'intégrité de l'épithélium colique, dépendra, en grande partie, des effets, parfois contraires, des métabolites engendrés par la flore colique. Certains d'entre eux sont capables de provoquer des altérations génétiques dans les cellules du compartiment prolifératif des cryptes.
- Des interactions entre les bactéries du côlon et les cellules intestinales ont été montrées : elles impliqueraient la sécrétion de molécules « signal » par les bactéries, pouvant moduler l'expression de gènes cibles dans l'épithélium intestinal.
- Une meilleure connaissance des mécanismes mis en jeu dans ce domaine rendra possible l'élaboration de stratégies, préventives et/ou thérapeutiques, limitant le risque de cancer colique.

Références

1. Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, *et al.* Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998 ; 62 : 1157-70.
2. Potten CS, Booth C, Pritchard DM. The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol* 1997 ; 78 : 219-43.
3. Marshman E, Booth C, Potten CS. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 2002 ; 24 : 91-8.
4. Cohn SM, Roth KA, Birkenmeier EH, *et al.* Temporal and spatial patterns of transgene expression in aging adult mice provide insights about the origins, organization, and differentiation of the intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 1034-8.
5. Wong MH, Hermiston ML, Syder AJ, *et al.* Forced expression of the tumor suppressor adenomatosis polyposis coli protein induces disordered cell migration in the intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 9588-93.
6. Merritt AJ, Potten CS, Watson AJ, *et al.* Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. *J Cell Sci* 1995 ; 108 : 2261-71.
7. Binder HJ, Sandle GI. Electrolyte transport in the mammalian colon. In : Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3rd ed. New York : Raven Press, 1994 : 2133-71.
8. Yun CH, Tse CM, Nath SK, *et al.* Mammalian Na⁺/H⁺ exchanger gene family: structure and function studies. *Am J Physiol* 1995 ; 269 : G1-11.
9. Rajendran VM, Binder HJ. Characterization and molecular localization of anion transporters in colonic epithelial cells. *Ann NY Acad Sci* 2000 ; 915 : 15-29.
10. Hermiston ML, Simon TC, Crossman MW, *et al.* Model systems for studying cell fate specification and differentiation in the gut epithelium. In : Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3rd ed. New York : Raven Press, 1994 : 521-69.
11. Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000 ; 103 : 311-20.
12. Korinek V, Barker N, Moerens P, *et al.* Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 1998 ; 19 : 379-83.
13. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, *et al.* The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002 ; 111 : 241-50.
14. Lorentz O, Duluc I, Arcangelis AD, *et al.* Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J Cell Biol* 1997 ; 139 : 1553-65.
15. Bonhomme C, Duluc I, Martin E, *et al.* The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut* 2003 ; 52 : 1465-71.
16. Cuff MA, Lambert DW, Shirazi-Beechey SP. Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J Physiol* 2002 ; 539 : 361-71.
17. Roediger WE. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology* 1982 ; 83 : 424-9.
18. Clausen MR, Mortensen PB. Kinetic studies on the metabolism of short-chain fatty acids and glucose by isolated rat colonocytes. *Gastroenterology* 1994 ; 106 : 423-32.
19. Cherbuy C, Darcy-Vrillon B, Morel MT, *et al.* Effect of germfree state on the capacities of isolated rat colonocytes to metabolize n-butyrate, glucose, and glutamine. *Gastroenterology* 1995 ; 109 : 1890-9.
20. Blottiere HM, Buecher B, Galmiche JP, *et al.* Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *Proc Nutr Soc* 2003 ; 62 : 101-6.
21. Sakata T, von Engelhardt W. Stimulatory effect of short chain fatty acids on the epithelial cell proliferation in rat large intestine. *Comp Biochem Physiol A* 1983 ; 74 : 459-62.
22. Hass R, Busche R, Luciano L, *et al.* Lack of butyrate is associated with induction of Bax and subsequent apoptosis in the proximal colon of guinea pig. *Gastroenterology* 1997 ; 112 : 875-81.
23. Mandal M, Olson DJ, Sharma T, *et al.* Butyric acid induces apoptosis by up-regulating Bax expression via stimulation of the c-Jun N-terminal kinase/activation protein-1 pathway in human colon cancer cells. *Gastroenterology* 2001 ; 120 : 71-8.

24. Medina V, Edmonds B, Young GP, *et al.* Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. *Cancer Res* 1997 ; 57 : 3697-707.
25. Sassone-Corsi P. The decline of induced transcription: a case of enzymatic symbiosis. *Nat Struct Biol* 2003 ; 10 : 151-2.
26. Ichikawa H, Sakata T. Stimulation of epithelial cell proliferation of isolated distal colon of rats by continuous colonic infusion of ammonia or short-chain fatty acids is nonadditive. *J Nutr* 1998 ; 128 : 843-7.
27. Darcy-Vrillon B, Cherbuy C, Morel MT, *et al.* Short chain fatty acid and glucose metabolism in isolated pig colonocytes : modulation by NH₄⁺. *Mol Cell Biochem* 1996 ; 156 : 145-51.
28. Babidge W, Millard S, Roediger W. Sulfides impair short chain fatty acid beta-oxidation at acyl-CoA dehydrogenase level in colonocytes: implications for ulcerative colitis. *Mol Cell Biochem* 1998 ; 181 : 117-24.
29. Loser C, Eisel A, Harms D, *et al.* Dietary polyamines are essential luminal growth factors for small intestinal and colonic mucosal growth and development. *Gut* 1999 ; 44 : 12-6.
30. Hessels J, Kingma AW, Ferwerda H, *et al.* Microbial flora in the gastrointestinal tract abolishes cytostatic effects of alpha-difluoromethylornithine *in vivo*. *Int J Cancer* 1989 ; 43 : 1155-64.
31. Thomas T, Thomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 2001 ; 58 : 244-58.
32. Alam M, Midtvedt T, Uribe A. Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. *Scand J Gastroenterol* 1994 ; 29 : 445-51.
33. Sakata T. Effects of short-chain fatty acids on the proliferation of gut epithelial cells *in vivo*. In : Cummings JH, Rombeau JL, Sakata T, eds. *Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids*. Cambridge : Cambridge University Press, 1995 : 289-305.
34. Cherbuy C, Andrieux C, Ide C, *et al.* Expression of mitochondrial HMGCoA synthase and glutaminase in the colonic mucosa is modulated by bacterial species. *Eur J Biochem* 2004 ; 271 : 87-95.
35. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, *et al.* Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001 ; 291 : 881-4.
36. Gordon JL, Hooper LV, McNevin MS, *et al.* Epithelial cell growth and differentiation. III. Promoting diversity in the intestine: conversations between the microflora, epithelium, and diffuse GALT. *Am J Physiol* 1997 ; 273 : G565-70.
37. Hooper LV, Bry L, Falk PG, *et al.* Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem. *Bioessays* 1998 ; 20 : 336-43.
38. Bry L, Falk PG, Midtvedt T, *et al.* A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science* 1996 ; 273 : 1380-3.
39. Hooper LV, Xu J, Falk PG, *et al.* A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 9833-8.
40. Nancey S, Coffin B, Descos L, *et al.* Flore et cancer colique. *Gastroenterol Clin Biol* 2001 ; 25 : C79-C84.
41. Rowland IR, Mallett AK, Wise A. The effect of diet on the mammalian gut flora and its metabolic activities. *Crit Rev Toxicol* 1985 ; 16 : 31-103.
42. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003 ; 361 : 512-9.
43. Quemener V, Moulinoux JP, Havouis R, *et al.* Polyamine deprivation enhances antitumoral efficacy of chemotherapy. *Anticancer Res* 1992 ; 12 : 1447-53.
44. Rafter J. Probiotics and colon cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003 ; 17 : 849-59.
45. Pitari GM, Zingman LV, Hodgson DM, *et al.* Bacterial enterotoxins are associated with resistance to colon cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 2695-9.



Influence de la microflore intestinale sur l'immunité de l'hôte : conditions physiologiques

Marie-Christiane Moreau

Unité d'Écologie et de Physiologie du Système Digestif, INRA, Jouy-en-Josas, France.

L'intestin est un organe encore très méconnu. Sa muqueuse, d'une superficie d'environ 300 m², est l'interface entre le monde extérieur et notre monde intérieur, permettant cette fonction vitale qu'est la digestion et l'assimilation des aliments tout en étant capable de nous protéger contre l'envahissement par les micro-organismes pathogènes. Ainsi, pour maintenir une homéostasie indispensable à son bon fonctionnement, l'intestin a développé d'autres fonctions : c'est le premier organe immunitaire de l'organisme et le « deuxième cerveau » du fait du nombre de cellules immunes et de neurones qu'il contient. Dès les premiers jours de vie, l'intestin héberge également une microflore intestinale considérable, cent mille milliards de bactéries, qui exerce de nombreux effets bénéfiques chez l'individu sain et lui permet de vivre dans un milieu septique. Parmi les multiples effets de cette flore, son action sur le système immunitaire et, en particulier, sur le système immunitaire intestinal (SII) est considérable. Dans les conditions physiologiques, on peut qualifier de « symbiotique » la relation SII et flore, le SII la tolérant comme ses propres tissus et inversement, la flore exerçant de nombreux effets sur l'optimisation du fonctionnement du système immunitaire de l'hôte, au niveau intestinal mais aussi au niveau périphérique (ou systémique), même si dans ce dernier cas les données sont encore peu nombreuses.

Microflore intestinale résidente : importance de la période néonatale

Chez l'enfant, on estime que l'équilibre de la microflore intestinale est proche de celui de l'homme adulte vers l'âge de 2 ans. Durant cette période, la flore très peu diversifiée chez le nouveau-né (environ dix à douze espèces microbiennes différentes) se complexifie peu à peu, atteignant un nombre de trois à quatre cents espèces différentes dans la flore de l'adulte. L'alimentation va jouer un rôle crucial dans cette diversification (*in* [1]). C'est également vers l'âge de 2 ans que les systèmes immunitaires périphérique et intestinal de l'enfant sont estimés matures. Ainsi, d'un point de vue physiologique, la relation flore-immunité est particulièrement importante à considérer durant cette première période de vie.

À la naissance, le bébé est dans un environnement bactérien essentiellement fourni par les flores vaginale et fécale de la mère et, pourtant,



seules quelques bactéries coloniseront son tube digestif. Les facteurs qui président à ce premier tri sont liés au bébé (mucus), aux conditions de l'accouchement (voie naturelle, césarienne, environnement) et à l'état de la mère (prise d'antibiotiques). *Escherichia coli* et *Streptococcus* sont parmi les premières bactéries à coloniser le tube digestif. Puis, les souches anaérobies strictes, *Bacteroides*, *Clostridium* et *Bifidobacterium* s'installent au cours de la première semaine de vie, après un deuxième tri au cours duquel le facteur aliment joue un rôle fondamental. On sait depuis longtemps que le bébé nourri au sein héberge une flore anaérobie stricte, composée essentiellement de bifidobactéries alors que, chez l'enfant nourri avec une formule infantile, elles sont absentes ou présentes de façon aléatoire [2]. Comme l'indiquent des études expérimentales et cliniques rapportées ici, la flore de l'enfant joue un rôle considérable sur la maturation de son système immunitaire et une perturbation de son fragile équilibre microbien par divers facteurs, conditions de la naissance, prise d'antibiotiques, mauvaise alimentation, peut avoir des conséquences importantes à court, mais aussi à long terme (Figure 1).

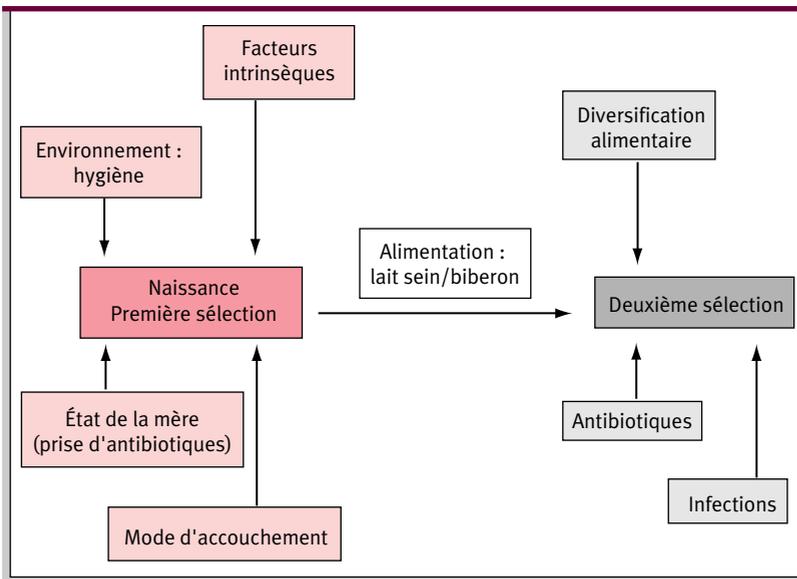


Figure 1.
Facteurs affectant l'établissement de la flore intestinale chez le nouveau-né

Chez l'homme adulte sain dont le système immunitaire est développé et fonctionnel, sa flore complexe, du moins colique gauche, est beaucoup moins influencée dans sa composition, par l'aliment. D'autres facteurs peuvent cependant perturber son équilibre, le plus évident étant la prise d'antibiotiques, mais le stress, une alimentation déséquilibrée, une modification du transit ou des infections intestinales peuvent aussi le modifier. Si l'on considère le rôle important joué par la flore intestinale sur l'optimisation et la régulation continue des réponses immunes de l'hôte, une modification de l'équilibre bactérien peut alors avoir des conséquences sur ces réponses, les rendant suboptimales ou inversées. Un bon équilibre de la flore intestinale est ainsi un

facteur important indispensable au maintien d'un fonctionnement optimal et adapté du système immunitaire.

Brefs rappels sur l'immunité

Immunité innée

La première ligne de défense de l'hôte, et la plus ancienne, est assurée par les cellules de l'immunité innée, monocytes/macrophages, cellules dendritiques (CD), cellules *natural killer* (NK) et polynucléaires neutrophiles. Ce sont les sentinelles de l'organisme. Ainsi, grâce à l'activité phagocytaire des CD, et surtout des macrophages, les organismes étrangers à l'hôte sont phagocytés et détruits.

Des données récentes montrent que les macrophages et CD périphériques sont capables de reconnaître des composants bactériens, anormalement présents, grâce à certains récepteurs exprimés à la surface des cellules dont le CD14 et une dizaine d'autres récepteurs appelés *Toll-like receptor* (TLR) (in [3]). La liaison de ces récepteurs avec ces composants bactériens conduit à l'activation du facteur nucléaire κ B (NF κ B) permettant la transcription des gènes codant pour des chimiokines dont l'IL-8, et des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL-1 ou l'IL-6. Cette synthèse a pour conséquence d'attirer sur le site d'inflammation des polynucléaires neutrophiles, puis des cellules B et T, permettant alors la mise en place d'une réponse immune « acquise », et aussi de provoquer la synthèse d'autres cytokines comme l'IL-12 avec, pour effets, une stimulation de l'expression des moles de costimulation des macrophages et CD, de la phagocytose, de la production de NO et une influence sur les réponses immunitaires acquises par une orientation Th0 vers Th1 (*voir plus loin* balance Th1/Th2). Parmi tous les TLR, certains sont maintenant bien connus. Ainsi, le TLR2 est un récepteur du peptidoglycane des bactéries à Gram positif, le TLR4 un récepteur du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif, le TLR5 reconnaît les flagelles bactériens et le TLR9 les motifs CpG (dinucléotide non méthylé : cytosine phosphoryl guanine) trouvés uniquement dans le génome bactérien. Les LPS de différentes bactéries n'ont pas tous les mêmes actions, et l'on parle de « répertoire » des TLR. Au niveau intestinal, les entérocytes sont aussi capables de reconnaître les composants bactériens et d'activer la voie NF κ B, mais celle-ci est soumise à de fortes et multiples formes de régulation, une réaction inflammatoire étant préjudiciable à l'homéostasie intestinale [4].

Les NK participent à l'activité antitumorale et peuvent aussi, par la synthèse d'interféron γ (IFN γ), orienter les réponses immunitaires acquises.

Ainsi, l'immunité innée, non spécifique, et non douée de mémoire, est la première à intervenir suite à une agression antigénique. Elle joue aussi un rôle important dans l'immunité acquise par la présentation de l'antigène (Ag) aux cellules T (cT) et par la synthèse de certaines cytokines.

Immunité acquise

Les réponses acquises concernent les réponses immunes humorales et cellulaires spécifiques de l'antigène (Ag). Lors d'un premier contact avec l'Ag, elles sont longues à se mettre en place (sept à dix jours) mais sont douées de mémoire, permettant une réponse très rapide lors d'un deuxième

contact. Ces réponses exigent la coopération entre les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), macrophages et CD, et la cT, *via* plusieurs interactions au cours desquelles des molécules « ligand-récepteur » sont exprimées à la fois par les CPA et les cT. La totalité de ces liaisons conduit alors à l'activation de la cT, de phénotype CD8+ pour les réponses de type cellulaire et CD4+ pour les réponses de type cellulaire et humoral. Ces interactions moléculaires et cellulaires sont très importantes et participent à la modulation des réponses immunes. Ainsi, les CPA jouent un rôle clé dans la réponse immune acquise par leur capacité à présenter l'Ag et à synthétiser diverses cytokines qui sont capables de moduler et orienter les réponses immunes.

Réponse humorale et balance Th1/Th2

Après activation par les CPA, les cT CD4+, ou cT *helper* (Th), agissent sur la synthèse d'anticorps par les cellules B, *via* la production de cytokines (Figure 2).

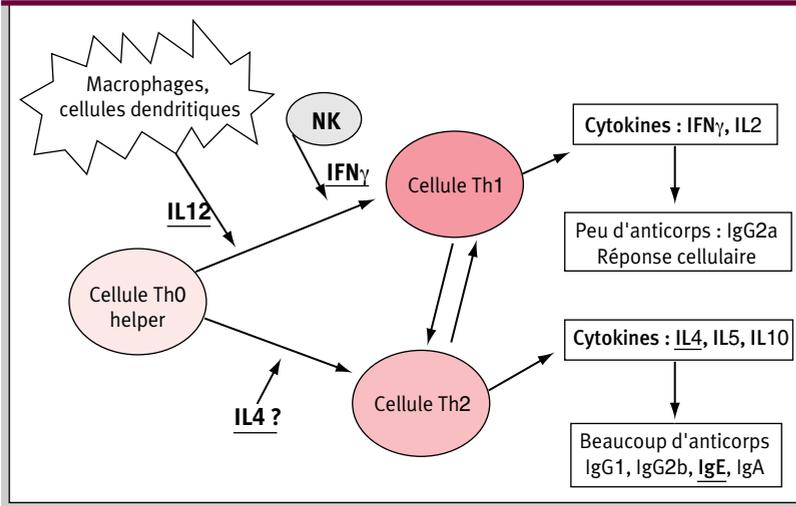


Figure 2.
Représentation schématique de balance Th1/Th2 : rôle des cytokines

Plusieurs populations de cellules Th diffèrent par le profil de cytokines émises. Les cellules T *helper* de type 1, ou Th1, sécrètent essentiellement de l'IFN γ , cytokine « pro-inflammatoire », et provoquent une faible synthèse d'anticorps par les cellules B (sous-classe IgG2a). Elles seront davantage sollicitées dans le cas de réponses cellulaires [5]. Au contraire, l'activation des cellules de type T *helper* 2, ou Th2, conduit à la synthèse de cytokines « anti-inflammatoires », IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 et à une production importante par les cellules B d'anticorps appartenant aux IgG1, IgA, ou IgE, ces derniers étant impliqués dans l'allergie. L'activation d'une population inhibe celle de l'autre. Le passage de la cellule précurseur Th0 à Th1 ou Th2 dépend des facteurs environnementaux vis-à-vis desquels les cellules de l'immunité innée, macrophages, CD et NK, jouent un rôle considérable par la synthèse de cytokines, dont l'IL-12 et l'IFN γ , qui agissent sur l'orientation

préférentielle vers un profil Th1. Cette balance Th1/Th2 permet une réponse immune adaptée à chaque type d'Ag : réponse Th1 inflammatoire et cellulaire pour des infections intracellulaires, réponse Th2 non inflammatoire avec synthèse importante d'anticorps IgG1 ou IgA, dans d'autres cas. Pour ce qui concerne la réponse IgE, celle-ci doit rester modérée sous peine de conduire à des réactions allergiques non désirables : parmi d'autres facteurs, l'IL-10 pourrait intervenir dans cette régulation [6]. La balance cytokinique joue ainsi un rôle considérable dans la régulation et l'orientation des réponses immunes.

Rôles de la microflore intestinale sur l'immunité de l'hôte

À partir des données essentiellement fournies par les modèles animaux, et par quelques études cliniques et épidémiologiques récentes chez l'enfant, on peut caractériser les actions de la flore intestinale sur l'immunité de l'hôte par trois effets : « activation » du système immunitaire, « modulation » des réponses immunes et, enfin, « régulation » des réponses permettant à court et long termes une bonne adéquation de celles-ci aux différents stimulus antigéniques. La période postnatale semble cruciale dans la mise en place de certains de ces mécanismes de régulation, notamment ceux impliqués dans les maladies atopiques.

Les données expérimentales acquises proviennent essentiellement d'études chez l'animal sans germe encore appelé axénique (AX). Ces animaux (souris et rats) sont élevés dans des « bulles », ou isolateurs stériles, dans lesquelles tout l'environnement, air, nourriture, matériel, est stérile. La comparaison souris AX et conventionnelle (CV), ou souris « humanisée » (souris axénique dont le tube digestif est ensuite colonisé avec une flore fécale humaine), a permis de mettre en évidence le rôle joué par la flore sur le développement cellulaire du système immunitaire et sur sa fonctionnalité. Ce modèle de souris AX est également intéressant, car il permet d'analyser, *in vivo*, le rôle spécifique joué par les différentes bactéries qui composent la flore intestinale sur les réponses immunes, en colonisant cette fois son tube digestif avec une ou plusieurs souches microbiennes connues (modèles de souris « gnotoxéniques »). Les résultats montrent que, selon les réponses immunes étudiées, l'effet immunomodulateur de la flore est dû, soit à l'implantation de la totalité des bactéries de la flore de la naissance à l'état adulte, soit à la présence d'une seule souche bactérienne, cette action étant alors souvent « souche-dépendante ». L'effet flore existe au niveau périphérique et intestinal.

Rôle de la flore sur le système immunitaire périphérique : immunité innée

Effet activateur de la flore

sur les cellules présentatrices de l'antigène

Les mécanismes d'activation de l'immunité innée par les composants bactériens jouent probablement un rôle clé dans l'activation permanente et indispensable du système immunitaire chez l'adulte et doivent participer à la maturation du système immunitaire du bébé chez lequel la cause principale de

l'immaturation du système immunitaire périphérique serait surtout l'immaturation des CPA [7]. Des arguments expérimentaux soutiennent cette hypothèse. Quelques picogrammes de LPS sont suffisants pour activer les CPA. Chez la souris axénique, la colonisation de son tube digestif par une flore de souris CV provoque la synthèse de cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6 et TNF α par les macrophages péritonéaux (Tableau I). Le même effet peut être reproduit avec seulement la présence d'*Escherichia coli* dans le tube digestif, alors qu'une souche de *Bifidobacterium bifidum* de bébé n'a aucun effet [8]. De même, la présence de la flore stimule, par les macrophages issus de précurseurs spléniques, la synthèse d'IL-12, dont on sait le rôle important sur l'orientation vers le profil Th1 [9] (Figure 2). Chez l'enfant, cette activation pourrait jouer un rôle crucial dans la régulation de la balance Th1/Th2 (voir plus loin). Chez l'adulte, le léger état inflammatoire physiologique existant au niveau du SII pourrait s'expliquer par cet effet continu de la flore. Il est intéressant de constater que deux bactéries à Gram négatif, *Escherichia coli* et *Bacteroides* font partie de la flore dominante de l'enfant et l'adulte. La colonisation du tube digestif par *Escherichia coli* dans les heures qui suivent la naissance pourrait ainsi avoir un impact très important sur la maturation du système immunitaire périphérique en créant un état inflammatoire physiologique indispensable à cette activation.

Flore intestinale	Cytokines		
	IL-1	IL-6	TNF α
Conventionnelle	18 200	6,33	72
Axénique	8 300	2,62	< 50
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	8 000	2,46	< 50
<i>Escherichia coli</i>	15 350	7,24	108

Tableau I.
Influence des bactéries intestinales sur la production de cytokines inflammatoires par les macrophages péritonéaux. Valeurs exprimées en unités/mL (d'après [10])

Conséquences : régulation de la balance Th1/Th2

Depuis une quarantaine d'années, on assiste à une augmentation inquiétante de l'incidence de l'allergie du nourrisson, touchant surtout les pays riches industrialisés sans que les causes « classiques » (génétique, pollution, tabagisme...) puissent expliquer ce fait (in [11]). Un mauvais équilibre de la balance Th1/Th2 pourrait être l'une des causes expliquant ces réponses atopiques. Du fait de l'importance des cytokines pro-inflammatoires sur l'orientation des réponses immunes vers un profil Th1, il a été suggéré que l'environnement bactérien jouerait un rôle crucial dans la régulation de la balance Th1/Th2 chez l'enfant. À la naissance, le jeune est dans un contexte immunologique Th2 nécessaire au non-rejet du fœtus durant la gestation, et les réponses Th1 sont en grande partie réprimées (in [11, 12]). Après la naissance, le nouveau-né doit rapidement rétablir l'équilibre entre Th2 et Th1 et ce processus s'établirait durant la période postnatale, au cours des deux premières années de vie, avec une importance prononcée de la première

année. Différentes études épidémiologiques et cliniques ont montré que, chez l'enfant atopique, le *switch* Th2 → Th1 ne s'est pas opéré et que l'enfant reste dans un contexte déséquilibré Th2, avec une prédisposition à développer des réponses allergiques IgE [12]. Ces études épidémiologiques récentes confortent le rôle important de l'environnement microbien durant la première année dans ce processus régulateur. La comparaison entre des enfants vivants sur le même site géographique, mais dans des conditions de vie différentes, ville et ferme, indique que les enfants qui passent leur première année de vie dans un environnement traditionnel rural, développent moins de maladies atopiques que les citadins [13]. L'existence d'un environnement microbien riche (contact avec les animaux, ingestion de lait cru, etc.) semble être déterminante. Le rôle du LPS a également été suggéré comme important, mais non suffisant. Actuellement, des études bactériologiques sur la flore fécale des enfants se développent afin de mieux comprendre l'éventuelle interaction existant entre l'établissement et la composition de la flore intestinale et le développement de l'atopie. (*in* [14]). Une modification dans l'établissement de la flore du nouveau-né est en effet observée dans plusieurs pays européens, avec une prépondérance de staphylocoques et de *Clostridium*, en même temps qu'une diminution du nombre de *Escherichia coli* et *bifides*. Le rôle important de l'équilibre microbien sur l'orientation Th2 vers Th1 a été démontré expérimentalement par Sudo *et al.* [15]. Ces auteurs ont montré comment, chez des souriceaux de trois semaines, la perturbation de l'équilibre bactérien intestinal consécutive à l'ingestion d'un antibiotique, la kanamycine, dévie les réponses immunes qui restent de type Th2, contrairement aux témoins non traités qui développent Th1 et Th2. Enfin, très récemment, des études cliniques utilisant des probiotiques ont montré que certains d'entre eux pouvaient traiter ou prévenir l'eczéma atopique du nourrisson, confortant l'hypothèse du rôle important joué par l'équilibre bactérien intestinal du nourrisson sur la bonne orientation des réponses immunes [14, 16]. Un effet préventif a été mis en évidence avec *Lactobacillus rhamosus* GG : dans un groupe de cent trente-quatre mères atopiques, la moitié a reçu 10¹⁰ bactéries/jour un mois avant l'accouchement puis six mois après (mère ou bébé), et l'autre moitié un placebo. À l'âge de 2 ans, la fréquence de l'eczéma atopique chez les enfants traités était de 23 % contre 46 % dans le groupe placebo [16]. Les mécanismes de cet effet préventif de la bactérie probiotique ne sont pas encore connus.

À partir de toutes ces données, une question importante doit alors se poser : un excès d'hygiène lors de l'accouchement et de la vie du nourrisson, un usage abusif des antibiotiques en antibioprophylaxie du *per partum* et durant les premières années de vie ne pourraient-ils pas être des causes conduisant à des perturbations de l'équilibre bactérien intestinal avec des conséquences irréversibles et désastreuses sur l'absence d'effets régulateurs bactériens sur la balance Th1/Th2 ? Cette question est d'importance ! Les probiotiques peuvent être également considérés comme des palliatifs intéressants à ce mauvais équilibre de la flore intestinale. La compréhension des mécanismes immunorégulateurs des bactéries résidentes de la flore et des probiotiques est indispensable pour aller vers une maîtrise des réponses immunes aux bactéries intestinales.

Rôles de la flore sur le système immunitaire périphérique : immunité acquise

Effet activateur et régulateur de la flore sur le taux d'immunoglobulines naturelles et le répertoire des cellules B

En dehors de toute immunisation, il existe dans le sérum des immunoglobulines (Ig) dites « naturelles » dont le taux est relativement constant et défini selon les isotypes et sous-classes d'Ig. La flore intestinale a une action importante sur les taux d'IgG et IgA, qui sont très faibles chez la souris AX. Elle n'a pas d'effet sur le taux d'IgM (*in* [17]).

La présence de la flore intestinale agit fortement, *via* les Ig naturelles, sur le répertoire des cB, donc sur la possibilité pour l'individu de développer des réponses humorales diversifiées. En effet, l'analyse de l'expression de certains gènes VH, codant pour la synthèse des parties dites « variables » des Ig, donc de leur site anticorps (Ac), a permis d'évaluer la diversité du répertoire des Ig sécrétées par les cellules B [17, 18]. Une forte utilisation du gène VH7183 est observée dans les cellules B de la rate du souriceau CV, signifiant une faible diversité des Ac sécrétés. Cependant, cette utilisation diminue fortement jusqu'à l'âge adulte, fait indiquant une diversification progressive du répertoire des cB périphériques, donc des Ac « naturels » synthétisés. Ce fait ne se produit pas chez la souris AX adulte dont le gène VH7183 reste très exprimé, comme chez le nouveau-né, indiquant que la flore intestinale aurait un rôle déterminant sur la diversification de la synthèse de ces Ac. Il a été montré que ce sont les Ac naturels qui exercent un effet sur l'expression des gènes VH, puisque l'injection d'Ig naturelles de souris CV à des souris AX réduit l'utilisation du VH7183 comme chez les souris CV adultes. La flore intestinale, *via* la stimulation des Ig naturelles, et particulièrement des IgG, serait donc responsable de la diversification du répertoire des cellules B périphériques qui s'effectue au cours de la vie. Ces Ac naturels joueraient leurs rôles régulateurs sur le répertoire B de l'individu par des interactions que l'on a qualifiées d'idiotypiques (interactions des Ac entre eux) [17, 18]. Chez l'homme, le rôle régulateur de ces Ig naturelles est exploité lors du traitement de certaines maladies auto-immunes pour lesquelles l'injection par voie intraveineuse d'une *pool* d'IgG humain apporte une amélioration clinique [19].

Flore et susceptibilité à certaines maladies :
exemple d'une maladie auto-immune

La relation entre certaines infections bactériennes systémiques et l'apparition d'affections auto-immunes est connue, mais le rôle protecteur des bactéries commensales sur la susceptibilité à ces maladies l'est moins. Un très joli exemple a été publié il y a quelques années et concerne l'arthrite expérimentale induite chez des rats après injection de parois de streptocoque [20]. Cette maladie auto-immune est caractérisée par une phase aiguë suivie d'une phase chronique. Cette dernière est déterminée génétiquement et certaines lignées de rats sont décrites comme résistantes (rats Fisher) alors que d'autres sont sensibles (rats Lewis). Il a été montré que, lorsque les rats Fisher sont mis en conditions AX, la résistance disparaît. Elle réapparaît lorsque les rats AX sont colonisés avec la flore d'un animal CV. L'effet protecteur de la flore serait dû à l'existence de clones de cT devenus tolérants,

en présence de la flore intestinale, à certains Ag bactériens, dont ceux de la paroi de streptocoque. Chez les rats sensibles, cette tolérance n'existerait pas ou serait fragile. Chez les rats résistants, elle est associée à la présence permanente de la flore intestinale. Cet exemple montre comment la susceptibilité génétique à certaines maladies peut être étroitement associée à un facteur environnemental important : la flore intestinale. Elle soulève également la question des conséquences que peuvent avoir des modifications importantes de l'équilibre bactérien intestinal sur l'apparition de maladies auto-immunes, suite, par exemple, à la prise d'antibiotiques.

Rôles de la microflore sur le système immunitaire intestinal

Physiologie du système immunitaire intestinal

Il ne sera traité ici que de la physiologie du SII, sa description anatomique ayant fait et faisant encore l'objet de nombreuses publications [21, 22].

À la différence du système immunitaire périphérique, le SII, en contact continu avec la masse antigénique considérable des protéines alimentaires et bactériennes, ne développe pas de réponses immunes inflammatoires inappropriées qui porteraient atteinte à l'intégrité de la muqueuse intestinale. Les réponses immunes du SII sont adaptées au milieu intestinal et la présence de la flore intestinale joue un rôle crucial sur ses fonctions.

Les fonctions du SII sont apparemment contradictoires [22]. Sa première fonction est d'élaborer des réponses protectrices cellulaire et humorale quand il y a danger : présence de virus, bactéries ou parasites entéropathogènes. La réponse anticorps humorale est caractérisée par une classe d'Ig, les IgA, spécifiques des muqueuses, qui sont excrétées dans la lumière intestinale associées à une protéine, la pièce sécrétoire, leur conférant une résistance aux enzymes protéolytiques et une action ciblée [21, 23]. Les anticorps IgA sécrétoires (IgAs) forment des immuns-complexes avec l'antigène, bloquant l'adhésion des bactéries pathogènes, la multiplication virale dans l'entérocyte, neutralisant les entérotoxines. Les réponses cellulaires feraient essentiellement appel aux lymphocytes intra-épithéliaux, dont une fonction primordiale serait de maintenir l'intégrité de l'épithélium intestinal en détruisant les entérocytes infectés ou anormaux [24].

La deuxième fonction du SII est, au contraire, d'empêcher l'induction de réponses immunes envers les Ag et composants bactériens, présents de façon permanente dans le tube digestif, par l'élaboration de réponses suppressives. L'une de ces réponses est « la tolérance orale » [22, 25] qui se définit par le fait que l'ingestion d'une protéine conduit à la suppression des réponses immunes cellulaires et humorales spécifiques de la protéine ingérée, aux niveaux intestinal et périphérique, en cas de ré-exposition à celle-ci. Cette réponse joue un grand rôle dans l'homéostasie intestinale, en évitant les réactions inflammatoires de la muqueuse incompatibles avec la fonction essentielle de l'intestin qu'est l'assimilation des nutriments. Lorsqu'elle est défectueuse, des pathologies inflammatoires apparaissent, en particulier les hypersensibilités alimentaires se manifestant au niveau périphérique (eczéma atopique) ou intestinal (diarrhées, vomissements). De même que pour la balance Th1/Th2, on peut penser que la tolérance orale, qui existe chez l'homme [26], empêche l'individu d'élaborer des réponses immunes non appropriées, donc néfastes, contre les protéines alimentaires. Le pourcentage

élevé d'hypersensibilité chez le nourrisson, jusqu'à 15 % durant la première année, pourrait donc être dû à une mauvaise mise en place de ces mécanismes (revu dans [22, 25]).

La tolérance orale s'adresse-t-elle aussi aux bactéries résidentes de la flore dont on sait qu'elles sont tolérées au même titre que les propres tissus de l'individu [27] ? On peut le penser, puisque certaines affections auto-immunes comme l'arthrite du rat seraient dues à une rupture de tolérance envers des antigènes bactériens arthritogéniques [20]. Cependant, l'absence de réactivité inflammatoire envers les bactéries intestinales pourrait aussi être due à d'autres mécanismes suppressifs spécifiques du SII. Il a ainsi été montré récemment que les CPA du SII, contrairement aux populations périphériques, n'exprimaient pas les récepteurs des composants bactériens, CD14 et TLR, ce qui pourrait expliquer leur non-réponse aux bactéries de la flore intestinale [28].

R le activateur de la flore sur le développement du système immunitaire intestinal : exemple des plasmocytes IgA

La comparaison de la souris AX et de la souris CV montre que la présence de la flore intestinale joue un rôle crucial sur le développement et l'activation du SII [1]. Chez la souris AX, comme chez le bébé, le SII est peu développé,

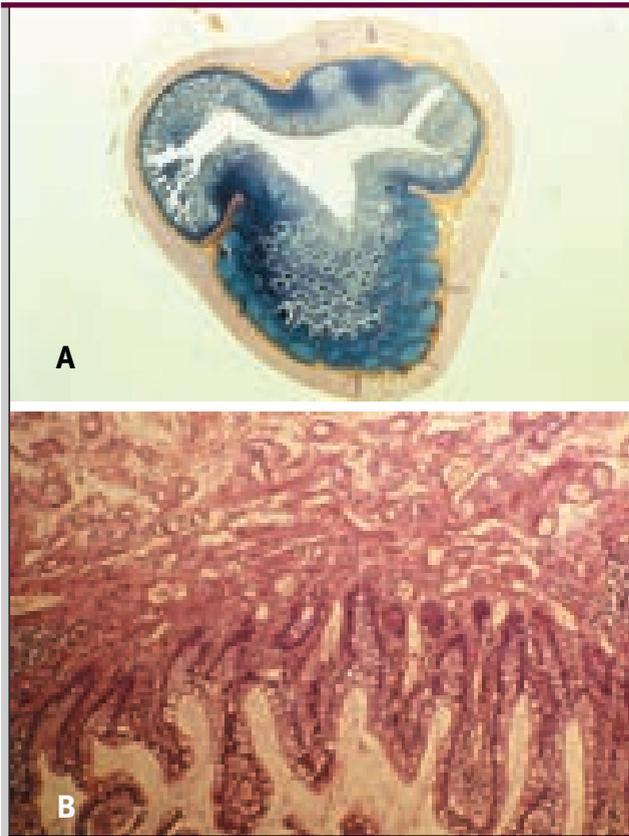


Figure 3.

A : coupe transversale d'iléon. La plaque de Peyer, visible en foncé dans la partie inférieure de la photographie, est formée par le groupement de nombreux follicules lymphoïdes dans la région opposée à la zone d'insertion du mésentère (cliché C. Da Lage).
B : système immunitaire intestinal : plaque de Peyer (cliché T. Piche, Nice)

les plaques de Peyer sont atrophiées et la cellularité de la *lamina propria* (cB, cT, plasmocytes à IgA) est très pauvre (Figure 3).

La colonisation de son tube digestif par une flore de souris CV adulte provoque, en trois semaines, l'activation du SII : augmentation des nombres de plasmocytes à IgA et de cT, expression des moles de classe II par les entérocytes du sommet des villosités et augmentation du nombre des lymphocytes intra-épithéliaux. Le rôle de la flore sur le nombre, l'activation et les particularités des CPA présentes dans l'intestin est encore peu connu.

Les nombreux plasmocytes à IgA peuplant la muqueuse sécrètent naturellement des IgAs qui contrôlent la translocation des bactéries de la flore résidente. À la naissance, le souriceau CV a, comme la souris AX adulte, un nombre très faible de plasmocytes à IgA qui augmente progressivement pour atteindre, vers l'âge de six semaines, soit trois semaines après le sevrage, un nombre équivalent à celui de la souris CV adulte. Cette situation est retrouvée chez l'enfant, chez lequel un nombre de plasmocytes à IgA intestinaux égal à celui trouvé chez l'adulte n'est atteint qu'entre la première et la deuxième année de la vie, parallèlement à l'installation progressive de la flore intestinale. Parmi les causes responsables de ce long délai dans l'activation du SII, l'immaturation éventuelle de celui-ci, l'effet inhibiteur des anticorps du lait maternel ou encore l'établissement séquentiel de la flore intestinale de la naissance jusqu'au sevrage ont été suggérés. Grâce aux modèles de souris AX adultes colonisées avec la flore intestinale de souriceaux CV âgés de un à vingt-cinq jours, il a été montré que c'est uniquement la colonisation séquentielle du tube digestif par les bactéries intestinales qui est responsable

Tableau II.
Rôle de l'établissement séquentiel de la flore intestinale du souriceau entre la naissance et après le sevrage sur l'activation du système immunitaire intestinal : exemple du développement du système intestinal plasmocytaire à IgA (valeurs \pm SEM) (d'après [28])

Flore intestinale hébergée par les souris gnotoxéniques	Nombre de plasmocytes à IgA/villosité intestinale
Flore de souris conventionnelle adulte	41 \pm 1
Souris axénique	4 \pm 0.5
Flores de souriceaux âgés de 1 à 4 jours	15 \pm 2
Flores de souriceaux âgés de 7-23 jours	23 \pm 1
Flores de souriceaux âgés de 25 jours	43 \pm 1

du complet développement du nombre de plasmocytes à IgA intestinaux [29] (Tableau II).

Si certaines bactéries à Gram négatif jouent un rôle adjuvant sur cette réponse IgA [30], il faut cependant que la flore soit complexe et diversifiée pour obtenir la stimulation maximale ([29] et *in* [1]). Ainsi, chez le souriceau, ce long délai de six semaines se justifie par le temps d'acquisition d'une flore intestinale proche de celle de l'adulte, qui se dessine entre l'âge de trois à quatre semaines, et par le délai nécessaire supplémentaire de trois semaines entre la colonisation du tube digestif et la réponse cellulaire intestinale IgA. Ces données mettent en évidence l'étroite relation qui existe entre l'alimentation, la diversification de la flore intestinale et son effet sur le SII

chez le jeune. Des perturbations de l'installation de la flore, une diversification alimentaire trop précoce ou tardive pourront avoir des répercussions sur la qualité de l'équilibre microbien de la flore de l'enfant et, par conséquent, sur le développement du SII. Chez l'adulte, une relation entre une flore déséquilibrée et un déficit en IgAs n'a pas été directement démontrée, mais on sait que l'ingestion de probiotiques peut stimuler la sécrétion des IgAs totales (*in* [31]).

R le modulateur de la flore
sur les fonctions du syst me immunitaire intestinal
exemple de la r ponse sp cifique IgA antirotavirus

On sait depuis très longtemps que les diarrhées à rotavirus, qui affectent tous les enfants, sont moins fréquentes et moins sévères chez le bébé allaité. La protection immunitaire contre les rotavirus est essentiellement intestinale et fournie par les Ac IgA spécifiques antirotavirus et par une immunité cellulaire. Pour distinguer l'effet protecteur apporté par le lait maternel et celui dû à la flore intestinale, particulièrement riche en bifides chez les enfants allaités, un modèle de souris adulte gnotoxénique infectée avec un rotavirus a été mis au point, permettant de comparer les effets immunomodulateurs de la flore fécale d'un bébé au sein par rapport à celle d'un bébé nourri avec une formule infantile, sur la réponse Ac IgA

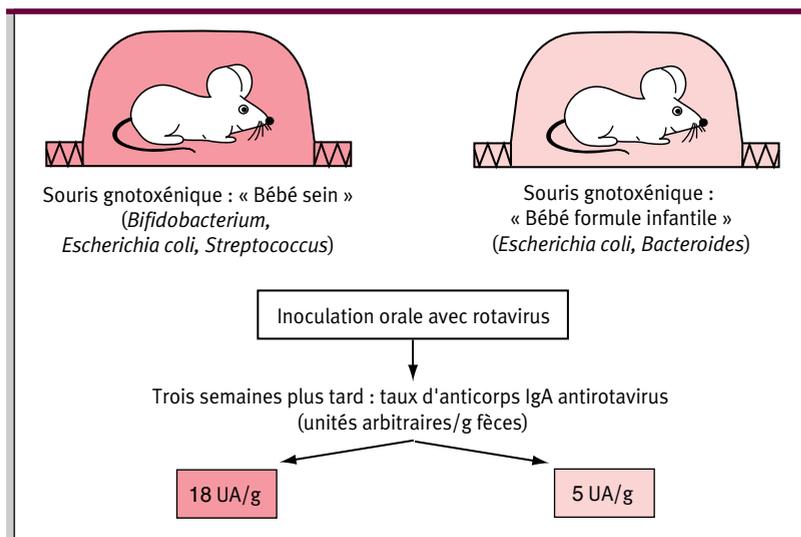


Figure 4.
Effet adjuvant de la flore intestinale du bébé nourri au sein sur la réponse anticorps IgA antirotavirus mesurée dans les fèces : études à partir de modèles de souris gnotoxéniques

antirotavirus intestinale. Ces souris gnotoxéniques sont identiques en tous points, sauf en ce qui concerne leur flore intestinale (Figure 4).

Escherichia coli était présent dans les deux flores, mais une souche de bifide, *Bifidobacterium bifidum*, n'était présente que dans la flore provenant de l'enfant nourri au sein. Après infection virale, la cinétique d'apparition des Ac IgAs dans les fèces était la même dans les deux groupes. Au plateau, soit environ vingt jours après l'inoculation virale, l'intensité de la réponse était

quatre fois supérieure dans les fèces des souris « flore bébé sein » comparée à celle trouvée dans les fèces de souris « flore bébé formule infantile » [32]. D'autres modèles de souris gnotoxéniques ont permis d'analyser *in vivo* le rôle respectif joué par la souche de bifide et *Escherichia coli*, montrant clairement que la souche de *Bifidobacterium bifidum* était responsable d'un effet adjuvant important sur la réponse IgA antirotavirus, alors que, au contraire, *Escherichia coli* exerçait nettement un effet suppresseur [32]. Ainsi, la présence de *Bifidobacterium* dans la flore fécale de l'enfant au sein modère l'effet suppresseur exercé par *Escherichia coli*, ce qui met en évidence l'importance de la présence de cette bactérie dans la flore des bébés afin de stimuler cette réponse immune protectrice si importante qu'est la réponse IgA antirotavirus. Ces résultats mettent une nouvelle fois en évidence le rôle considérable que va jouer l'équilibre bactérien de la flore sur une réponse immune. Chez l'adulte, les espèces de bifides présentes, souvent différentes de celles trouvées chez le bébé, ne semblent pas exercer les mêmes effets immunostimulants sur la réponse IgA antirotavirus (résultats non encore publiés), et auraient au contraire un effet suppresseur. Cet effet immunomodulateur « souche-dépendant » rend encore plus complexe ces études et leurs conclusions.

R le r gulateur de la flore sur le syst me immunitaire intestinal : cas de la tol rance orale

La flore intestinale exerce un effet régulateur sur les fonctions du SII, permettant en particulier la mise en place des mécanismes de suppression des réponses immunes, comme la tolérance orale, mécanismes qui jouent un rôle clé dans l'homéostasie intestinale. La tolérance orale est particulièrement importante chez le nouveau-né qui doit, le plus rapidement possible, empêcher le développement de réponses immunes inopportunes contre les protéines alimentaires nouvellement rencontrées dans le régime. Dans ce cas encore, les résultats proviennent essentiellement des études faites chez les souris gnotoxéniques colonisées avec des bactéries de la flore humaine.

On met en évidence expérimentalement l'induction de la tolérance orale en gavant un lot de souris avec une protéine alimentaire comme l'ovalbumine (OVA), puis en l'immunisant par voie systémique, sept jours plus tard, avec la même protéine, l'OVA. La comparaison de la réponse immune anti-OVA, mesurée au niveau périphérique, entre le lot gavé OVA et le lot témoin, gavé avec du tampon, permet de savoir si la tolérance orale a été établie. Lorsque c'est le cas, la réponse anti-OVA cellulaire et/ou humorale est très diminuée ou supprimée dans le lot gavé OVA par rapport au lot témoin alors que, dans le cas contraire, elle est comparable entre les deux lots, indiquant un non-établissement de la tolérance orale. Ce protocole expérimental a permis de montrer que, parmi les facteurs influençant l'établissement du processus de la tolérance orale, il y avait la flore intestinale [1, 25].

Wannemuehler *et al.* [33] ont été les premiers à décrire que, contrairement à la souris CV, le gavage de souris AX avec des globules rouges de mouton n'induisait pas de tolérance orale, mais que celle-ci était rétablie par l'ingestion préalable de LPS. Ils en avaient conclu que les bactéries à Gram négatif jouaient un rôle fondamental dans les mécanismes responsables de la tolérance orale. L'utilisation d'un autre Ag, l'OVA, nous a permis de voir que, chez la souris AX adulte, on peut induire une tolérance orale, mesurée par la

suppression de la réponse sérique IgG anti-OVA après gavage avec l'OVA, mais que, contrairement à la souris CV ou colonisée avec une flore d'homme adulte, cette suppression est très brève : environ dix jours contre plus de cinq mois chez la souris CV [34, 35]. La colonisation préalable au gavage du tube digestif avec *Escherichia coli* ou *Bacteroides*, deux bactéries à Gram négatif et riches en LPS, suffit à restaurer une suppression aussi durable que celle existant chez la souris CV. En revanche, une souche de *Bifidobacterium bifidum* n'a aucun effet (résultats non encore publiés). Récemment, Sudo *et al.* [36], étudiant le rôle de la flore sur la suppression de la réponse IgE anti-OVA, ont montré que, dans leurs conditions expérimentales, le gavage de souris AX avec l'OVA n'entraînait pas de suppression de la réponse IgE anti-OVA sérique, contrairement à ce qui était observé chez la souris CV. La colonisation du tube digestif des souris AX avec une souche de *Bifidobacterium infantis* rétablissait cette suppression, à la condition cependant que la souche soit établie dans le tube digestif depuis la naissance. D'autres études ont également montré que la flore intestinale jouait un rôle protecteur important contre l'effet abrogatif de certaines toxines (toxine cholérique, toxine thermolabile d'*Escherichia coli*) vis-à-vis du processus de la tolérance orale, mais à la condition, dans certains cas, que la flore soit présente depuis la naissance [1, 35].

L'ensemble de ces données expérimentales met en lumière l'importance que peut avoir la présence d'une seule souche bactérienne appartenant à la flore du bébé sur les mécanismes de la tolérance orale. Ils montrent également le rôle crucial que peut jouer la période postnatale dans la mise en place de ces mécanismes de régulation. Ces observations [35, 36] rejoignent les études épidémiologiques de Rieder *et al.* [13], suggérant l'importance d'un environnement bactérien riche entourant l'enfant durant les premiers mois de vie, pour prévenir l'atopie.

L'impact exact des bactéries de la flore sur les mécanismes de la tolérance orale n'est pas encore connu, puisque ces mécanismes eux-mêmes ne sont pas complètement élucidés. Les études actuelles montrent que les CPA intestinales, en particulier les CD, et des populations de cT régulatrices particulières au tube digestif seraient en cause. Les mécanismes impliqueraient principalement une présentation particulière de l'Ag par les CPA conduisant à une non-activation des cT (anergie clonale) et une sécrétion préférentielle de certaines cytokines, l'IL-10 en particulier, par les CD intestinales en réponse au stimulus antigénique. Cette cytokine orienterait la réponse Th vers la production d'IL-10 et TGF- β par des cT de type Th3 et par des cellules T régulatrices, les cTr1, induites dans ce contexte cytokinique et décrites récemment (*in* [22]). Cet environnement cytokinique anti-inflammatoire et suppresseur empêcherait alors l'activation des cT classiques. Ce phénomène est appelé « *bystander suppression* » par les Anglo-Saxons [1, 22, 25]. Le rôle clé de la sécrétion d'IL-10 sur la suppression des réponses inflammatoires au niveau intestinal est également renforcé par d'autres études expérimentales [37, 38]. Il a été suggéré que l'un des mécanismes d'action de certains probiotiques dans le maintien de la phase de rémission chez des patients souffrant de maladies inflammatoires du tube digestif, pourrait être associé à cette synthèse [39].

Pour ce qui est de la tolérance à sa propre flore intestinale, les études récentes de Neish *et al.* [40] et Dubuquoy *et al.* [41] ont apporté des éléments

très intéressants sur le rôle joué par les bactéries intestinales commensales ou non pathogènes, dans la régulation de la voie d'activation NF- κ B de la synthèse des cytokines inflammatoires. Cette régulation obéit à de multiples processus faisant appel à des molécules ou/et des récepteurs divers [4, 40]. Brièvement, au niveau des CPA et surtout des cellules composant l'épithélium intestinal (entérocytes et colonocytes), ces auteurs ont montré *in vitro* que la présence d'une souche de *Salmonella* non pathogène permettait le blocage de l'activation de la voie NF- κ B en empêchant la dégradation, par phosphorylation, de la molécule régulatrice I κ B α [40]. Dans une autre étude *in vivo* et utilisant des souris AX, Dubuquoy *et al.* [41] ont montré que la présence de la flore intestinale activait le récepteur PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*), bloquant par cet autre processus l'activation de la voie NF- κ B. Ce récepteur est surtout exprimé à la surface des colonocytes chez l'homme.

L'ensemble de ces données met de plus en plus en évidence l'importance du dialogue qui existe entre les bactéries intestinales et le SII par l'intermédiaire des cellules épithéliales qui jouent un rôle prépondérant sur la régulation du fonctionnement du SII. Dans ce cas encore, l'action décrite de certains probiotiques, en particulier le VSL#3 qui est un mélange de huit souches de bactéries lactiques [42], ou la souche de levure *Saccharomyces boulardii* [43], sur le maintien de la rémission de la pouchite chronique et de la rectocolite hémorragique, pourrait s'expliquer par un rétablissement du dialogue rompu ou perturbé « flore intestinale-épithélium ».

Si toutes ces données expérimentales et cliniques apportent de solides bases pour croire à un effet très important de la flore sur le SII, nous sommes encore loin de connaître tous les rôles régulateurs joués par les bactéries sur les particularités qui différencient le SII du système immunitaire périphérique et qui sont résumées dans le **Tableau III**. Pourtant, ce point est important à connaître car ces particularités, en particulier l'induction préférentielle des

Tableau III.
Caractéristiques du système immunitaire intestinal.
Rôles de la flore intestinale ?

- Populations particulières de CD dans les plaques de Peyer (synthèse d'IL-10)
- Présence de cT régulatrices (CD4 + CD25 +)
- Non-expression du CD14 et du CD89 des macrophages de la lamina propria
- Apoptose importante des cT de la lamina propria
- Stimulation préférentielle d'anticorps d'isotype IgA : rôles du TGF β et de l'IL-12

réponses suppressives, sont associées à un bon fonctionnement du SII, donc au maintien de notre santé.

Conclusion

Il est de plus en plus acquis par la communauté scientifique et médicale que la flore intestinale exerce un rôle considérable sur le développement, le fonctionnement et le dysfonctionnement du SII. Malheureusement, le nombre trop faible de chercheurs qui se sont intéressés à ce sujet durant les dernières années n'a pas permis de préciser un certain nombre de points qu'il est maintenant indispensable de développer afin d'acquérir les connaissances fondamentales nécessaires aux applications thérapeutiques prometteuses, comme l'utilisation des probiotiques. Trois domaines de recherches sont donc à poursuivre. Le premier concerne la connaissance de la flore intestinale : ce qu'elle est, son importance fonctionnelle chez l'enfant, l'adulte, la personne âgée, son comportement face aux stress de la vie courante ou après des maladies affectant le tube digestif, l'impact des métabolites bactériens dans l'immunorégulation, avec comme corollaire la connaissance du métabolisme de la flore dont on sait qu'il est très dépendant de l'alimentation chez l'adulte... Le second concerne la connaissance du fonctionnement du SII : comment gère-t-il cette dualité étonnante d'élaborer dans le même temps des réponses immunes de défense et de tolérance ? Quels sont les liens du SII avec le compartiment périphérique ? Comment la flore exerce-t-elle ses effets de façon continue et quelle est la « bonne » flore en relation avec son ordre préférentiel d'acquisition ? Ces connaissances sont indispensables au troisième domaine de recherche constitué par les probiotiques : dans quelles conditions les micro-organismes probiotiques peuvent-ils agir dans le tube digestif ? Quelles sont les propriétés immunomodulatrices propres à chaque souche de probiotique, car il est tout à fait improbable qu'une seule souche puisse agir sur toutes les réponses immunitaires ? Quelle est l'importance de leur adhésion dans le tube digestif ?

Le travail qui reste à faire est donc énorme, mais il faut espérer que face aux promesses que constituent en particulier les probiotiques pour « agir » sur la flore intestinale, donc sur ses fonctions, donc sur notre santé, ces trois domaines de recherches se développent de manière interactive, et apportent des réponses attendues... et probablement d'autres qui n'ont pas fini de nous étonner !

Points clés

- Le système immunitaire intestinal (SII) exerce deux fonctions essentielles et contradictoires pour le maintien de l'homéostasie intestinale : fonctions de défense contre les micro-organismes entéro-pathogènes (anticorps IgA et réponses cellulaires) et mise en place de réponses suppressives empêchant les réponses immunes d'exister contre les protéines alimentaires et les composants bactériens de la flore intestinale présents en permanence dans le tube digestif.
- La colonisation séquentielle du tube digestif du nourrisson, stérile à la naissance, par la flore intestinale joue un rôle crucial dans la maturation de son SII qui, plutôt qu'immature, est inactivé. Elle joue probablement aussi un rôle important dans la maturation du système immunitaire périphérique, même si ce point est moins connu.
- La flore intestinale a trois rôles fondamentaux sur les systèmes immunitaires intestinal et périphérique : rôle d'activation, rôle de modulation des réponses spécifiques, par exemple au niveau intestinal sur la réponse protectrice IgA antirotavirus, importante chez le bébé et, enfin, rôle de régulation pour la mise en place des fonctions suppressives, par exemple la tolérance induite par voie orale qui empêche les réactivités immunitaires aux protéines alimentaires et aux composants de notre flore intestinale.
- Selon les cas, la flore interviendra de façon différente :
 - elle aura besoin d'une diversité et complexité proches de celle existant dans la flore de l'adulte pour exercer complètement son effet sur l'activation du SII ;
 - elle ne demandera que la présence, dans la flore dominante, de certaines bactéries qui pourront exercer un rôle modulateur adjuvant sur des réponses de défense comme la réponse intestinale IgA antirotavirus ;
 - elle ne demandera également que la présence, dans la flore dominante, de bactéries (les mêmes ou d'autres) permettant la mise en place de mécanismes de régulation, à la condition cependant qu'elles soient parfois présentes dès le jeune âge, mettant en lumière l'importance de la période postnatale dans l'acquisition d'un certain nombre de mécanismes de régulation qui seront ensuite fonctionnels durant toute la vie.
- D'après des études cliniques, les probiotiques peuvent, dans certains cas, avoir des effets comparables à ceux des bactéries composant la flore intestinale, renforçant le concept du rôle important de l'équilibre bactérien intestinal sur l'optimisation et l'adéquation des réponses immunes de l'hôte en fonction des situations trouvées. Les probiotiques sont des perspectives nouvelles d'intervention sur la flore intestinale, ses fonctions, donc sur notre santé.

Références

1. Moreau MC, Gaboriau-Routhiau V. Influence of resident intestinal microflora on the development and functions of the Gut-Associated Lymphoid Tissue. *Microb Ecol Health Dis* 2001 ; 13 : 65-86.
2. Moreau MC, Thomasson M, Ducluzeau R, *et al.* Cinétique d'établissement de la microflore digestive chez le nouveau-né humain en fonction de la nature du lait. *Reprod Nutr Dévelop* 1986 ; 26 : 745-53.
3. Uderhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002 ; 14 : 103-10.
4. Neish AS. The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microb Infect* 2002 ; 4 : 309-17.
5. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm and allergic disorders. *Allergy* 1998 ; 53 : 12-5.
6. Pretolani M, Goldman M. IL-10: a potential therapy for allergic inflammation? *Immunol Today* 1997 ; 6 : 277-80.
7. Bondada S, Wu HJ, Robertson DA, *et al.* Accessory cell defect in unresponsiveness of neonates and aged to polysaccharides vaccines. *Vaccine* 2001 ; 19 : 557-65.
8. Nicaise P, Gleizes A, Forestier F, *et al.* The influence of *E. coli* implantation in axenic mice on cytokine production by peritoneal and bone marrow-derived macrophages. *Cytokine* 1995 ; 7 : 713-9.
9. Nicaise P, Gleizes A, Sandre C, *et al.* The intestinal microflora regulates cytokine production positively in spleen-derived macrophages but negatively in bone marrow-derived macrophages. *Eur Cytokine Netw* 1999 ; 10 : 365-72.
10. Nicaise P, Gleizes A, Forestier F, Quero AM, Labarre C. Influence of intestinal bacteria flora on cytokine (IL-1, IL-6 and TNF- α) production by mouse peritoneal macrophages. *Eur Cytokine Netw* 1993 ; 4 : 133-8.
11. Wold AE. The hygiene hypothesis revised: is the rising frequency of allergy due to changes in the intestinal flora? *Allergy* 1998 ; 46 : 20-5.
12. Renz H, vonMutius E, Illi S, *et al.* T (H) 1/T (H) 2 immune responses profiles differ between atopic children in eastern and western Germany. *J Allergy Clin Immunol* 2002 ; 109 : 338-42.
13. Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, *et al.* Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 2001 ; 358 : 1129-33.
14. Isolauri E, Rautava S, Kalliomäki M, *et al.* Role of probiotics in food hypersensitivities. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002 ; 2 : 263-71.
15. Sudo N, Yu XN, Aiba Y, *et al.* An oral introduction of intestinal bacteria prevents the development of a long-term Th2-skewed immunological memory induced by neonatal antibiotic treatment in mice. *Clin Exp Allergy* 2002 ; 32 : 1112-6.
16. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, *et al.* Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001 ; 357 : 1076-9.
17. Wostmann BS, Pleasants JR. The germ-free animal fed chemically defined diet: a unique tool. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991 ; 198 : 539-46.
18. Freitas AA, Viale AC, Sunblad A, *et al.* Normal serum immunoglobulins participate in the selection of peripheral B-cell repertoires. *PNAS* 1991 ; 88 : 5640-4.
19. Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S, Mouthon L, *et al.* Human natural antibodies: lessons from physiology and prospects for therapy. *Immunologist* 1998 ; 6 : 227-33.
20. Van der Broek MF, Van Bruggen MCJ, Koopman JP, *et al.* Gut flora induces and maintains resistance against streptococcal cell wall-induced arthritis in F344 rats. *Clin Exp Immunol* 1992 ; 88 : 313-7.
21. Cellier C, Cerf-Bensussan N, Brousse N, *et al.* Le système immunitaire intestinal. In : Rampal P, Beaugerie L, Marteau P, Corthier G, eds. *Colites infectieuses de l'adulte*. Paris : John Libbey Eurotext, 2000 : 27-38.
22. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Rev Immunol* 2003 ; 3 : 331-41.
23. Phalipon A, Cardona A, Kraehenbuhl JP, *et al.* Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion *in vivo*. *Immunity* 2002 ; 17 : 107-15.

24. Guy-Grand D, Vassali P. Gut intraepithelial lymphocyte development. *Curr Opin Immunol* 2002 ; 14 : 255-9.
25. Strobel S, Mowat A Mcl. Immune responses to dietary antigens : oral tolerance. *Immunol Today* 1998 ; 19 : 173-81.
26. Husby S, Mestecky J, Moldoveanu Z, *et al.* Oral tolerance in humans – T cell but not B cell tolerance after antigen feeding. *J Immunol* 1994 ; 152 : 4663-70.
27. Dutchmann R, Kaiser I, Hermann E, *et al.* Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1995 ; 102 : 448-55.
28. Smith PD, Smythies LE, Mosteller-Barnum M, *et al.* Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. *J Immunol* 2001 ; 167 : 2651-6.
29. Moreau MC, Raibaud P, Muller MC. Relation entre le développement du système immunitaire intestinal à IgA et l'établissement de la flore microbienne dans le tube digestif du souriceau holoxénique. *Ann Immunol (Inst. Pasteur)* 1982 ; 133D : 29-39.
30. Moreau MC, Ducluzeau R, Guy-Grand D, *et al.* Increase in the population of duodenal IgA plasmacytes in axenic mice monoassociated with different living or dead bacterial strains of intestinal origin. *Infect Immun* 1978 ; 21 : 532-9.
31. Moreau MC. Microflore intestinale, prébiotiques, probiotiques et immunomodulation. *NAFAS* 2001 ; 6 : 19-26.
32. Moreau MC. Effet immunomodulateur des bactéries intestinales : rôle des bifidobactéries. *J Pédiat Puér* 2001 ; 14 : 135-9.
33. Wannemuehler, MJ, Kiyono, H, Babb, JL, *et al.* Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS converts germfree mice to sensitivity to oral tolerance induction. *J Immunol* 1982 ; 129 : 959-65.
34. Moreau MC, Gaboriau-Routhiau V. The absence of gut flora, the doses of antigen ingested and aging affect the long-term peripheral tolerance induced by ovalbumin feeding in mice. *Res Immunol* 1996 ; 147 : 49-59.
35. Gaboriau-Routhiau V, Raibaud P, Dubuquoy C, *et al.* Colonization of gnotobiotic mice with human microflora at birth protects against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin-mediated abrogation of oral tolerance. *Pediatr Res* 2003 ; 54 : 739-46.
36. Sudo N, Sawamura SA, Tanaka K, *et al.* The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol* 1997 ; 159 : 1739-45.
37. Madsen K, Cornish A, Soper P, *et al.* Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001 ; 121 : 580-91.
38. Steidler L, Hans W, Schotte L, *et al.* Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000 ; 289 : 1352-5.
39. Tamboli CP, Caucheteux C, Cortot A, *et al.* Probiotics in inflammatory bowel disease: a critical review. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003 ; 17 : 805-20.
40. Neish AS, Gewirtz AT, Zeng T, *et al.* Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I κ B- ubiquitination. *Science* 2000 ; 289 : 1560-3.
41. Dubuquoy L, Jansson EA, Deeb S, *et al.* Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003, 124 : 1265-76.
42. Gionchetti P, Rizello F, Venturi A, *et al.* Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis; a double blind placebo controlled trial. *Gastroenterology* 2000 ; 119 : 305-9.
43. Guslandi M, Giollo P, Testoni PA. A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003 ; 15 : 697-8.



Influence de la microflore intestinale sur l'immunité de l'hôte au cours des maladies inflammatoires intestinales

Pierre Desreumaux, Christel Rousseaux

Service des Maladies de l'Appareil Digestif et de la Nutrition, Équipe INSERM-Université o114, CHU Lille, France.

La maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique sont des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), évoluant par poussées entrecoupées de périodes de rémission. Cette évolution particulière est à l'origine de lésions d'âge différent que l'on peut distinguer macroscopiquement et histologiquement en lésions aiguës et chroniques. Les MICI sont caractérisées par une dysrégulation de la réponse immunitaire muqueuse, dirigée contre des éléments de la flore intestinale, survenant chez des patients génétiquement déterminés. L'interaction entre la flore intestinale et le système immunitaire muqueux intestinal joue donc un rôle important dans la physiopathologie de ces maladies inflammatoires intestinales.

Flore et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Arguments en faveur du rôle de la flore dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

La majorité des modèles animaux développant des colites inflammatoires spontanées ou induites par des agents chimiques est influencée par la présence d'une flore bactérienne dans la lumière intestinale [1, 2]. Seuls les modèles de souris invalidées pour la protéine gliale fibrillaire acide (GFAP) et la protéine *Gαi2* développent des lésions respectivement jéjunales et coliques en l'absence de flore intestinale [3, 4]. Dans les autres modèles, l'inflammation intestinale est absente ou très atténuée chez des animaux axéniques. Par ailleurs, un modèle de colite chronique granulomateuse a été obtenu par l'administration intrapariétale de paroi bactérienne de streptocoque (PG-PS) dans le côlon distal des rats, mimant une maladie de Crohn [2, 5]. Ainsi, dans les modèles animaux, la flore intestinale est un élément crucial intervenant dans la chronicité et dans l'induction des lésions intestinales.

Chez l'homme, des résultats similaires ont été obtenus. La muqueuse intestinale de patients atteints de MICI est colonisée par une flore intestinale abondante, notamment dans les ulcérations et les fistules (Figure 1). Cartun *et al.* ont montré la présence d'antigènes d'*Escherichia coli* et de streptocoque dans 69 % et 63 % des tissus intestinaux réséqués de maladie de Crohn [6].



Figure 1.
 Maladie de Crohn.
 Aspect endoscopique
 de colite grave.
A : ulcérations
 longitudinales, en rail.
B : ulcérations en puits.
 (clichés A. Bitoun,
 Hôpital Lariboisière,
 Paris.
*Traité de Gastro-
 entérologie, 2000,
 J.C. Rambaud, ed.
 Médecine-Sciences
 Flammarion)*

Plusieurs travaux ont montré des taux élevés d'anticorps dirigés contre de nombreuses bactéries de la flore saprophyte, notamment *Bacteroides*, *Streptococcus faecalis* et *Escherichia coli* dans le sérum de patients atteints de maladie de Crohn [7]. Le rôle initiateur de la flore intestinale dans la maladie de Crohn a surtout été illustré par les travaux portant sur le modèle de récurrence endoscopique après chirurgie. Après résection chirurgicale de l'iléon terminal suivie d'une anastomose iléocolique, une récurrence endoscopique survenait dans 73 % des cas à un an. Si l'anastomose était protégée du flux fécal par une stomie d'amont, elle restait indemne de lésions. La récurrence apparaissait, en revanche, peu après le rétablissement de la continuité digestive, permettant au flux fécal de baigner à nouveau la région anastomotique [8]. Nous avons récemment montré que, dans cette situation, le néo-iléon, siège de la récurrence, était colonisé par une flore intestinale de type colique dont le rôle dans la réactivation de la maladie est possible [9]. Harper *et al.* ont montré que l'instillation du contenu iléal dans le côlon exclu de patients porteurs de maladie de Crohn en rémission entraînait une rechute clinique en une semaine dans 60 % des cas. En revanche, aucune récurrence n'était observée si le contenu iléal était stérile et ultrafiltré, éliminant ainsi les particules supérieures à 0,22 μm (et en particulier les bactéries), ce qui suggérait le rôle primitif de la flore intestinale [10]. Enfin, l'efficacité de certains probiotiques dans le traitement préventif et curatif des poussées de MICI, ainsi que leur action sur les pochites rebelles après colectomie totale pour rectocolite hémorragique (voir le chapitre « Probiotiques et pathologies digestives ») est un argument indirect en faveur de l'implication de la flore intestinale dans ces maladies.

Modification de la flore endogène au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les études portant sur la flore intestinale de patients souffrant de maladie de Crohn ont été jusqu'à maintenant essentiellement réalisées à partir de prélèvements fécaux. Elles ont montré une augmentation des concentrations fécales de bactéries anaérobies et notamment de *Bacteroides vulgatus* et de certains cocci Gram positif (*Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Coprococcus*) [11]. Ces modifications pourraient être génétiquement déterminées : dans une étude prospective, Van de Merwe *et al.* ont montré qu'un tiers des enfants

asymptomatiques de patients atteints de maladie de Crohn avaient des concentrations fécales de bactéries anaérobies augmentées par rapport à des contrôles [12] ; ces résultats n'ont jusqu'à maintenant pas été confirmés. Keighley *et al.* ont observé une augmentation significative des populations d'*Escherichia coli* et de *Bacteroides fragilis* dans la lumière iléale et colique de patients avec maladie de Crohn [13].

Peu d'études ont concerné la flore adhérente au cours des MICI. Sur une série de vingt-cinq rectocolites hémorragiques en première poussée, vingt en rechute et quarante-quatre en rémission, Hartley *et al.* ont observé une réduction du nombre des *Bifidobacterium* et une augmentation de la colonisation par *Escherichia coli* au niveau des zones malades pendant la poussée [14]. Dans un autre travail sur la flore associée à la muqueuse iléale, les entérobactéries étaient plus souvent isolées à partir de biopsies de maladie de Crohn que chez des témoins [15]. L'analyse de la flore associée à la muqueuse iléale dans la maladie de Crohn permet d'étudier la zone d'atteinte préférentielle de la maladie, tout en éliminant les interférences avec la flore de fermentation abondante dans le côlon. Nos premiers résultats sont en faveur d'une baisse de la fréquence d'isolement des bacilles Gram+ anaérobies non sporulés (*Eubacterium*, *Bifidobacterium*) alors que les entérobactéries, et surtout *Escherichia coli*, sont plus fréquemment isolées [16].

Une autre approche possible pour l'étude de la flore est l'étude de ses fonctions métaboliques. Plusieurs travaux ont montré une réduction des activités exoglycosidasiqes (β -galactosidase, N-acétyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase) dans les selles de patients avec une maladie de Crohn active. Cette diminution était corrélée à une baisse des *Bifidobacterium* dans la flore fécale [17]. Les enzymes dégradant les mucines sont augmentés dans la rectocolite hémorragique, mais inchangés dans la maladie de Crohn. Les acides gras à courte chaîne (AGCC) (acides acétique, propionique et butyrique) sont les principaux produits de la fermentation bactérienne colique. Le butyrate fournit 70 % des besoins énergétiques du colonocyte. Dans la rectocolite hémorragique en poussée, on observe une diminution de la concentration fécale des AGCC et une augmentation des concentrations de lactate. Selon Roediger, la rectocolite hémorragique résulterait d'un déficit énergétique de l'épithélium colique : les colonocytes de patients avec rectocolite hémorragique métaboliseraient moins les AGCC que les colonocytes des sujets normaux [18]. Cette déviation métabolique pourrait être induite par les sulfures produits par des bactéries sulfato-réductrices en excès : ces bactéries représenteraient jusqu'à 97 % des bactéries fécales de patients avec rectocolite hémorragique *versus* 50 % à 70 % chez les contrôles. Cette théorie est à l'origine d'essais thérapeutiques par lavements d'AGCC dans la rectocolite hémorragique, dont les résultats sont dans l'ensemble décevants.

Rôle spécifique de composants de la flore intestinale dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Bactéries anaérobies strictes

Plusieurs observations plaident en faveur d'un rôle spécifique des bactéries anaérobies dans les MICI. Des essais d'implantation sélective de flores ont montré, dans le modèle du rat transgénique HLA-B27, que la présence de

bactéries anaérobies et notamment de *Bacteroides* était un élément critique pour la survenue d'une inflammation [19]. Les concentrations fécales de *Bacteroides vulgatus* sont accrues dans la maladie de Crohn en poussée et l'efficacité thérapeutique du métronidazole est corrélée à la baisse de ces concentrations [20]. Des propriétés d'adhérence particulière ont été décrites pour certaines souches de *Bacteroides vulgatus*, mais aucune ne provenait jusqu'à maintenant de patients atteints de MICI. D'autres arguments expérimentaux suggèrent également un pouvoir pro-inflammatoire particulier de certaines espèces de *Clostridium* comme *Clostridium ramosum* [21].

Bactéries anaérobies facultatives

Une implication spécifique d'*Escherichia coli* est actuellement envisagée dans les MICI. *Escherichia coli* fait partie des bactéries trouvées augmentées de façon reproductible dans la flore luminale et adhérente [22]. Les taux d'anticorps anti-*Escherichia coli* sont plus élevés chez les patients atteints de maladie de Crohn que chez les sujets normaux [7]. Des antigènes spécifiques d'*Escherichia coli* ont été identifiés dans la muqueuse de maladie de Crohn au niveau des macrophages, des cellules géantes à la base des ulcérations, des granulomes et de la *lamina propria* [6]. Plusieurs travaux ont montré que des souches d'*Escherichia coli* isolées de selles de patients souffrant de MICI avaient, *in vitro*, des propriétés adhésives similaires à celles de souches entéropathogènes [23, 24]. Plus de 80 % des souches d'*Escherichia coli* associées à la muqueuse iléale de patients atteints de maladie de Crohn adhéraient aux cellules Caco-2, contre 33 % des souches d'*Escherichia coli* de référence – entéro-invasifs (EIEC), entéropathogènes (EPEC), entérotoxigènes (ETEC), entéro-aggrégants (EaggEC), entérohémorragiques (EHEC) ou adhérents (DAEC) –. Ces souches ne possédaient pas les gènes de virulence décrits pour les souches d'*Escherichia coli* entéropathogènes et un quart d'entre elles synthétisait une α -hémolysine induisant un effet cytotoxique sur cellules en culture [25]. Ainsi, parallèlement à l'acquisition de souches d'*Escherichia coli* exprimant certains facteurs de pathogénicité, le développement de la maladie de Crohn pourrait être également lié à une susceptibilité particulière de la muqueuse des patients à être colonisés.

Immunité et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

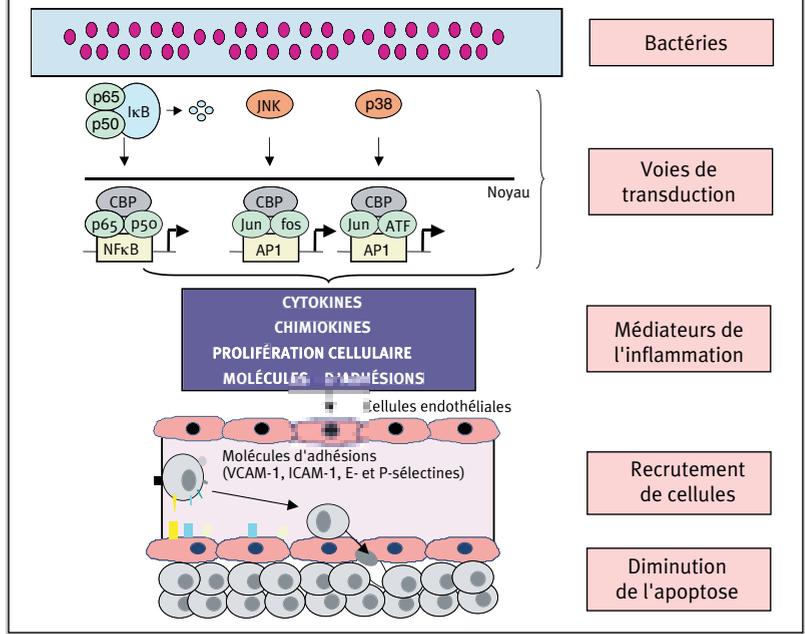
Au cours des MICI, la dysrégulation du système immunitaire muqueux est caractérisée par une cascade de mécanismes. Le premier est la stimulation anormale des cellules résidentes dans la muqueuse intestinale, à l'origine de l'activation de voies de transduction – facteur nucléaire kappa B (NF κ B) et kinases de stress. Cette activation permettra la production de médiateurs inflammatoires (cytokines et chimiokines) qui seront également impliqués dans le recrutement de nouvelles cellules inflammatoires sanguines dans la paroi intestinale *via* la surexpression de molécules d'adhésion (Figure 2).

Ces deux mécanismes vont aboutir à la formation, dans la paroi intestinale, d'un infiltrat de cellules pro-inflammatoires activées. Un dernier mécanisme pathologique, caractérisé par une inhibition des mécanismes de

mort naturelle des cellules (apoptose), entraînera une augmentation de la survie de ces cellules pro-inflammatoires dans la muqueuse intestinale et donc la chronicité de l'inflammation.

Figure 2.

Différentes cascades d'événements au cours de l'inflammation intestinale. L'inflammation intestinale est médiée par l'activation des cellules résidentes par les bactéries luminales (cercles rouges). Cette activation entraîne la dégradation de la protéine inhibitrice kappa B ($\text{I}\kappa\text{B}$) et la translocation du facteur nucléaire kappa B ($\text{NF}\kappa\text{B}$) formé notamment par les deux sous-unités de 50 (p50) et 65 (p65) K Dalton. Elle provoque également l'activation des kinases de stress permettant à p38 et



c-jun-NH2-terminal kinase (JNK) de passer dans le noyau de la cellule et de faire intervenir des co-activateurs tels que le Cyclic AMP response element binding protein (CREB) - Binding protein (CBP) ou des dimères de facteurs de transcription jun-fos ou jun-Activating transcription factor (ATF) capables de se fixer sur un élément de l'ADN appelé l'Activating protein (AP)-1, impliqué dans la régulation de l'inflammation et de la prolifération cellulaire. Ces voies de signalisation cellulaire sont à l'origine de la transcription (→) de médiateurs de l'inflammation (cytokines, chimiokines), de facteurs de croissance et de molécules d'adhésions capables d'induire le recrutement de cellules sanguines dans la paroi intestinale. Le défaut d'élimination des cellules inflammatoires intestinales par diminution des mécanismes apoptotiques participe également à l'inflammation digestive

Activation des voies de transduction

Les deux principales voies de transduction du signal impliquées dans les phénomènes inflammatoires sont les voies de $\text{NF}\kappa\text{B}/\text{I}\kappa\text{B}$ (protéine inhibitrice kappa B) et des kinases de stress ou protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK). L'hétérodimère $\text{NF}\kappa\text{B}/\text{I}\kappa\text{B}$ est présent dans le cytoplasme de toutes nos cellules. Après activation de la cellule, une cascade de phosphorylation entraîne une dégradation de la protéine inhibitrice $\text{I}\kappa\text{B}$, permettant la translocation de $\text{NF}\kappa\text{B}$, formé notamment par les deux sous-unités de 50 (p50) et 65 (p65) K Dalton, du cytoplasme vers le noyau de la cellule. Une fois dans le noyau de la cellule, $\text{NF}\kappa\text{B}$ et des co-activateurs transcriptionnels nucléaires tels que le *Cyclic AMP response element binding protein* (CREB) - *Binding protein* (CBP) seront impliqués dans la réponse

inflammatoire médiée par deux cytokines inflammatoires (TNF α et IL-1 β). La voie des MAPK est constituée d'une cinquantaine de facteurs de transcription cytoplasmiques organisés en trois modules : les MAP kinases kinases kinases (MAPKKK), les MAP kinases kinases (MAPKK) et les MAP kinases (MAPK). L'activation de ces trois modules par des facteurs de stress sera essentiellement à l'origine de trois facteurs – p38, c-jun-NH2-terminal kinase (JNK) et l'*Extracellular-signal regulated kinase* (ERK) – qui vont pouvoir passer dans le noyau de la cellule. Au niveau nucléaire, p38 et JNK vont faire intervenir des co-activateurs tels que CBP ou des dimères de facteurs de transcription jun-fos ou *jun-activating transcription factor* (ATF) capables de se fixer sur un élément de l'ADN appelé l'*Activating protein* (AP)-1, impliqué dans la régulation de l'inflammation et de la prolifération cellulaire (Figure 2).

Dans les MICI, plusieurs travaux ont mis en évidence une augmentation, dans la muqueuse intestinale, de l'activation des voies de NF κ B/I κ B et des MAPK. Le rôle pathologique de cette activation locale a surtout été apprécié dans les modèles de colite expérimentale, où des inhibiteurs de la voie de NF κ B (oligonucléotide antisens codant pour la p65 de NF κ B ou inhibiteur enzymatique [OXIS]) ou des MAPK (anti-p35) ont été utilisés avec succès pour le traitement de ces animaux. Plusieurs essais thérapeutiques sont actuellement en cours d'évaluation chez des patients atteints de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique [26].

Production de cytokines et de chimiokines

Classification des cytokines et chimiokines

Les cytokines sont des protéines solubles de faible poids moléculaire impliquées dans la communication entre les cellules. Elles peuvent être synthétisées par plusieurs types cellulaires. Elles sont produites localement en faible quantité et ont une demi-vie courte, ce qui rend difficile leur détection et explique l'intérêt des techniques d'identification par amplification génique (PCR). Les cytokines sont exprimées à l'état physiologique dans la muqueuse intestinale et des techniques quantitatives d'analyse sont nécessaires pour leur attribuer un éventuel rôle physiopathologique. Depuis la mise en évidence de la première cytokine en 1957, plusieurs classifications basées sur la structure et les principales fonctions de ces médiateurs ont été proposées. Malgré l'existence de nombreuses boucles de régulation et l'étonnant pléiotropisme fonctionnel des cytokines, trois grands groupes ont été caractérisés : les cytokines inflammatoires/anti-inflammatoires, les cytokines immunorégulatrices et les chimiokines. La balance entre les cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, TNF α) et anti-inflammatoires – antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1RA), IL-10, TGF β – gère localement l'intensité et la durée de la réaction inflammatoire. Elle peut être également à l'origine d'effets systémiques tels que la diminution de la synthèse de l'albumine et l'augmentation de la synthèse de protéines inflammatoires. Les cytokines immunorégulatrices interviennent dans la susceptibilité/résistance aux agents infectieux, les mécanismes allergiques et la régulation des cytokines inflammatoires. Elles sont classées en deux types appelés chez l'homme type 1 ou type 2 par analogie avec la classification proposée par Mossman *et al.* chez la souris

pour les clones lymphocytaires T CD4⁺ (profils Th1 et Th2). Les cytokines immunorégulatrices de type 1 sont représentées par l'IL-2 et l'IFN γ . Elles sont impliquées dans l'activation du système immunitaire cellulaire et la résistance aux infections bactériennes, les réactions d'hypersensibilité retardée et la synthèse d'IgG2a. Les cytokines de type 2 (IL-4, IL-5 et IL-13) interviennent préférentiellement dans la synthèse d'IgE, l'activation et le recrutement des éosinophiles, la résistance aux infections parasitaires, les mécanismes allergiques et la susceptibilité aux infections bactériennes. Les chimiokines définissent un sous-groupe d'une cinquantaine de médiateurs caractérisés par leurs propriétés chimio-attractantes [27]. En fonction de leur structure, on distingue essentiellement deux sous-familles : les CXC chimiokines représentées notamment par l'IL-8 et les *Growth related oncogenes* (GRO) α , β , γ , impliquées dans le recrutement et l'activation des polynucléaires neutrophiles, et les CC chimiokines dont les *Monocyte chemotactic proteins* (MCP)-4 et 5, RANTES et l'éotaxine impliquées avec l'IL-5 dans l'activation et le recrutement des éosinophiles dans les tissus.

Les cytokines agissent sur les cellules cibles en se fixant sur des récepteurs spécifiques qui vont activer une cascade d'événements intracellulaires et notamment les voies de NF κ B/I κ B et des MAPK. Il y aura donc des boucles autocrines et/ou paracrines entre ces signaux de transduction et la production de cytokines inflammatoires dont les éléments régulateurs restent actuellement mal connus.

Cytokines et mod les animaux de colite

Trois groupes d'une cinquantaine modèles animaux développant des colites inflammatoires ont été décrits [28]. Le premier groupe est représenté par les modèles de colite spontanée survenant chez des animaux manipulés génétiquement. Ces animaux peuvent être invalidés pour un gène (animaux *knockout*), ou exprimer anormalement un gène (animaux transgéniques ou transfert de gène dans un tissu). Les deux autres groupes développent des colites induites, soit par le transfert de cellules activées (transfert de lymphocytes T chez la souris immunodéficiente SCID), soit par des agents chimiques (indométhacine, acide trinitrobenzène sulfonique – TNBS –, sulfate de dextran sodique – DSS –, acide acétique), soit par des produits bactériens (peptidoglycane-polysaccharide – PG-PS). Dans ces modèles animaux, la majorité des lésions chroniques est située dans le côlon.

Dans tous ces modèles, les lésions intestinales sont associées à une augmentation de la synthèse des cytokines inflammatoires. Si l'on considère les cytokines immunorégulatrices, les lésions de colite chronique sont associées à une augmentation de la synthèse de cytokines de type 1 (IL-2 ou IFN γ) [29]. Ainsi, l'IFN γ joue un rôle important dans l'induction et la chronicité des lésions dans les modèles de souris invalidées pour le gène codant pour l'IL-10 ou pour la protéine inhibitrice de transduction G α i2, ainsi que lors du transfert de cellules T activées (CD45RB^{high}) chez la souris SCID. Plusieurs travaux plus récents ont mis en évidence l'importance des cytokines de type 2 dans l'induction des lésions coliques. Dans les modèles de colite spontanée (souris invalidée pour la chaîne α du récepteur T) ou induite par des agents chimiques (TNBS), les profils de cytokines évoluent en fonction de l'ancienneté des lésions intestinales : les lésions aiguës sont associées à une augmentation de la synthèse d'IL-4 et à la production locale d'IgE (type 2) ;

l'évolution des lésions vers la chronicité est précédée par une modification des profils de cytokines immunorégulatrices d'un type 2 vers un type 1. Enfin, des lésions inflammatoires iléales et coliques mimant des MICI ont été décrites chez les souris transgéniques pour l'IL-5 et l'IL-4, deux cytokines de type 2.

Cytokines/chimiokines

et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

La détection de cytokines dans le sang périphérique n'est pas le reflet des modifications immunologiques intestinales. Nous ne résumerons dans cette revue que les études réalisées localement dans la muqueuse intestinale de patients atteints de MICI.

Les cytokines inflammatoires $\text{TNF}\alpha$, IL-6 et IL-1 β sont impliquées dans les lésions inflammatoires intestinales chroniques de patients atteints de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique. Dans la maladie de Crohn, l'expression de $\text{TNF}\alpha$ est présente dans les lésions au niveau de la muqueuse, de la sous-muqueuse et de la séreuse. La principale source cellulaire dans la *lamina propria* est le macrophage. Un marquage en immunohistochimie est également trouvé dans d'autres structures telles que les granulomes, les centres germinatifs des follicules lymphoïdes et la graisse mésentérique de patients atteints de maladie de Crohn [30]. Le rôle de cette synthèse anormale de $\text{TNF}\alpha$ par les adipocytes et les macrophages du mésentère est inconnu, mais elle pourrait expliquer en partie la localisation préférentielle des lésions muqueuses intestinales de la maladie de Crohn le long du bord mésentérique et la fréquence des adhérences des anses intestinales. Quantitativement, il semble que la synthèse de $\text{TNF}\alpha$ soit plus importante dans la muqueuse lésée de patients avec maladie de Crohn chronique que dans la rectocolite hémorragique. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'IL-6 et l'IL-1 β . Bien que des résultats contradictoires aient été publiés, il ne semble pas exister d'anomalie primitive de la synthèse des cytokines inflammatoires ou du TGF β dans la muqueuse saine de patients avec maladie de Crohn ou rectocolite hémorragique. La présence d'IL-1RA a été également recherchée dans la muqueuse lésée de patients atteints de MICI. Il existerait de façon contestée une diminution relative de l'IL-1RA avec un ratio IL-1RA/IL-1 abaissé par rapport à d'autres pathologies inflammatoires. En conclusion, les lésions intestinales de maladie de Crohn et de rectocolite hémorragique sont associées à une augmentation de la synthèse des cytokines inflammatoires et probablement à un déficit relatif en cytokines anti-inflammatoires. Cette anomalie de la balance des cytokines inflammatoires/anti-inflammatoires paraît secondaire à l'inflammation et n'existe pas dans la muqueuse saine de patients avec MICI.

Comme dans les modèles animaux, les profils de synthèse de cytokines immunorégulatrices varient au cours de l'évolution de la maladie de Crohn [31]. Les lésions iléales aiguës survenant trois mois après chirurgie sont associées à un profil de synthèse de cytokines de type 2 et notamment d'IL-4, ainsi qu'à une augmentation de l'expression d'ARNm productif codant pour l'IgE. Ces cytokines sont synthétisées essentiellement par les lymphocytes T, les mastocytes et les éosinophiles. Chez ces mêmes patients, un profil de cytokines de type 1 est associé aux lésions chroniques. Ce profil de type 1 pourrait être induit par l'IL-12 et l'IL-18 synthétisées par les macrophages de la *lamina propria*. Ces résultats suggèrent que des mécanismes

immunologiques différents sont à l'origine de l'induction et de la chronicité des lésions. Des protocoles thérapeutiques différents pourraient ainsi être nécessaires pour éviter la récurrence de la maladie après chirurgie ou pour traiter des lésions chroniques.

L'IL-8 est la chimiokine la mieux étudiée dans les MICI. Plusieurs travaux ont mis en évidence une augmentation de l'IL-8, tant au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique, dans la muqueuse colique inflammatoire de patients atteints de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique. Les principales sources cellulaires sont les macrophages et les polynucléaires neutrophiles. Cette augmentation de synthèse est secondaire à l'inflammation, puisque les quantités d'IL-8 sont comparables dans les muqueuses saines de patients avec MICI ou de témoins. La synthèse des autres chimiokines impliquées dans le recrutement et l'activation des polynucléaires neutrophiles, mais aussi des macrophages dans la muqueuse intestinale, telles que GRO, MCP-1, le *Macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 α et β est également augmentée dans les MICI. La synthèse de C-C chimiokines impliquées dans l'activation et le recrutement des éosinophiles dans la muqueuse intestinale a été peu étudiée. Trois travaux ont mis en évidence une augmentation de la synthèse de RANTES dans la maladie de Crohn et une augmentation de l'éotaxine plus importante dans la rectocolite hémorragique que dans la maladie de Crohn. Ces résultats expliquent la nature pléiotrope des cellules qui constituent l'infiltrat inflammatoire de patients atteints de MICI. D'autres travaux sont nécessaires pour déterminer la cascade d'événements impliquée dans la réaction inflammatoire au cours de l'évolution de la maladie.

Augmentation de l'expression des molécules d'adhésion

Au cours de la maladie de Crohn et de la rectocolite hémorragique (Figure 3), les lésions intestinales sont caractérisées par une infiltration de la muqueuse par des leucocytes périphériques.

Figure 3.
Rectocolite hémorragique
de moyenne gravité :
érythème et ulcérations superficielles.
(cliché A. Bitoun, Hôpital Lariboisière, Paris.
Traité de Gastro-entérologie, 2000,
J.C. Rambaud, ed.
Médecine-Sciences Flammarion)



Ces leucocytes circulants, essentiellement des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes, vont adhérer aux cellules endothéliales intestinales *via* différents récepteurs de surface cellulaires appelés molécules d'adhésion (Figure 2). L'expression de ces molécules d'adhésion est régulée en partie par les cytokines. On distingue deux grandes familles de molécules d'adhésion : les molécules apparentées aux immunoglobulines et les sélectines [32]. La liaison entre les molécules *Lymphocyte function antigen* (LFA)-1/*Intercellular adhesion molecule* (ICAM-1 ou ICAM-2) va permettre le recrutement des leucocytes périphériques dans les tissus intestinaux. D'autres interactions entre les molécules *Very late antigen* (VLA)-4/*Vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1 ou $\alpha 4\beta 7$ /VCAM-1 ont un rôle plus sélectif en attirant des lymphocytes dans la paroi intestinale, alors que l'interaction entre les molécules macrophage-1(Mac-1)/ICAM-1 sera responsable d'un infiltrat plus riche en polynucléaires neutrophiles. La découverte de ces molécules d'adhésion et de leurs ligands a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le recrutement des cellules sanguines dans la paroi intestinale et de développer des molécules capables de bloquer la constitution de l'infiltrat cellulaire. Ces molécules, dirigées notamment contre $\alpha 4\beta 7$, sont en cours d'évaluation thérapeutique chez les patients atteints de maladie de Crohn.

Inhibition des mécanismes d'apoptose

L'apoptose est la mort cellulaire programmée. À la différence de la nécrose cellulaire, l'apoptose est un processus actif qui requiert de l'énergie. Elle se traduit morphologiquement par une réduction du volume cellulaire et une condensation nucléaire avec fragmentation de l'ADN. L'apoptose est un mécanisme physiologique qui permet d'éliminer rapidement des cellules en sénescence et de protéger les tissus environnants, notamment de l'inflammation produite par les enzymes protéolytiques cytoplasmiques.

Au cours de la maladie de Crohn, il existe une diminution de l'apoptose de certains lymphocytes T (LT) présents dans la *lamina propria* et responsables de réactions inflammatoires [33]. Cette diminution de l'apoptose est probablement multifactorielle, mettant en jeu l'IL-6 produite essentiellement par les macrophages et les LT. L'IL-6 produite se fixe sur son récepteur, qui est un hétérodimère formé d'une chaîne de liaison pour l'IL-6 (IL-6R) et d'une chaîne permettant la transduction du signal (gp130). L'IL-6R se détache de la membrane cellulaire, devient soluble et forme un complexe avec l'IL-6 capable de fixer la chaîne gp130 exprimée par le lymphocyte T (LT) et d'activer des facteurs anti-apoptotiques, tels que le *Signal transducer and activator of transcription* (STAT)-3 et les gènes *bcl-2* et *bcl-xl* [33].

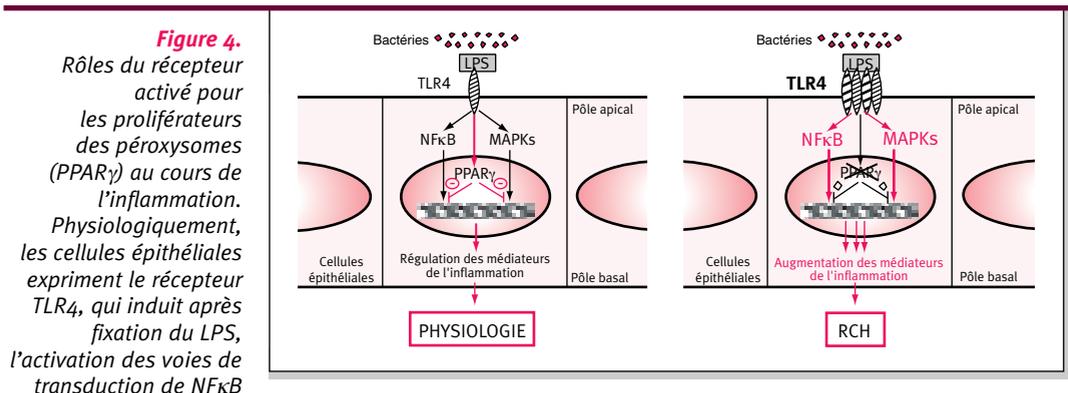
Mécanismes de l'inflammation induite par la flore intestinale au cours des colites inflammatoires

Il existe une interaction entre la flore intestinale et le système immunitaire muqueux digestif. La flore intestinale peut induire une inflammation intestinale par de multiples mécanismes. Inversement, il est également possible qu'une réponse immunitaire non adaptée contre sa propre flore rende le tube digestif susceptible vis-à-vis des bactéries non pathogènes.

Action de la flore intestinale sur le système immunitaire

R le pro-inflammatoire des composants bactériens

Les lipopolysaccharides (LPS) bactériens sont les principaux constituants de la paroi des bactéries Gram négatives. Ces endotoxines sont de puissants activateurs des macrophages, des polynucléaires, des cellules endothéliales et des lymphocytes T et B. L'activation des monocytes/macrophages par le LPS est dépendante en partie de la présence du récepteur CD14 et du récepteur Toll 4 (TLR4) (Figure 4).



et des kinases de stress (MAPK). Cependant, cette activation des voies de transduction est régulée par l'induction de PPAR γ provoquée par la liaison entre TLR-4 et les bactéries lumineales, permettant de maintenir l'homéostasie intestinale. Au cours de la RCH, il existe une surexpression de TLR4 et un défaut de ce récepteur à induire l'expression de PPAR γ . Ainsi, les voies de NF κ B et des MAPK ne sont pas régulées, à l'origine d'une augmentation de l'expression de médiateurs inflammatoires

Physiologiquement, les macrophages de la *lamina propria* expriment faiblement CD14. Le bas niveau d'expression de cette protéine membranaire pourrait expliquer le faible effet activateur des LPS bactériens. Dans les MICI, l'augmentation primitive de l'expression de CD14 sur les macrophages extraits de la *lamina propria* de côlon sain et lésé pourrait expliquer en partie le rôle de la flore intestinale dans l'initiation et la chronicité des lésions [34]. De façon similaire, l'augmentation de l'expression de TLR4 par les macrophages et les cellules épithéliales intestinales de patients atteints de maladie de Crohn pourrait favoriser la susceptibilité à l'inflammation induite par des bactéries [35-37]. Récemment, une anomalie de la balance entre les expressions de TLR4 et du récepteur activé pour les peroxyosomes (PPAR γ) a été mise en évidence au cours de la rectocolite hémorragique [38]. PPAR γ est un récepteur nucléaire à fonction anti-inflammatoire [39], naturellement exprimé par les cellules épithéliales du côlon [40], dont l'expression est régulée au moins en partie par TLR4. Au cours de la rectocolite hémorragique, la surexpression de TLR4 activé par le LPS bactérien et le déficit d'expression de PPAR γ au niveau de la cellule épithéliale, provoquerait une absence de régulation des voies de NF κ B et des MAPK, à

l'origine de la chronicité de la réaction inflammatoire (Figure 4). Une autre protéine présente dans la paroi des bactéries Gram négatives et Gram positives pourrait également jouer un rôle important dans la physiopathologie de la maladie de Crohn. Il s'agit du peptidoglycane et, plus précisément, du muramyl dipeptide capable d'activer le récepteur cytoplasmique CARD15 à l'origine de la production de médiateurs de l'inflammation (*voir plus loin*).

Les formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP) sont des oligopeptides sécrétés par certaines bactéries intestinales dont *Escherichia coli*. Ce sont de puissants agents chimiotactiques des polynucléaires neutrophiles [41], capables d'induire des colites aiguës expérimentales après instillation intraluminaire [42]. Anton *et al.* ont montré que les neutrophiles circulants de patients atteints de maladie de Crohn expriment plus de récepteurs de surface aux FMLP que ceux de patients souffrant de rectocolite hémorragique et de témoins [43]. De plus, l'activité des enzymes dégradant les FMLP (FMLP-ase) est réduite dans l'iléon des patients atteints de maladie de Crohn par rapport à ceux souffrant de rectocolite hémorragique ou à des témoins sains [44]. L'ensemble de ces facteurs conjugués à une perméabilité muqueuse accrue aux composants bactériens (*voir ci-dessous*) pourrait contribuer au chimiotactisme des neutrophiles initiant l'inflammation.

D'autres composants des parois bactériennes (PG-PS) sont capables d'induire des colites expérimentales après injection dans la paroi colique [2, 5].

Flore et perméabilité intestinale

Certaines bactéries telles que les *Klebsiella* et les streptocoques augmentent la perméabilité intestinale évaluée par le test au dextran-mannitol chez le rat [45]. Cette augmentation de la perméabilité intestinale pourrait être à l'origine d'une augmentation du passage des antigènes bactériens ou alimentaires dans la paroi intestinale et d'une stimulation anormale du système immunitaire muqueux.

Recrutement des cellules inflammatoires

Les bactéries peuvent influencer la domiciliation de cellules inflammatoires périphériques dans le tube digestif. Ainsi, les souris axéniques ont moins de polynucléaires dans la *lamina propria* que des souris conventionnelles. Chez la souris immunodéficiente SCID, l'injection périphérique de lymphocytes T immunocompétents CD45^{RB}^{high} induit des colites. La domiciliation dans le tube digestif de ces cellules périphériques injectées par voie parentérale ne se fait qu'en présence d'une flore intestinale et disparaît chez les souris axéniques [46]. Les mécanismes bactériens à l'origine de la domiciliation des cellules dans le tube digestif pourraient impliquer des molécules d'adhésion. Chez le rat, la présence d'une flore colique induit l'expression muqueuse d'ICAM-1, ligand des β 2 intégrines LFA-1 et Mac-1 exprimées principalement par les polynucléaires [47].

Réponse immunitaire anormale de l'hôte vis-à-vis de la flore

Rupture de tolérance

Des bactéries commensales peuvent stimuler les lymphocytes T de la muqueuse intestinale et pourraient être à l'origine des lésions des MICI. Chez l'homme sain, les cellules mononucléées extraites de la muqueuse intestinale

sont normalement tolérantes à la flore homologue, mais prolifèrent et s'activent au contact d'une flore hétérologue. Dans la maladie de Crohn, les cellules mononucléées extraites de zones de côlon lésées et non de côlon sain s'activent également en présence d'une flore homologue. Cette activation pourrait traduire une rupture de la tolérance vis-à-vis de la propre flore intestinale du sujet, secondaire à l'apparition des lésions [48]. Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris dans le modèle de colite induite par le TNBS [49]. La rupture de tolérance induite par l'injection de TNBS est médiée par l'IL-12 et inhibée par l'IL-10. Ce phénomène pourrait ainsi jouer un rôle important dans l'entretien des lésions inflammatoires.

Modulation de la susceptibilité et de la résistance aux bactéries par les cytokines

Le déclenchement d'une inflammation par les bactéries commensales pourrait également être induit par une réponse immunitaire intestinale inadaptée de l'hôte. Certains profils de cytokines déterminent la susceptibilité ou la résistance de l'organisme vis-à-vis d'une bactérie. Les cytokines immunorégulatrices de type 1 (IL-2, IFN γ) et les cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF α) déterminent en partie le caractère résistant de l'hôte à différents agents bactériens ou viraux. La majorité des bactéries et notamment les bactéries intracellulaires telles que les mycobactéries ou *Listeria*, induisent une réponse immunitaire de type 1 qui permet d'éliminer l'agent infectieux et d'éviter une réponse inflammatoire chronique. Les animaux invalidés pour l'IFN γ [50] ou pour l'IL-6 [51] ou le TNF α [52] sont susceptibles à ces agents bactériens pathogènes, mais aussi aux infections par *Candida albicans*. Inversement, les réponses immunitaires de type 2 et notamment la synthèse d'IL-4, sont associées à des infections chroniques aussi bien pour des bactéries pathogènes que pour des bactéries de la flore intestinale saprophyte. *In vitro*, l'IL-4 est nécessaire pour cultiver la bactérie à l'origine de la maladie de Whipple [53]. Chez le porc, l'expression intestinale de cytokines de type 2 induite par le ver non pathogène *Trichuris suis*, rend « pathogène » la flore commensale de l'animal et provoque des entérocolites hémorragiques [54]. L'existence connue d'une réponse immunitaire intestinale de type 2 dans les lésions aiguës de maladie de Crohn pourrait entraîner une susceptibilité anormale du tube digestif vis-à-vis de sa propre flore intestinale [31].

Anomalie de la reconnaissance de composants bactériens par le système immunitaire inné

Il y a un an, trois équipes européennes et américaine ont mis en évidence le premier gène de susceptibilité à la maladie de Crohn, Nod2 renommé depuis CARD15 par une commission de nomenclature internationale [55-57]. Trois mutations principales et une trentaine de mutations mineures du gène CARD15 ont été observées chez les patients atteints de maladie de Crohn. Environ 50 % des patients ont une de ces mutations sur un chromosome (sujets hétérozygotes) et 15 % ont la même mutation (sujets homozygotes) ou deux mutations différentes (hétérozygotes composites) sur leurs deux chromosomes. À partir de ces chiffres, on peut estimer que le risque d'avoir une maladie de Crohn est une fois et demi à trois fois plus important chez les hétérozygotes simples que chez les sujets n'ayant pas de mutation et environ quarante fois

plus important chez les homozygotes ou hétérozygotes composites, ce qui représente le plus important facteur de risque de la maladie connu à ce jour. Les premières études phénotypiques réalisées à partir des trois principales mutations permettent de définir un sous-groupe de patients qui développent une maladie plus précoce, localisée plus fréquemment dans l'iléon et d'évolution plus volontiers sténosante (Figure 5) [58-62].

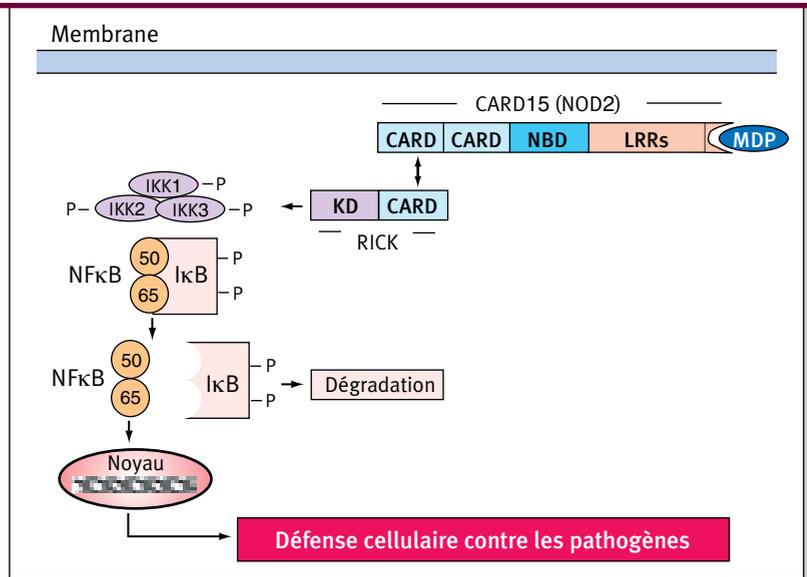


Figure 5.
*Maladie de Crohn.
Pièce de résection iléo-caécale.
Lésions iléales terminales et de
la valvule de Bauhin ;
épaississement pariétal
responsable d'une sténose.
(cliché A. Lavergne-Slove,
Hôpital Lariboisière, Paris.
Traité de Gastro-entérologie,
2000, J.C. Rambaud, ed.
Médecine-Sciences
Flammarion)*

CARD15 est un récepteur cytoplasmique exprimé par les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les cellules de Paneth, les cellules épithéliales et les lymphocytes T. Si CARD15 est présent spontanément dans les monocytes/macrophages et cellules dendritiques (cellules spécialisées dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes), son expression dans les lymphocytes T, et surtout les cellules épithéliales coliques, est induite par le TNF α , médiateur central de l'inflammation. Ainsi, CARD15 est exprimé dans les cellules qui jouent un rôle clé au cours de la réponse immunitaire et dans la surveillance des phénomènes infectieux dans l'intestin. Sur le plan fonctionnel, bien que le rôle du récepteur reste mal connu, il semble impliqué dans la réponse aux infections bactériennes. CARD15 fait partie d'une famille récemment décrite, comprenant Nod1/CARD4, *ICE protease activating factor* (Ipaf)-1/CARD12, *Apoptotic protease activation factor* (Apaf)-1, qui présente des homologies structurales avec des molécules exprimées chez les plantes et impliquées dans la résistance aux bactéries pathogènes [63]. CARD15 contient deux domaines de recrutement et d'activation des caspases situés en N-terminal (CARD, *caspase-recruitment domain*) et liés à un domaine de liaison aux nucléotides (NBD, *nucleotide-binding domain*) et à un domaine C-terminal composé de motifs répétés riches en leucines (LRRs, *leucin-rich repeats*) (Figure 6). Le rôle fonctionnel des LRRs n'est actuellement pas encore totalement élucidé, mais l'hypothèse avancée est qu'ils interviendraient dans la reconnaissance de composants bactériens comme les peptidoglycanes [55]. Cette reconnaissance de composés bactériens déclencherait une cascade d'événements dans le cytoplasme de la cellule et, notamment, le recrutement d'un facteur de transcription appelé RICK qui, grâce à une interaction CARD-CARD, va entraîner des phosphorylations et l'activation de NF κ B (Figure 6). Deux études, réalisées chez la souris, indiquent que l'absence de RICK rend les animaux

susceptibles aux infections bactériennes et notamment aux bactéries intracellulaires telles que *Listeria monocytogenes* [64, 65]. Ce partenaire de CARD15, RICK, est impliqué dans le contrôle des phénomènes infectieux en régulant notamment la production de cytokines essentielles à une réponse immunitaire efficace (IFN γ , IL-12, IL-18). Ces résultats ajoutent à la compréhension de la physiopathologie de la maladie de Crohn. L'absence de CARD15 fonctionnel dans les cellules épithéliales et les acteurs clés de la réponse immunitaire pourrait expliquer le rôle des bactéries lumineales dans le déclenchement et l'entretien des lésions intestinales. De plus, l'existence d'une boucle de régulation entre le TNF α et CARD15 dans la cellule épithéliale suggère que les infections opportunistes qui surviennent après traitement par anti-TNF α pourraient être secondaires à une inhibition de l'expression de CARD15, récepteur clé dans le contrôle des infections bactériennes à point de départ muqueux.

Figure 6.
NOD2/CARD15 et réponse immunitaire innée. CARD15 est un récepteur cytoplasmique formé par deux domaines de recrutement et d'activation des caspases situé en N-terminal (CARD, caspase-recruitment domain), liés à un domaine de liaison aux nucléotides (NBD, nucleotide-binding domain) et par un domaine C-terminal composé de motifs répétés riches en leucines (LRRs, leucine-rich repeats). La région C-terminal LRRs



interviendrait dans la reconnaissance du muramyl dipeptide (MDP), composé des peptidoglycanes exprimés par les membranes des bactéries Gram positif et négatif. Cette reconnaissance de composés bactériens par CARD15 déclencherait une cascade d'événements dans le cytoplasme de la cellule et notamment le recrutement d'un facteur de transcription appelée RICK qui, grâce à une interaction CARD-CARD va entraîner des phosphorylations du complexe des kinases de I κ B (IKK1-2-3), la dégradation de la protéine inhibitrice I κ B et la libération du complexe NF κ B formé par les hétérodimères p50 et p65. Ainsi CARD15 serait impliqué dans la réponse immunitaire innée non spécifique contre les bactéries en activant la voie NF κ B à l'origine de la production de médiateurs de l'inflammation capable de limiter le pouvoir pathogène des bactéries

Conclusion

De nombreuses études montrent l'importance de l'interaction entre les bactéries et le système immunitaire muqueux intestinal dans la physiopathologie des MICI. Ce concept est encore renforcé par la découverte du gène CARD15 associé à la maladie de Crohn et impliqué dans la réponse inflammatoire induite par la structure peptidoglycane des bactéries. Cependant, les mécanismes précis à l'origine du dysfonctionnement de l'interaction entre des organismes infectieux et l'hôte restent hypothétiques. S'agit-il de l'existence d'une bactérie pathogène qui persisterait au niveau muqueux et serait à l'origine d'une activation anormale des cellules immunitaires ou, inversement, d'une réponse immunitaire anormale vis-à-vis de la propre flore intestinale du sujet ? L'utilisation d'outils moléculaires pour l'analyse de la flore intestinale non cultivable par les méthodes de bactériologie conventionnelle, la comparaison entre les profils d'expression de flores fécale et adhérente prélevées en muqueuse saine et inflammatoire chez les patients, l'étude descriptive et fonctionnelle de gènes de l'immunité régulés par les agents infectieux et des récepteurs muqueux pour les bactéries, virus et ADN chez les patients atteints de MICI et, enfin, le phénotypage de modèles de souris génétiquement modifiées, notamment pour CARD15, devraient permettre prochainement une meilleure compréhension de l'interaction flore-intestin et donc de la physiopathologie des MICI.

Points clés

- De nombreux arguments militent en faveur du rôle de la flore colique saprophyte ou endogène au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. En particulier, cette flore est indispensable au développement de la très grande majorité des colites expérimentales. Chez l'homme, la diversion du flux fécal d'amont protège de la récurrence iléale après iléo-colectomie droite pour maladie de Crohn.
- Les données sur les possibles altérations de la flore iléo-colique endogène au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont encore peu nombreuses. Le rôle des anaérobies strictes et de souches d'*Escherichia coli* antéro-adhérentes est bien établi.
- Les cytokines inflammatoires $TNF\alpha$, IL-6 et IL- 1β sont augmentées dans les lésions inflammatoires chroniques des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Les lésions iléales post-opératoires précoces sont associées à un profil de synthèse de cytokines de type 2, IL-4 notamment.
- La chimiokine IL-8 est augmentée dans la muqueuse lésée des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Parallèlement, l'expression accrue des molécules d'adhésion permet le recrutement des leucocytes circulants, en même temps que l'apoptose de certains lymphocytes T est inhibée.
- Au cours des MICI, la surexpression de CD14 et TLR-4 activé par les lipopolysaccharides bactériens et le déficit d'expression du $PPAR\gamma$ provoque une dérégulation des voies $NF\kappa B$ et MAPK, à l'origine d'une réaction inflammatoire chronique. Une rupture de la tolérance à la flore endogène homologue, peut-être médiée par l'IL-12 et inhibée par l'IL-10, a été mise en évidence dans la maladie de Crohn.
- CARD 15, molécule jouant un rôle clé au cours de la réponse immunitaire et dans la surveillance des phénomènes infectieux dans l'intestin, est mutée et non fonctionnelle dans un sous-groupe de patients atteints de maladie de Crohn, fait éclairant d'un jour nouveau le rôle des bactéries intraluminales dans cette affection.

Références

1. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995 ; 109 : 1344-67.
2. Sartor RB. Insights into the pathogenesis of inflammatory bowel diseases provided by new rodent models of spontaneous colitis. *Inflamm Bowel Dis* 1995 ; 1 : 64-75.
3. Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, *et al.* Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 1998 ; 93 : 189-201.
4. Rudolph U, Finegold MJ, Rich SS, *et al.* Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G alpha i2-deficient mice. *Nat Genet* 1995 ; 10 : 143-50.
5. Sartor RB. Microbial agents in the pathogenesis, differential diagnosis, and complications of inflammatory bowel disease. In : Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL, eds. *Infections of the gastrointestinal tract*. New York : Raven Press, 1995 : 435-58.
6. Cartun RW, Van Kruiningen HJ, Pedersen CA, Berman MM. An immunocytochemical search for infectious agents in Crohn's disease. *Mod Pathol* 1993 ; 6 : 212-9.
7. Tabaqchali S, O'Donoghue DP, Bettelheim KA. *Escherichia coli* antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1978 ; 19 : 108-13.
8. Rutgeerts P, Geboes K, Peeters M, *et al.* Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet* 1991 ; 338 : 771-4.
9. Lederman E, Neut C, Desreumaux P, *et al.* Bacterial overgrowth in the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997 ; 112 : A1023.
10. Harper PH, Lee EC, Kettlewell MG, Bennett MK, Jewell DP. Role of the faecal stream in the maintenance of Crohn's colitis. *Gut* 1985 ; 26 : 279-84.
11. Ruseler-van Embden JG, Both-Patoir HC. Anaerobic gram-negative faecal flora in patients with Crohn's disease and healthy subjects. *Antonie van Leeuwenhoek* 1983 ; 49 : 125-32.
12. Van de Merwe JP, Schroder AM, Wensinck F, Hazenberg MP. The obligate anaerobic faecal flora of patients with Crohn's disease and their first-degree relatives. *Scand J Gastroenterol* 1988 ; 23 : 1125-31.
13. Keighley MR, Arabi Y, Dimock F, Burdon DW, Allan RN, Alexander-Williams J. Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora. *Gut* 1978 ; 19 : 1099-104.
14. Hartley MG, Hudson MJ, Swarbrick ET, *et al.* The rectal mucosa-associated microflora in patients with ulcerative colitis. *J Med Microbiol* 1992 ; 36 : 96-103.
15. Peach S, Lock MR, Katz D, Todd IP, Tabaqchali S. Mucosal-associated bacterial flora of the intestine in patients with Crohn's disease and in a control group. *Gut* 1978 ; 19 : 1034-42.
16. Neut C, Bulois P, Desreumaux P, *et al.* Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002 ; 97 : 939-46.
17. Favier C, Neut C, Mizon C, Cortot A, Colombel JF, Mizon J. Fecal β -D-galactosidase production and Bifidobacteria are decreased in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1997 ; 42 : 817-22.
18. Roediger WEW. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut* 1980 ; 21 : 793-8.
19. Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, *et al.* Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human β 2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* 1996 ; 98 : 945-53.
20. Krook A, Lindstrom B, Kjellander J, Jarnerot G, Bodin L. Relation between concentrations of metronidazole and *Bacteroides* spp in faeces of patients with Crohn's disease and healthy individuals. *J Clin Pathol* 1981 ; 34 : 645-50.
21. Senda S, Fujiyama Y, Ushijima T, *et al.* *Clostridium ramosum*, an IgA protease-producing species and its ecology in the human intestinal tract. *Microbiol Immunol* 1985 ; 29 : 1019-28.
22. Burke DA, Axon AT. Adhesive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea. *Br Med J* 1988 ; 297 : 102-4.
23. Gjaffer MH, Holdsworth CD, Duerden BI. Virulence properties of *Escherichia coli* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1992 ; 33 : 646-50.
24. Lobo AJ, Sagar PM, Rothwell J, *et al.* Carriage of adhesive *Escherichia coli* after restorative proctocolectomy and pouch anal anastomosis: relation with functional outcome and inflammation. *Gut* 1993 ; 34 : 1379-83.

25. Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* 1999 ; 67 : 4490-510.
26. Van Montfrans C, Peppelenbosch M, te Velde AA, van Deventer S. Inflammatory signal transduction in Crohn's disease and novel therapeutic approach. *Biochem Pharmacol* 2002 ; 64 : 789-95.
27. Desreumaux P. Cytokines, chimiokines et signaux de transduction. *Lett Hépatogastroentérol* 1998 ; 6 : 295-7.
28. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002 ; 20 : 495-549.
29. Desreumaux P, Nutten S, Cortot A, Colombel JF. Cytokines, chimiokines et anticytokines dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *HepatoGastro* 1999 ; 6 : 6-15.
30. Dubuquoy L, Dharancy S, Nutten S, Auwerx J, Desreumaux P. PPAR γ /RXR in inflammatory digestive diseases: a new therapeutic target in hepatogastroenterology. *Lancet* 2002 ; 360 : 1410-8.
31. Desreumaux P, Brandt E, Gambiez L, et al. Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997 ; 113 : 118-26.
32. Cellier C, Cervoni JP, Barbier JP, Brousse N. Adhérences cellulaires et maladies inflammatoires chroniques intestinales. *Gastroenterol Clin Biol* 1997 ; 21 : 832-42.
33. Atreya R, Mudter J, Finotto S, et al. Blockage of IL-6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn disease and experimental colitis *in vivo*. *Nat Med* 2000 ; 6 : 583-8.
34. Grimm MC, Pavli P, Van de Pol E, Doe WF. Evidence for a CD14+ population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa: implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 1995 ; 100 : 291-7.
35. Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ. The biology of Toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000 ; 11 : 219-32.
36. Cario E, Podolsky DK. Alteration in intestinal epithelial cell expression of Toll-like receptors in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000 ; 118 : 3684.
37. Bogunovic M, Reka S, Evans KN, Mayer LF, Sperber K, Plevy SE. Functional Toll-like receptors (TLR) are expressed on intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2000 ; 118 : 4269.
38. Dubuquoy L, Jansson EA, Deeb S, et al. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003 ; 124 : 1265-76.
39. Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, et al. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 2001 ; 193 : 827-38.
40. Dubuquoy L, Dharancy S, Nutten S, Pettersson S, Auwerx J, Desreumaux P. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases. *Lancet* 2002 ; 360 : 1410-8.
41. Marasco WA, Phan SH, Krutzsch H, et al. Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1984 ; 259 : 5430-9.
42. Hobson CH, Butt TJ, Ferry DM, Hunter J, Chadwick VS, Broom MF. Enterohepatic circulation of bacterial chemotactic peptide in rats with experimental colitis. *Gastroenterology* 1988 ; 94 : 1006-13.
43. Anton PA, Targan SR, Shanahan F. Increased neutrophil receptors for and response to the proinflammatory bacterial peptide formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1989 ; 97 : 20-8.
44. Chadwick VS, Schlup MM, Cooper BT, Broom MF. Enzymes degrading bacterial chemotactic F-met peptides in human ileal and colonic mucosa. *J Gastroenterol Hepatol* 1990 ; 5 : 375-81.
45. Garcia-Lafuente A, Antolin M, Crespo E, Guarner F, Malagelada JR. Intestinal permeability is modulated by the composition of the commensal flora. *Gastroenterology* 1997 ; 112 : 979.
46. Morrissey PJ, Charrier K. Induction of wasting disease in SCID mice by the transfer of normal CD4+/CD45RB^{hi}T cells and the regulation of this autoreactivity by CD4+/CD45RB^{lo}T cells. *Res Immunol* 1994 ; 145 : 357-62.
47. Komatsu S, Panes J, Mori N, Grisham MB, Russel JM, Granger DN. Effects of intestinal stasis on ICAM-1 expression: role of enteric bacteria. *Gastroenterology* 1997 ; 112 : 1018.

48. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Büschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1995 ; 102 : 448-55.
49. Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, Meyer zum Büschenfelde KH, Neurath M. Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *Eur J Immunol* 1996. ; 26 : 934-8.
50. Harty JT, Bevan MJ. Specific immunity to *Listeria monocytogenes* in the absence of IFN gamma. *Immunity* 1995 ; 3 : 109-17.
51. Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reifenberg K, Kopf M, Kaufmann SH. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. *Infect Immun* 1997 ; 65 : 4843-9.
52. Marino MW, Dunn A, Grail D, *et al.* Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 8093-8.
53. Schoedon G, Goldenberger D, Forrer R, *et al.* Deactivation of macrophages with interleukin-4 is the key to the isolation of *Tropheryma whippelii*. *J Infect Dis* 1997 ; 176 : 672-7.
54. Mansfield LS, Urban JF. The pathogenesis of necrotic proliferative colitis in swine is linked to whipworm induced suppression of mucosal immunity to resident bacteria. *Vet Immunol Immunopathol* 1996 ; 50 : 1-17.
55. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001 ; 411 : 599-603.
56. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001 ; 411 : 603-6.
57. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, *et al.* Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001 ; 357 : 1925-8.
58. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, *et al.* CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002 ; 70 : 845-57.
59. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, *et al.* The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002 ; 122 : 867-74.
60. Vermeire S, Wild G, Kocher K, *et al.* CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. *Am J Hum Genet* 2002 ; 71 : 74-83.
61. Radmayr M, Torok HP, Martin K, Folwaczny C. The c-insertion mutation of the NOD2 gene is associated with fistulizing and fibrostenotic phenotypes in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002 ; 122 : 2091-2.
62. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, *et al.* Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002 ; 123 : 679-88.
63. Girardin SE, Sansonetti PJ, Philpott DJ. Intracellular vs extracellular recognition of pathogens-common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol* 2002 ; 10 : 193-9.
64. Cin AI, Dempsey PW, Bruhn K, Miller JF, Xu Y, Cheng G. Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptative immune response. *Nature* 2002 ; 416 : 190-3.
65. Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD, *et al.* RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptative immune systems. *Nature* 2002 ; 416 : 194-8.



Microflore saprophyte colique au cours des diarrhées aiguës infectieuses

Philippe Seksik

Département
de Gastro-entérologie,
Hôpital Européen
Georges Pompidou
Paris, France.

Au cours d'une diarrhée aiguë infectieuse, un agent pathogène peut être mis en évidence à l'examen microbiologique des selles sans que l'on puisse préjuger des bouleversements de la microflore colique. Si l'on connaît mieux, actuellement, les micro-organismes responsables des diarrhées infectieuses, les modifications de la microflore saprophyte colique restent, quant à elles, mal connues. La reconnaissance des bactéries pathogènes a permis le développement rationnel de traitements antibiotiques. Ainsi, par analogie, une meilleure connaissance des modifications de la microflore colique dans son ensemble pourrait théoriquement permettre l'utilisation de pré- ou probiotiques ayant pour rôle de rétablir l'équilibre de cet écosystème. L'étude des modifications de la microflore colique saprophyte au cours des diarrhées infectieuses est donc l'objet de ce présent chapitre.

Microflore saprophyte colique

Généralités

Le tractus digestif est peuplé d'un grand nombre de bactéries, correspondant à dix fois le nombre de cellules constituant le corps humain. Cet écosystème est caractérisé par une grande biodiversité. Ainsi, près de cinq cent espèces seraient présentes et des techniques nouvelles de biologie moléculaire révèlent de nombreuses espèces non encore isolées par la culture [1]. Les conditions physico-chimiques varient considérablement le long du tube digestif, il existe d'importantes variations qualitatives et quantitatives de la microflore digestive aux différents sites. Le côlon est le segment le plus peuplé, hébergeant environ 10^{11} bactéries par gramme de contenu [2]. La microflore fécale est considérée par certains comme représentative de la microflore colique dans son ensemble, mais reflète plus probablement seulement la microflore luminale du côlon distal (côlon gauche, sigmoïde, rectum). En effet, les populations sont moins importantes d'environ deux unités logarithmiques dans le côlon proximal que dans le côlon distal (ou le rectum) et les micro-organismes anaérobies facultatifs, qui sont co-dominants avec les anaérobies stricts dans le côlon droit, n'évoluent pas en population jusqu'au rectum tandis que les anaérobies stricts dominent dans le côlon gauche et la matière fécale [3].

Au sein de la microflore saprophyte, on distingue une microflore dominante constituée de bactéries anaérobies strictes (nombre supérieur à 10^8 bactéries par gramme de fèces) et une microflore sous-dominante

constituée de bactéries anaérobies facultatives cent à mille fois moins abondantes. À ces bactéries autochtones, il faut ajouter une microflore allochtone, en transit dans l'écosystème digestif, apportée par l'alimentation.

Chez l'adulte, la taxonomie bactérienne phénotypique a permis d'établir un profil de microflore fécale relativement stable à l'échelle des grands groupes microbiens. Les micro-organismes dominants de la microflore fécale humaine sont, pour les Gram négatifs les bacilles du genre *Bacteroides*, pour les Gram positifs, les bacilles non sporulés des genres *Eubacterium* et *Bifidobacterium*, les coques des genres *Peptostreptococcus* et *Ruminococcus* et, enfin, les bacilles sporulés du genre *Clostridium*. Les genres *Lactobacillus*, *Streptococcus* et les entérobactéries sont fréquemment représentés mais par des espèces sous-dominantes [4]. L'étape d'isolement en conditions anaérobies strictes a été un facteur limitant de cette approche.

Les limites de la culture se matérialisent à la fois par l'inaptitude à cultiver l'intégralité de la microflore visualisable au microscope et par la lourdeur matérielle qu'imposent l'isolement et la conservation de toutes les bactéries cultivables dominantes. L'avènement d'outils moléculaires a récemment permis de se soustraire à l'exigence de la culture [5]. Les méthodes qui se sont le plus développées à ce jour sont basées sur la reconnaissance des ARN 16S ribosomaux par des sondes oligonucléotidiques spécifiques de domaines, de groupes, sous-groupes et d'espèces, et permettent de caractériser, d'une part, la composition globale de la microflore digestive humaine et, d'autre part, la biodiversité d'espèce.

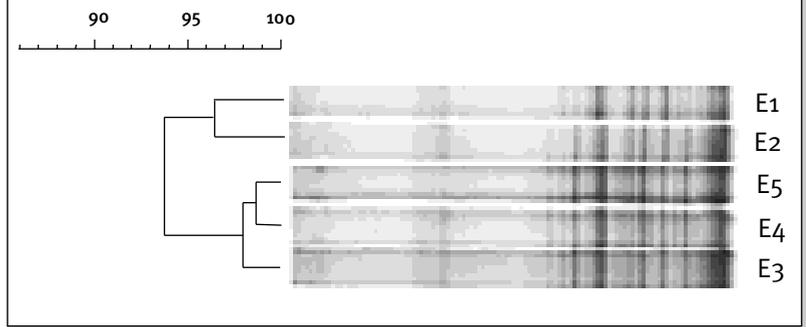
Stabilité de la microflore saprophyte colique

Des études anciennes ont montré la spécificité de chaque microflore à l'échelon individuel et la stabilité dans le temps de cet écosystème microbien. Gorbach *et al.* ont étudié, par des méthodes de culture, la microflore fécale de soixante-dix sujets sains âgés de vingt à cent ans [6]. Les analyses quantitatives et qualitatives ont mis en évidence des différences interindividuelles significatives au sein d'une même classe d'âge et une stabilité remarquable de la microflore fécale chez un même individu au cours du temps sur une période de sept semaines à sept mois. Ces travaux princeps ont récemment été confirmés grâce à l'avènement des outils moléculaires. La biodiversité de la microflore dominante, spécifique d'un individu à l'autre, est parfaitement stable au cours du temps chez un même individu. Si l'on fait migrer sur un gel d'électrophorèse des fragments d'ADN ribosomal extraits de la microflore fécale d'un sujet sain, on obtient également un profil spécifique de cet individu et stable au cours du temps (Figure 1) [7]. Les essais d'implantation de micro-organismes chez l'adulte restent un sujet d'étude. Les modifications de l'équilibre microbien par des facteurs alimentaires restent mal connues ou limitées au côlon droit. D'autres facteurs exogènes pourraient rompre cet équilibre comme une antibiothérapie ou une diarrhée infectieuse. Pour assurer la stabilité d'un écosystème aussi complexe, il existe un mécanisme protecteur exercé par la microflore saprophyte, appelé effet de barrière.

Effet de barrière

Bien que les mécanismes de l'effet de barrière restent mal connus, ils sont soumis à un même principe : la bactérie exerçant l'effet de barrière doit être

Figure 1.
Électrophorèse en gradient dénaturant de température (TTGE) des produits d'amplifications de fragment de gène codant pour les ARN 16S (obtenus par l'utilisation d'amorces pour les régions V6-V8 des gènes) de la microflore dominante



d'un sujet sain recueillie à plusieurs reprises sur une période de 2 ans. **E1** : échantillon recueilli en 1997 ; **E2-E5** : échantillons recueillis en 1999 à J1, J23, J58 et J78 respectivement. Le dendrogramme donne une représentation statistique optimale des similarités entre les profils de TTGE.

dans la microflore dominante. L'équilibre de la microflore intestinale résulte d'interactions microbiennes au sein de la microflore saprophyte sous la forme de compétitions (pour des substrats nutritifs ou des sites d'adhérence) et de modifications de l'écosystème par des produits du métabolisme bactérien (pH, bactériocines, acides organiques, etc.) [8, 9]. On distingue deux types de barrières : intraspécifique et interspécifique.

Plusieurs expériences animales illustrent les barrières intraspécifiques. En effet, chez la souris et le porcelet gnotoxénique, des souches d'*Escherichia coli* dépourvues de plasmides porteurs de facteur de pathogénicité peuvent exercer un effet de barrière sur des souches d'*Escherichia coli* porteuses de plasmides avec facteurs de pathogénicité. Chez l'homme, ce travail a eu des implications médicales puisque l'inoculation d'une souche d'*Escherichia coli* dépourvue de plasmides à des jeunes enfants réduit le portage d'*Escherichia coli* résistants aux antibiotiques [10]. De même, chez la souris gnotoxénique puis chez l'homme, on a pu montrer que des souches de *Clostridium difficile* non toxigènes peuvent empêcher la multiplication de souches toxigènes [11-14]. Les barrières interspécifiques sont plus difficiles à mettre en évidence. Chez l'homme, *Bacteroides thetaiotamocron* et *Fusobacterium necrogenes* ont été identifiés comme responsable d'un effet de barrière vis-à-vis de *Clostridium perfringens* [15].

Modifications de la microflore saprophyte colique au cours de diarrhées infectieuses

Diarrhées infectieuses

Les diarrhées aiguës sont définies par l'OMS comme l'émission d'au moins trois selles molles à liquides par 24 heures depuis moins de quatorze jours. Les infections constituent la cause la plus importante des diarrhées aiguës. En France, les résultats du relevé de l'incidence hebdomadaire des diarrhées aiguës par le réseau Sentinelle montrent qu'il existe un pic hivernal

regroupant cinq cent mille cas et une recrudescence en été. Cette distribution bipolaire, ainsi que d'autres arguments indirects, plaident pour une origine infectieuse des diarrhées aiguës : virales en hiver et bactériennes en été. Trois cohortes européennes rapportent des études systématiques microbiologiques au cours de colites aiguës [16-18]. La recherche des causes bactériennes, parasitaires ou virales, comportait une analyse des selles et de biopsies coliques ensemencées sur des milieux de cultures spécifiques, une analyse histologique des biopsies et un examen parasitologique des selles. L'analyse des résultats de ces trois cohortes montre que les colites infectieuses documentées représentent la moitié des colites aiguës étudiées. Ces colites infectieuses sont dominées par les causes bactériennes suivantes : *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, *Salmonella* (Figures 2 et 3), *Shigella*, *Yersinia*, *Klebsiella oxytoca* et *Escherichia coli* (Figure 4).

Ces données nous renseignent sur la présence d'un germe pathogène dans les selles ou associé à la muqueuse colique au cours d'une diarrhée infectieuse bactérienne. L'isolement de bactéries pathogènes se fait à partir

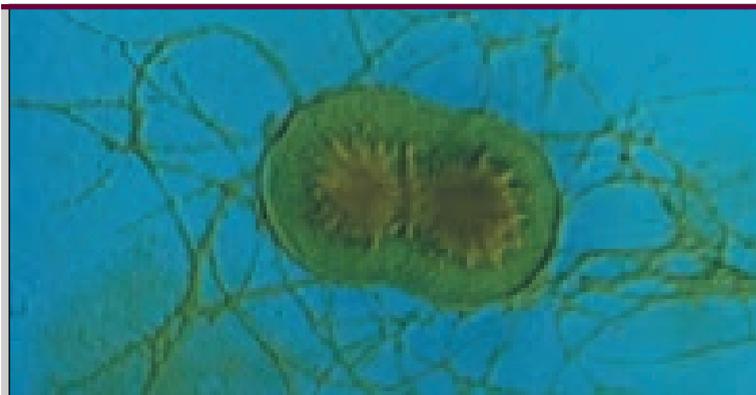


Figure 2.
Salmonelle en microscopie électronique à balayage (cliché T. Piche, Nice)

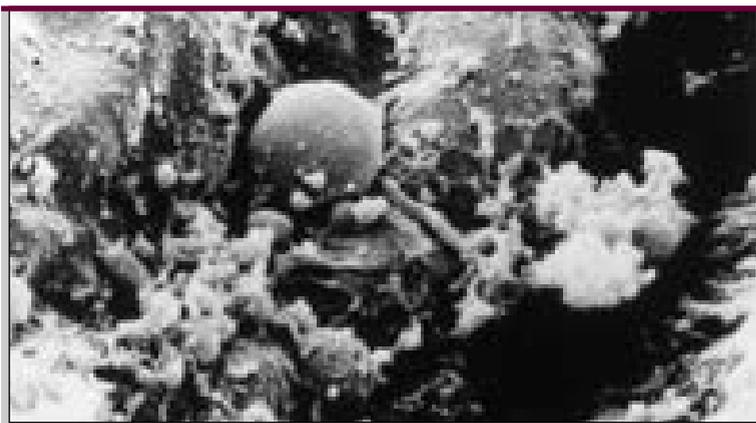


Figure 3.
MEB, muqueuse du côlon sigmoïde au cours d'une infection à Salmonella enteritidis (type B). Mise en évidence d'un bacille au contact direct de la membrane basale (flèche) qui correspond vraisemblablement à une salmonelle (cliché G. Brandi, Bologne)

Figure 4.
Biopsie colique d'un patient porteur d'une infection à *Escherichia coli* O157 : H7. Pseudomembraneuse recouvrant la muqueuse (cliché D. Surawicz, Seattle)



d'échantillons recueillis dès l'émission des selles et conservés à +4 °C pendant 12 heures au maximum. L'examen microscopique, après coloration de Gram, permet de mettre en évidence des modifications drastiques de l'équilibre de la microflore saprophyte, mais ne renseigne pas de façon précise sur ces modifications. De ce fait, les modifications de la microflore colique saprophyte au cours des diarrhées infectieuses ne peuvent s'appréhender que par une analyse systématique, soit par des techniques de microbiologie classiques, soit actuellement par des techniques de biologie moléculaire.

Modifications de la microflore saprophyte colique

Peu d'études se sont intéressées aux modifications de la microflore saprophyte au cours des diarrhées infectieuses [19]. D'un point de vue caricatural, on pourrait imaginer qu'une bactérie pathogène remplace qualitativement et quantitativement la microflore colique normale au cours d'une diarrhée infectieuse. De fait, il a été observé, chez des patients atteints par le choléra, que les concentrations fécales de *Vibrio cholerae* pouvaient atteindre 3.10^7 CFU/mL, tandis que le taux de *Bacteroides* diminuait à 10^5 CFU/mL. La restitution rapide d'une microflore normale a été observée après guérison [20].

Gorbach *et al.* ont étudié la microflore fécale de dix-sept adultes indiens au cours d'une diarrhée aiguë et pendant la période de guérison [21]. Au cours de la diarrhée, huit sujets présentaient une microflore constituée de façon dominante d'*Escherichia coli*, tandis que les autres présentaient une microflore variée associant *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter cloacae* et *Alcaligenes faecalis*. Dans le premier groupe, la concentration d'*Escherichia coli* au cours de la diarrhée était d'une à trois unités logarithmiques plus élevée que celle des autres bactéries aérobies et anaérobies. Cela était dû à une conjonction d'effets : une augmentation des bactéries aérobies et une diminution des anaérobies. Au cours de la période de guérison, le niveau des coliformes diminuait, plusieurs espèces apparaissaient,

et les taux de *Bacteroides*, *Lactobacillus* et *Clostridium* augmentaient significativement. Dans le second groupe, les taux d'*Escherichia coli* dans les selles n'étaient pas augmentés pendant la phase aiguë, cependant que le taux de *Bacteroides*, de *Clostridium* et des bactéries micro-aérophiles était diminué en comparaison des taux observés pendant la période de guérison. Pour résumer ces travaux, on pourrait dire qu'on observe globalement une augmentation des bactéries aérobies et une diminution des anaérobies au cours des diarrhées infectieuses. Ces résultats ont été confirmés par plusieurs auteurs.

Fujita *et al.* ont étudié la microflore fécale de quatorze enfants du Kenya ayant une diarrhée aiguë due à des pathogènes variés : *Shigella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* entérotoxigène et rotavirus (dans trois cas, la cause n'était pas retrouvée) [22].

La microflore fécale était étudiée au moment de la diarrhée et au cours de la guérison. Au cours de la diarrhée, si l'on ne prenait pas en compte les bactéries pathogènes, les taux de bactéries aérobies étaient les mêmes pendant les deux périodes d'observation. Les taux de bactéries anaérobies *Bacteroides* et *Bifidobacterium* étaient significativement plus bas au cours de l'épisode de diarrhée qu'au cours de la période de guérison. Une même tendance était observée pour les *Lactobacillus* et les *Eubacterium*. Les propriétés physico-chimiques des échantillons de selles étaient également étudiées : au cours de la diarrhée, le pH était plus élevé et les acides gras volatils étaient diminués en comparaison avec la phase de guérison. Ces résultats étaient observés quel que soit l'agent pathogène responsable de la diarrhée.

Albert *et al.* ont étudié la composition de la microflore fécale de quarante-neuf enfants ayant une diarrhée aiguë infectieuse ainsi que celle de vingt-neuf enfants sains [23]. Dans cette étude, chez les enfants ayant une diarrhée aiguë, les bactéries anaérobies étaient diminuées, de sorte que le rapport anaérobies/aérobies était inversé par rapport aux sujets sains. Aucune différence qualitative n'était mise en évidence entre la composition des microflore fécales des enfants ayant une diarrhée d'origine bactérienne et celle des enfants ayant une diarrhée d'origine virale. De même, de façon globale, les modifications la microflore saprophyte colique étaient identiques qu'un agent pathogène soit identifié ou non.

Au terme de l'analyse de ces travaux, quelques remarques générales peuvent être dégagées. La connaissance de la microflore colique au cours des diarrhées infectieuses repose sur des études anciennes ayant étudié la microflore fécale d'adultes et/ou d'enfants de pays en développement. Au cours de ces études, le dénombrement bactérien a été réalisé essentiellement par des techniques de bactériologie classique. Les modifications globales semblent univoques quel que soit l'agent incriminé : une augmentation des aérobies et une diminution concomitante des anaérobies strictes.

Ces constatations amènent à dégager des hypothèses physiopathologiques. Les modifications de la microflore saprophyte pourraient être le reflet d'un bouleversement de l'écosystème colique par altération de ses propriétés physico-chimiques : changement des substrats (sang) et variation du pH et/ou du potentiel d'oxydoréduction. Les taux élevés de bactéries aérobies peuvent être rapprochés, par analogie, de la composition de la microflore du côlon droit [23]. Sur la base de ces observations, on pourrait imaginer que, au cours des diarrhées infectieuses, en raison de l'afflux d'eau et d'électrolytes ou à

l'occasion de troubles moteurs, une partie de la microflore habituelle du côlon droit se retrouve au niveau du côlon gauche et des selles. Il faut, cependant, tempérer ces résultats du fait de l'impossibilité de cultiver l'intégralité de la microflore et des difficultés techniques du dénombrement bactérien au cours des épisodes de diarrhée du fait de la dilution des échantillons. Dans ces conditions, une sous-estimation de la microflore anaérobie stricte est probable. Il n'existe pas d'études de la microflore colique au cours des diarrhées infectieuses chez l'homme, basées sur la reconnaissance des ARN ribosomiaux 16S.

Ces travaux restent un champ d'investigation important pour la description et la compréhension des mécanismes physiopathologiques des modifications de l'écosystème bactérien. À titre d'exemple, une étude chez le porc a permis de mettre en évidence une déstabilisation de la microflore colique au cours d'une diarrhée infectieuse induite expérimentalement par *Brachyspira hyodysenteriae* (agent de la dysenterie porcine) [24]. L'analyse des polymorphismes de restriction des gènes codant pour les ARN ribosomiaux 16S a montré des fluctuations importantes des profils de restriction au cours des épisodes de diarrhée, contrastant avec une stabilité remarquable de ces profils au cours du temps dans un groupe témoin sans diarrhée infectieuse. À l'inverse, chez la souris conventionnelle, une diarrhée expérimentale néonatale à rotavirus ne modifie ni l'implantation de *Lactobacillus* spp et d'*Escherichia coli* avant le sevrage, ni le développement d'un effet barrière vis-à-vis d'*Escherichia coli*, non plus que le peuplement du duodénum en plasmocytes à IgA après le sevrage [19]. Chez l'homme, la déstabilisation de la microflore mérite d'être mieux caractérisée à l'échelle de groupes phylogénétiques ou d'espèces moléculaires.

Bases théoriques à l'utilisation des probiotiques au cours des diarrhées infectieuses

Les diarrhées infectieuses sont un problème de santé publique à l'échelle internationale. De fait, elles représentent l'une des causes principales de mortalité néonatale et infantile dans les pays en développement [25, 26]. La reconnaissance de bactéries pathogènes au cours des diarrhées bactériennes a conduit à l'utilisation rationnelle des antibiotiques. Cependant, les causes virales représentant la première cause de diarrhée infectieuse, le traitement repose essentiellement sur des mesures symptomatiques de correction des troubles hydro-électrolytiques. La diminution de l'intensité et de la durée d'une diarrhée infectieuse apparaît donc un enjeu important de la prise en charge thérapeutique. La reconnaissance de l'effet de barrière, c'est-à-dire du rôle protecteur de la microflore endogène vis-à-vis de l'implantation d'un micro-organisme pathogène, associé aux modifications observées de la microflore saprophyte colique au cours des diarrhées infectieuses, a conduit à proposer une bactériothérapie curative et préventive des diarrhées infectieuses par des probiotiques. En effet, afin de rétablir l'équilibre de la microflore saprophyte, l'administration de bactéries ingérées vivantes semble être un concept séduisant. Une utilisation rationnelle des probiotiques au cours des diarrhées infectieuses passe par une meilleure connaissance des déséquilibres de la microflore mais également par la description des mécanismes d'action des probiotiques. Un grand champ d'investigation, à la fois clinique et fondamental, reste ouvert. L'utilisation d'outils moléculaires devrait

permettre, dans les années qui viennent, de pouvoir acquérir de nouvelles connaissances dans ces domaines.

Points clés

- La microflore saprophyte colique est spécifique de chaque individu et reste stable au cours du temps, grâce notamment à un effet protecteur de la microflore elle-même, appelé effet de barrière.
- Les diarrhées infectieuses sont un problème de santé publique à l'échelle internationale et représentent l'une des causes principales de mortalité néonatale et infantile dans les pays en développement.
- Peu d'études se sont intéressées aux modifications de la microflore saprophyte au cours des diarrhées infectieuses et le dénombrement bactérien au cours de ces études a été réalisé essentiellement par des techniques de bactériologie classique.
- Les modifications globales semblent univoques, quel que soit l'agent incriminé : une augmentation des bactéries aérobies et une diminution concomitante des anaérobies strictes.
- La reconnaissance de l'effet de barrière associée à ces modifications de la microflore saprophyte colique au cours des diarrhées infectieuses a conduit à proposer une bactériothérapie curative et préventive des diarrhées infectieuses par des probiotiques.

Références

1. Suau A, Bonnet R, Sutren M, *et al.* Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 1999 ; 65 : 4799-807.
2. Ducluzeau R. Role of experimental microbial ecology in gastroenterology. In : Bergognier-Berezin E, ed. *Microbial ecology and intestinal infection*. Berlin : Springer-Verlag, 1988 : 7-26.
3. Marteau P, Pochart P, Doré J, Bera-Maillet C, Bernalier A, Corthier G. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2001 ; 67 : 4939-42.
4. Wilson KH. The gastrointestinal microflora. In : Yamada T, ed. *Textbook of gastroenterology*. Philadelphia : JB Lippincott, 1991 ; 26 : 532-43.
5. Blaut M, Collins MD, Welling GW, Doré J, van Loo J, de Vos W. Molecular biological methods for studying the gut microbiot : the EU human gut flora project. *Br J Nutr* 2002 ; 87 Suppl 2 : S203-11.
6. Gorbach SL, Nahas L, Lerner PI, Weinstein L. Studies of intestinal microflora. I. Effects of diet, age, and periodic sampling on numbers of fecal microorganisms in man. *Gastroenterology* 1967 ; 53 : 845-55.
7. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, *et al.* Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003 ; 52 : 237-42.
8. Freter R. Factors influencing the microecology of the gut. In : Fuller R, ed. *Probiotics: the scientific basis*. London : Chapman & Hall, 1992 : 11-45.
9. Duncan HE, Edberg SC. Host-microbe interaction in the gastrointestinal tract. *Crit Rev Microbiol* 1995 ; 21 : 85-100.
10. Duval-Iflah Y, Ouriet MF, Moreau C, Daniel N, Gabilan JC, Raibaud P. Implantation précoce d'une souche d'*Escherichia coli* dans l'intestin de nouveau-né humain : effet de barrière vis-à-vis de souches d'*E. coli* antibiorésistants. *Ann Microbiol* 1982 ; 133 : 393-408.
11. Corthier G, Dubos F, Raibaud P. Modulation of cytotoxin production by *Clostridium difficile* in the intestinal tracts of gnotobiotic mice inoculated with various human intestinal bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1985 ; 49 : 250-2.
12. Corthier G, Muller MC. Emergence in gnotobiotic mice of nontoxigenic clones of *Clostridium difficile* from a toxigenic one. *Infect Immun* 1988 ; 56 : 1500-4.
13. Schwan A, Sjolín S, Trottestam U, Aronsson B. Relapsing *Clostridium difficile* enterocolitis cured by rectal infusion of normal faeces. *Scand J Infect Dis* 1984 ; 16 : 211-5.
14. Wilson KH, Sheagren JN. Antagonism of toxigenic *Clostridium difficile* by nontoxigenic *C. difficile*. *J Infect Dis* 1983 ; 147 : 733-6.
15. Yurdusev N, Ladire N, Ducluzeau R, Raibaud P. Antagonism exerted by an association of a *Bacteroides thetaiotaomicron* strain and a *Fusobacterium necrogenes* strain against *Clostridium perfringens* in gnotobiotic mice and in fecal suspensions incubated *in vitro*. *Infect Immun* 1989 ; 57 : 724-31.
16. Roussin Bretagne S, Barge J, Boussougant Y, Hagiage M, Devars du Mayne JF, Cerf M. La diarrhée aiguë de l'adulte en région parisienne. Aspects cliniques, bactériologiques, endoscopiques et histologiques. Étude de 52 cas. *Gastroenterol Clin Biol* 1989 ; 13 : 804-10.
17. Beaugerie L, Barbut F, Delas N, *et al.* Caractérisation des colites aiguës de l'adulte immunocompétent : résultats préliminaire d'une série prospective multicentrique de 93 cas. *Gastroenterol Clin Biol* 1998 ; 22 : A15.
18. Schumacher G, Kollberg B, Sandstedt B, *et al.* A prospective study of first attacks of inflammatory bowel disease and non-relapsing colitis. Microbiologic findings. *Scand J Gastroenterol* 1993 ; 28 : 1077-85.
19. Moreau MC, Corthier G, Muller MC, Dubos F, Raibaud P. Relationships between rotavirus diarrhea and intestinal microflora establishment in conventional and gnotobiotic mice. *J Clin Microbiol* 1986 ; 23 : 863-8.
20. Gorbach SL, Banwell JG, Jacobs B, *et al.* Intestinal microflora in Asiatic cholera. I. « Rice-water » stool. *J Infect Dis* 1970 ; 121 : 32-7.
21. Gorbach SL, Banwell JG, Chatterjee BD, Jacobs B, Sack RB. Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics. I. Alterations in intestinal microflora. *J Clin Invest* 1971 ; 50 : 881-9.

22. Fujita K, Kaku M, Yanagase Y, *et al.* Physicochemical characteristics and flora of diarrhoeal and recovery faeces in children with acute gastro-enteritis in Kenya. *Ann Trop Paediatr* 1990 ; 10 : 339-45.
23. Albert MJ, Bhat P, Rajan D, Maiya PP, Pereira SM, Baker SJ. Faecal flora of South Indian infants and young children in health and with acute gastroenteritis. *J Med Microbiol* 1978 ; 11 : 137-43.
24. Leser TD, Lindecrone RH, Jensen TK, Jensen BB, Moller K. Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Appl Environ Microbiol* 2000 ; 66 : 3290-6.
25. Snyder GD, Holmes RW, Bates JN, Van Voorhis BJ. Nitric oxide inhibits aromatase activity: mechanisms of action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996 ; 58 : 63-9.
26. Ho MS, Glass RI, Pinsky PF, *et al.* Diarrheal deaths in American children. Are they preventable? *JAMA* 1988 ; 260 : 3281-5.



Flore et diarrhées : diarrhées associées aux antibiotiques

Yoram Bouhnik

Hépatogastro-entérologie
et Assistance Nutritive,
Hôpital Lariboisière,
Paris, France.

La diarrhée a été définie par l'OMS par l'émission de plus de trois selles par jour, de consistance molle ou liquide. La diarrhée associée aux antibiotiques (DAA) est définie par une diarrhée inexpliquée apparaissant en association à un traitement antibiotique.

On distingue un peu artificiellement trois situations cliniques :

- les diarrhées simples, situation la plus fréquente, dont les mécanismes sont multiples ;
- les colites hémorragiques, peut-être en rapport avec l'émergence d'une souche toxigène de *Klebsiella oxytoca* ;
- la colite pseudomembraneuse, liée à l'émergence, rendue possible par la rupture de l'effet de barrière, d'une souche toxigène de *Clostridium difficile*.

À tous les mécanismes pathogéniques invoqués, le préalable commun et incontournable est le déséquilibre de l'écosystème bactérien intestinal lié à l'antibiothérapie [1]. Ainsi, la prise d'un antibiotique, quelle que soit sa famille, peut avoir deux types de conséquences :

- une modification de la composition de la flore, responsable de la perte de « l'effet de barrière », dû lui-même à la présence de bactéries anaérobies commensales dominantes qui s'opposent, par leur équilibre complexe et subtil, à la prolifération de germes pathogènes endogènes ou exogènes ;
- une modification du métabolisme bactérien, à l'origine d'une diminution des activités hydrolytiques et de fermentation de la flore colique, responsable d'une diarrhée « métabolique » [2].

En règle générale, l'équilibre rompu se rétablit peu de temps après l'arrêt de l'antibiothérapie, ce qui suggère que les bactéries de la flore de barrière ne sont que transitoirement éradiquées, ou plutôt que leur multiplication est seulement inhibée durant le traitement antibiotique.

Épidémiologie et facteurs de risque de la diarrhée associée aux antibiotiques

La fréquence de la DAA varie selon les antibiotiques utilisés. Elle est observée chez 5 % à 10 % des patients traités par ampicilline, 10 % à 25 % de ceux traités par amoxicilline-acide clavulanique, 15 % à 20 % de ceux recevant des céphalosporines de 3^e génération, et 2 % à 5 % de ceux traités par d'autres antibiotiques [1, 3]. Les taux rapportés de DAA après

administration d'antibiotiques par voie parentérale, en particulier ceux ayant un cycle entéro-hépatique, sont similaires à ceux observés après administration orale [4]. Seuls les aminosides administrés par voie parentérale n'entraînent jamais de diarrhée.

L'épidémiologie de la DAA en milieu communautaire a été récemment précisée dans une étude prospective incluant deux cent soixante-six adultes vivants en région parisienne et traités par antibiotique pendant cinq à dix jours [5]. Une diarrhée, modérée et auto-limitée, est survenue dans 17,5 % des cas, et durait un jour seulement dans 66 % des cas. Dans une étude pédiatrique incluant six cent cinquante enfants âgés de un mois à quinze ans traités par antibiotique, une diarrhée est survenue dans 11 % des cas [6]. Dans cette étude, la diarrhée était définie par l'émission de trois selles liquides ou davantage pendant deux jours consécutifs.

Les facteurs de risque de la DAA sont récapitulés dans le **Tableau I**. Il est à noter que le sexe, la dose et la voie d'administration de l'antibiothérapie ne sont pas des facteurs de risque significatif de DAA [7].

Facteurs liés à l'antibiothérapie	Facteurs liés à l'hôte	Tableau I. <i>Facteurs de risque de la diarrhée associée aux antibiotiques (d'après [7])</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Antibiotiques à large spectre <ul style="list-style-type: none"> - Amoxicilline - Amoxicilline-clavulanate - Céphalosporines de 2^e et 3^e génération - Clindamycine • Durée de l'antibiothérapie <ul style="list-style-type: none"> - traitements longs - traitements répétés • Utilisation de plusieurs antibiotiques • Antibiotiques à excrétion biliaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Âges extrêmes de la vie <ul style="list-style-type: none"> - < 6 ans - > 65 ans • Terrain <ul style="list-style-type: none"> - antécédents de DAA - maladie sous-jacente sévère - affection digestive chronique - co-morbidité - immunodépression • Hospitalisation <ul style="list-style-type: none"> - longs séjours - chirurgie - interventions gastro-intestinales - alimentation par sonde naso-gastrique 	

Diarrhées dites « simples »

De loin les plus fréquentes, elles surviennent en général quelques jours après le début de l'antibiothérapie, mais elles peuvent également apparaître jusqu'à six semaines après son arrêt [8]. Ces diarrhées « simples » sont le plus souvent modérées, aqueuses, rarement accompagnées de douleurs abdominales et de fièvre. Elles régressent en général à l'arrêt du traitement ou lors de la réduction des doses d'antibiotiques. L'endoscopie basse, rarement pratiquée, est normale ou montre des lésions non spécifiques, telles qu'un œdème, un érythème, des pétéchies ou des érosions. Il faut cependant noter

l'absence générale de données précises et de corrélation entre l'aspect endoscopique observé et les germes retrouvés.

La physiopathologie de ces diarrhées « simples » est discutée. On peut distinguer les causes « infectieuses », les causes métaboliques et les autres causes.

Causes de diarrhées « simples » associées aux antibiotiques

Causes infectieuses

Une proportion significative des ces diarrhées (10 % à 20 %) a été rapportée à une colonisation par *Clostridium difficile* [1, 4, 9-11]. Dans l'étude prospective communautaire précédemment citée [5], un examen de selles était effectué avant et quatorze jours après le début du traitement antibiotique ; il comprenait une coproculture avec recherche de *Clostridium difficile*, de la toxine et d'un effet cytopathogène pour la toxine B. *Clostridium difficile* a été isolé avant et après le traitement chez un patient qui n'a pas développé de diarrhée. Des souches de *Clostridium difficile* productrices de toxine étaient isolées dans moins de 3 % (7/262) des cas, plus fréquemment en cas de diarrhée (8,7 versus 1,4 %, $P = 0,02$). Ainsi, *Clostridium difficile* n'est pas le principal agent de la DAA chez les patients ambulatoires.

La DAA peut également être causée par d'autres agents pathogènes. Il s'agit de *Salmonella*, *Clostridium perfringens* type A, *Staphylococcus aureus*, et peut-être *Candida albicans*. *Clostridium perfringens* type A produit une entérotoxine connue pour entraîner une intoxication alimentaire ; plus récemment, un génotype différent a été impliqué dans la DAA [12]. Il n'y a pas de traitement spécifique et peu de laboratoires offrent les tests diagnostiques nécessaires à l'identification de ce pathogène. *Salmonella* Newport multi-résistante provenant de bœufs contaminés a été impliquée dans des épidémies de diarrhée chez des patients prenant de l'ampicilline [13].

La découverte de *Candida albicans* dans les selles, à une concentration supérieure à 10^6 organismes/g, chez quelques patients dont la condition s'est améliorée après traitement par la nystatine, a suggéré que certaines souches de *Candida* pouvaient causer des DAA ; cela reste controversé [14].

Causes métaboliques

Les antibiotiques peuvent substantiellement réduire la concentration des bactéries anaérobies normalement présentes dans le côlon et, donc, entraîner la réduction des réactions de fermentation. Dans ces conditions, la persistance, dans la lumière colique, de molécules glucidiques osmotiquement actives, peut être responsable d'une diarrhée osmotique, mécanisme bien démontré chez l'homme après prise d'ampicilline [15]. Simultanément, la diminution de la production d'acides gras à chaînes courtes, dont l'absorption favorise celles des électrolytes, entraîne une diminution de l'absorption colique du sodium et du potassium, et donc de l'eau, mécanisme également bien démontré chez l'homme [2]. Enfin, on peut également observer une diminution de la conversion des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires, responsable alors d'une diarrhée sécrétoire cholérétique par effet direct des acides biliaires primaires sur la muqueuse colique.

Autres causes

Les antibiotiques ont des effets multiples sur le tractus gastro-intestinal, parfois indépendants de leur activité antimicrobienne. Ainsi, l'érythromycine

agit comme un agoniste « *motiline-like* » et accélère le transit ; l'acide clavulanique de la formulation amoxicilline-acide clavulanique semble stimuler la motilité du grêle [16].

Enfin, dans de nombreux cas, des traitements non antibiotiques prescrits simultanément sont la cause de diarrhées attribuées à des antibiotiques ; il s'agit de laxatifs, d'anti-acides, de produits de contraste, d'agents contenant du lactose ou du sorbitol, d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, d'anti-arythmiques et d'agents cholinergiques [16, 17].

Traitement des diarrhées « simples » associées aux antibiotiques

Le plus souvent, le simple arrêt de l'agent responsable suffit à entraîner une disparition de la diarrhée en quelques heures ou jours.

À ce jour, le traitement préventif de la DAA a fait l'objet de neuf essais contrôlés contre placebo évaluant l'efficacité des probiotiques. Une méta-analyse récente regroupant ces études a confirmé l'efficacité de ces traitements, avec un odds ratio en faveur du traitement actif de 0,39 (IC_{95 %} 0,25-0,62) ; P < 0,001) pour *Saccharomyces boulardii* et de 0,34 (IC_{95 %} 0,19-0,61) ; P < 0,01) pour *Lactobacillus* spp [18]. Ces résultats ont été confirmés par une deuxième méta-analyse prenant également en compte les études ouvertes [19].

Colite hémorragique

Étiopathogénie

Le rôle de *Klebsiella oxytoca* dans la colite hémorragique est probable. Il s'agit d'un bacille Gram négatif, aéroanaérobie facultatif, détecté dans la flore fécale humaine dans 30 % à 40 % des cas. Cette bactérie possède une résistance naturelle aux pénicillines et aux synergistines et, de ce fait, sa détection dans les selles après traitement par ces antibiotiques a peu de valeur, sauf peut-être lorsqu'on observe une culture pure de la bactérie [20]. En revanche, sa détection sur les biopsies coliques pourrait témoigner de propriétés d'adhésion ou d'invasion cellulaires, ce qui est un argument fort en faveur de la pathogénicité du micro-organisme. De plus, une cytotoxine thermostable a été isolée à partir du surnageant de cultures de souches de *Klebsiella oxytoca* provenant de malades atteints de colite hémorragique post-antibiotique. L'inoculation de cette cytotoxine à des anses intestinales ligaturées de lapin entraîne une hémorragie muqueuse intense avec accumulation de liquide, ce qui est aussi en faveur du rôle étiopathogénique de *Klebsiella oxytoca* dans la colite hémorragique post-antibiotique. Cependant, la masse moléculaire extrêmement faible et la structure chimique particulièrement simple de cette cytotoxine contrastent avec les caractéristiques des cytotoxines bactériennes actuellement identifiées [21].

Présentation clinique

Les manifestations digestives sont stéréotypées [22, 23]. Le tableau caractéristique associe :

- des douleurs abdominales d'apparition brutale, à type de coliques et épreintes (98 %), généralement violentes, voire pseudo-chirurgicales ;

- une diarrhée avec plus de quinze émissions hydriques par jour, qui deviennent sanglantes en quelques heures (100 %) ;
- une fièvre absente ou modérée, c'est-à-dire inférieure à 38,5 °C (90 %) ;
- un syndrome inflammatoire biologique (un tiers à deux tiers des cas).

Il n'a pas été rapporté à ce jour de signes de gravité. Les symptômes apparaissent en moyenne 5,3 (extrêmes : 1-17) jours après le début d'un traitement antibiotique, prescrit pour une infection ORL ou bronchique dans la grande majorité (88 %) des cas. Certains cas ont été rapportés jusqu'à six semaines après l'arrêt de l'antibiotique. Deux cas ont été rapportés après administration de l'antibiotique par voie intramusculaire. Le sex-ratio est proche de 1 et il est intéressant de noter que, dans plus de 60 % des cas, les sujets touchés sont âgés de vingt à quarante ans [22, 23].

Les antibiotiques responsables sont principalement représentés par les pénicillines et leurs dérivés (ampicilline : 20 % ; amoxicilline : 45 % ; amoxicilline-acide clavulanique : 20 % ; céphalosporines de 1^e à 3^e génération : 5 % ; synergistines : 10 %) [8, 22, 23]. Plus rarement, des fluoroquinolones ont été incriminées [24]. Les traitements associés, notamment anti-inflammatoires stéroïdiens ou non, n'ont pas été systématiquement répertoriés, mais ne semblent pas exercer d'effet délétère.

Examens complémentaires

Endoscopies et biopsies

Les lésions touchent le côlon droit dans trois quarts des cas, le côlon transverse, le côlon gauche et le sigmoïde dans la moitié des cas et le rectum dans un tiers des cas. Le côlon gauche est exclusivement atteint dans 15 % des cas, le côlon droit dans 36 % des cas et les deux parties du côlon dans 48 % des cas [22, 23]. Dans un travail récent, la simple rectosigmoïdoscopie réalisée pour une diarrhée aiguë sanglante a permis de retrouver des lésions caractéristiques dans sept cas sur neuf, le rectum étant atteint de façon isolée dans un cas sur neuf [25].

La coloscopie montre des lésions caractéristiques, principalement représentées par une congestion muqueuse, parfois associée à de nombreuses érosions, très étendues, entraînant une véritable hémorragie muqueuse en nappe (**Figure 1**), évoluant généralement d'un seul tenant. La survenue d'ulcérations creusantes n'a pas été rapportée dans cette situation.

Figure 1.
*Aspect endoscopique caractéristique d'une colite hémorragique à *Klebsiella oxytoca* (cliché Y. Bouhnik, Hôpital Lariboisière, Paris)*



Les lésions histologiques ne sont pas spécifiques. Les biopsies montrent généralement une dissociation hémorragique de la *lamina propria* qui, dans ce contexte, prend toute sa valeur lorsqu'elle s'associe à d'autres signes tels que :

- une exocytose à polynucléaires neutrophiles ;
- des abrasions et/ou érosions muqueuses ;
- une inflammation (souvent discrète) de la *lamina propria*, avec rares polynucléaires neutrophiles ;
- une fibrose, d'intensité diversement appréciée ;
- des altérations cryptiques avec diminution de la mucosécrétion (Figure 2).

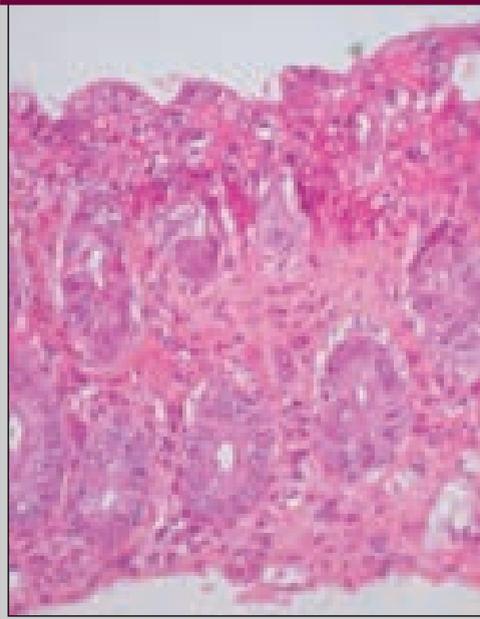


Figure 2.

Biopsie du côlon droit : dissociation hémorragique et inflammation à minima de la lamina propria, comme on peut l'observer dans les colites hémorragiques à *Klebsiella oxytoca* (HES, grossissement x 100) (cliché A. Lavergne-Slove, Anatomie pathologique, Hôpital Lariboisière, Paris)

Examens bactériologiques

Ceux-ci comportent une coproculture et surtout la mise en culture de biopsies coliques. En colligeant les principales séries de la littérature dans lesquelles une coproculture et une culture des biopsies ont été réalisées, *Klebsiella oxytoca* a été isolée à partir des selles dans un tiers des cas et à partir de la culture des biopsies coliques dans deux tiers des cas. La présence simultanée de *Clostridium difficile* dans les selles a été rapportée dans 10 % des cas. Dans un travail plus récent, *Klebsiella oxytoca* a été isolée sept fois sur neuf à partir des biopsies, mais dans aucun cas à partir des selles [25].

Dans un travail récent, des biopsies et du liquide coliques étaient prélevées lors d'une coloscopie chez quatre-vingt-treize patients consécutifs atteints de colite aiguë post-antibiotique [26] :

- *Klebsiella oxytoca* était isolé significativement plus souvent en cas de colite hémorragique non associée à la présence de *Clostridium difficile* ;
- les souches de *Klebsiella oxytoca* isolées étaient plus souvent cytotoxiques sur lignées cellulaires Hep-2 que celles retrouvées chez des porteurs sains.

Évolution

Celle-ci est rapidement favorable avec une disparition spontanée des symptômes cliniques après arrêt de l'antibiotique en moins de quatre jours dans 80 % des cas (extrêmes : 1-23 jours). Il faut signaler, cependant, que des traitements par vancomycine, métronidazole ou fluoroquinolone ont été parfois prescrits de façon empirique, sans arguments réels pour affirmer leur utilité.

Lorsqu'un contrôle endoscopique a été effectué, une normalisation complète de la muqueuse (parfois des biopsies) était notée, en quatre à douze jours, dans 80 % des cas [8, 22, 23].

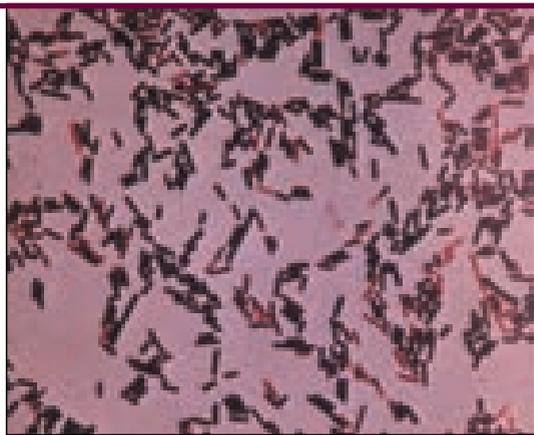
Aucune donnée publiée ne permet de savoir si la réintroduction de l'antibiotique responsable est suivie de la réapparition ou non des symptômes, mais la prudence doit conduire à le proscrire définitivement.

Colite pseudomembraneuse

Épidémiologie, facteurs de risque, étiopathogénie

Les sujets adultes hospitalisés ont des taux de colonisation par *Clostridium difficile* de l'ordre de 20 % à 30 %, comparés à 3 % pour les sujets ambulatoires [1, 27] (Figure 3).

Figure 3.
Clostridium difficile en microscopie optique
(cliché Y. Boussougant,
Hôpital Louis Mourier, Colombes)



Les facteurs de risque d'infection clinique figurent sur le Tableau I. Une étude suédoise en population ambulatoire a montré que la toxine de *Clostridium difficile* était vingt à cent fois plus souvent retrouvée chez les patients âgés de plus de soixante ans que chez ceux âgés de moins de vingt ans [28]. Les antibiotiques les plus fréquemment impliqués dans la diarrhée associée à *Clostridium difficile* sont la clindamycine, les pénicillines à large spectre et les céphalosporines [1, 9-11]. Cependant, tous les antibiotiques peuvent être en cause, quelle que soit la durée du traitement, à l'exception de la vancomycine et des aminosides par voie parentérale. Les épidémies de colite pseudomembraneuse sont particulièrement observées chez des personnes âgées en institution et doivent conduire à la restriction de

l'utilisation des antibiotiques, en particulier, ceux à large spectre [11, 19, 29-31]. Des cas occasionnels de colite à *Clostridium difficile* ont été rapportés après chimiothérapie. Des études récentes ont confirmé que le statut immunitaire avait un rôle dans l'expression des infections à *Clostridium difficile*.

Clostridium difficile entraîne une maladie intestinale médiée par deux toxines A et B, dont les caractéristiques cliniques et pathologiques ont été reproduites dans un modèle animal, le hamster [1].

Le mode d'action des toxines est de mieux en mieux connu. Les toxines A et B de *Clostridium difficile* sont responsables des lésions épithéliales, de la diarrhée et de l'inflammation intestinale survenant au cours de l'infection par ce pathogène. Les toxines sont codées par deux gènes, *tox A* et *tox B*, qui sont situés à proximité sur le chromosome bactérien. Pratiquement toutes les souches pathogènes produisent les deux toxines, alors que les souches non toxinogènes n'en produisent aucune. Quelques souches ne produisent que la toxine B. Les effets intestinaux des toxines sont spécifiques de l'espèce considérée. Chez l'homme, la toxine B est environ dix fois plus puissante que la toxine A au niveau du côlon, alors que, dans l'intestin du rongeur, seule la toxine A produit une inflammation ou une diarrhée. Ces différences reflètent probablement celles qui existent au niveau des récepteurs entre les rongeurs et les humains. Chez l'homme ou le rongeur, l'exposition intra-luminale du côlon ou de l'iléon aux toxines entraîne une désagrégation des filaments d'actine dans les entérocytes, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité paracellulaire. Il existe, de plus, une sécrétion active de chlore. Cela est suivi d'une réaction inflammatoire aiguë de la *lamina propria* qui provoque l'activation des mastocytes, d'une surexpression des molécules d'adhésion des leucocytes sur l'endothélium vasculaire, de la libération de substance P, d'icosanoïdes et de chimiokines. Le résultat final est l'infiltration de la paroi intestinale par des neutrophiles et la présence de pseudomembranes avec diarrhée sécrétoire et exsudative [32].

Le spectre clinique des infections à *Clostridium difficile* va du portage sain aux colites mortelles ; l'une des hypothèses est que l'immunité à médiation humorale (générale et locale à IgAs) en soit le principal déterminant. Des travaux expérimentaux chez l'animal ont montré qu'une immunisation passive et active contre la toxine A était efficace [33]. Chez l'homme, on peut observer une augmentation des anticorps anti-*Clostridium difficile* après une infection aiguë. En revanche, les taux d'anticorps sont bas au cours des infections récidivantes, aussi bien chez l'enfant [34] que chez l'adulte [35]. Plus récemment, une étude prospective a analysé les caractéristiques de l'infection à *Clostridium difficile* chez les patients hospitalisés recevant des antibiotiques [36]. Sur une population de deux cent soixante-et-onze malades, trente-sept (14 %) étaient colonisés par *Clostridium difficile* au moment de l'admission, dont dix-huit étaient porteurs asymptomatiques. Parmi les quarante-sept malades (17 %) contaminés durant l'hospitalisation, dix-neuf restaient asymptomatiques. Les auteurs notaient une association entre l'augmentation des taux d'IgG dirigés contre la toxine A et le portage asymptomatique de *Clostridium difficile*. La même équipe a également démontré que, lors d'un épisode initial de diarrhée associée à *Clostridium difficile*, la détection d'anticorps sériques dirigés contre la toxine A était associée à un moindre risque de récurrence [37].

Présentation clinique

La colite pseudomembraneuse se manifeste, dans 95 % des cas, par une diarrhée sévère du fait de ses caractéristiques propres et/ou de signes généraux associés. La diarrhée est en générale abondante, faite de quatre à dix selles par jour, liquides, crémeuses ou verdâtres ; des épreintes sont notées dans 70 % des cas et une fièvre supérieure à 38,8 °C dans 26 % des cas. Les hémocultures sont toujours négatives. Des signes de déshydratation sont observés dans 30 % des cas et un amaigrissement supérieur à 10 % du poids corporel dans 23 % des cas. Les rectorragies sont rares (< 5 %) et doivent faire rechercher une cause associée [38]. Sur le plan biologique, on peut observer une hyperleucocytose et une entéropathie exsudative, souvent responsable d'une hypocholestérolémie et/ou d'une hypoalbuminémie [39].

Le diagnostic est facilité par la notion d'une antibiothérapie en cours ou récente, retrouvée dans 95 % des cas. Le délai moyen d'apparition des signes par rapport au début de l'antibiothérapie est de sept jours, mais les signes peuvent débuter plusieurs semaines après l'arrêt de l'antibiothérapie.

Il faut connaître les tableaux révélateurs trompeurs, en l'absence de diarrhée, à type d'abdomen chirurgical, de mégacôlon toxique ou d'iléus paralytique, notamment post-opératoire. Une ascite ou un épanchement pleural peuvent également être observés. Des localisations rares telles qu'une atteinte de l'intestin grêle, un abcès intra-abdominal, voire une arthrite, sont possibles. Les signes généraux sont généralement sévères. Le diagnostic doit être évoqué quand il existe la notion d'une antibiothérapie récente [38].

Moyens du diagnostic

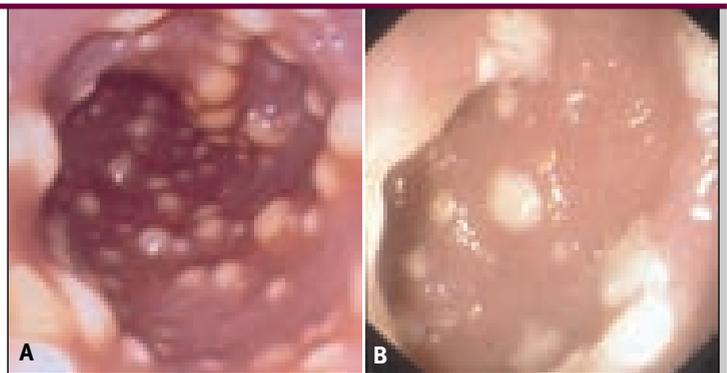
Endoscopie et biopsies

Le diagnostic est facile en endoscopie à la phase d'état (stade II). Les lésions muqueuses peuvent être visualisées dès l'examen du rectum dans 70 % des cas. Autrement, il est nécessaire d'avoir recours à une rectosigmoïdoscopie souple, voire à une coloscopie. L'aspect endoscopique est pathognomonique du diagnostic lorsqu'il montre des plaques blanches jaunâtres adhérentes de 2 à 20 mm de diamètre sur une muqueuse érythémateuse (Figure 4).

Figure 4.

A : aspect endoscopique caractéristique d'une colite pseudomembraneuse associée à *Clostridium difficile* (cliché Y. Bouhnik, Hôpital Lariboisière, Paris).

B : aspect rectoscopique de fausses membranes dans une colite pseudomembraneuse (cliché A. Bitoun, Hôpital Lariboisière, Paris. *Traité de Gastro-entérologie*, 2000, J.C. Rambaud, ed. Médecine-Sciences Flammarion)



Les biopsies montrent une nécrose superficielle de la muqueuse associée à un exsudat fibrino-leucocytaire, à des débris tissulaires et à du mucus (Figure 5). Les cryptes sont distendues par un mucus abondant et il existe un infiltrat inflammatoire de la *lamina propria* par les polynucléaires. Cette colite est spécifique d'une infection à *Clostridium difficile* [1, 9-11].



Figure 5.

Biopsie colique : aspect caractéristique d'une colite pseudomembraneuse : la muqueuse est enduite d'un exsudat abondant, mêlé à du mucus en regard de cryptes dilatées, remplies elles aussi de mucus (cliché A. Lavergne-Slove, Anatomie pathologique, Hôpital Lariboisière, Paris)

Certaines formes sont de diagnostic plus difficile, notamment au stade I où les fausses membranes sont absentes à l'endoscopie, qui peut montrer des altérations muqueuses non spécifiques ou être normale [40]. Les biopsies sont alors particulièrement importantes. L'anomalie caractéristique est la lésion apicale dénommée « *summit lesion* », constituée par une nécrose focale de l'épithélium superficiel associée à un exsudat fibrino-leucocytaire discret. Sous cette lésion, la *lamina propria* peut contenir de la fibrine et quelques polynucléaires, mais les cryptes sont normales.

À l'opposé, dans les formes très sévères, dites de stade III, le diagnostic différentiel avec une colite ischémique, infectieuse ou inflammatoire, peut être très difficile. Les ulcérations macroscopiques sont dues à la destruction complète de la muqueuse et de la musculaire muqueuse, et sont recouvertes d'un exsudat fibrino-leucocytaire banal, dépourvu de mucus. Il faut noter que le diagnostic endoscopique n'est jamais porté à ce stade. Les biopsies sont utiles afin de rechercher les lésions associées de stade II et d'essayer d'éliminer les autres causes de colite ulcérée [40].

Le lavement opaque, obsolète, peut montrer un aspect non spécifique en empreintes de pouce, témoignant de l'épaississement de la paroi colique. Le scanner, utile dans les formes postopératoires, montre cet épaississement dans 61 % des cas et, plus rarement, un aspect considéré comme plus spécifique d'épaississement des haustrations dit en accordéon [38].

Examens bactériologiques

La présence isolée de *Clostridium difficile* à la coproculture a peu de valeur. C'est la détection de la ou des toxine(s) qui permet le diagnostic.

La recherche de la cytotoxine B sur cultures cellulaires est la méthode de référence pour le diagnostic. Elle est la plus sensible [41, 42], permettant de détecter des quantités de 10 pg de toxine B. Cependant, la majorité des laboratoires n'ont pas de systèmes de cultures tissulaires, et les résultats obtenus ne sont pas disponibles avant 24 à 48 heures. Des alternatives utilisant des techniques ELISA sont maintenant proposées par la majorité des laboratoires [1, 9-11, 34, 37, 41, 43, 44] et ont une bonne spécificité mais le seuil de positivité est de l'ordre de 100 à 1 000 pg de toxine A ou B : des faux négatifs sont observés dans 10 % à 20 % des cas. Certains kits commerciaux détectent les toxines A ou B [45]. Ceux qui détectent les deux toxines doivent être préférés, car 1 % à 2 % des cas impliquent des souches bactériennes qui ne produisent que la toxine B [46]. Les résultats sont généralement disponibles en moins de 24 heures.

Il n'est pas utile de tester plus d'un spécimen de selles pour les toxines de *Clostridium difficile* ; la répétition des recherches par techniques ELISA sur deux ou trois spécimens augmente la rentabilité diagnostique de 5 % à 10 % [47] mais également le prix, chaque examen coûtant approximativement 40 €.

Traitement de l'infection à *Clostridium difficile*

Un traitement est indiqué en présence des toxines de *Clostridium difficile* lorsque s'associe une des conditions suivantes :

- une colite – fièvre, hyperleucocytose et aspect caractéristique en endoscopie (suffisant pour traiter avant même le résultat de la recherche de toxines et de la culture), ou en tomодensitométrie ;
- une diarrhée sévère même sans colite ;
- une diarrhée simple persistante malgré l'arrêt de l'agent incriminé ;
- la nécessité de poursuivre le traitement antibiotique de l'infection initiale.

Différentes sociétés scientifiques ont établi des recommandations pour le diagnostic et le traitement des infections à *Clostridium difficile* [48]. Toutes proposent le métronidazole comme traitement de choix, à la dose de 500 mg trois fois par jour ou 250 mg quatre fois par jour. L'antibiotique de deuxième ligne est la vancomycine orale à la dose de 125 mg quatre fois par jour. Le métronidazole *per os* et la vancomycine ont une efficacité supérieure à 90 % [49, 50]. La durée habituelle du traitement est de dix jours. Il n'y a pas de résistance connue de *Clostridium difficile* au métronidazole ou à la vancomycine. Idéalement, étant donné que *Clostridium difficile* siège dans la lumière colique, le traitement antibiotique doit être administrés *per os*. Si un traitement intraveineux est nécessaire, le métronidazole (et pas la vancomycine) est efficace, car il atteint une bonne concentration dans la lumière colique [11]

Le traitement entraîne habituellement une disparition de la fièvre en 24 heures, et de la diarrhée en quatre à cinq jours [11]. Le métronidazole doit être proposé en première intention car il est moins coûteux que la vancomycine et n'a pas le risque potentiel de sélection d'entérocoques résistants, source d'infections nosocomiales. Les indications du traitement par vancomycine *per os* sont la grossesse, la lactation, une intolérance au

métronidazole ou la non réponse clinique au métronidazole après trois à cinq jours de traitement.

En l'absence de réponse rapide au traitement par vancomycine ou métronidazole, il faut évaluer l'observance du traitement, rechercher un autre diagnostic parfois associé (maladie inflammatoire intestinale chronique) ou une complication du type mégacôlon toxique ou ileus [48]. Dans ce dernier cas, l'administration de l'antibiotique directement dans la lumière colique en utilisant de fortes doses de vancomycine orale (500 mg x 4 par jour) ou en instillant directement la vancomycine ou le métronidazole par voie naso-entérale ou par lavement a été proposée. Dans certains cas, le traitement a été administré *in situ* dans le côlon par le canal opérateur d'un endoscope après exsufflation. Le métronidazole par voie intraveineuse peut être également efficace [51].

Les ralentisseurs du transit doivent être évités étant donnés qu'ils peuvent favoriser la rétention de la toxine [48]. Dans les formes sévères, notamment en cas de déshydratation importante, des mesures de réanimation s'imposent. En cas de non réponse rapide au traitement d'une forme grave, la colectomie subtotala avec iléostomie temporaire est nécessaire.

Problème des infections récidivantes à *Clostridium difficile*

La principale complication du traitement antibiotique est la rechute, observée dans 20 % à 25 % des cas [9-11, 41, 52, 53]. Elle est suspectée en cas de récurrence des symptômes trois jours à trois semaines après l'arrêt du métronidazole ou de la vancomycine. La survenue d'une rechute traitée comme la première atteinte expose, dans 40 % à 60 % des cas, à une plusieurs rechutes itératives.

Deux mécanismes peuvent expliquer les rechutes d'infection à *Clostridium difficile* :

- la réinfection (exogène), qui peut apparaître après éradication initiale si le sujet reste exposé à un environnement contaminé, les spores de *Clostridium* pouvant persister plusieurs mois dans l'environnement ;
- la récurrence (endogène), due à la persistance de spores de *Clostridium difficile* dans le côlon, les spores résistant aux antibiotiques.

Différents traitements proposés pour prévenir les rechutes de diarrhées associées à *Clostridium difficile* ne manquent pas d'originalité. La première approche consiste à administrer des probiotiques ou des bactéries saprophytes pour restaurer l'équilibre bactérien intracolique :

- administration de *Saccharomyces boulardii* [53, 54] ;
- administration de *Lactobacillus GG* [37, 50, 52, 55-57] ;
- lavements de selles ou plutôt de mélanges bactériens [58-60] d'origine fécale, les premiers étant interdits pour des raisons de risque de transmission d'un agent pathogène.

Dans un essai contre placebo, l'administration de *Saccharomyces boulardii*, pendant quatre semaines, en association initiale aux antibiotiques standards, a montré, sur un effectif important (cent vingt-quatre patients) suivi pendant quatre semaines supplémentaires que :

- lorsqu'il s'agissait du premier épisode de diarrhée associée à *Clostridium difficile* (soixante-quatre patients), *Saccharomyces boulardii* n'apportait pas de bénéfice significatif ;

- lorsqu'il s'agissait d'une récurrence de diarrhée associée à *Clostridium difficile* (soixante malades), *Saccharomyces boulardii* entraînait une diminution significative du risque de nouvelle récurrence (35 % versus 65 %, $p = 0,04$).

Saccharomyces boulardii ne réduisait pas le taux de colonisation par *Clostridium difficile*, mais diminuait la détection de sa toxine B. Cela est en accord avec le concept que les protéases libérées par *Saccharomyces boulardii* inhibent les toxines A et B et leurs récepteurs, mais n'éradiquent pas le germe [53].

Après administration pendant plusieurs jours de *Lactobacillus GG*, Gorbach *et al.* n'ont pas observé de rechutes chez quatre malades sur cinq étudiés avec un suivi minimum de deux mois [56]. Après administration unique de *Lactobacillus GG*, Bennett *et al.* n'ont pas observé de rechutes chez 84 % des trente-deux patients atteints d'une forme récidivante d'infection à *Clostridium difficile* avec un suivi de un à quatre ans [55].

Les tentatives de reconstitution de la flore colique des patients atteints de maladie récidivante due à *Clostridium difficile* par l'administration de lavements de selles [58, 59] ou d'infusions rectales de mélanges de bactéries anaérobies fécales provenant de volontaires sains, ont donné des résultats intéressants dans des cas rebelles à tout autre traitement. L'administration par voie rectale d'une solution comportant des concentrations élevées de plusieurs bactéries anaérobies (*Bacteroides*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*) a permis l'éradication de *Clostridium difficile* chez cinq malades [60]. Cependant, aucun essai contrôlé contre placebo n'a été publié à ce jour et les patients sont généralement réticents à ces formes de traitement. Afin de traiter l'ensemble des lésions (côlon droit), et peut-être de contourner ces réticences, il a été proposé d'administrer la selle directement par le coloscope [61].

Une autre approche originale pour le traitement des infections récidivantes à *Clostridium difficile* est l'immunothérapie passive, par perfusion d'immunoglobulines [31]. Étant donné qu'il s'agit de cas relativement anecdotiques, ces traitements ne doivent être envisagés qu'en cas d'ultime recours. L'immunothérapie active pourrait aussi être une piste prometteuse [62].

Autres mesures préventives

Clostridium difficile est un pathogène nosocomial majeur, et quelques hôpitaux et unités de longs séjours ont rapporté des épidémies plus ou moins prolongées de diarrhées avec ou sans colite causées par cet agent [35, 36, 40, 44, 45, 47, 63]. Le typage des espèces de *Clostridium difficile* a été suggéré comme une méthode pour évaluer les épidémies, mais la majorité des laboratoires ne permettent pas la réalisation de ces tests. La restriction dans l'utilisation des antibiotiques, en particulier à large spectre, a permis de contrôler certaines épidémies [35, 37]. Surtout, l'application stricte des mesures de lutte contre les infections nosocomiales est un élément essentiel, la transmission de spores de *Clostridium difficile* étant à l'origine des contaminations en raison de leur dissémination et de leur persistance prolongée dans l'environnement.

Points clés

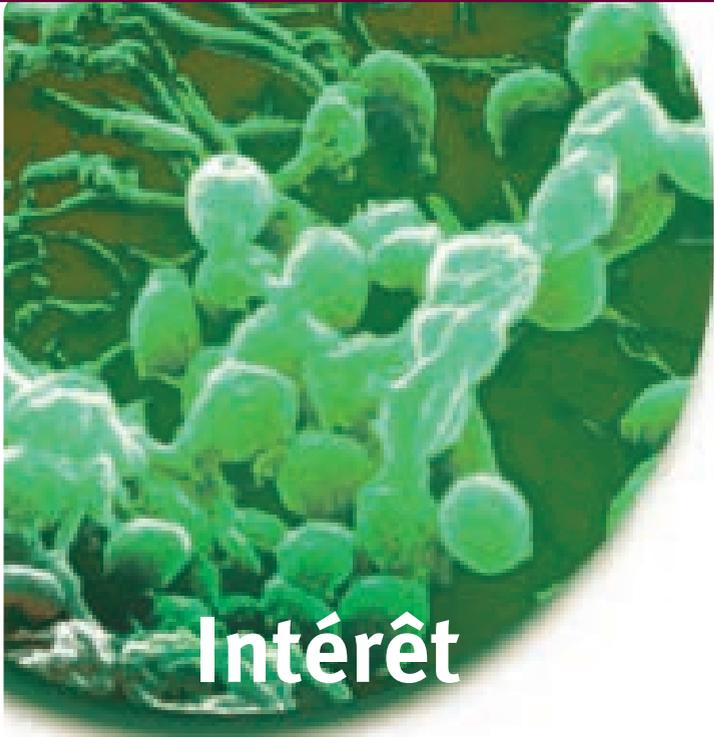
- La diarrhée associée aux antibiotiques complique 5 % à 20 % des traitements, selon le type d'antibiotique et la définition de la diarrhée retenue.
- Les diarrhées dites simples sont les plus fréquentes et les moins sévères cliniquement. En revanche, leur mécanisme est complexe et leur étiologie fait intervenir des causes infectieuses (*Clostridium difficile* surtout), métaboliques (par éradication des bactéries anaérobies de la flore dominante) ou autres (accélération du transit intestinal...). Elles régressent après arrêt de l'agent responsable.
- La colite hémorragique post-antibiotique réalise un tableau stéréotypé caractérisé par l'apparition brutale, chez un malade traité par pénicillines ou synergistines, de crampes abdominales suivies d'une diarrhée sanglante. L'agent responsable semble être *Klebsiella oxytoca* dont l'isolement est au mieux effectué par la mise en culture des biopsies coliques. Dans la grande majorité des cas, l'évolution est rapidement favorable après simple arrêt de l'antibiotique.
- *Clostridium difficile* est responsable de la colite pseudo-membraneuse. Sa recherche est maintenant aisée grâce au développement de tests ELISA permettant de mettre en évidence les toxines A et/ou B. Le traitement de choix est le métronidazole.
- La principale complication du traitement antibiotique des infections à *Clostridium difficile* est la rechute, observée dans 20 % à 25 % des cas et souvent itérative. Parmi les traitements proposés pour prévenir les rechutes itératives, les probiotiques, principalement *Saccharomyces boulardii*, occupent une place de choix.

Références

1. Bartlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 1992 ; 15 : 573-81.
2. Clausen MR, Bonnen H, Tvede M, Mortensen PB. Colonic fermentation to short-chain fatty acids is decreased in antibiotic-associated diarrhea. *Gastroenterology* 1991 ; 101 : 1497-504.
3. Gilbert DN. Aspects of the safety profile of oral antimicrobial agents. *Infect Dis Clin Pract* 1995 ; 4 : Suppl 2 : S103-12.
4. Wistrom J, Norrby SR, Myhre EB, *et al.* Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2,462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. *J Antimicrob Chemother* 2001 ; 47 : 43-50.
5. Beaugerie L, Flahault A, Barbut F, *et al.*, Study Group. Antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* in the community. *Aliment Pharmacol Ther* 2003 ; 17 : 905-12.
6. Turck D, Bernet JP, Marx J, *et al.* Incidence and risk factors of oral antibiotic-associated diarrhea in an outpatient pediatric population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003 ; 37 : 22-6.
7. McFarland LV. Facteurs de risque de la diarrhée associée aux antibiotiques. Une revue de la littérature. *Ann Med Interne* 1998 ; 149 : 261-6.
8. Caron F, Lerebours E. Effets secondaires gastrointestinaux des antibiotiques. *Gastroenterol Clin Biol* 1991 ; 15(8-9) : 604-12.
9. Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT. *Clostridium difficile* colitis. *N Engl J Med* 1994 ; 330 : 257-62.
10. Gerding DN. Disease associated with *Clostridium difficile* infection. *Ann Intern Med* 1989 ; 110 : 255-7.
11. Fekety R, Shah AB. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* colitis. *JAMA* 1993 ; 269 : 71-5.
12. Sparks SG, Carman RJ, Sarker MR, McClane BA. Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. *J Clin Microbiol* 2001 ; 39 : 883-8.
13. Sun M. In search of Salmonella's smoking gun. *Science* 1984 ; 226 : 30-2.
14. Forbes D, Ee L, Camer-Pesci P, Ward PB. Faecal candida and diarrhoea. *Arch Dis Child* 2001 ; 84 : 328-31.
15. Rao SS, Edwards CA, Austen CJ, Bruce C, Read NW. Impaired colonic fermentation of carbohydrate after ampicillin. *Gastroenterology* 1988 ; 94 : 928-32.
16. Chassany O, Michaux A, Bergmann JF. Drug-induced diarrhoea. *Drug Saf* 2000 ; 22 : 53-72.
17. Hogenauer C, Hammer HF, Krejs GJ, Reisinger EC. Mechanisms and management of antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 1998 ; 27 : 702-10.
18. D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *Br Med J* 2002 ; 324 : 1361-7.
19. Cremonini F, Di Caro S, Nista EC, *et al.* Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther* 2002 ; 16 : 1461-7.
20. Wilhelm MP, Lee DT, Rosenblatt JE. Bacterial interference by anaerobic species isolated from human feces. *Eur J Clin Microbiol* 1987 ; 6 : 266-70.
21. Minami J, Katayama S, Matsushita O, *et al.* Enterotoxic activity of *K. oxytoca* cytotoxin in rabbit intestinal loops. *Infect Immun* 1994 62 : 172-7.
22. Sakurai Y, Tsuchiya H, Ikegami F, *et al.* Acute right-sided hemorrhagic colitis associated with oral administration of ampicillin. *Dig Dis Sci* 1979 ; 24 : 910-5.
23. Benoit R, Danquechin Dorval E, Loulergue J, *et al.* Diarrhée post-antibiotique : rôle de *Klebsiella oxytoca*. *Gastroenterol Clin Biol* 1992 ; 16 : 860-4.
24. Koga H, Aoyagi K, Yoshimura R, Kimura Y, Iida M, Fujishima M. Can quinolones cause hemorrhagic colitis of late onset? Report of three cases. *Dis Colon Rectum* 1999 ; 42 : 1502-4.
25. Bellaïche G, Le Pennec MP, Choudat L, *et al.* Intérêt de la rectosigmoidoscopie avec cultures bactériologiques de biopsies coliques dans le diagnostic des colites hémorragiques à *Klebsiella oxytoca*. *Gastroenterol Clin Biol* 1997 ; 21 : 764-7.
26. Beaugerie L, Metz M, Barbut F, *et al.*, and the Infectious Colitis Study group. *Klebsiella oxytoca* as an agent of antibiotic-associated haemorrhagic colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* : in press.

27. Viscidi R, Willey S, Bartlett JG. Isolation rates and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from various patient populations. *Gastroenterology* 1981 ; 81 : 5-9.
28. Karlstrom O, Fryklund B, Tullus K, Burman LG. A prospective nationwide study of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Sweden. *Clin Infect Dis* 1998 ; 26 : 141-5.
29. Gerding DN, Johnson S, Peterson LR, Mulligan ME, Silva J Jr. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995 ; 16 : 459-77.
30. Johnson S, Samore MH, Farrow KA, et al. Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. *N Engl J Med* 1999 ; 341 : 1645-51.
31. Climo MW, Israel DS, Wong ES, Williams D, Coudron P, Markowitz SM. Hospital-wide restriction of clindamycin: effect on the incidence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and cost. *Ann Intern Med* 1998 ; 128 : 989-95.
32. Lamont JT. Recent advances in the structures and function of *Clostridium difficile* toxins. In : Rambaud JC, Lamont JT, eds. *Updates on Clostridium difficile*. Paris : Springer-Verlag, 1996 : 73-82.
33. Kelly CP. Immune response to *Clostridium difficile* infection. *Eur J Gastroenterol* 1996 ; 8 : 1048-53
34. Leung DY, Kelly CP, Boguniewicz M, Pothoulakis C, LaMont JT, Flores A. Treatment with intravenously administered gamma globulin of chronic relapsing colitis induced by *Clostridium difficile* toxin. *J Pediatr* 1991 ; 118 : 633-7.
35. Warny M, Fatimi A, Bostwick EF, et al. Bovine immunoglobulin concentrate-*Clostridium difficile* retains *C. difficile* toxin neutralising activity after passage through the human stomach and small intestine. *Gut* 1999 ; 44 : 212-7.
36. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med* 2000 ; 342 : 390-7.
37. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet* 2001 ; 357 : 189-93.
38. Marteau P, Rambaud JC. Colites pseudomembraneuses et autres manifestations de l'infection à *Clostridium difficile*. In : Rambaud JC, ed. *Traité de gastro-entérologie*. Paris, Flammarion, 2000 : 687-93.
39. Bulusu M, Narayan S, Shetler K, Triadafilopoulos G. Leukocytosis as a harbinger and surrogate marker of *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients with diarrhea. *Am J Gastroenterol* 2000 ; 95 : 3137-41.
40. Price AB. Pseudomembranous colitis. In : Wright R, ed. *Recent advances in gastroenterology*. London : WB Saunders : 15-172.
41. Mylonakis E, Ryan ET, Calderwood SB. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a review. *Arch Intern Med* 2000 ; 161 : 525-5-33.
42. Laughon BE, Viscidi RP, Gdovin SL, Yolken RH, Bartlett JG. Enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in fecal specimens. *J Infect Dis* 1984 ; 149 : 781-8.
43. Barbut F, Kajzer C, Planas N, Petit JC. Comparison of three enzyme immunoassays, a cytotoxicity assay, and toxigenic culture for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 1993 ; 31 : 963-7.
44. Merz CS, Kramer C, Forman M, et al. Comparison of four commercially available rapid enzyme immunoassays with cytotoxin assay for detection of *Clostridium difficile* toxin(s) from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1994 ; 32 : 1142-7.
45. Lozniewski A, Rabaud C, Dotto E, Weber M, Mory F. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis: usefulness of premier cytoclone A+B enzyme immunoassay for combined detection of stool toxins and toxigenic *C. difficile* strains. *J Clin Microbiol* 2001 ; 39 : 1996-8.
46. Johnson S, Kent SA, O'Leary KJ, et al. Fatal pseudomembranous colitis associated with a variant *Clostridium difficile* strain not detected by toxin A immunoassay. *Ann Intern Med* 2001 ; 135 : 434-8.
47. Manabe YC, Vinetz JM, Moore RD, Merz C, Charache P, Bartlett JG. *Clostridium difficile* colitis: an efficient clinical approach to diagnosis. *Ann Intern Med* 1995 ; 123 : 835-40.
48. Guerrant RL. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clin Infect Dis* 2001 ; 32 : 331-51.

49. Teasley DG, Gerding DN, Olson MM, *et al.* Prospective randomised trial of metronidazole *versus* vancomycin for *Clostridium difficile*-associated diarrhoea and colitis. *Lancet* 1983 ; 2 : 1043-6.
50. Wensch C, Parschalk B, Hasenhundl M, Hirschl AM, Graninger W. Comparison of vancomycin, teicoplanin, metronidazole, and fusidic acid for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 1996 ; 22 : 813-8. [Erratum, *Clin Infect Dis* 1996 ; 23 : 423.]
51. Friedenberg F, Fernandez A, Kaul V, Niami P, Levine GM. Intravenous metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile* colitis. *Dis Colon Rectum* 2001 ; 44 : 1176-80.
52. Bartlett JG. Treatment of *Clostridium difficile* colitis. *Gastroenterology* 1985 ; 89 : 1192-5.
53. McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, *et al.* A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *JAMA* 1994 ; 271 : 1913-8.
54. Surawicz CM, McFarland LV, Elmer G, Chinn J. Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with vancomycin and *Saccharomyces boulardii*. *Am J Gastroenterol* 1989 ; 84 : 1285-7.
55. Gorbach SL, Chang TW, Goldin B. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus GG*. *Lancet* 1987 ; 2 : 1519.
56. Bennett RG, Gorbach SL, Goldin BR. Treatment of relapsing *Clostridium difficile* diarrhea with *Lactobacillus GG*. *Nutrition Today* 1996 ; 31 (suppl) : 35S-8S.
57. Pochapin M. The effect of probiotics on *Clostridium difficile* diarrhea. *Am J Gastroenterol* 2000 ; 95 : S11-3.
58. Bowden TA Jr, Mansberger AR Jr, Lykins LE. Pseudomembraneous enterocolitis - : mechanism for restoring floral homeostasis. *Am Surg* 1981 ; 47 : 178-83.
59. Schwan A, Sjolín S, Trottestam U, Aronsson B. Relapsing *Clostridium difficile* enterocolitis cured by rectal infusion of normal faeces. *Scand J Infect Dis* 1984 ; 16 : 211-5.
60. Tvede M, Rask-Madsen J. Bacteriotherapy for chronic relapsing *Clostridium difficile* diarrhoea in six patients. *Lancet* 1989 ; 1 (8648) : 1156-60.
61. Persky SE, Brandt LJ. Treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea by administration of donated stool directly through a colonoscope. *Am J Gastroenterol* 2000 ; 95 : 3283-5.
62. Kyne L, Kelly C. Prospects for a vaccine for *Clostridium difficile*. *BioDrugs* 1998 ; 10 : 173-81.
63. Fekety R, Kim KH, Brown D, Batts DH, Cudmore M, Silva J Jr. Epidemiology of antibiotic-associated colitis: isolation of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *Am J Med* 1981 ; 70 : 906-8.



Intérêt

**de l'administration
de micro-organismes
vivants**



Probiotiques et affections digestives

Les probiotiques sont des micro-organismes (bactéries ou levures) qui, ingérés vivants en quantités suffisantes, sont capables d'exercer des effets bénéfiques sur l'hôte. Un probiotique doit remplir les conditions suivantes :

- ne pas avoir de caractère pathogène ;
- apporter un nombre important d'organismes viables ;
- résister aux sécrétions gastriques, biliaires et pancréatiques, pour rester vivant au niveau de l'intestin grêle et du côlon ;
- exercer un effet bénéfique sur l'hôte [1].

Les probiotiques exercent des effets directs au cours de leur transit gastro-intestinal et peuvent significativement modifier le métabolisme de la microflore et ses interactions avec la muqueuse [2]. La littérature qui concerne les probiotiques est très importante, avec plus de neuf cents publications dont environ 90 % remontent à moins de dix ans. Ils ont démontré, chez l'homme, des effets bénéfiques dans de nombreuses affections digestives et extradiigestives. Leur efficacité sur le tube digestif a été démontrée, notamment pour prévenir les diarrhées associées aux antibiotiques, limiter la fréquence des récurrences des infections à *Clostridium difficile*, exercer une action préventive et curative dans les diarrhées infectieuses aiguës, inhiber l'adhérence d'*Helicobacter pylori* à la paroi gastrique, ou encore limiter l'activité de maladies inflammatoires du tube digestif. Dans ce chapitre, nous allons passer en revue les principales affections digestives et extradiigestives au cours desquelles les probiotiques ont démontré une efficacité dans des études contrôlées.

Pharmacologie, effets biologiques et mécanismes d'action

L'administration de probiotiques constitue un moyen de véhiculer des principes actifs (enzymes, peptides immunomodulateurs, substances antibactériennes) jusqu'à un site d'action dans le tractus digestif et d'interférer avec la flore endogène [3]. L'étude pharmacologique d'un probiotique doit conduire à identifier les constituants actifs des micro-organismes en transit, à apprécier leur pharmacocinétique jusqu'à leur cible et à démontrer des effets spécifiques bénéfiques. Comme la nature exacte des principes actifs est souvent imprécise, c'est la capacité du micro-organisme

probiotique à survivre dans le tube digestif et sa pharmacologie qui sont les mieux documentés. Les concentrations de probiotiques véhiculés et viables sont variables en fonction de la quantité et de la nature des différentes souches ingérées [3]. Certaines sont rapidement détruites dès leur arrivée dans l'estomac alors que d'autres (*Saccharomyces boulardii*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*) peuvent parvenir dans le côlon à de fortes concentrations. Quand ils atteignent leur site d'action, les probiotiques exercent des effets directs luminaux et pariétaux (sur les entérocytes et les cellules immunitaires du *Gut associated lymphoid tissue* – GALT) et des effets indirects liés aux modifications de l'écosystème colique (Figure 1).

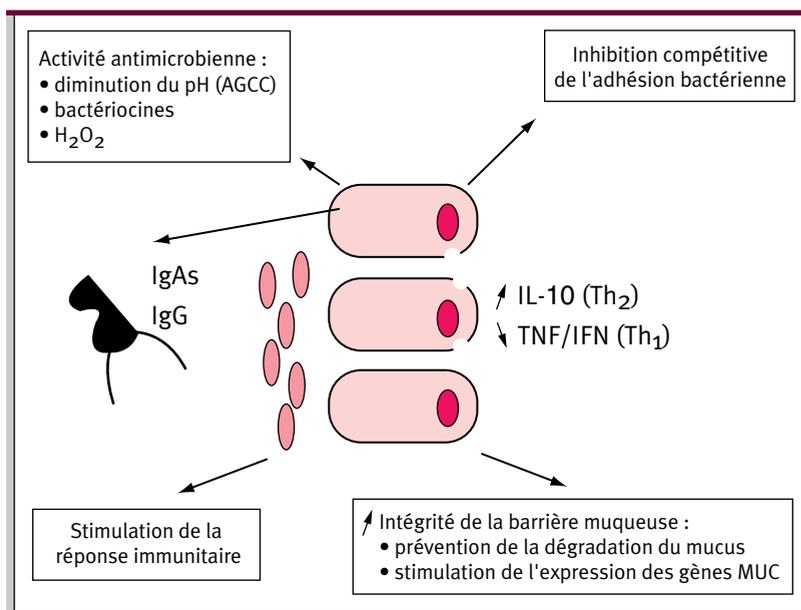


Figure 1. Effets moléculaires et mécanismes d'action des probiotiques au niveau de l'épithélium intestinal ou colique. AGCC : acides gras à chaîne courte H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène INF : interféron TNF : facteur nécrosant des tumeurs

Il existe un nombre important de publications sur les effets moléculaires des micro-organismes probiotiques ; cependant, les mécanismes d'action de ces agents sont encore largement en évaluation. Les effets protecteurs de certaines souches contre les infections intestinales s'exercent par des effets immunomodulateurs, par l'inhibition de la croissance de bactéries intracoliques, la synthèse de substances antibactériennes et la réduction du pH intracolique [4]. Les effets les mieux documentés concernent l'inhibition de l'adhésion de bactéries pathogènes, la modulation des fonctions macrophagiques et l'élimination de toxines (pour revue générale voir [5]). L'inhibition de l'adhérence des bactéries pathogènes s'exerce par une compétition pour les mêmes récepteurs, une expression accrue des ARN messagers des mucines (MUC2 et MUC3), la production de bactériocines, voire des modifications de l'environnement comme la production de radicaux libres, d'acides organiques ou de peroxyde d'hydrogène. La stimulation des fonctions des macrophages par les probiotiques entraîne une augmentation des phénomènes de phagocytose de particules inertes ou, dans certains cas,

d'organismes vivants comme cela a pu être démontré pour les salmonelles [6]. Enfin, plusieurs études ont confirmé que certains probiotiques pouvaient inhiber et parfois éliminer des toxines (toxine A de *Clostridium difficile* pour *Saccharomyces boulardii*, aflatoxine B1 pour les bifidobactéries) [7, 8].

Diarrhée associée aux antibiotiques

La diarrhée est un effet secondaire des antibiotiques qui conduit parfois les malades à interrompre leur traitement. Une modification de la consistance des selles ou une diarrhée vraie compliquent 5 % à 30 % des traitements antibiotiques au cours du traitement ou après son arrêt. La fréquence de la diarrhée est variable suivant les antibiotiques considérés. Une diarrhée est observée chez 5 % à 10 % des malades sous ampicilline, chez 10 % à 20 % des patients qui reçoivent l'association amoxicilline et acide clavulanique, 15 % à 20 % des sujets sous cefixime et, enfin, chez 5 % des malades traités par d'autres antibiotiques comme les fluoroquinolones, la clarithromycine, l'érythromycine et les tétracyclines [9]. La pathogénie des diarrhées sous antibiotiques est complexe et repose sur des perturbations quantitatives et qualitatives de la microflore. Deux mécanismes à l'origine de la diarrhée sous antibiotiques ont été clairement documentés, la prolifération de germes pathogènes et une diminution de l'activité fermentaire de la microflore. Cette dernière peut induire une réduction de la production d'acides gras à chaîne courte et une augmentation de la quantité de glucides non absorbés susceptibles d'induire, d'une part, une diarrhée osmotique [10] et, d'autre part, une baisse de l'absorption du sodium normalement stimulée par les acides gras à chaînes courtes. Clausen *et al.* [11] ont montré que des malades qui présentaient une diarrhée associée aux antibiotiques (DAA) avaient des concentrations fécales d'acides gras à chaîne courte significativement plus faibles que celles de sujets témoins non diarrhéiques. Parfois, l'antibiothérapie favorise une infection intestinale, essentiellement par *Clostridium difficile*, plus rarement par *Klebsiella oxytoca* [12, 13]. L'intérêt de la prescription de probiotiques en prévention de la DAA a été démontré dans de nombreuses études, dont les principales sont présentées dans le **Tableau I**.

Deux méta-analyses récentes ont évalué les effets préventifs des probiotiques sur la diarrhée associée à l'antibiothérapie. D'Souza *et al.* [14] ont retenu neuf essais randomisés contre placebo qui regroupaient plus de mille sujets. Cinq de ces essais concernaient des bactéries probiotiques et quatre *Saccharomyces boulardii*. L'odds ratio en faveur d'une efficacité des probiotiques concernés par rapport au placebo était de 0,37 (IC₉₅ : 0,26 à 0,53 ; p < 0,001) ; une autre méta-analyse, incluant des études ouvertes, aboutit aux mêmes conclusions [15]. Les lactobacilles ont été les premiers probiotiques bactériens à être évalués dans la DAA. Le choix des lactobacilles était orienté par la réduction du nombre des lactobacilles qui est généralement observée chez les sujets traités par ampicilline. Dans un travail récent, Vanderhoof *et al.* [16] concluaient à l'efficacité de l'administration de *Lactobacillus rhamnosus* souche GG (*Lactobacillus* GG) pour prévenir la diarrhée chez deux cent deux enfants sous antibiotiques. Dans ce travail, sept enfants qui recevaient *Lactobacillus* GG développaient une diarrhée contre

vingt-cinq soumis au placebo et la durée moyenne de la diarrhée était réduite de manière significative (4,7 *versus* 5,8 jours). En revanche, Thomas *et al.* [17] n'ont pas mis en évidence de supériorité de *Lactobacillus* GG par rapport au placebo chez trois cent deux malades traités par *Lactobacillus* GG pendant quatorze jours. Dans ce travail, le taux de diarrhée était de 29 % sous *Lactobacillus* GG contre 29,9 % sous placebo. Une autre étude a montré que *Lactobacillus acidophilus* était efficace en prévention de la diarrhée induite par la néomycine alors que *Lactobacillus bulgaricus* n'avait pas d'effet [18]. Gotz *et al.* [19] ont évalué une préparation contenant *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* contre un placebo chez des malades soumis à des traitements antibiotiques divers. Dans cette étude, la fréquence de survenue d'une diarrhée était identique entre les deux groupes. En revanche, en ne retenant que les diarrhées liées à l'ampicilline, aucun patient sous lactobacilles ne développait de diarrhée contre 14 % sous placebo. Enfin, deux études menées chez des volontaires sains ont suggéré que *Bifidobacterium longum* et *Lactobacillus* GG pouvaient diminuer les effets secondaires attribués à l'érythromycine, en particulier l'accélération du transit intestinal [20, 21].

Probiotiques étudiés	Population patients	N	Antibiotiques	Durée de l'étude thérapeutique	Effet (% diarrhée)	p	Réf.
Saccharomyces boulardii	Malades hospitalisés	180	Divers	Variable	9,5 % vs 21,8 % placebo	= 0,04	[24]
Saccharomyces boulardii	Malades hospitalisés	193	β-lactamines	Antibiothérapie + 1 mois	7,2 % vs 14,6 % placebo	= 0,03	[25]
Saccharomyces boulardii	Malades ambulatoires	388	β-lactamines cyclines	Variable	4,5 % vs 17,5 % placebo	< 0,01	[26]
Lactobacillus GG	Enfants hospitalisés	202	Divers	Variable	2,0 % vs 26 % placebo	< 0,02	[16]
Lactobacillus GG	Malades hospitalisés	302	Divers	Variable	29,3 % vs 29,9 % placebo	NS	[17]

Tableau 1.
Principaux essais randomisés des probiotiques dans la prévention de la diarrhée due aux antibiotiques

Parmi les probiotiques évalués dans la prévention des DAA, *Saccharomyces boulardii* a été le mieux étudié et a démontré une efficacité claire en réduisant de moitié la survenue de la diarrhée. *Saccharomyces boulardii* est une souche de levure non pathogène génétiquement résistante aux antibiotiques antibactériens, alors que les probiotiques bactériens sont, en règle générale, très sensibles à ces mêmes antibiotiques, ce qui rend leur viabilité incertaine et leurs mécanismes d'action imprécis [22, 23]. Surawicz *et al.* [24] ont évalué l'efficacité de *Saccharomyces boulardii* administré au cours d'une antibiothérapie et poursuivi deux semaines après son arrêt, chez cent quatre-vingt malades hospitalisés soumis à des traitements antibiotiques

de classes différentes. L'incidence de la diarrhée, chez les malades qui recevaient *Saccharomyces boulardii*, était réduite de manière significative (9,5 % versus 21,8 % sous placebo). Les mêmes auteurs ont effectué une étude similaire en limitant les antibiotiques aux β -lactamines et en prolongeant le suivi sept semaines après arrêt des antibiotiques [25]. *Saccharomyces boulardii* ou un placebo étaient administrés chez cent quatre-vingt-treize malades dès le début de l'antibiothérapie à la posologie de 1 g par jour et poursuivi trois jours après son arrêt. Dans ce travail, *Saccharomyces boulardii* exerçait un effet préventif significatif sur la survenue d'une diarrhée (7,2 % versus 14,6 %, $p = 0,02$). Ces résultats sont confirmés par ceux d'Adam *et al.* [26] dans une étude menée chez trois cent quatre-vingt-huit malades ambulatoires qui recevaient des tétracyclines ou des β -lactamines et *Saccharomyces boulardii* à la dose de 200 mg/jour. Une autre étude, réalisée à la même posologie chez des malades hospitalisés, n'a pas donné de résultat significatif, mais sur un effectif très réduit [27] et avec une durée d'observation limitée à celle de l'antibiothérapie.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'une prévention de la DAA est possible grâce à certains probiotiques. Il est pertinent de la proposer chez des malades qui ont un risque accru de diarrhée lors d'une prise d'antibiotiques : dans une récente étude épidémiologique en médecine ambulatoire [28], un nombre élevé de selles, la durée de l'antibiothérapie et le type d'antibiotique (amoxicilline/clavulanate) ont été des facteurs de risque significatifs de survenue d'une DAA.

Cas particulier de *Clostridium difficile*

Il s'agit d'un bacille non-invasif responsable de la majorité des colites pseudomembraneuses, mais aussi de colites aiguës non pseudomembraneuses. *Clostridium difficile* est un modèle de prolifération opportuniste d'un pathogène digestif après perte de l'effet barrière de la microflore lié à une antibiothérapie. *Clostridium difficile* serait impliqué dans 10 % à 20 % des cas de diarrhée simple associée aux antibiotiques en milieu hospitalier et dans la quasi-totalité des cas de colite pseudomembraneuse. Les facteurs de risque les mieux documentés de colites à *Clostridium difficile* sont, outre la consommation d'antibiotiques, un âge avancé et l'hospitalisation en institution. Les autres facteurs de risque de colite à *Clostridium difficile* font intervenir un déficit immunitaire, une stase fécale et donc des perturbations de l'écosystème colique. Après la prise d'antibiotiques, *Clostridium difficile* est susceptible de coloniser l'intestin et de sécréter deux exotoxines A et B qui sont les médiateurs de la diarrhée. La particularité de la bactérie réside dans la capacité à former des spores résistantes qui expliquent la transmission nosocomiale et, en partie, la fréquence des rechutes. Tous les antibiotiques sont potentiellement responsables d'une diarrhée associée à *Clostridium difficile*, mais les pénicillines à large spectre et les céphalosporines sont le plus souvent en cause. Le traitement de référence de la colite à *Clostridium difficile* consiste en l'administration orale de métronidazole (500 mg/3 fois par jour ou 250 mg/4 fois par jour), ou de vancomycine (125 mg/4 fois par jour) avec un taux de réponse de 90 % à 97 % [29]. Une récurrence est observée dans 20 % à 25 % des cas, en moyenne six jours après l'arrêt du traitement

initial. En cas de récurrence, la mise en route du même traitement est le plus souvent efficace, mais 40 % des malades feront une ou plusieurs nouvelles rechutes, 3 % à 5 % des malades pouvant présenter plus de six rechutes. Le mécanisme de ces rechutes est mal compris. Il est possible que les spores de *Clostridium difficile* puissent survivre dans l'intestin après arrêt de l'antibiothérapie. Plusieurs études ouvertes ont suggéré que *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus* GG et *Lactobacillus plantarum* LP299v pouvaient être bénéfiques dans les diarrhées associées à *Clostridium difficile* [30-32]. Dans un essai randomisé contre placebo, Mc Farland *et al.* [33] ont évalué l'effet de *Saccharomyces boulardii* (1 g par jour pendant 28 jours), ou d'un placebo, en association avec le métronidazole ou la vancomycine chez cent vingt-quatre malades. Pour soixante-quatre malades, il s'agissait du premier épisode d'infection par *Clostridium difficile* et pour soixante d'entre eux d'une récurrence. Dans cette étude, les auteurs ont observé, après administration de *Saccharomyces boulardii*, une réduction d'environ 50 % du risque de rechute chez les malades qui avaient déjà présenté une première récurrence d'infection par *Clostridium difficile*. *Saccharomyces boulardii* pourrait exercer son action préventive par une protéolyse et une inhibition de la fixation de la toxine A de *Clostridium difficile* sur son récepteur [7, 34].

Diarrhées infectieuses

La diarrhée est un problème fréquent pour les voyageurs qui se rendent d'une zone à niveau d'hygiène élevé vers un pays à plus bas niveau d'hygiène. L'incidence de la diarrhée du voyageur varie de 20 % à 50 % en fonction de l'origine, de la destination mais aussi du mode de transport. Le plus souvent, il s'agit d'un événement bénin et de courte durée (un à cinq jours). Cependant, 20 % de ces troubles digestifs conduisent à un alitement de quelques jours et plus rarement à une hospitalisation. Plusieurs agents infectieux peuvent être en cause, mais *Escherichia coli* entérotoxigène est le plus fréquemment observé après absorption d'aliments ou d'eau contaminés. La prévention repose essentiellement sur des règles hygiéno-diététiques et sur l'amélioration des structures sanitaires des pays en développement. Un traitement préventif peu onéreux et sans effet secondaire serait le bienvenu.

Les principales études qui concernent l'administration de probiotiques en prévention des diarrhées du voyageur sont résumées dans le **Tableau II**.

Black *et al.* [35] ont testé l'efficacité d'un mélange de probiotiques (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*) contre un placebo chez quatre-vingt-quatorze touristes qui voyageaient deux semaines en Égypte. Dans le groupe qui recevait les probiotiques, l'incidence de la diarrhée était réduite de manière significative (43 % *versus* 71 %, $p = 0,02$). D'autres auteurs ont montré que *Lactobacillus* GG [36, 37] et *Saccharomyces boulardii* [38] conféraient une protection contre la diarrhée seulement pour certaines destinations. Des agents infectieux différents pourraient expliquer la variabilité des résultats en fonction de la destination. Dans le travail de Kollaritsch *et al.* conduit chez des voyageurs qui recevaient *Saccharomyces boulardii* ou un placebo, la protection contre la survenue de la diarrhée était

modérée mais statistiquement significative et dépendante de la dose [38]. En revanche, Pozo-Olano [39] et Katelaris [40] n'ont pas observé d'effet préventif avec diverses préparations de lactobacilles.

Tableau II. Principaux essais randomisés des probiotiques dans la prévention de la diarrhée du voyageur	Probiotiques	Nbre de patients	Effet thérapeutique	P	Réf.
	Lactobacilli Bifidobacteria Streptococci	94	43 % vs 71 %	= 0,02	[35]
	Lactobacillus GG	756	41 % vs 46,5 %	NS	[36]
	Lactobacillus GG	245	3,9 %/jour à risque vs 7,4 %	0,05	[37]
	Saccharomyces boulardii	1 016	28,7 % vs 39,1 %	= 0,005	[38]
	Lactobacillus acidophilus Lactobacillus bulgaricus	50	35 % vs 29 %	NS	[39]
	Lactobacillus fermentum strain KLD	282	23,8 % vs 23,8 %	NS	[40]
	Lactobacillus acidophilus	282	25,7 % vs 23,8 %	NS	[40]

Chez l'enfant, les diarrhées infectieuses constituent un problème de santé publique et, dans le tiers-monde, plusieurs millions d'enfants meurent de déshydratation chaque année. Certains probiotiques ont été évalués pour leur capacité à prévenir la survenue de diarrhées infectieuses (Tableau III).

L'administration de lactobacilles à des volontaires sains ayant ingéré une souche d'*Escherichia coli* entérotoxigène n'a eu aucun effet protecteur sur la survenue d'une diarrhée [41]. Oberhelman *et al.* [42] ont évalué l'efficacité de *Lactobacillus* GG administré pendant 15 mois chez deux cent quatre enfants péruviens dénutris. Un effet modeste mais significatif était observé, puisque les enfants qui recevaient *Lactobacillus* GG avaient des épisodes diarrhéiques moins fréquents (5,21 *versus* 6,02 épisodes par enfant et par an, $p = 0,02$) que les enfants non traités. L'étude de Saavedra *et al.* [43] a également montré que l'administration d'un mélange *Bifidobacterium bifidum* + *Streptococcus thermophilus* à cinquante-sept nourrissons hospitalisés prévenait la diarrhée et limitait la dissémination du rotavirus. Des résultats comparables ont été obtenus avec *Lactobacillus* GG [44].

Plusieurs probiotiques ont également montré une efficacité curative en réduisant l'intensité et la durée de la diarrhée (Tableau III). Isolauri *et al.* [45] ont traité soixante-quatorze enfants qui présentaient une diarrhée infectieuse par un produit laitier fermenté enrichi par *Lactobacillus* GG (125 g deux fois par jour) ou un placebo. Dans cette étude, les auteurs ont montré que la durée

de la diarrhée était réduite de manière significative sous *Lactobacillus* GG (1,4 *versus* 2,4 jours) et que cet effet était plus marqué quand l'analyse se limitait aux enfants infectés par un rotavirus. Récemment, *Lactobacillus* GG ou un placebo ont été utilisés au sein d'un large essai européen en complément de la réhydratation chez deux cent quatre-vingt-trois enfants atteints de diarrhée infectieuse [46] ; la durée de la diarrhée était réduite significativement dans le groupe qui recevait *Lactobacillus* GG et cet effet était également plus prononcé chez les enfants infectés par rotavirus.

Probiotiques	Population étudiée	Effet thérapeutique sur la diarrhée	P	Réf.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Volontaires sains : challenge par <i>Escherichia coli</i> n = 48 Prévention	Pas de bénéfice	NS	[41]
<i>Lactobacillus</i> GG	Diarrhée de l'enfant n = 204 Prévention	Survenue réduite (5,21 épisodes diarrhéiques/enfant/an vs 6,02)	= 0,028	[42]
<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	Diarrhée nosocomiale chez l'enfant n = 57 Prévention	Survenue réduite (7 % vs 31 %) surtout si rotavirus	= 0,035	[43]
<i>Lactobacillus</i> GG	Gastro-entérite à rotavirus n = 81 Prévention	Survenue réduite (2,2 % vs 16,7 %)	= 0,04	[44]
<i>Lactobacillus</i> GG	Diarrhée de l'enfant (rotavirus dans 80 %) n = 74 Traitement	Réduction de la durée (1 vs 2,4 j)	< 0,001	[45]
<i>Lactobacillus</i> GG	Diarrhée de l'enfant n = 283 Traitement	Réduction de la durée (58,3 vs 72 h)	< 0,008	[46]
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Diarrhée de l'enfant (n = 130) Traitement	Guérison clinique à 96 h (85 % vs 40 %)	< 0,01	[47]
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Diarrhée de l'adulte (n = 92) Traitement	Score de diarrhée à 48 h (nombre x indice de consistance) (5,5 vs 6,7)	= 0,035	[48]

Tableau III.
Principaux essais randomisés des probiotiques dans les diarrhées infectieuses

L'efficacité de *Saccharomyces boulardii* a été évaluée dans une étude en double aveugle contre placebo chez cent trente nourrissons et enfants âgés de trois mois à trois ans présentant une diarrhée aiguë [47] ; le pourcentage de guérisons cliniques (moins de quatre selles non liquides/24 heures) était significativement augmenté dans le groupe *Saccharomyces boulardii* à 48 heures et 96 heures (85 % versus 40 %, $p < 0,01$). Dans un essai en double aveugle contre placebo chez quatre-vingt-douze patients adultes présentant une diarrhée aiguë [48], l'administration de *Saccharomyces boulardii* a permis de réduire significativement le score de diarrhée (= nombre de selles x indice de consistance, coté 1 : normale, 2 : molle, 3 : liquide) à 48 heures : 5,5 versus 6,7, $p = 0,035$).

Dans un travail récent, Szajewska *et al.* [49] ont passé en revue l'ensemble des essais thérapeutiques contrôlés concernant les effets curatifs ou préventifs de probiotiques dans les diarrhées aiguës infectieuses de l'enfant. L'analyse de treize essais a confirmé l'intérêt thérapeutique de ces micro-organismes. Cet effet était particulièrement marqué dans les diarrhées à rotavirus. D'autres travaux sont cependant nécessaires pour préciser l'intérêt des probiotiques en prévention des épisodes de gastro-entérites.

Troubles fonctionnels intestinaux et dyspepsie

Les troubles fonctionnels intestinaux (TFI) sont définis par l'association de symptômes gastro-intestinaux d'évolution chronique, sans anomalie structurale du tube digestif. Les TFI affectent 8 % à 22 % de la population générale et sont plus fréquents chez la femme. L'origine des symptômes fonctionnels reste mal comprise. Les rôles respectifs de facteurs psychosociaux, de la carence d'apport en fibres, des infections digestives, de certaines intolérances alimentaires ou des altérations de la perméabilité intestinale ont été envisagés, mais aucune de ces anomalies n'explique à elle seule l'origine des TFI. Au cours des deux dernières décennies, de nombreux travaux se sont focalisés sur les anomalies de la motricité, puis de la sensibilité digestives. Quelques travaux ont montré que la microflore jouait un rôle important dans la pathogénie des TFI en interagissant avec la production de gaz intestinaux. Dans une étude récente menée chez des malades atteints de TFI, King *et al.* [50] ont observé une augmentation des fermentations coliques avec une production colique accrue de gaz (méthane et hydrogène). Dans ce travail, une amélioration significative des symptômes et une réduction de la production excessive de gaz au niveau du côlon étaient observées chez les malades qui suivaient un régime alimentaire pauvre en éléments fermentescibles. Chez les malades atteints de TFI, la microflore fécale apparaît souvent perturbée avec une augmentation du nombre de certaines bactéries anaérobies facultatives et une réduction du nombre de lactobacilles et de bifidobactéries [51]. L'efficacité des probiotiques sur les symptômes fonctionnels reste débattue. Dans un essai contrôlé, Maupas *et al.* ont montré que *Saccharomyces boulardii* améliorait la diarrhée sans influencer les autres symptômes fonctionnels [52]. Très récemment, Nobaek *et al.* [53] ont observé une amélioration significative des douleurs abdominales et des flatulences chez soixante malades atteints de TFI qui recevaient *Lactobacillus plantarum* pendant un mois.

En revanche, Hentschel *et al.* [54] n'ont observé aucune amélioration symptomatique chez cent vingt-six malades atteints de dyspepsie non ulcéreuse idiopathique qui recevaient un mélange de lactobacilles et d'*Escherichia coli*.

Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

De nombreuses données suggèrent que la microflore joue un rôle déterminant dans la pathogénie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), en particulier dans la maladie de Crohn (voir le chapitre « Influence de la microflore intestinale sur l'immunité de l'hôte au cours des maladies inflammatoires intestinales »). Récemment, Madsen *et al.* ont montré que des lésions inflammatoires causées par certains composants bactériens pouvaient être atténués par d'autres organismes, suggérant l'intérêt des probiotiques dans les MICI [55]. Ces auteurs ont étudié des souris déficientes en IL-10 qui développent spontanément des ulcérations coliques identiques à celles observées au cours de la maladie de Crohn. Dans ce travail, une modification de la microflore était observée deux semaines avant l'apparition de la colite, associant une augmentation des phénomènes d'adhérence et de translocation bactérienne. Les concentrations intraluminales de lactobacilles étaient réduites de manière significative et évoluaient parallèlement aux lésions digestives. L'administration intrarectale préalable de lactobacilles prévenait l'apparition de la colite. D'autres auteurs ont obtenu des résultats similaires en modulant indirectement les concentrations de lactobacilles par l'ingestion de lactulose, un sucre non absorbé capable de stimuler le développement de bactéries lactiques dans le côlon [56]. Schultz *et al.* [57] ont également montré que *Lactobacillus plantarum* améliorait la sévérité des colites observées chez des souris déficientes en IL-10. Chez le rat, *Lactobacillus reuteri* R2LC améliorait significativement la colite induite par l'acide acétique, alors que *Lactobacillus HLC* n'avait pas d'effet [58]. Wagner *et al.* [59] ont montré que l'administration orale d'un mélange de quatre probiotiques (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus GG*, *Lactobacillus reuteri* et *Bifidobacterium animalis*) chez des souris athymiques réduisait la diffusion systémique de *Candida albicans* et la mortalité de l'infection, ce qui suggère une action sur les mécanismes de défense de l'hôte contre les pathogènes. L'administration de *Lactobacillus reuteri* R2LC et de *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 à des rats porteurs d'une colite induite par le méthotrexate diminuait la perméabilité intestinale, les translocations bactériennes et les concentrations plasmatiques d'endotoxines [60].

L'ensemble de ces données chez l'animal suggère que le développement de l'inflammation digestive qui caractérise les MICI serait associé à la perte d'une fraction protectrice de la microflore et que sa restauration pourrait avoir un intérêt thérapeutique.

Chez l'homme, dans une étude ouverte, l'administration de *Lactobacillus GG* à quatorze enfants porteurs d'une maladie de Crohn augmentait le nombre de cellules productrices d'IgA dans la muqueuse intestinale, fait indiquant une

interaction entre le probiotique et le système immunitaire muqueux [61]. En revanche, dans une étude récente, Prantera *et al.* [62] concluaient à l'inefficacité de *Lactobacillus* GG en prévention des rechutes cliniques et/ou endoscopiques au cours de la maladie de Crohn : le pourcentage de rechutes était de 16,6 % sous *Lactobacillus* GG et 10,5 % sous placebo (NS) ; pour les patients en rémission clinique, 60 % de ceux ayant reçu *Lactobacillus* GG présentaient une rechute endoscopique contre 35,2 % de ceux ayant reçu le placebo (NS). Dans un essai randomisé contre placebo, Plein et Hotz [63] ont étudié l'effet de *Saccharomyces boulardii* sur les symptômes de patients porteurs d'une maladie de Crohn stable peu active. Vingt malades recevaient *Saccharomyces boulardii* (ou un placebo) à la dose de 250 mg/trois fois par jour pendant sept semaines en plus du traitement conventionnel de la MICI. Une réduction significative du nombre de selles quotidiennes et de l'index d'activité de la maladie était notée chez les malades qui recevaient *Saccharomyces boulardii*. Dans un autre travail récent, *Saccharomyces boulardii* s'est montré efficace en prévention des récives de la maladie de Crohn : une rechute était observée chez 37,5 % des malades traités par méسالazine (3 g/jour) contre 6,25 % des malades traités par l'association méسالazine (2 g/jour) et *Saccharomyces boulardii* (1 g/jour) [64]. Dans la rectocolite hémorragique, deux études ont comparé l'efficacité d'une préparation orale d'*Escherichia coli* à celle de la méسالazine sur le maintien en rémission [65, 66]. Ces études montraient que le taux de rechute est similaire entre le groupe probiotique et le groupe méسالazine, de l'ordre de 13 %. Chez des malades atteints de rectocolite hémorragique, la préparation VSL#3, association de plusieurs organismes probiotiques, (*Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*) a été évaluée récemment dans une étude non contrôlée [67] ; dans ce travail, les trois quarts des malades traités pendant un an restaient en rémission. Au cours des pouchites, la préparation VSL#3 a également donné des résultats spectaculaires. La pouchite est une inflammation non spécifique du réservoir iléal qui survient après colectomie totale avec anastomose iléo-anale effectuée dans le cadre d'une rectocolite hémorragique ; sa fréquence cumulée après dix ans est d'environ 50 % ; elle peut être aiguë, unique ou récidivante, ou chronique ; son étiologie est inconnue et probablement multifactorielle ; toutefois, la réponse immédiate au traitement antibiotique suggère un rôle pathogénique de la microflore et la pouchite est associée à une diminution du ratio anaérobies/aérobies et à une réduction des concentrations des lactobacilles et des bifidobactéries [68]. Dans une première étude contrôlée, quarante patients présentant une pouchite chronique en rémission clinique et endoscopique après métronidazole, ont reçu, soit le VSL#3, soit le placebo. Au cours des neuf mois de suivi, trois patients sous VSL#3 ont rechuté contre 100 % sous placebo ($p < 0,001$). Sous produit actif, les concentrations fécales de lactobacilles, bifidobactéries et *Streptococcus thermophilus* étaient significativement augmentées ($p < 0,01$) [69]. Dans une seconde étude, quarante patients avec anastomose iléoanale pour rectocolite hémorragique ont été suivis pendant un an : deux patients sous VSL#3 (10 %) ont présenté une pouchite aiguë contre huit (40 %) pour les patients sous placebo ($p < 0,05$) [70].

Helicobacter pylori

Dans un travail déjà ancien, Bhatia *et al.* [71] ont suggéré que *Lactobacillus acidophilus* était capable d'inhiber la croissance d'*Helicobacter pylori* *in vitro*. Canducci *et al.* [72] ont confirmé cette observation dans un essai thérapeutique récent, au cours duquel cent vingt malades infectés par *Helicobacter pylori* (Figure 2) recevaient un lyophilisat de *Lactobacillus acidophilus* ou un placebo en plus du traitement conventionnel d'éradication (rabéprazole, clarithromycine, amoxicilline).

Dans ce travail, le taux d'éradication était significativement plus élevé dans le groupe *Lactobacillus acidophilus* que dans le groupe placebo (88 % versus 72 %, $p < 0,03$). Une réduction significative de la production de $^{13}\text{CO}_2$ au cours de tests respiratoires à l'urée marquée au ^{13}C a été mise en évidence après une consommation quotidienne prolongée de *Lactobacillus acidophilus* [73]. Une éradication d'*Helicobacter pylori* n'a cependant jamais été observée avec un probiotique seul.

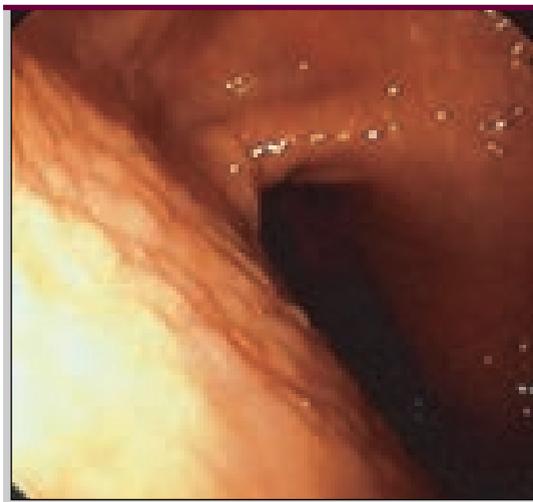


Figure 2.

Gastrite à *Helicobacter pylori* : aspect endoscopique de gastrite nodulaire antrale

(cliché A. Bitoun,

Hôpital Lariboisière, Paris.

Traité de Gastro-entérologie, 2000,

J.C. Rambaud, ed. Médecine-Sciences Flammarion)

Cancer du côlon

La microflore peut influencer la carcinogénèse intestinale (Figure 3) en produisant des enzymes (glycosidases, β -glucuronidase, azoréductases et nitroréductases) qui transforment des précarcinogènes en carcinogènes actifs. Certains micro-organismes de la flore pourraient avoir un rôle protecteur : chez l'homme, l'incidence du cancer colique serait réduite quand la microflore est anormalement pauvre en bifidobactéries et riche en bactéries anaérobies comme *Clostridium perfringens* [74]. L'effet bénéfique de certains probiotiques pourrait reposer sur leur capacité à inhiber des bactéries responsables de la production d'enzymes procarcinogènes et à détruire des carcinogènes comme les nitrosamines. Les études chez l'animal suggèrent que

certains probiotiques pourraient être efficaces en prévention du cancer du côlon (pour une revue générale voir [75]).

In vitro, les bifidobactéries diminuent la croissance des lignées cancéreuses coliques. Chez le rat, l'ingestion de bifidobactéries diminue le taux des tumeurs coliques induites par la diméthylhydrazine ou l'azoxyméthane et diminue également l'apparition de cryptes aberrantes, la prolifération cellulaire et l'expression de l'oncoprotéine p21 codée par les protooncogènes de la famille *ras* [76]. Chez des volontaires sains, Ling *et al.* [77] ont montré que *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus casei* diminuaient significativement l'activité des glucuronidase, nitroréductase et azoréductase qui sont impliquées dans la transformation de précarcinogènes en carcinogènes. Dans cette étude, l'activité enzymatique initiale était restaurée dix à trente jours après arrêt des probiotiques, suggérant qu'une consommation continue serait nécessaire pour observer des effets durables. Chez des patients porteurs d'adénomes coliques, l'ingestion de *Bifidobacterium bifidus* et *Lactobacillus acidophilus* diminue la prolifération cellulaire au niveau de la partie supérieure des cryptes coliques [78]. Des études d'intervention sont maintenant nécessaires pour déterminer l'effet d'une supplémentation en probiotiques sur les étapes de la cancérogénèse colique chez l'homme.

Figure 3.

Aspect ulcéro-végétant
d'un cancer du côlon
ascendant anatomique
(cliché

A. Lavergne-Slove,
Hôpital Lariboisière,
Paris. *Traité de Gastro-
entérologie*, 2000,
J.C. Rambaud, ed.
*Médecine-Sciences
Flammarion*)



Intolérance aux disaccharides

L'intolérance au lactose est souvent observée chez les sujets porteurs d'un déficit en lactase (involution primitive) ou chez des malades ayant subi une résection intestinale (déficiência secondaire). De multiples travaux ont montré que la lactase véhiculée par certaines bactéries lactiques participait à la digestion du lactose dans l'intestin, ce qui explique l'excellente digestion du lactose du yaourt chez les sujets qui présentent un déficit en lactase [79, 80]. Arrigoni *et al.* [81] ont comparé l'absorption et la tolérance d'une charge orale de 20 g de lactose administré, soit dans le lait, soit dans des yaourts, chez des malades porteurs d'un grêle court. Ces auteurs ont pu montrer que

l'absorption du lactose contenu dans les yaourts était meilleure que celle du lactose contenu dans le lait. Enfin, chez de jeunes enfants porteurs d'un déficit congénital en saccharase-isomaltase, il a été montré que la tolérance à ce disaccharide était améliorée par la consommation régulière de *Saccharomyces cerevisiae*, une levure qui contient une saccharase-isomaltase [82].

Pullulation microbienne de l'intestin grêle

Des symptômes digestifs sont souvent associés à une prolifération anormale de bactéries au niveau de l'intestin grêle. Les possibilités thérapeutiques sont limitées à l'administration d'antibiotiques, avec une réponse souvent partielle et temporaire. Dans une étude contrôlée menée en *cross-over* chez dix malades porteurs d'une diarrhée par pullulation microbienne intestinale, Attar *et al.* [83] ont montré que la norfloxacine (800 mg/jour) ou l'amoxicilline (1 500 mg/jour) réduisaient de manière significative le nombre de selles quotidiennes et les concentrations d'hydrogène dans l'air expiré ; cet effet n'était pas observé avec *Saccharomyces boulardii*. En revanche, Vanderhoof *et al.* [84] ont montré que les symptômes digestifs (diarrhée, ballonnements) de malades porteurs d'une pullulation microbienne intestinale et réfractaires aux antibiotiques pouvaient être amélioré par l'administration de *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus GG* ; il s'agissait cependant d'une étude ouverte chez six enfants.

Encéphalopathie hépatique

La pathogénie de l'encéphalopathie hépatique reste mal connue. La toxicité neurologique de l'ammoniaque produite par les bactéries intestinales est l'un des mécanismes évoqués. Quelques travaux anciens ont montré que l'activité enzymatique de l'uréase mesurée dans les fèces de patients en encéphalopathie hépatique était plus faible chez les malades traités par *Lactobacillus acidophilus* associé au lactulose ou à la néomycine, comparativement à ceux traités par lactulose ou néomycine seuls [85, 86]. Dans ces études, la baisse de l'activité uréasique dans les fèces était associée à une réduction des concentrations plasmatiques d'ammoniaque et à une amélioration clinique. Mais l'essentiel de l'ammoniaque provient de la désamination des acides aminés.

Prévention des allergies

La physiopathologie de l'allergie alimentaire est incomplètement élucidée, mais la flore intestinale y joue un rôle important (*voir le chapitre « Influence de la microflore intestinale sur l'immunité de l'hôte : conditions physiologiques »*). La microflore commensale dispose de mécanismes protecteurs contre l'allergie : une réponse préférentielle de type Th-1, la possibilité de produire du TGF- β qui s'oppose à la réponse de type Th-2 dominante au cours de l'allergie et favorise la tolérance orale et, enfin, une production d'IgAs. À la naissance, la colonisation sélective du nouveau-né

par la microflore de l'environnement est un stimulus majeur qui permet la mise en place du système immunitaire digestif (GALT) [87]. L'origine de l'allergie pourrait prendre sa source au cours de phénomènes dysimmunitaires complexes lors de cette colonisation par la microflore [88]. Les probiotiques ont donc été évalués chez l'homme en raison, d'une part, de leur innocuité qui autorise leur administration dès le plus jeune âge et, d'autre part, de leurs effets immunomodulateurs. Majamaa *et al.* [89] ont évalué les effets d'une supplémentation en *Lactobacillus* GG chez de jeunes enfants porteurs d'une intolérance au lait de vache avec dermatite atopique. Dans cette étude, une régression de la dermatite atopique était observée chez les enfants qui recevaient *Lactobacillus* GG. Plus récemment, Kalliomäki *et al.* [90] ont comparé les effets de l'administration de *Lactobacillus* GG ou d'un placebo chez cent cinquante-neuf femmes atopiques en fin de grossesse puis à leur nouveau-né pendant six mois ; chez les nouveau-nés, le risque de développer un eczéma atopique était réduit de moitié dans le groupe qui recevait *Lactobacillus* GG (23 % versus 46 %). Les potentialités immunomodulatrices de certains probiotiques et leurs effets bénéfiques dans l'allergie aux protéines animales ont été très récemment confortés dans des études randomisées contre placebo [91, 92].

Conclusion

Le nombre très important de publications consacrées aux probiotiques témoigne de l'intérêt majeur qu'accorde actuellement la communauté médicale au potentiel thérapeutique de ces micro-organismes. Depuis une dizaine d'années, une méthodologie scientifique rigoureuse pour la réalisation d'essais thérapeutiques chez l'homme a permis de montrer le bénéfice de certains probiotiques dans de nombreuses affections du tube digestif. L'efficacité la mieux documentée concerne l'utilisation de *Saccharomyces boulardii* pour prévenir la diarrhée associée aux antibiotiques et dans le traitement des infections multirécidivantes à *Clostridium difficile*, et celle de l'administration de *Lactobacillus* GG ou de *Bifidobacterium* pour limiter la durée des épisodes gastro-entériques à rotavirus chez le nourrisson. Parmi les perspectives thérapeutiques émergentes, il faut citer l'utilisation de probiotiques dans le traitement des maladies inflammatoires intestinales chroniques et le développement de probiotiques génétiquement modifiés qui synthétisent des cytokines ou d'autres agents thérapeutiques [93]. L'obtention de souches qui possèdent une activité biologique ciblée et capables de produire des molécules spécifiques laisse envisager de nouvelles perspectives dans le spectre d'activité des probiotiques.

Points-clés

- *Saccharomyces boulardii* est efficace pour prévenir la diarrhée associée aux antibiotiques et les rechutes itératives des infections à *Clostridium difficile*
- Certains probiotiques peuvent prévenir la survenue de diarrhées du voyageur.
- L'administration de probiotiques au cours des épisodes gastro-entériques à rotavirus de l'enfant limite la durée de la diarrhée.
- Les effets protecteurs des probiotiques contre les infections intestinales s'exercent par une inhibition de la croissance des bactéries intracoliques, la production de substances antibactériennes et l'activation de l'immunité intestinale.
- On peut envisager un rôle bénéfique des probiotiques dans de nombreuses affections digestives comme les maladies inflammatoires chroniques du tube digestif ou le syndrome de l'intestin irritable, mais aussi dans des maladies générales comme les allergies ou l'encéphalopathie hépatique.

Références

1. Collins MD, Gibson GR. Probiotics, prebiotics and symbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr* 1999 ; 69 : S1052-7.
2. Bouhnik Y, Pochart P, Marteau P, *et al.* Fecal recovery in man of viable *Bifidobacterium* sp ingested in a fermentable milk. *Gastroenterology* 1992 ;102 : 875-8.
3. Marteau P, Pochart P, Bouhnik Y, *et al.* Fate and effects of some transiting microorganisms in the human gastrointestinal tract. *World Rev Nutr Diet* 1993 ; 74 : 1-21.
4. McFarlane GT, Cummings JH. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *Br Med J* 1999 ; 78 : 999-1003.
5. Bengmark S. Pre-, pro- and symbiotics. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001 ; 4 : 571-9.
6. Hatcher GE, Lamprecht RS. Augmentation of macrophage phagocytic activity by cell-free extracts of selected lactic acid-producing bacteria. *J Dairy Sci* 1993 ; 76 : 2485-92.
7. Castagliuolo I, LaMont T, Nikulasson ST, *et al.* *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. *Infect Immun* 1996 ; 64 : 5225-32.
8. Oatley JT, Rarick MD, Ge J, *et al.* Binding of aflatoxin to *Bifidobacteria* *in vitro*. *J Food Protect* 2000 ; 63 : 1133-6.
9. Bartlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 1992 ; 15 : 573-81.
10. McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, *et al.* Prevention of beta-lactam associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am J Gastroenterol* 1995 ; 90 : 439-48.

11. Clausen MR, Bonnen H, Tvede M, *et al.* Colonic fermentation to short chain fatty acids is decreased in antibiotic associated diarrhea. *Gastroenterology* 1991 ; 101 : 1497-504.
12. Benoit R, Dorval D, Loulergue J, *et al.* Post-antibiotic diarrheas: role of *Klebsiella oxytoca*. *Gastroenterol Clin Biol* 1992 ; 16 : 860-4.
13. Soyletir G, Eskitürk A, Kilie G, *et al.* *Clostridium difficile* acquisition rate and its role in nosocomial diarrhoea at a university hospital in Turkey. *Eur J Epidemiol* 1996 ; 12 : 391-4.
14. D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, *et al.* Probiotics in prevention of antibiotic-associated diarrhoea: meta-analysis. *Br Med J* 2002 ; 324 : 1361-4.
15. Cremonini F, Di Caro S, Nista EC, *et al.* Meta analysis: the effect probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther* 2002 ; 16 : 1461-7.
16. Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, *et al.* *Lactobacillus GG* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr* 1999 ; 135 : 564-8.
17. Thomas MR, Litin SC, Osmon DR, *et al.* Lack of effect of *Lactobacillus GG* on antibiotic-associated diarrhea: a randomised, placebo-controlled trial. *Mayo Clinic Proc* 2001 ; 76 : 883-9.
18. Clements ML, Levine MM, Ristaino PA, *et al.* Exogenous lactobacilli fed to man - their fate and ability to prevent diarrheal disease. *Prog Food Nutr Sci* 1983 ; 7 : 29-37.
19. Gotz V, Romankiewicz JA, Moss J, *et al.* Prophylaxis against ampicillin-associated diarrhea with a *Lactobacillus* preparation. *Am J Hosp Pharm* 1979 ; 36 : 754-7.
20. Colombel JF, Cortot A, Neut C, *et al.* Yoghurt with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin-induced gastrointestinal effects. *Lancet* 1987 ; 2 : 43.
21. Siitonen S, Vapaatalo H, Salminen S. Effect of *Lactobacillus GG* yoghurt in prevention of antibiotic-associated diarrhoea. *Ann Med* 1990 ; 22 : 57-9.
22. Temmerman R, Pot B, Huys G, *et al.* Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int J Food Microbiol* 2000 ; 81 : 1-10.
23. Bergogne-Bérézin E. Place des micro-organismes de substitution dans le contrôle des diarrhées et colites associées aux antibiotiques. *Presse Med* 1995 ; 24 : 145-6.
24. Surawicz CM, Elmer GW, Speelman P, *et al.* Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology* 1989 ; 96 : 981-8.
25. McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, *et al.* Prevention of beta lactam associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am J Gastroenterol* 1995 ; 90 : 439-48.
26. Adam J, Barret A, Barret-Bellet C. Essais cliniques contrôlés en double insu de l'Ultralevure lyophilisée : étude multicentrique par 25 médecins de 388 cas. *Méd Chir Dig* 1976 ; 5 : 401-5.
27. Lewis SJ, Potts LF, Barry RE. The lack of therapeutic effect of *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic associated diarrhoea. *J Infect* 1998 ; 36 : 171-4.
28. Beaugerie L, Flahault A, Barbut F, *et al.* Antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* in the community. *Aliment Pharmacol Ther* 2003 ; 17 : 905-12.
29. Wenisch C, Parschalk B, Hasenhundl M, *et al.* Comparison of vancomycin, teicoplanin, metronidazole, and fusidic acid for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 1996 ; 22 : 813-8.
30. Buts JP, Corthier G, Delmée M. *Saccharomyces boulardii* for *Clostridium difficile* associated enteropathies in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993 ; 16 : 419-25.
31. Gorbach SL, Chang TW, Goldin B. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus GG*. *Lancet* 1987 ; 2 : 1519.
32. Levy J. Experience with live *Lactobacillus plantarum* 299v: a promising adjunct in the management of recurrent *Clostridium difficile* infection. *Gastroenterology* 1997 ; 112 : A379.
33. McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, *et al.* A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *J Am Med Assoc* 1994 ; 271 : 1913-8.
34. Czerucka D, Rampal P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microb Infect* 2002 ; 4 : 733-9.
35. Black FT, Anderson PL, Orskov J, *et al.* Prophylactic efficacy of lactobacilli on traveller's diarrhea. *J Travel Med* 1989 ; 7 : 333-5.
36. Oksanen PJ, Salminen S, Saxelin M, *et al.* Prevention of travellers' diarrhoea by *Lactobacillus GG*. *Ann Med* 1990 ; 22 : 53-6.

37. Hilton E, Kolakowski P, Singer C, *et al.* Efficacy of *Lactobacillus* GG as a diarrheal preventive in travelers. *J Travel Med* 1997 ; 4 : 41-3.
38. Kollaritsch H, Holst H, Grobara P, *et al.* Prophylaxe der reisediarrhöe mit *Saccharomyces boulardii*. *Forst Chr Med* 1993 ; 111 : 152-6.
39. Pozo-Olano JD, Warram JH, Gomez RG, *et al.* Effect of a lactobacilli preparation on traveller's diarrhea. A randomized, double blind clinical trial. *Gastroenterology* 1978 ; 74 : 829-30.
40. Katelaris PH, Salam I, Farthing MJ. Lactobacilli to prevent traveller's diarrhea? *N Engl J Med* 1995 ; 333 : 1360-1.
41. Clements ML, Levine MM, Black RE, *et al.* *Lactobacillus* prophylaxis for diarrhea due to enterotoxinogenic *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1981 ; 20 : 104-8.
42. Oberhelman RA, Gilman RH, Sheen P, *et al.* A placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG to prevent diarrhea in undernourished peruvian children. *J Pediatr* 1999 ; 134 : 15-20.
43. Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, *et al.* Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994 ; 344 : 1046-9.
44. Szajewska H, Kotowska M, Mrukowicz JZ, *et al.* Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J Pediatr* 2001 ; 138 : 361-5.
45. Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T, Sillanaukee P, Kolvula T. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 1991 ; 88 : 90-7.
46. Guandalini S, Pensabene L, Zikri MA, *et al.* *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European study. *J Pediatr Gastr Nutr* 2000 ; 30 : 54-60.
47. Cetina-Sauri G, Sierra Basto G. Évaluation thérapeutique de *Saccharomyces boulardii* chez des enfants souffrant de diarrhée aiguë. *Ann Pediatr* 1994 ; 41 : 397-400.
48. Höchter W, Chase D, Hagenhoff G. *Saccharomyces boulardii* in treatment of acute adult diarrhea. Efficacy and tolerance of treatment. *Münchener Medizinische Wochenschrift* 1990 ; 132(12) : 188-92.
49. Szajewska H, Mrukowicz JZ. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double blind, placebo-controlled trials. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001 ; 33 : S17-25.
50. King TS, Elia M, Hunter JO. Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome. *Lancet* 1998 ; 10 : 1187-9.
51. Hunter JO, Madden JA, Hunter JO. A review of the role of the gut microflora in irritable bowel syndrome and the effects of probiotics. *Br J Nutr* 2002 ; 88 : 67-72.
52. Maupas JL, Champemont P, Delforge M. Traitement des colopathies fonctionnelles. Essai en double aveugle de l'ultra-levure. (Treatment of irritable bowel syndrome with *Saccharomyces boulardii* - a double blind, placebo controlled study.). *Méd Chir Dig* 1983 ; 12 : 77-9.
53. Nobaek S, Johansson ML, Molin G, *et al.* Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000 ; 95 : 1231-8.
54. Hentschel C, Bauer J, Dill N. Complementary medicine in non-ulcer dyspepsia: is alternative medicine a real alternative? A randomized placebo-controlled double-blind clinical trial with two probiotic agents-Hylac, and Hylac, forte. *Gastroenterology* 1997 ; 112 : A146.
55. Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, *et al.* *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene deficient mice. *Gastroenterology* 1999 ; 116 : 1107-14.
56. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995 ; 125 : 1401-12.
57. Schultz M, Veltkamp C, Dieleman LA, *et al.* Continuous feeding of *Lactobacillus plantarum* attenuates established colitis in interleukin-10 deficient mice. *Gastroenterology* 1998 ; 114 : A1081.
58. Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML, *et al.* The effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and oat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1993 ; 28 : 155-62.
59. Wagner ED, Warner T, Roberts L, *et al.* Colonization of congenitally immunodeficient mice with probiotic bacteria. *Infect Immun* 1997 ; 65 : 3345-51.
60. Mao Y, Nobaek S, Kasravi B, *et al.* The effects of *Lactobacillus* strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology* 1996 ; 111 : 334-44.

61. Malin M, Suolmalainen H, Saxelin M, *et al.* Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus* GG. *Ann Nutr Metab* 1996 ; 40 : 137-45.
62. Prantera C, Scribano ML, Falasco G, *et al.* Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus* GG. *Gut* 2002 ; 51 : 405-9.
63. Plein K, Hotz J. Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea - a pilot study. *Z Gastroenterol* 1993 ; 31 : 129-34.
64. Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, *et al.* *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000 ; 45 : 1462-4.
65. Kruis W, Schütz E, Frick P, *et al.* Double blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997 ; 11 : 853-8.
66. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, *et al.* Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomized trial. *Lancet* 1999 ; 354 : 635-9.
67. Venturi A, Gionchetti P, Rizello F, *et al.* Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999 ; 13 : 1103-8.
68. Rueseler-Van-Embden JGH, Schouten WR, van Lieshout LMC. Pouchitis: result of microbial imbalance? *Gut* 1994 ; 35 : 658-64.
69. Gionchetti P, Rizello F, Venturi A, *et al.* Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000 ; 119 : 305-9.
70. Gionchetti P, Rizello F, Helwig U, *et al.* Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2003 ; 124 : 1202-9.
71. Bhatia SJ, Kochar N, Abraham P. *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* *in vitro*. *J Clin Microbiol* 1989 ; 27 : 2328-30.
72. Canducci F, Armuzzi A, Cremonini F, *et al.* A lyophilised and inactivated culture of *Lactobacillus acidophilus* increases *Helicobacter pylori* eradication rates. *Aliment Pharmacol Ther* 2000 ; 14 : 1625-9.
73. Michetti P, Dorta G, Wiesel PH, *et al.* Effect of whey based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (jonsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infections in humans. *Digestion* 1999 ; 60 : 203-9.
74. Kubota Y. Fecal intestinal flora in patients with colon adenoma and colon cancer. *Nippon Shok Gakkai Zasshi* 1990 ; 87 : 771-9.
75. Burns AJ, Rowland IR. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr Issues Intest Microbiol* 2000 ; 1 : 13-24.
76. Singh J, Rivenson A, Tomita M, *et al.* *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997 ; 18 : 833-41.
77. Ling WH, Korpela R, Mykkänen H, *et al.* *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic reductive enzyme activities in healthy female adults. *J Nutr* 1994 ; 124 : 18-23.
78. Biasco G. Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on rectal cell kinetics and fecal pH. *Ital J Gastroenterol* 1991 ; 23 : 142-6.
79. Marteau P, Flourié B, Pochart P, *et al.* Effect of the microbial lactase activity in yogurt on the intestinal absorption of lactose: an *in vivo* study in lactase-deficient humans. *Br J Nutr* 1990 ; 64 : 71-9.
80. de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, *et al.* Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* 2001 ; 73 : 421S-9S.
81. Arrigoni E, Marteau P, Briet F, *et al.* Tolerance and absorption of lactose from milk and yogurt during short-bowel syndrome in humans. *Am J Clin Nutr* 1994 ; 60 : 926-9.
82. Harms HK, Bertele-Harms RM, Bruer-Kleis D. Enzyme substitution therapy with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in congenital sucrase-isomaltase deficiency. *N Engl J Med* 1987 ; 316 : 13-6.

83. Attar A, Flourie B, Rambaud JC, *et al.* Antibiotic efficacy in small intestinal bacterial overgrowth-related chronic diarrhea: a crossover, randomized trial. *Gastroenterology* 1999 ; 117 : 794-7.
84. Vanderhoof JA, Young RJ, Murray N, *et al.* Treatment strategies for small bowel bacterial overgrowth in short bowel syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998 ; 27 : 155-60.
85. Loguerio C, Del Vecchio Blanco C, Coltorti M. *Enterococcus* lactic acid bacteria strain SF68 and lactulose in hepatic encephalopathy: a controlled study. *J Int Med Res* 1987 ; 15 : 335-43.
86. Scevola D, Zambelli A, Concia E, *et al.* Lactitol and neomycin: monotherapy or combined therapy in the prevention and treatment of hepatic encephalopathy. *J Clin Ther* 1989 ; 129 : 105-11.
87. Corthier G, Doré J. La flore intestinale. In : Rampal P, Beaugerie L, Marteau P, Corthier G eds. *Colites infectieuses de l'adulte*. Paris : John Libbey Eurotext, 2000 : 3-25.
88. Lessof M. Food intolerance. *Scand J Gastroenterol* 1985 ; 20 : 117-21.
89. Majamaa H, Isolauri E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1997 ; 99 : 179-85.
90. Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, *et al.* Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001 ; 357 : 1076-9.
91. Peltö L, Isolauri E, Liluis EM, *et al.* Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin Exp Allergy* 1998 ; 28 : 1474-9.
92. Pessi T, Sutas Y, Hurme M, *et al.* Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin Exp Allergy* 2000 ; 30 : 1804-8.
93. Steidler L, Hans W, Schotte L, *et al.* Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000 ; 289 : 1352-5.



Exemple d'un médicament probiotique : *Saccharomyces boulardii* lyophilisé

Jean-Paul Buts

Université Catholique de Louvain,
Pédiatrie Générale et Unité de Gastro-entérologie Pédiatrique,
Cliniques Universitaires Saint Luc,
Bruxelles, Belgique

S*accharomyces boulardii* est une levure d'origine naturelle, non génétiquement modifiée, isolée à partir de l'écorce de lychées en Indochine, et qui présente une température optimale de développement inhabituellement élevée, de l'ordre de 37 °C, d'où son qualificatif de « levure ultra-haute ».

Saccharomyces boulardii est une variété voisine mais distincte de *Saccharomyces cerevisiae* dont elle se différencie par différentes caractéristiques taxonomiques, métaboliques et génétiques [1, 2].

Sous forme lyophilisée, *Saccharomyces boulardii* constitue le principe actif d'un médicament commercialisé dans près de cent pays dans le monde sous différents noms de marque, formes et dosages, le plus fréquemment en gélules dosées à 50 mg.

Saccharomyces boulardii lyophilisé est un exemple de ce que l'on dénomme un « médicament probiotique » :

- « probiotique » puisque *Saccharomyces boulardii* lyophilisé est reviviscible dans le tube digestif après administration orale et exerce une « influence positive sur la santé et la physiologie de l'hôte » [3, 4]. Au terme probiotique est parfois préféré par certains celui d'« agent biothérapeutique » pour désigner parmi les microorganismes probiotiques ceux qui sont « utilisés pour prévenir ou traiter des maladies humaines » [5, 6] ;
- « médicament » puisque la formulation lyophilisée est préparée, conditionnée et contrôlée comme tel, et que le dossier pharmaceutique et clinique de *Saccharomyces boulardii* lyophilisé obéit aux règles de mise sur le marché d'un médicament dans les pays où le produit est disponible.

Saccharomyces boulardii lyophilisé, médicament probiotique, se distingue donc clairement des aliments probiotiques contenant diverses souches de micro-organismes, utilisés chez l'animal pour améliorer les performances zootechniques ou chez l'homme sain (souvent sous forme de yaourts ou d'aliments lactés) pour renforcer la physiologie de l'hôte, à l'exclusion de tout contexte pathologique.

Présentation et pharmacocinétique

Saccharomyces boulardii lyophilisé est obtenu par cryodessiccation en présence de lactose : cette technique permet de préserver la vitalité et la stabilité de la levure. L'étude des propriétés pharmacodynamiques de

Saccharomyces boulardii a montré qu'elles étaient liées, dans la plupart des cas, à son caractère reviviscible. Comme toutes les levures, *Saccharomyces boulardii* est génétiquement résistant aux antibiotiques antibactériens ; pour la quasi-totalité des antibiotiques étudiés, leur CMI à l'égard de *Saccharomyces boulardii* est toujours très élevée, supérieure à 128 mg/L [7].

Saccharomyces boulardii est résistant à l'acidité gastrique, à la protéolyse et peut atteindre très rapidement des concentrations élevées dans le tractus

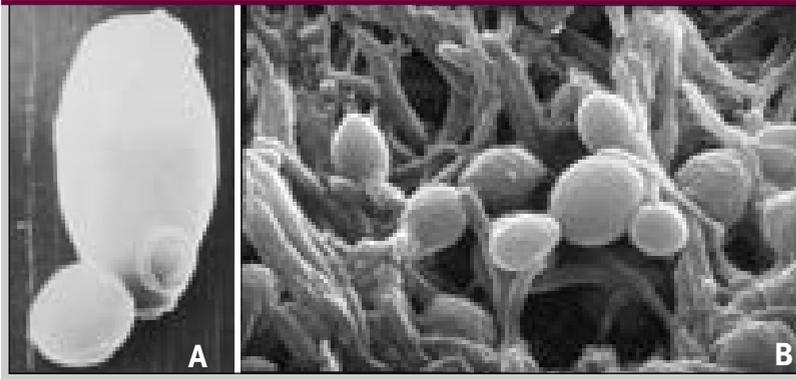


Figure 1.
Saccharomyces boulardii
(clichés M. Bastide,
Montpellier).
A : cellules identifiées
par microscopie
électronique à balayage
B : caecum de souris,
trois heures après
l'administration de
Saccharomyces boulardii

gastro-intestinal, puis s'y maintenir à des niveaux constants sous une forme viable [6] (Figure 1).

Chez l'animal axénique (stérile), *Saccharomyces boulardii*, administré en dose unique, s'établit et persiste dans le tube digestif à des concentrations cependant moindres (5×10^7 cellules/g fèces) que des micro-organismes autochtones de la flore dominante (10^9 à 10^{10}), démontrant une capacité de la levure à s'adapter aux conditions physicochimiques du milieu intestinal. En revanche, chez l'animal holoxénique (à flore normale), *Saccharomyces boulardii* est éliminé très rapidement, en quelques jours. Ainsi, en présence d'une flore normale, *Saccharomyces boulardii* ne s'implante pas dans le tube digestif [8]. Une analyse de la cinétique d'élimination fécale des cellules vivantes de *Saccharomyces boulardii* au cours de l'administration répétée de lyophilisat ($\pm 4 \times 10^{10}$ cellules viables de *Saccharomyces boulardii*) à des volontaires adultes sains [9] a révélé qu'un état d'équilibre d'environ 10^8 cellules/jour est atteint dès le troisième jour d'administration. *Saccharomyces boulardii* disparaît rapidement des selles, deux à cinq jours après l'arrêt du traitement. Le taux de récupération fécale des cellules vivantes ingérées a été évalué à 0,2 % - 0,4 % chez le rat [10] comme chez l'homme [11] avec une relation linéaire dose/récupération. Ce rapport est plus que doublé lorsque les sujets reçoivent simultanément un antibiotique actif sur la flore anaérobie dominante du côlon (ampicilline) [11]. Une étude clinique réalisée chez des malades atteints d'une infection multirécidivante à *Clostridium difficile* et traités par *Saccharomyces boulardii* à la dose de 1 g/jour a démontré que la concentration fécale en cellules viables de levure chez les patients ne présentant pas de rechutes ultérieures était en moyenne supérieure (1×10^6 cellules/g) à celle observée chez les patients présentant une rechute ($2,5 \times 10^4$ /g, $p = 0,02$). Il existe donc un lien significatif entre le niveau de

concentration de *Saccharomyces boulardii* dans les fèces et l'activité thérapeutique du médicament [12].

Mécanismes	Réponse
• Production de substances anti-microbiennes	Inconnue
• Interactions avec la flore	Oui
• Inactivation de toxines bactériennes ou de leurs sites de fixation aux récepteurs	Oui
• Effets antisécrétoires	Oui
• Stimulation du système immunitaire	Oui
• Inhibition de la réponse inflammatoire induite par les entérotoxines	Oui
• Effets trophiques sur la muqueuse	Oui

Tableau I.
Mécanismes d'action de
Saccharomyces boulardii

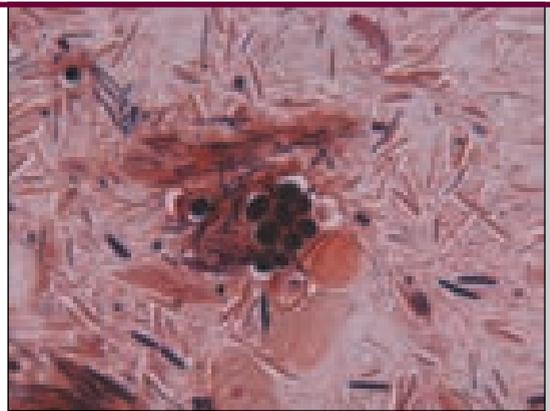
Propriétés pharmacodynamiques

Le **Tableau I** résume les principaux mécanismes d'action de *Saccharomyces boulardii*. Au cours de son transit dans le tube digestif, *Saccharomyces boulardii* exerce des effets pharmacodynamiques qui s'apparentent aux effets physiologiques de la flore intestinale en équilibre.

Effets de *Saccharomyces boulardii* sur les infections intestinales expérimentales

Les effets de l'administration orale de *Saccharomyces boulardii* ont été évalués sur plusieurs modèles d'infection et/ou de colonisation digestive par différents micro-organismes.

Figure 2.
Flore intestinale du hamster sain
traité par *Saccharomyces boulardii* :
mucus prélevé dans le caecum (x 1 000)
(cliché BCX)



Clostridium difficile

L'administration de *Saccharomyces boulardii* réduit de manière significative la mortalité induite par la colite à *Clostridium difficile* chez des hamsters traités par clindamycine [13] et des souris inoculées oralement, soit par *Clostridium difficile* [14], soit directement par les toxines A et B produites par cette bactérie [15] (Figure 2).

L'absence de lésions de la muqueuse intestinale et colique chez les animaux protégés par *Saccharomyces boulardii* a été visualisée en microscopie optique [16] ou électronique [17, 18] et a été confirmée sur un modèle *in vitro* d'une lignée de cellules épithéliales intestinales de rat (IRD 98) [19]. L'effet protecteur vis-à-vis de l'entérotoxigénicité de *Clostridium difficile* est plus marqué lorsque le traitement par *Saccharomyces boulardii* est préventif et administré en continu [13, 14, 20]. Il disparaît lorsque les cellules de levure sont tuées par amphotéricine-B ou par hyperthermie et est linéairement dépendant de la dose administrée et de la viabilité de *Saccharomyces boulardii* [20]. L'effet protecteur est parfois corrélé à une baisse de la concentration intestinale de *Clostridium difficile* [21] et toujours à une réduction des titres de toxine A et/ou de toxine B [14, 17, 20, 21]. De plus, Elmer et Corthier ont documenté une corrélation significative entre le taux de survie chez la souris infectée par *Clostridium difficile* et la dose orale

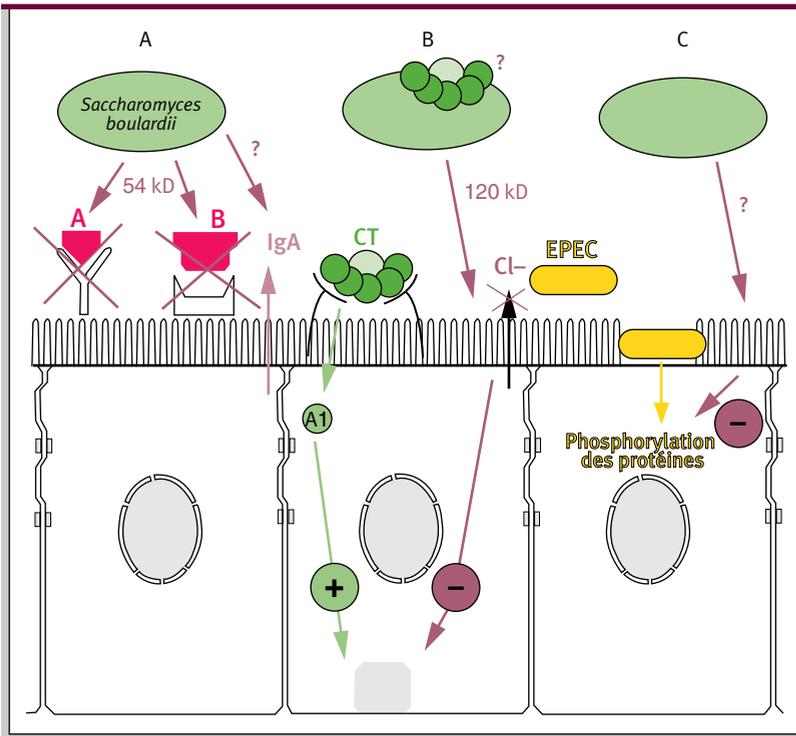


Figure 3. Représentation schématique des mécanismes protecteurs de *Saccharomyces boulardii* vis-à-vis de *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli* entérotoxigène (EPEC) (d'après [22])

A : *Saccharomyces boulardii* sécrète une protéase de 54 kDa qui entraîne une protéolyse des toxines A et B de *Clostridium difficile* et de leurs récepteurs.
B : *Saccharomyces boulardii* sécrète une protéase de 120 kDa qui exerce un effet sur la muqueuse intestinale, inhibe la stimulation de l'adénylate cyclase (AC) par la toxine cholérique (CT) et inhibe la sécrétion de chlore.

C : *Saccharomyces boulardii* exerce une action sur la muqueuse intestinale et réduit la phosphorylation des protéines induite lors de l'infection par des *Escherichia coli* entérotoxigènes (EPEC). Le point d'interrogation indique que le « messenger » de cette action, libéré par *Saccharomyces boulardii*, n'est pas encore identifié

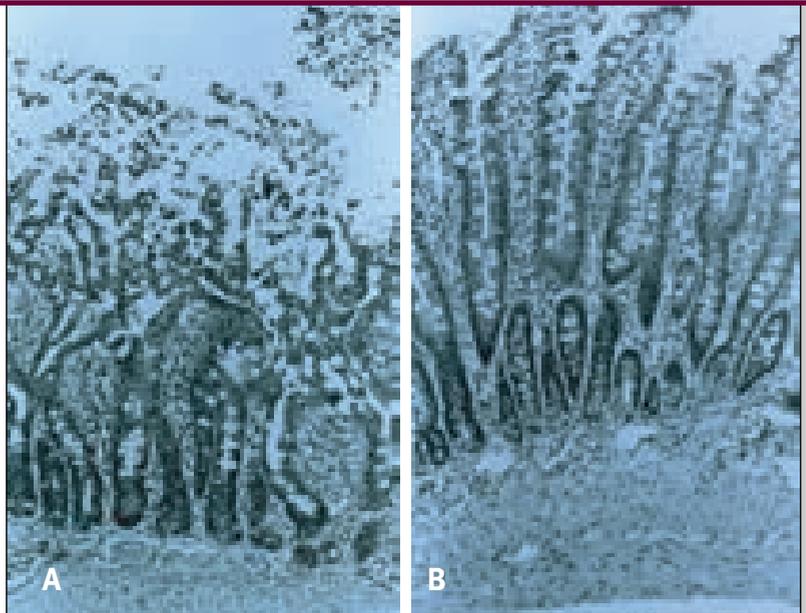
de *Saccharomyces boulardii* administrée. Si la dose de *Saccharomyces boulardii* était augmentée de 3×10^8 à $3,3 \times 10^{10}$ cellules/ml dans l'eau de boisson des souris infectées par *Clostridium difficile*, le taux de survie augmentait de façon linéaire de 0 % à 85 % [20].

L'action protectrice de *Saccharomyces boulardii* vis-à-vis de l'infection intestinale à *Clostridium difficile* résulte des effets complémentaires de plusieurs mécanismes (Figure 3) :

- sécrétion *in vivo* par la levure d'une protéase de 54 kDa, inhibant les effets entérotoxiques et cytotoxiques des toxines A et B du *Clostridium difficile*. Le récepteur intestinal pour la toxine A de *Clostridium difficile* est une glycoprotéine de haut poids moléculaire sensible aux protéases. Pothoulakis *et al.* [23, 24] ont démontré que *Saccharomyces boulardii* produit *in vivo* une protéase, d'un poids moléculaire de 54 kDa, qui diminue les sécrétions hydro-électrolytiques dans un modèle d'anse isolée de lapin, mais n'a aucun effet sur les lésions cellulaires induites par *Clostridium difficile* sur d'autres lignées que les lignées intestinales, telles que les fibroblastes de poumon humain (IMR-90) ou la lignée cellulaire de la leucémie basophile du rat (RBL). La protéase de *Saccharomyces boulardii* inhibe la liaison d'[H³]-entérotoxine A purifiée aux membranes microvillositaires intestinales de 37 %, réduit de 55 % les sécrétions hydro-électrolytiques induites chez le rat par l'entérotoxine A et diminue de 93 % la perméabilité intestinale au mannitol. De plus, après administration orale de *Saccharomyces boulardii* à

Figure 4.

Inhibition par la protéase de Saccharomyces boulardii de l'entérite induite par la toxine A de Clostridium difficile. Une dose de 5 mg de toxine A ou de toxine A pré-incubée avec la protéase de Saccharomyces boulardii a été injectée dans des anses iléales de rat. Après 4 heures d'exposition, les rats ont été sacrifiés, les anses iléales fixées dans la formaline, et les sections ont été colorées par l'hématoxyline et l'éosine. A : pour l'anse exposée à la toxine A, on observe une nécrose villositaire et une infiltration



de la lamina propria par les neutrophiles.

B : au niveau de l'anse exposée à la toxine A après pré-incubation par la protéase de Saccharomyces boulardii, on observe une prévention complète des lésions induites par la toxine A [24]

des rats pendant trois jours, l'administration orale d'entérotoxine A n'avait plus aucun effet de stimulation sur les sécrétions et la perméabilité intestinale. Castagliuolo *et al.* [24, 25] ont confirmé que la protéase partiellement purifiée pouvait protéolyser directement et spécifiquement la toxine A et détruire du moins en partie le site du récepteur au niveau des membranes microvillositaires intestinales, en inhibant ainsi la liaison des toxines A et B aux récepteurs (Figure 4) ;

- stimulation de la réponse immunitaire antitoxine A : chez la souris inoculée oralement par un toxoïde de la toxine A, l'administration de *Saccharomyces boulardii* entraîne une forte amplification de la réponse immunitaire spécifique mesurée par les taux d'IgA sécrétoires et d'IgM sériques anti-toxine A [26] ;
- enfin, l'inhibition par *Saccharomyces boulardii* de l'adhésion de *Clostridium difficile* aux cellules intestinales a été démontrée sur un modèle cellulaire *in vitro* [27].

Vibrio cholerae

Sur un modèle *in vivo* d'anse jéjunale ligaturée chez le rat, l'administration de *Saccharomyces boulardii* réduit significativement l'hypersécrétion hydrosodée induite par l'inoculation préalable de toxine cholérique [28].

Cet effet inhibiteur a été confirmé *in vitro* sur des modèles de cellules épithéliales intestinales de rat : IRD 98 , IEC 17 [29] et IEC 6 [30]. L'effet de *Saccharomyces boulardii* est associé à une diminution significative de 50 % du taux d'AMPc induit par la toxine cholérique. Cet effet disparaît après destruction des levures par autoclavage. Le surnageant de culture de *Saccharomyces boulardii* (appelé milieu conditionné ou MC) est capable à lui seul de diminuer de façon dose dépendante, les taux d'AMPc induits par la toxine cholérique dans les cellules IEC 6 ; cet effet disparaît lorsque le milieu est dénaturé par la chaleur, hydrolysé par la trypsine ou traité à l'acide trichloroacétique, ce qui suggère la présence d'un facteur protéique ; celui-ci a été identifié par autoradiographie après séparation sur gel polyacrylamide et élution comme une protéine de 120 kDa [30]. Par ailleurs, le MC ne modifie pas les paramètres de fixation de la toxine cholérique iodée sur son récepteur [29] et n'exerce pas d'activité protéolytique vis-à-vis de la toxine cholérique [30]. Ces observations ont conduit Czerucka *et al.* [31] à étudier l'effet du MC de *Saccharomyces boulardii* sur les voies de signalisation intracellulaire pouvant réguler la sécrétion de chlore.

L'effet du MC sur le transport du chlore a été étudié sur la lignée T84 établie à partir d'un carcinome humain. Cette lignée présente les caractéristiques de cellules cryptiques sécrétrices de chlore par la pompe Na⁺, K⁺ATPase, le co-transporteur Na⁺/K⁺/Cl⁻ et le canal K⁺ situés du côté basolatéral ainsi que par le canal Cl⁻ situé du côté apical. Tous les échangeurs participent à la sécrétion de chlore induite par des agonistes agissant *via* l'AMPc – par exemple, la forskoline, le *vasoactive intestinal polypeptide* (VIP) et les prostaglandines (PGE) – ou *via* le Ca²⁺, comme le carbachol [32]. La sécrétion de chlore induite après soixante minutes d'exposition à la toxine cholérique a pu être quantifiée par la technique de Venglarik *et al.* [33].

En présence du MC de *Saccharomyces boulardii*, la sécrétion de chlore ainsi que les taux d'AMPc stimulés par la toxine cholérique dans les cellules T84

étaient ramenés aux valeurs témoins. Par ailleurs, le MC de *Saccharomyces boulardii* diminuait la sécrétion chlorée induite par le VIP ou la PGE₂ uniquement si les cellules avaient été exposées pendant soixante minutes au MC de *Saccharomyces boulardii* avant l'incubation en présence de ces agonistes : ce phénomène est corrélé à une diminution du taux d'AMPc [31].

Une heure d'incubation en présence du MC de *Saccharomyces boulardii* est également nécessaire pour diminuer la sécrétion chlorée induite par le carbachol sans pour autant diminuer les taux intracellulaires d'inositol-tri-phosphatase. Le MC de *Saccharomyces boulardii* semble donc générer dans les cellules T84 un médiateur cellulaire capable de dissocier les canaux ioniques du taux intracellulaire de Ca²⁺.

En résumé, ces travaux montrent que *Saccharomyces boulardii* sécrète une protéine de 120 kDa qui exerce une action directe sur l'entérocyte et induit dans la cellule des voies de signalisation impliquées dans la régulation de la sécrétion (Figure 3).

Escherichia coli

Sur le modèle de la diarrhée induite par l'entérotoxine thermostable d'*Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC) chez le souriceau, l'administration simultanée d'une suspension de *Saccharomyces boulardii* exerce un effet inhibiteur significatif sur l'hypersécrétion intestinale [34].

Les *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC) représentent un agent bactérien prédominant incriminé dans les diarrhées infantiles, particulièrement dans les pays en développement. Les *Escherichia coli* entéro-hémorragiques (EHEC) sont impliqués dans les infections d'origine alimentaire des pays industrialisés (États-Unis, Canada, Japon) et induisent des colites hémorragiques qui peuvent être associées au syndrome hémolytique et urémique [35]. Ces bactéries synthétisent une « *Shiga-like toxine* » qui inhibe la synthèse protéique des cellules intestinales, mais qui ne semble pas être impliquée dans la pathologie intestinale liée aux EHEC. La pathogénie des EPEC et des EHEC débute par l'adhésion à la muqueuse intestinale, ce qui induit des modifications morphologiques de cellules hôtes dont les principales caractéristiques sont la destruction des microvillosités et la formation de lésions appelées « attachement/effacement » avec accumulation de fibres d'actine formant un « piédestal » sous le site d'attachement des bactéries [35]. Une des conséquences de ces modifications est la rupture des jonctions serrées aboutissant à la disparition des fonctions barrières des entérocytes [36]. Ces infections sont associées à la transmigration de cellules polynucléées et à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-8) [37]. Certaines réponses cellulaires à l'infection ont pu être corrélées à l'activation par phosphorylation de protéines cellulaires. Ainsi, la phosphorylation de la *myosine light chain* (MLC) a été directement impliquée dans la rupture des jonctions serrées lors d'infections par les EPEC [38].

La présence de *Saccharomyces boulardii* durant l'infection de cellules T84 par des EPEC producteurs de « *Shiga-like toxine* » (souche EDL 931) restaure les fonctions de barrière (mesurées par la résistance transépithéliale, le passage de l'inuline ou l'immunolocalisation de la protéine ZO-1) (Figure 5). De plus, l'étude du clivage de la caspase 32 démontre que la levure est capable de retarder le processus d'apoptose ou mort cellulaire programmée

liée à l'infection des cellules T84 par les EPEC. La levure n'a aucun effet sur le nombre de bactéries EPEC ou EHEC qui adhèrent aux entérocytes. En

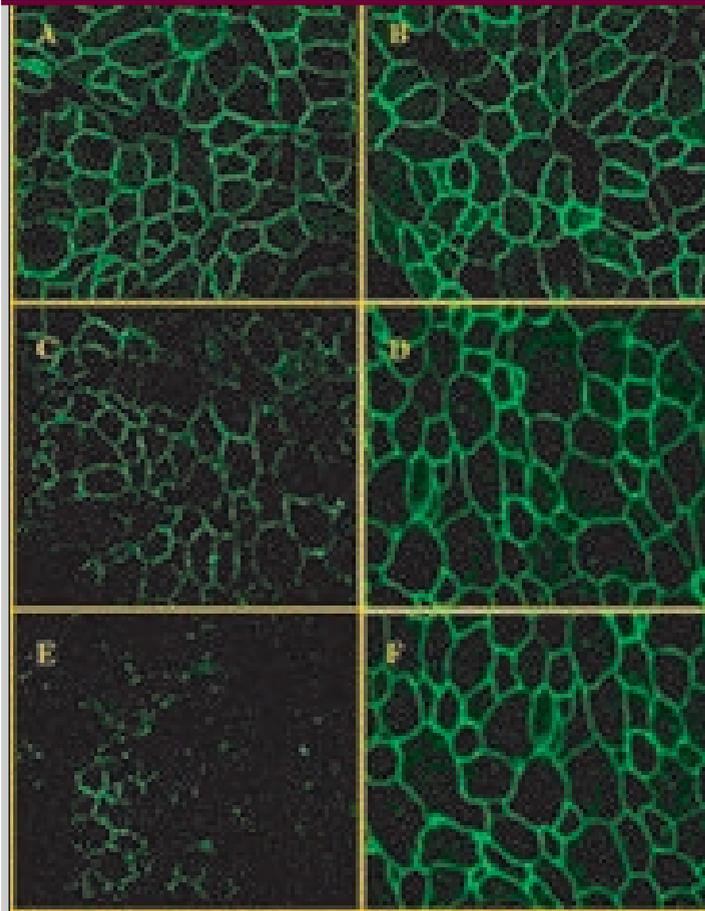


Figure 5.

Immunolocalisation de la protéine ZO-1 (associée aux jonctions serrées) dans des cellules T84.

Les figures A et B montrent la distribution normale de la protéine ZO-1 dans les cellules non infectées (A) et les cellules exposées à *Saccharomyces boulardii* (B).

La protéine ZO-1 disparaît dans les cellules infectées pendant 6 heures (C) ou 9 heures (E) par les *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC).

La distribution de la protéine ZO-1 n'est pas modifiée quand l'infection par EPEC est réalisée en présence de *Saccharomyces boulardii* (D, F) [39].

revanche, la levure inhibe la phosphorylation de certaines protéines, normalement phosphorylées en réponse à l'infection [39, 40].

Ainsi, l'infection des cellules T84 par EPEC ou EHEC engendre l'activation des trois voies de MAP (*Mitogen activating protein*) kinases : *extra-cellular-regulating protein kinase* 1 et 2 (ERK-1 et ERK-2), p38 MAP kinase et JUN-kinase. L'activation de ces kinases ne semble pas impliquée dans le phénomène d'« attachement/effacement » ni dans les modifications des jonctions serrées intercellulaires [41, 42].

En revanche, l'activation d'ERK 1,2 est directement liée à l'internalisation des bactéries. La présence de *Saccharomyces boulardii* diminue le nombre de bactéries internalisées et module également le degré de phosphorylation d'ERK-1 et 2 [41] (Figure 2). En situation physiologique normale,

l'activation par diphosphorylation des ERK-1 et 2 est impliquée dans les processus de croissance et de différenciation cellulaire en réponse à des facteurs trophiques tels que l'insuline, l'IgF-1.

La diphosphorylation de la voie p38 MAP kinase est impliquée dans le phénomène d'apoptose. Lors de l'infection par des bactéries invasives telles que *Salmonella typhimurium* [43] et *Listeria monocytogenes* [44], les voies de

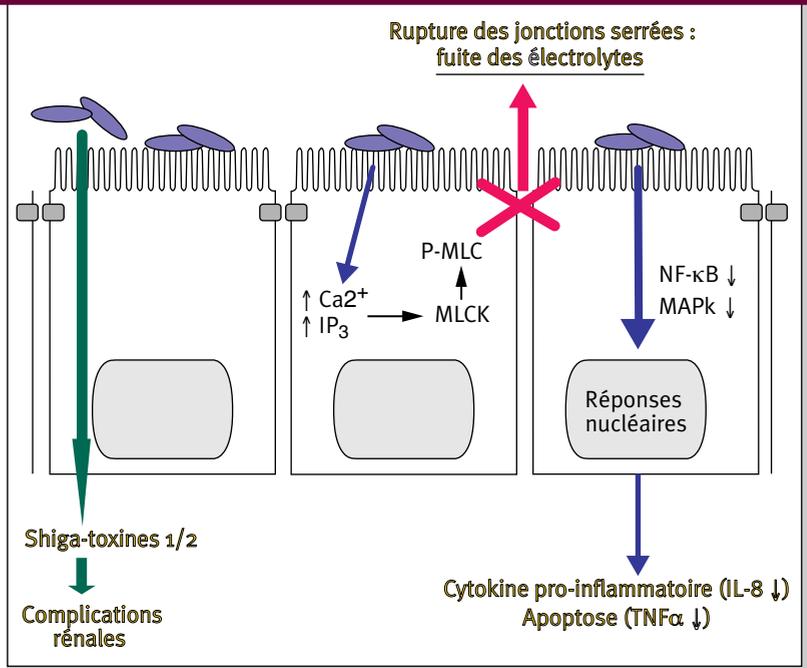
Figure 6.

Propriétés exercées par *Saccharomyces boulardii* lors d'une infection par *Escherichia coli* entéro-hémorragique (EHEC).

- *Saccharomyces boulardii* empêche la phosphorylation par EHEC de la Myosine light chain (MLC), s'opposant ainsi aux modifications de la jonction serrée : la fuite d'électrolytes est ainsi réduite.

- *Saccharomyces boulardii* limite la phosphorylation des MAP kinases (ERK 1/2, p38 et JNK), ainsi que l'activation du facteur NF-κB et diminue ainsi la synthèse de la cytokine pro-inflammatoire IL-8.

- *Saccharomyces boulardii* réduit l'apoptose induite par EHEC et diminue la synthèse du TNFα.



signalisation intracellulaire des MAP kinases ont été impliquées dans le processus invasif et la synthèse de cytokines. Czerucka *et al.* [41, 42] ont démontré que les voies MAP kinases stimulées lors d'infection par EPEC et EHEC, ainsi que la voie NF-κB induite par EHEC, sont impliquées dans la synthèse d'IL-8. *Saccharomyces boulardii* inhibe ces voies ainsi que la synthèse d'IL-8 lors d'infection par ces bactéries [40].

Par ailleurs, *Saccharomyces boulardii* empêche l'apoptose induite par EHEC et diminue la synthèse du TNFα (Figure 6).

Autres bactéries entéropathogènes

L'administration d'une dose unique de 10 mg de *Saccharomyces boulardii* à des souris gnotoxéniques inoculées oralement par une suspension de *Shigella flexneri* ou de *Salmonella typhimurium* exerce un effet protecteur vis-à-vis de la mortalité (*Shigella flexneri*) ou de la sévérité des lésions intestinales (*Salmonella typhimurium*) induites par ces agents entéropathogènes [45]. Cet effet protecteur n'est pas lié à une réduction du niveau de pullulation intestinale de ces bactéries.

Effets de *Saccharomyces boulardii* sur le tractus intestinal

Effets trophiques

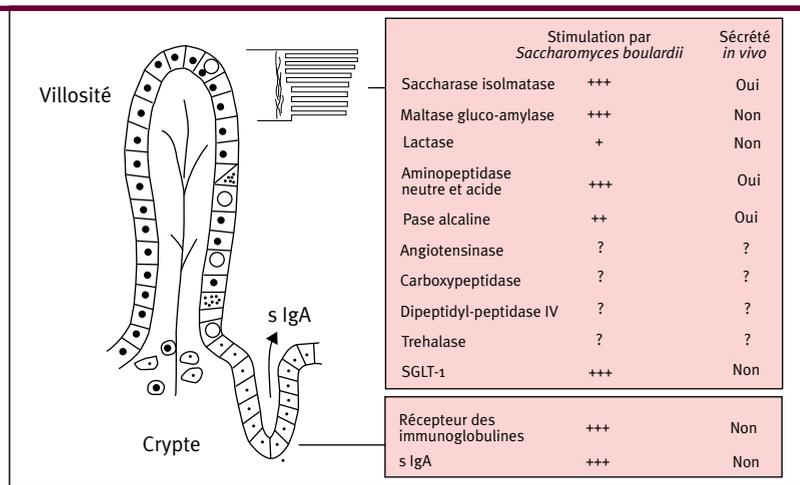
L'administration orale de *Saccharomyces boulardii* à des volontaires adultes sains pendant huit jours n'a produit aucun effet sur la morphologie intestinale (histologie conventionnelle), sur la hauteur villositaire, ni sur la profondeur des cryptes. De même, l'examen en microscopie électronique de cellules épithéliales intestinales de rats traités par *Saccharomyces boulardii* n'a montré aucune translocation intracellulaire de levure ni aucune altération morphologique des microvillosités, villosités et cryptes [46]. Utilisant une technique tridimensionnelle de microdensification de biopsies humaines, Jahn *et al.* [47] ont confirmé que, après un traitement oral par *Saccharomyces boulardii*, il n'y avait aucune différence significative dans la surface villositaire et la profondeur des cryptes. Dans une étude conduite chez l'homme et le rat, Buts *et al.* [46] ont démontré que, comparativement aux biopsies initiales, les biopsies de volontaires humains présentaient des augmentations significatives de l'activité spécifique et totale de la saccharase-isomaltase (+ 82 %), de la lactase (+ 77 %) et de la maltase (+ 75 %) après huit jours de traitement. De même, chez des rats de trente jours sevrés et traités pendant quatorze jours par *Saccharomyces boulardii*, l'activité spécifique et totale de la saccharase-isomaltase, de la maltase et de la lactase était significativement plus élevée que celle de rats témoins traités avec un placebo.

Dans une étude réalisée chez des volontaires adultes sains, Jahn *et al.* [47] ont utilisé une technique *in situ* pour mesurer l'activité d'enzymes microvillositaires sur des coupes de biopsies intestinales congelées. Après traitement par *Saccharomyces boulardii*, ces auteurs ont démontré une augmentation significative de la lactase, des α -glucosidases et de la phosphatase alcaline de + 22 % à + 55 % par rapport aux activités basales mesurées avant traitement. De ces études, il ressort que *Saccharomyces boulardii* stimule, chez l'homme comme chez le rat, l'expression des disaccharidases et de la phosphatase alcaline, enzymes qui participent à la digestion des nutriments et qui sont souvent altérées dans les entéropathies aiguës et chroniques. *Saccharomyces boulardii* sécrète, dans le milieu endoluminal, une saccharase à des niveaux tels que ce médicament probiotique est efficace dans le traitement des déficiences congénitales en saccharase-isomaltase [48]. Une étude récente [49] démontre que *Saccharomyces boulardii* libère également dans le milieu endoluminal une leucine aminopeptidase, appartenant au groupe des zinc-métalloprotéases, qui renforce la protéolyse de petits peptides N-terminaux. Ce mécanisme pourrait permettre de réduire l'allergénisation aux protéines alimentaires particulièrement au

décours de gastro-entérites aiguës. Enfin, une étude [50] a montré que l'administration orale de *Saccharomyces boulardii* à des rats pendant huit jours après une entérectomie proximale étendue à 60 %, non seulement stimulait l'activité des disaccharidases, mais stimulait également l'absorption du D-glucose couplé au Na⁺ par le symport glucose/Na⁺. L'absorption du D-glucose a été mesurée *in vitro* sur des préparations de vésicules de bordure en brosse, tant en fonction du temps d'incubation que de la concentration de glucose dans le milieu d'incubation, comparativement à des rats contrôles réséqués mais non traités et à des rats contrôles transéqués. L'expression dans la bordure en brosse de SGLT-1 de 70 kDa (sodium glucose cotransporter-1) mesurée par autoradiographie était stimulée chez les rats réséqués et traités par *Saccharomyces boulardii*. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus ultérieurement par Zaouche *et al.* [51].

Saccharomyces boulardii stimule la production de glycoprotéines de la bordure en brosse des microvillosités, comme les hydrolases, des transporteurs, l'IgA sécrétoire [26, 52] et le récepteur pour les

Figure 7.
Effets trophiques de l'administration orale de *Saccharomyces boulardii*.
Fonctions intestinales stimulées au niveau villositaire et cryptique, ainsi que facteurs trophiques sécrétés dans le milieu endoluminal par la cellule de levure elle-même.



immunoglobulines polymériques [52] dont les fonctions physiologiques et la synthèse intracellulaire diffèrent profondément. Le ou les mécanismes de cette stimulation ont été évalués récemment. Du fait que *Saccharomyces boulardii* ne pénètre pas dans les entérocytes [46], nous avons évalué l'influence potentielle de facteurs trophiques sécrétés par *Saccharomyces boulardii* durant son transit endoluminal. La Figure 7 résume les fonctions intestinales stimulées par la prise orale de *Saccharomyces boulardii* tant au niveau villositaire que cryptique, ainsi que les facteurs enzymatiques et trophiques sécrétés dans le milieu endoluminal.

Comme le montre le Tableau II, les déterminations par HPLC effectuées sur la levure lyophilisée révèlent des concentrations non négligeables de polyamines, totalisant 679 nanomoles/100 mg de préparation lyophilisée,

principalement de la spermidine (55 %) et de la spermine (43 %) avec des apports négligeables en putrescine (1,4 %) [53].

Théoriquement, de tels apports en polyamines peuvent influencer l'expression intestinale de glycoprotéines de la bordure en brosse (hydrolases, protéases, molécules de transport...). En effet, une stimulation marquée de l'activité des disaccharidases, de l'aminopeptidase et de la sécrétion endoluminale d'IgA sécrétoire a été observée dans l'intestin grêle de jeunes rats non sevrés en réponse à une ingestion orale de spermine et de spermidine équivalente à 1 000 nanomoles/jour de polyamines purifiées. Lorsque les rats étaient traités avec un apport de spermine (500 nanomoles/jour) équivalent au contenu en polyamines de la levure lyophilisée

	S. boulardii, nanomoles/mg n = 8	S. boulardii, nanomoles/mg protéines n = 8	Tableau II. Concentrations en polyamines dans les préparations lyophilisées de <i>Saccharomyces boulardii</i>
Putrescine	0,095 ± 0,014	0,28 ± 0,05	
Spermidine	3,766 ± 0,328	10,9 ± 0,84	
Spermine	2,930 ± 0,268	8,42 ± 0,67	
TOTAL	6,79	19,6	

n = nombre d'échantillons individuels analysés
Les valeurs représentent des moyennes ± DS [53]

(679 nanomoles/100 mg), des réponses enzymatiques semblables ont été observées comprenant des augmentations significatives de l'activité spécifique et totale de la saccharase (x 2,5) et de la maltase (+ 24 %). En réponse à 1 000 nanomoles de spermine, la stimulation des activités enzymatiques était proportionnellement plus grande avec une augmentation de l'activité de la saccharase (x 4,6) et de la maltase (+ 70 %). De même, des rats sevrés traités, soit par *Saccharomyces boulardii*, soit avec des apports équivalents de spermine (500 nanomoles) présentaient des augmentations parallèles et significatives de l'activité spécifique de la saccharase (+ 157 %) et de la maltase (+ 47,5 %).

Donc, l'administration orale de 100 mg de *Saccharomyces boulardii* lyophilisé contenant 679 nanomoles de polyamines, comparée ici à celle de 500 nanomoles de spermine purifiée à des rats en lactation ou à des rats sevrés, aboutit à des modifications similaires des réponses enzymatiques microvillositaires. La stimulation de la saccharase et de la maltase par l'administration orale de spermine est un phénomène dose-dépendant. Il est plus sensible que pour d'autres enzymes microvillositaires (lactase, aminopeptidase) et devient détectable pour des doses de spermine excédant 250 nanomoles/jour. De plus, à la fois *Saccharomyces boulardii* [53] et la spermine purifiée (500 nanomoles/jour) peuvent stimuler significativement la production intestinale du récepteur pour les immunoglobulines polymériques chez des rats en sevrage entre le jour 20 et le jour 40 du *post-partum*.

Parallèlement aux modifications des activités enzymatiques, le traitement oral par *Saccharomyces boulardii* produit des modifications parallèles dans

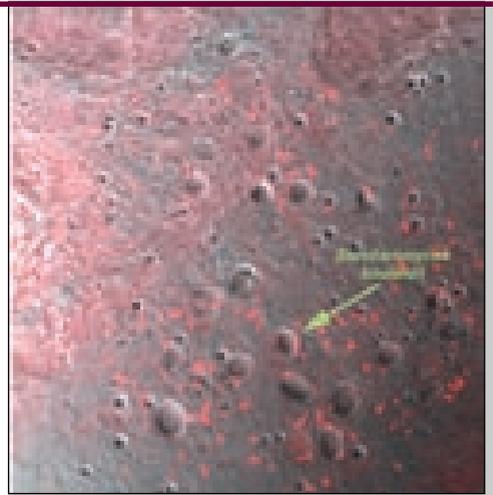
les concentrations en polyamines tant dans la muqueuse intestinale (+ 21,4 %) que dans le liquide endoluminal (+ 48 % à + 316 % au niveau du jéjunum et + 60,8 % à + 150 % au niveau de l'iléon). Les variations des concentrations des trois polyamines mesurées dans la muqueuse intestinale (putrescine : + 7 %, spermidine : + 21,9 %, spermine : + 21,4 %) étaient proportionnelles à leurs concentrations respectives mesurées dans la préparation lyophilisée de levures. En effet, la spermine et la spermidine, qui représentaient 44 % et 55 % du total des polyamines libérées par *Saccharomyces boulardii*, augmentaient dans des proportions semblables dans la muqueuse intestinale (+ 21,4 % et + 21,9 %).

En concordance avec les faibles apports en putrescine produits par la levure (1,4 %), les taux de putrescine dans la muqueuse variaient peu et n'étaient pas affectés par le traitement.

Des données expérimentales indiquent que le transport transépithélial des polyamines par les vésicules de la bordure en brosse des microvillosités est un processus sélectif et saturable, dépendant en large mesure de leurs concentrations endoluminales. Dans des échantillons de liquide jéjunal et iléal récoltés par rinçage de la lumière, suivi d'une filtration pour écarter les cellules de levure, les taux de spermidine et de spermine étaient augmentés de 48 % à 316 % chez les rats traités par *Saccharomyces boulardii* comparés aux contrôles, alors que les taux de putrescine n'étaient pas significativement modifiés. Les polyamines endoluminales (en particulier la putrescine) étant originaires de plusieurs sources comprenant certains aliments (fromages), les sécrétions intestinales, les cellules desquamées et le métabolisme de la flore

Figure 8.

Coupe de caecum de souris en microscopie confocale.
Bacteroides vulgatus + antibiotiques
+ *Saccharomyces boulardii*
(cliché M.C. Barc, Faculté de Pharmacie,
Université Paris XI)



bactérienne, les variations en concentration sont beaucoup plus grandes dans le milieu endoluminal que dans la muqueuse intestinale.

En résumé, les données ci-contre indiquent que, aux doses utilisées, la préparation lyophilisée de *Saccharomyces boulardii* exerce des effets trophiques sur la muqueuse intestinale (Figure 8), qui sont vraisemblablement

médiés par la libération endoluminale de spermine et de spermidine. Ces substances polycationiques pourraient être libérées par les levures durant leur catabolisme intestinal plutôt qu'être sécrétées par des cellules vivantes durant leur transit. En effet, seules des traces de putrescine ont été détectées dans les milieux de culture de levures après 96 heures de croissance exponentielle, sans évidence de spermine ou de spermidine dans les milieux.

En raison des effets physiologiques bien connus des polyamines exogènes sur la maturation cellulaire intestinale, l'expression d'enzymes et de mécanismes de transport, la division de cellules cryptiques, la synthèse de l'ADN et la transcription des gènes, l'apport substantiel de polyamines par *Saccharomyces boulardii* pourrait avoir des implications cliniques importantes. Bien que l'usage de *Saccharomyces boulardii* soit bien documenté dans les gastro-entérites aiguës, les diarrhées associées aux antibiotiques et les entérocolopathies dues à *Clostridium difficile* chez l'enfant, les effets trophiques potentiels de la levure pour la prévention des diarrhées chroniques persistantes, des diarrhées rebelles, de l'allergénisation aux protéines alimentaires et pour le traitement substitutif de déficiences enzymatiques congénitales (saccharase-isomaltase, tréhalase) méritent de plus amples investigations.

À côté des effets trophiques médiés par les polyamines, une voie de recherche très prometteuse est ouverte par l'étude des effets de *Saccharomyces boulardii* sur les acides gras à chaîne courte (AGCC), butyrate, acétate, propionate. Les AGCC sont l'un des métabolites les plus importants produits par la flore anaérobie du côlon ; ils jouent en particulier un rôle majeur dans l'absorption colique de l'eau et des électrolytes [54]. Sur un modèle *ex vivo* d'écosystème microbien chez le porc, l'apport de *Saccharomyces boulardii* permet de rétablir à un niveau normal la production des AGCC, diminuée sous l'effet de la destruction de la flore microbienne par la clindamycine [55]. Dans une étude de pharmacologie clinique réalisée chez dix patients recevant une nutrition entérale exclusive, le traitement par *Saccharomyces boulardii* a permis d'augmenter les concentrations fécales d'AGCC, en particulier du butyrate, les ramenant à des niveaux comparables à ceux des sujets normaux [56]. Cette propriété peut rendre compte, au moins en partie, de l'effet antidiarrhéique de *Saccharomyces boulardii* dans les situations cliniques où l'on observe une chute des AGCC en relation avec des altérations de la flore colique, telles que les diarrhées associées aux antibiotiques et les diarrhées associées à la nutrition entérale exclusive.

Effet antiscratoire

Saccharomyces boulardii diminue la sécrétion hydrique (- 39 %) et la perméabilité au mannitol (- 65 %) induites par la toxine A de *Clostridium difficile* sur l'iléon du rat [23, 25]. Par ailleurs, *Saccharomyces boulardii* inhibe la sécrétion de chlore induite par les deux voies de signalisation médiées par l'AMPc intercellulaire et les ions calcium au niveau des cellules villositaires intestinales [31, 57].

Enfin, en administration préventive chez le rat, *Saccharomyces boulardii* exerce un puissant effet sur la diarrhée sécrétoire induite par l'huile de ricin, de façon dose dépendante [58]. Cet effet est significativement inhibé par la L-arginine, suggérant l'implication de la voie oxyde-nitrique (NO) dans ce mécanisme.

Effet immunostimulant

Chez le rat en croissance, *Saccharomyces boulardii* produit un accroissement marqué (+ 57 %) des concentrations d'IgA sécrétoires dans le liquide intestinal ainsi que de la concentration de la pièce sécrétoire (+ 63 %) dans les cellules cryptiques de la muqueuse intestinale [52]. Une action comparable a été observée chez des souris BALB/c inoculées oralement par un toxoïde de la toxine A de *Clostridium difficile* résultant en une forte augmentation des taux d'IgA sécrétoires totales (x 1,8) et du taux d'IgA sécrétoires spécifiques antitoxine A (x 4,4) [26].

Effet anti-inflammatoire

Les travaux portant sur les mécanismes protecteurs de *Saccharomyces boulardii* vis-à-vis de l'infection par EPEC et EHEC ont montré que *Saccharomyces boulardii* inhibait les voies de signalisation MAP kinases et NF-κB ainsi que la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 [40]. De façon similaire, Sogioultzis a mis en évidence un facteur hydrosoluble sécrété par *Saccharomyces boulardii* qui inhibe également cette signalisation NF-κB lors de l'exposition de cellules intestinales à la toxine A de *Clostridium difficile* [59]. Ces travaux ouvrent une perspective dans la mise en place d'études cliniques de *Saccharomyces boulardii* dans le traitement des maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin (MICI).

En résumé, les mécanismes de l'action antidiarrhéique de *Saccharomyces boulardii* sont principalement définis par deux types de propriétés pharmacodynamiques :

- l'inhibition de certaines toxines bactériennes et/ou de leurs effets pathogènes,
- des effets directs sur la muqueuse intestinale faisant intervenir des effets trophiques, une action antisécrétoire, une stimulation de l'immunité intestinale et un effet anti-inflammatoire.

Études cliniques

Diarrhées associées à l'antibiothérapie et aux entérocolopathies à *Clostridium difficile*

Les diarrhées associées à l'antibiothérapie (DAA) compliquent, selon les auteurs, de 5 % à 30 % les traitements antibiotiques. La symptomatologie s'étend de la diarrhée « simple » sans déshydratation ni troubles hydro-électrolytiques à la diarrhée sécrétoire sévère susceptible de compromettre la vie du patient, le cas extrême étant la colite ou l'entérocolite pseudomembraneuse.

La physiopathologie comprend toujours la rupture de l'équilibre micro-écologique et des perturbations de la flore de barrière induites par l'élimination de certaines bactéries sensibles à l'antibiotique administré. Il est classiquement admis que *Clostridium difficile* est responsable de 10 % à 30 % des DAA et de 95 % des colites pseudomembraneuses [60]. Il est également responsable de certains cas d'entérocolopathies rebelles du nourrisson [61]. Les DAA dues à *Clostridium difficile*, outre leur gravité potentielle, se distinguent par la fréquence élevée des rechutes après traitement initial : 20 %

après l'épisode initial et jusqu'à 60 % après une première récurrence [62]. L'étiopathogénie des DAA ne se résume pas à *Clostridium difficile* : un syndrome « d'insuffisance bactérienne colique » lié à l'absence de dégradation de dérivés glucidiques par la flore bactérienne normale et/ou à un déficit en acides gras à chaîne courte a été fréquemment évoqué [63]. Par ailleurs, divers micro-organismes dont *Klebsiella oxytoca* [64] ont parfois été mis en cause. Les facteurs de risque de la DAA sont désormais mieux connus. Ils sont liés, soit au type et à la durée de l'antibiothérapie (traitements longs et répétés, poly-antibiothérapie, antibiotiques à excrétion biliaire, antibiotiques agissant sur les anaérobies, antibiotiques à large spectre), soit à des facteurs liés à l'hôte (âges extrêmes de la vie, sévérité de l'infection causale, affections digestives chroniques, interventions chirurgicales, immunosuppression, antécédents de DAA, hospitalisation) [65]. L'existence d'un ou de la combinaison de plusieurs de ces facteurs de risque peut justifier une prévention sélective des DAA. L'utilisation, en clinique, de la préparation lyophilisée de *Saccharomyces boulardii* s'inspire directement de ces considérations épidémiologiques et physiopathologiques.

Prévention des diarrhées associées aux antibiotiques

Trois études prospectives et randomisées en double aveugle contre placebo ont confirmé l'efficacité du *Saccharomyces boulardii* dans la prévention des DAA.

Dans une première étude, conduite chez cent quatre-vingt patients hospitalisés [66], *Saccharomyces boulardii* a été administré à la dose de 1 g/jour pendant l'antibiothérapie et deux semaines après son arrêt. Le pourcentage de patients développant une DAA était de 21,8 % dans le groupe placebo contre 9,5 % dans le groupe actif ($p = 0,038$).

Dans une deuxième étude bicentrique portant sur cent quatre-vingt-treize patients hospitalisés et recevant une β -lactamine associée ou non à d'autres antibiotiques [67], *Saccharomyces boulardii* administré à la dose de 1 g/jour (traitement débutant 48 heures après l'antibiothérapie et se poursuivant trois jours après son arrêt) a réduit la survenue des diarrhées dans la même proportion : 14,6 % dans le groupe placebo *versus* 7,2 % dans le groupe traité ($p = 0,03$).

Ces résultats confirment les données d'une étude antérieure réalisée chez trois cent quatre-vingt-huit patients adultes en ambulatoire [68]. Le traitement par *Saccharomyces boulardii* à la dose de 200 mg/jour pendant la durée de l'antibiothérapie (β -lactamines ou cyclines) a réduit le pourcentage de patients présentant une DAA de 17,5 % à 4,5 %.

Traitement des formes récurrentes de diarrhée et colite *Clostridium difficile*

Plusieurs études cliniques visant à évaluer l'efficacité du *Saccharomyces boulardii* dans le traitement des rechutes de colite et diarrhée à *Clostridium difficile* ont été réalisées.

Dans une étude préliminaire ouverte chez treize patients présentant des rechutes multiples de colite pseudomembraneuse à *Clostridium difficile* [69], l'administration de *Saccharomyces boulardii* prescrit à la dose de 1 g/jour pendant un mois en association au traitement standard par vancomycine a

permis d'éviter la survenue de rechutes ultérieures chez onze des treize patients.

Une étude multicentrique randomisée en double aveugle contre placebo chez cent vingt-quatre patients traités par vancomycine ou metronidazole pour un épisode de colite ou diarrhée à *Clostridium difficile* [62] a évalué l'effet de *Saccharomyces boulardii* sur la survenue de récurrences ultérieures. Chez les patients ayant déjà présenté au moins une première rechute (n = 60), l'administration de *Saccharomyces boulardii* a permis de réduire significativement la survenue de récurrences ultérieures : 64,7 % de rechutes dans le groupe placebo versus 34,6 % de rechutes dans le groupe traité par *Saccharomyces boulardii* (p = 0,04).

Une autre étude multicentrique contrôlée en double aveugle versus placebo portant sur cent soixante-dix patients avec infection intestinale multirésistante à *Clostridium difficile* traités pendant dix jours par vancomycine à forte (2 g/jour) ou faible (500 mg) dose ou par métronidazole et par *Saccharomyces boulardii* (1 g/jour) ou placebo pendant quatre semaines, a montré que le schéma thérapeutique « forte dose de vancomycine + *Saccharomyces boulardii* » représentait un traitement de choix pour la prise en charge de cette pathologie [70].

Traitement des entérocopathies

Clostridium difficile chez l'enfant

Chez l'enfant, l'infection intestinale à *Clostridium difficile* s'exprime rarement par une colite pseudomembraneuse, plus volontiers par une diarrhée aiguë ou le plus souvent par une entérocopathie chronique. Dans une étude ouverte, dix-neuf nourrissons et enfants présentant un tableau clinique de diarrhée chronique et chez lesquels un *Clostridium difficile* toxigène était le seul entéropathogène identifié à la coproculture ont été inclus. La plupart des patients avaient reçu un ou plusieurs traitements antibiotiques pour infections diverses dans les semaines ou mois précédant l'admission. Le traitement par *Saccharomyces boulardii* à la dose de 500 à 1000 mg/jour selon l'âge pendant quinze jours a conduit à une disparition rapide de la symptomatologie clinique chez dix-huit enfants et à une négativation de la toxine B chez seize d'entre eux [61].

Gastro-entérites aiguës

Une étude prospective et randomisée a évalué l'intérêt de *Saccharomyces boulardii* à la dose de 500 mg/jour, en complément de la réhydratation orale dans les entérites aiguës d'intensité moyenne du nourrisson. La comparaison à J1 et à J4 du groupe traité (n = 19) et du groupe contrôle (n = 19) a révélé une différence significative portant sur quatre critères cliniques d'appréciation : nombre, poids et consistance des selles, et temps de transit du rouge carmin [71].

Dans une étude menée en double aveugle contre placebo portant sur cent trente enfants âgés de trois mois à trois ans, l'administration de *Saccharomyces boulardii*, à la dose de 300 mg/jour, a réduit significativement la fréquence des selles dès la quarante-huitième heure de traitement. À 48 et 96 heures de traitement, le nombre de guérisons cliniques était significativement plus élevé dans le groupe traité [72].

Chez l'adulte, dans une étude en double aveugle contre placebo menée chez quatre-vingt-douze sujets présentant une diarrhée aiguë [73], l'administration de *Saccharomyces boulardii* a réduit de manière significative ($p = 0,035$), après 48 heures de traitement, la symptomatologie diarrhéique exprimée par un score composite évaluant nombre et consistance des selles.

Diarrhées du voyageur

Les touristes voyageant dans des pays au climat chaud sont exposés à des risques plus importants de diarrhée. Il s'agit de l'affection la plus fréquente chez les touristes fréquentant les régions tropicales ou sub-tropicales.

L'efficacité de *Saccharomyces boulardii* dans la prévention de la diarrhée du voyageur a été démontrée sur un vaste effectif de voyageurs se rendant dans différentes parties du monde. Un total de mille seize questionnaires répondant aux critères de réalisation de l'étude a pu être analysé pour évaluer l'efficacité de *Saccharomyces boulardii*. Le traitement a été administré cinq jours avant le départ et tout au long du voyage.

Ces patients étaient répartis en trois groupes : le premier recevait un placebo, le deuxième recevait *Saccharomyces boulardii* à la dose de 250 mg/jour et le troisième recevait *Saccharomyces boulardii* à la dose de 1 000 mg/jour.

L'incidence des diarrhées a été, respectivement, de 39,1 %, 34,4 % ($p = 0,019$ versus placebo) et 28,7 % ($p = 0,005$ versus placebo). Des différences régionales ont été observées, l'effet préventif étant plus marqué chez les voyageurs séjournant en Afrique du Nord [74].

Études cliniques portant sur d'autres affections

Des travaux cliniques ont été menés dans d'autres affections comprenant une rupture de l'équilibre de l'écosystème intestinal.

Diarrhées associées à la nutrition entérale exclusive

Trois études randomisées en double aveugle contre placebo ont montré une efficacité de *Saccharomyces boulardii* dans la prévention des diarrhées survenant chez les patients en nutrition entérale exclusive.

Chez des patients hospitalisés dans une unité de réanimation médicale, l'administration de *Saccharomyces boulardii* à la dose de 500 mg/L de solution nutritive a permis de réduire l'incidence des jours de diarrhée de 16,9 % à 8,7 % ($p < 0,001$) [75].

Chez des patients hospitalisés dans une unité de soins pour brûlés, un traitement préventif par *Saccharomyces boulardii* à la dose de 2 g/jour a diminué l'incidence des jours de diarrhée de 9,1 % à 1,5 % ($p < 0,001$) et a amélioré significativement la tolérance digestive de la nutrition entérale exclusive exprimée par le niveau d'apport calorique [76].

Enfin, une étude multicentrique (onze centres) portant sur cent vingt-huit patients a confirmé l'efficacité de *Saccharomyces boulardii*, administré à la dose de 2 g/jour, dans la prévention des diarrhées chez des sujets hospitalisés en réanimation médico-chirurgicale et bénéficiant d'une nutrition entérale exclusive [77]. Les auteurs ont observé, dans le groupe traité par *Saccharomyces boulardii*, une réduction significative du nombre de jours de diarrhée (14 % *Saccharomyces boulardii* versus 19 % placebo, $p < 0,01$) avec une efficacité relative de 29 %.

Diarrhées au cours du sida

Dans une étude ouverte portant sur dix-sept patients présentant une diarrhée chronique au cours du sida, *Saccharomyces boulardii* prescrit à la dose de 3 g/jour pendant quinze jours a exercé un effet antidiarrhéique très net avec une diminution du nombre quotidien de selles de 9,0 à 2,1 en moyenne [78]. Une étude en double aveugle, réalisée chez trente-cinq patients, a confirmé ces résultats : après une semaine de traitement, la diarrhée a été contrôlée chez 61 % des patients du groupe traité par *Saccharomyces boulardii* contre 12 % du groupe placebo ($p < 0,002$). Le nombre, le poids et le volume des selles, les douleurs abdominales, le poids corporel et l'indice de qualité de vie selon la méthode de Karnofsky ont également été améliorés de manière significative [79].

Colon irritable

Une étude clinique en double aveugle contre placebo, portant sur trente-quatre patients atteints d'un côlon irritable avec diarrhée prédominante, a montré un effet significatif du traitement par *Saccharomyces boulardii* sur le nombre et la consistance des selles ($p < 0,05$) après un mois de traitement [80].

Maladies inflammatoires cryptogoniques de l'intestin

Une étude clinique randomisée a évalué l'efficacité d'un traitement par *Saccharomyces boulardii* (1 g/jour) associé à la mésalazine (2 g/jour) versus mésalazine seule (3 g/jour) dans la prévention des rechutes de maladie de Crohn [81]. À l'issue des six mois de l'étude, le taux de rechutes a été de 37,5 % dans le groupe traité par mésalazine seule ($n = 16$) versus 6,25 % dans le groupe traité par *Saccharomyces boulardii* et mésalazine ($n = 16$, $p = 0,04$).

Une récente étude pilote ouvre des perspectives intéressantes pour le traitement d'entretien de formes modérées de rectocolite hémorragique [82].

Sécurité d'utilisation

Saccharomyces boulardii lyophilisé est un médicament bien toléré dans les conditions habituelles d'utilisation. De très rares cas d'hémocultures positives ou de fongémies à *Saccharomyces boulardii* ont été publiés. Dans les cas documentés, tous les patients étaient porteurs d'un cathéter veineux central ; un état d'immunodépression a probablement, dans certains cas, majoré l'expression de la symptomatologie [83].

Les fongémies à *Saccharomyces boulardii* ont cédé, soit spontanément à l'arrêt du produit, soit sous l'effet d'un traitement antifongique ; dans certains cas, l'ablation du cathéter veineux central a été nécessaire. La colonisation du cathéter veineux central lors de la manipulation de sachets ou de gélules paraît être le mécanisme étiopathogénique le plus probable ; en conséquence, l'administration de *Saccharomyces boulardii* lyophilisé est contre-indiquée chez les patients porteurs d'un cathéter veineux central [83, 84].

Conclusion

Bénéficiant des avancées significatives dans la connaissance du rôle physiologique de la flore intestinale, les mécanismes d'action de *Saccharomyces boulardii* sont en partie élucidés : libération *in vivo* de substances inhibitrices de certaines toxines bactériennes et/ou de leurs effets pathogènes, effets trophiques, antisécrétoire, immunostimulant et anti-inflammatoire sur la muqueuse intestinale.

L'efficacité de *Saccharomyces boulardii* lyophilisé a été cliniquement mise en évidence, par des études contrôlées, dans différents syndromes

Points clés

- *Saccharomyces boulardii* lyophilisé est un exemple de médicament probiotique dont le principe actif est constitué d'un micro-organisme vivant, destiné à traiter ou prévenir diverses affections digestives, et développé au plan réglementaire comme un médicament.
- Après administration orale répétée, *Saccharomyces boulardii* s'implante pas mais transite dans le tube digestif sous forme viable, à un niveau de concentration stable dès le troisième jour d'administration ; la levure disparaît des selles 48 heures après l'arrêt du traitement.
- Au cours de son transit intestinal, *Saccharomyces boulardii* exerce des effets pharmacodynamiques qui s'apparentent aux effets protecteurs de la flore intestinale normale. Les mécanismes d'action de *Saccharomyces boulardii* font principalement intervenir des effets inhibiteurs de certaines toxines bactériennes et/ou de leurs effets pathogènes et des effets trophiques, antisécrétoire, immunostimulant et anti-inflammatoire sur la muqueuse intestinale.
- L'activité clinique de *Saccharomyces boulardii* lyophilisé s'applique tout particulièrement aux diarrhées associées aux antibiotiques et aux infections intestinales récidivantes à *Clostridium difficile*, mais aussi à la prévention et au traitement de diverses autres affections diarrhéiques.
- Des perspectives de recherches intéressantes sont ouvertes dans le traitement d'entretien des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

diarrhéiques en rapport avec une rupture d'équilibre de l'écosystème microbien intestinal. L'activité du produit a été particulièrement documentée dans la prévention des diarrhées associées aux antibiotiques chez les malades à risque, et le traitement des infections intestinales récidivantes à *Clostridium difficile*.

Le caractère probiotique (micro-organisme vivant) du principe actif du médicament rend compte de la complexité de ses mécanismes d'action et de la diversité de ses applications cliniques potentielles.

Références

1. Hennequin C, Thierry A, Richard GF, *et al.* Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Clin Microbiol* 2001 ; 39 : 551-9.
2. Maillié M, Nguyen Van P, Bertout S, Vaillant C, Bastide JM. Genotypic study of *Saccharomyces boulardii* compared to the *Saccharomyces sensu stricto* complex species. *J Mycol Med* 2001 ; 11 : 19-25.
3. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* 1991 ; 32 : 439-42.
4. Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 2001 ; 73 : 4305-65.
5. Elmer GW, Surawicz CM, McFarland LV. Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *JAMA* 1996 ; 275 : 870-6.
6. McFarland LV, Bernasconi P. *Saccharomyces boulardii*: a review of an innovative biotherapeutic agent. *Microbiol Ecology Health Dis* 1993 ; 6 : 57-171.
7. Bergogne-Bérézin E. Impact écologique de l'antibiothérapie. Place des micro-organismes de substitution dans le contrôle des diarrhées et colites associées aux antibiotiques. *Presse Med* 1995 ; 24 : 145-56.
8. Ducluzeau R, Bensaada M. Effet comparé de l'administration unique ou en continu du *Saccharomyces boulardii* sur l'établissement de diverses souches de *Candida* dans le tractus digestif de souris gnotoxéniques. *Ann Microbiol (Paris)* 1982 ; 133 : 491-501.
9. Bléhaut H, Massot J, Elmer GW, Levy RH. Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat. *Biopharm Drug Dispos* 1989 ; 10 : 353-64.
10. Boddy AV, Elmer GW, McFarland LV, Levy RH. Influence of antibiotics on the recovery and kinetics of *Saccharomyces boulardii* in rats. *Pharm Res* 1991 ; 8 : 796-800.
11. Klein SM, Elmer GW, McFarland LV, Surawicz CM, Levy RH. Recovery and elimination of the biotherapeutic agent, *Saccharomyces boulardii*, in healthy human volunteers. *Pharm Res* 1993 ; 10 : 1615-9.
12. Elmer GW, McFarland LV, Surawicz CM, Dankos L, Greenberg RN. Behavior of *Saccharomyces boulardii* in recurrent healthy human volunteers. *Aliment Pharmacol Ther* 1999 ; 13 : 1663-8.
13. Toothaker RD, Elmer GW. Prevention of Clindamycin-induced mortality in hamster by *Saccharomyces boulardii*. *Antimicrobial Ag Chemother* 1984 ; 26 : 552-6.
14. Corthier G, Dubois F, Ducluzeau R. Prevention of *Clostridium difficile* induced mortality in gnotobiotic mice by *Saccharomyces boulardii*. *Can J Microbiol* 1986 ; 32 : 294-6.
15. Corthier G, Lucas F, Jouvart S, Castex F. Effect of oral *Saccharomyces boulardii* treatment on the activity of *Clostridium difficile* toxins in mouse digestive tract. *Toxicon* 1992 ; 30 : 1583-9.
16. Massot J, Sanchez O, Couchy R, Antoin J, Parodi AL. Bacterio-pharmacological activity of *Saccharomyces boulardii* in Clindamycin induced colitis in the hamster. *Arzn-Forsch/Drug Res* 1984 ; 34 : 794-7.
17. Castex F, Corthier G, Joubert S, Elmer GW, Lucas F, Bastide M. Prevention of *Clostridium difficile*-induced experimental pseudomembranous colitis by *Saccharomyces boulardii*: a scanning electron microscopic and microbiological study. *J Gen Microbiol* 1990 ; 136 : 1085-9.
18. Corthier G, Muller MC, Wilkins TD, L'Haridon R. Protection against pseudomembranous colitis in gnotobiotic mice by use of monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxin A. *Infect Immun* 1991 ; 59 : 1192-5.
19. Czerucka D, Nano JL, Bernasconi P, Rampal P. Réponse aux toxines A et B de *Clostridium difficile* d'une lignée de cellules épithéliales de rat : IRD 98. Effet de *Saccharomyces boulardii*. *Gastroenterol Clin Biol* 1991 ; 15 : 22-7.
20. Elmer GW, Corthier G. Modulation of *Clostridium difficile* induced mortality as a function of the dose and viability of the *Saccharomyces boulardii* used as a preventative agent in gnotobiotic mice. *Can J Microbiol* 1991 ; 37 : 315-7.
21. Elmer GW, McFarland LV. Suppression by *Saccharomyces boulardii* of toxinogenic *Clostridium difficile* overgrowth after Vancomycin treatment in hamsters. *Antimicrobiol Ag Chemother* 1987 ; 31 : 129-31.
22. CzeruckaD, Rampal P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes Infect* 2002 ; 4 : 733-9.

23. Pothoulakis C, Kelly CP, Joshi MA, *et al.* *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology* 1993 ; 104 : 1108-15.
24. Castagliuolo I, LaMont JT, Nikulasson ST, Pothoulakis C. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. *Infect Immun* 1996 ; 12 : 5225-32.
25. Castagliuolo I, Riegler MF, Valenick L, LaMont JT, Pothoulakis C. *Saccharomyces boulardii* protease mediates *Clostridium difficile* toxin A and B effects in human colonic mucosa. *Infect Immun* 1999 ; 67 : 302-7.
26. Qamar A, Aboudola S, Wamy M, *et al.* *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. *Infect Immun* 2001 ; 69 : 2762-5.
27. Tasteyre A, Barc MC, Karjalainen T, Bourlioux P, Collignon A. Inhibition of *in vivo* cell adherence of *Clostridium difficile* by *Saccharomyces boulardii*. *Microbiol Pathogen* 2002 ; 32 : 219-25.
28. Vidon N, Huchet B, Rambaud JC. Influence de *Saccharomyces boulardii* sur la sécrétion jéjunale induite chez le rat par la toxine cholérique. *Gastroenterol Clin Biol* 1986 ; 10 : 13-6.
29. Czerucka D, Nano JL, Bernasconi P, Rampal P. Réponse à la toxine cholérique de deux lignées de cellules épithéliales intestinales. Effet de *Saccharomyces boulardii*. *Gastroenterol Clin Biol* 1989 ; 13 : 383-7.
30. Czerucka D, Roux I, Rampal P. *Saccharomyces boulardii* inhibits secretagogue-mediated adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate induction in intestinal cells. *Gastroenterology* 1994 ; 106 : 65-72.
31. Czerucka D, Rampal P. Effect of *Saccharomyces boulardii* on cAMP-and Ca²⁺-dependent Cl⁻ secretion in T84 cells. *Dig Dis Sci* 1999 ; 44 : 2359-68.
32. Barrett KE. Positive and negative regulation of chloride secretion. *Am J Physiol* 1993 ; 265 : C859-68.
33. Venglarik CJ, Bridges RJ, Frizel RA. A simple assay for agonist-regulated Cl and K conductances in salt-secreting epithelial cells. *Am J Physiol* 1990 ; 259 : C358-64.
34. Massot J, Desconclois M, Astoin J. Protection par *Saccharomyces boulardii* de la diarrhée à *Escherichia coli* du souriceau. *Annal Pharm Franc* 1982 ; 40 : 445-9.
35. Nataro J, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998 ; 11 : 142-201.
36. Philpott DJ, McKay DM, Sherman PM, Perdue MH. Infection of T84 cells with enteropathogenic *Escherichia coli* alters barrier and transport functions. *Am J Physiol* 1998 ; 33 : G634-45.
37. Savkovic SD, Koutsouris A, Hecht G. Attachment of a non invasive enteric pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli*, to cultured human intestinal epithelial monolayers induces transmigration of neutrophils. *Infect Immun* 1996 ; 64 : 4480-7.
38. Yuhan R, Koutsouris A, Savkovic SD, Heicht G. Enteropathogenic *Escherichia coli*-induced myosin light chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1997 ; 113 : 1873-82.
39. Czerucka D, Dahan S, Mograbi B, Rossi B, Rampal P. *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Infect Immun* 2000 ; 68 : 5998-6004.
40. Dahan S, Dalmasso G, Imbert V, Peyron JF, Rampal P, Czerucka D. *Saccharomyces boulardii* interferes with enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced signaling pathways in T84 cells. *Infect Immun* 2003 ; 71 : 766-73.
41. Czerucka D, Dahan S, Mograbi B, Rossi B, Rampal P. Implication of mitogen-activated protein kinases in T84 cell responses to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* 2001 ; 69 : 1298-305.
42. Dahan S, Busutill V, Imbert V, Peyron JF, Rampal P, Czerucka D. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection induces interleukin-8 production via activation of mitogen-activated protein kinases and the transcription factors NF-kappa B and AP-1 in T84 cells. *Infect Immun* 2002 ; 70 : 2304-10.
43. Hobbies S, Chen LM, Davis RJ, Galan JE. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1997 ; 57 : 1290-8.
44. Tang P, Sutherland YA, Gold MR, Finlay BB. *Listeria monocytogenes* invasion of epithelial cells requires the MEK-1/ERK-2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Infect Immun* 1998 ; 66 : 1106-12.

45. Rodrigues ACP, Nardi RM, Bambirra EA, Viera EC, Nicoli JR. Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* conventional and gnotobiotic mice. *J Appl Bacteriol* 1996 ; 91 : 251-6.
46. Buts JP, Bernasconi P, Van Craynest MP, Maldague P, De Meyer R. Response of human and rat small intestinal mucosa to oral administration of *Saccharomyces boulardii*. *Pediatr Res* 1986 ; 20 : 192-6.
47. Jahn HU, Ullrich R, Schneider T, et al. Immunology and tropical effects of *Saccharomyces boulardii* on the small intestine in healthy human volunteers. *Digestion* 1996 ; 57 : 95-104.
48. Harms HK, Bertele-Harms RM, Bruer-Kleis D. Enzyme substitution therapy with the yeast *Saccharomyces boulardii* in congenital sucrase isomaltase deficiency. *N Engl J Med* 1987 ; 316 : 1306-9.
49. Buts JP, De Keyser N, Stilmant C, Sokal E, Marandi S. *Saccharomyces boulardii* enhances N-terminal peptide hydrolysis in suckling rat small intestine by endoluminal release of a zinc-binding metalloprotease. *Pediatr Res* 2002 ; 51 : 528-34.
50. Buts JP, De Keyser N, Marandi S, et al. *Saccharomyces boulardii* upgrades cellular adaptation after proximal enterectomy in rats. *Gut* 1999 ; 45 : 89-96.
51. Zaouche A, Loukil C, de La Gausie P, et al. Effects of oral *Saccharomyces boulardii* on bacterial overgrowth, translocation and intestinal adaptation after small bowel resection in rats. *Scand J Gastroenterol* 2000 ; 35 : 160-5.
52. Buts JP, Bernasconi P, Vaerman JP, Dive C. Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. *Dig Dis Sci* 1990 ; 35 : 251-6.
53. Buts JP, De Keyser N, De Raedemaeker L. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. *Pediatr Res* 1994 ; 36 : 522-7.
54. Bowling TF, Raimundo AH, Grimble GK, Silk DB. Reversal by short-chain fatty acids of colonic fluid secretion induced by enteral feeding. *Lancet* 1993 ; 342 : 1266-8.
55. Breves G, Faul K, Schröder B, Holst HF, Caspary W, Stein J. Application of the colon-stimulation technique for studying the effects of *Saccharomyces boulardii* on basic parameters of porcine cecal microbial metabolism disturbed by Clindamycin. *Digestion* 2000 ; 61 : 193-200.
56. Schneider SM, Girard-Pipau F, Filippi J, et al. Effects of *Saccharomyces boulardii* on the intestinal flora of patients on long-term enteral nutrition. *Gastroenterology* 2002 ; 122 : A-459 (abstract).
57. Krammer M, Karbach U. Antidiarrheal action of the yeast *Saccharomyces boulardii* in the rat small and large intestine by stimulating chloride absorption. *Z Gastroenterol* 1993 ; 31 : 73-7.
58. Girard P, Pansart Y, Lorette I, Gillardin JM. Dose-response relationship and mechanism of action of *Saccharomyces boulardii* in castor oil-induced diarrhea in rats. *Dig Dis Sci* 2003 ; 48 : 770-4.
59. Sogioltzits, et al. *Gastroenterology* 2003 ; 125 : 606 abstract.
60. Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT. Pseudomembranous colitis. *N Engl J Med* 1994 ; 330 : 257-62.
61. Buts JP, Corthier G, Delmée M. *Saccharomyces boulardii* for *Clostridium difficile*-associated enterocolopathies in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993 ; 16 : 419-25.
62. McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, et al. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *JAMA* 1994 ; 271 : 1913-8.
63. Clausen MR, Bonnen H, Tvede M, Mortensen PB. Colonic fermentation to short-chain fatty acids is decreased in antibiotic-associated diarrhea. *Gastroenterology* 1991 ; 101 : 1497-504.
64. Benoit R, Dorval D, Loulergue J, et al. Diarrhée post-antibiotique : rôle de *Klebsiella oxytoca*. *Gastroenterol Clin Biol* 1992 ; 16 : 860-4.
65. McFarland LV. Risk factors for antibiotic-associated diarrhea. A review of the literature. *Ann Med Int* 1998 ; 149 : 261-6.
66. Surawicz CM, Elmer GW, Speelman P, McFarland LV, Chinn J, Van Belle G. Prevention of antibiotic associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology* 1989 ; 96 : 981-8.
67. McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, et al. Prevention of beta-lactam associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am J Gastroenterol* 1995 ; 90 : 439-48.
68. Adam J, Barret A, Barret-Bellet C. Essais cliniques contrôlés en double insu de l'Ultra-Levure lyophilisée. Étude multicentrique par 25 médecins de 388 cas. *Med Chir Dig* 1976 ; 5 : 401-5 .

Index

A

Anaérobiose : 4, 15, 37, 41, 83
Acétate : 52, 64, 67, 69, 70, 72, 78, 114, 234
Acéto-genèse réductrice : 69, 70
Acides biliaires : 37, 39, 50, 63, 74, 76, 77, 100, 114, 126
Acides gras à chaîne courte (AGCC) : 52, 61, 64, 72, 78, 101-103, 105, 107, 108, 111, 114-117, 120, 122, 153, 202, 203, 234, 235
ADN ribosomique (ADNr) : 7-10, 13, 14, 19, 23, 31
Agent biothérapeutique : 42, 221
Allergie : 31, 134, 136, 214-216
Animaux axéniques : 119-124, 135, 136, 141, 151, 162, 222
Animaux conventionnels : 120-124, 135, 136, 141, 162, 177
Apoptose : 109, 110, 116-118, 125, 145, 155, 160, 167, 227-229
ARN ribosomique (ARNr) : 7-14, 19, 23-25

B

Bactéries aérobies : 28, 32, 83, 154, 175, 176, 178
Bactéries anaérobies : 19, 21, 22, 25, 28, 29, 32, 99, 152-154, 171, 172, 174, 177, 178, 181, 183, 193, 194, 209, 212
Ballonnement : 87-89, 92, 103, 214
Bifidobactéries : 12, 20, 28, 29, 39, 43, 45, 47, 49, 51, 52, 55, 67, 100, 132, 203, 209, 211-213
Biodiversité : 23, 32, 41, 171, 172
Biopsies : 25, 26, 44, 45, 48, 153, 174, 175, 184-187, 189, 190, 194, 230
Butyrate : 52, 64, 67, 68, 72, 78, 99, 101, 104, 107, 14-118, 120-123, 126, 128, 153, 234

C

Cancer colorectal : 52, 125-127, 212, 213
Cellules souches : 107-110, 112
Chimiokines : 133, 154-159, 167, 188
Cinétique d'implantation : 27, 28, 31, 32
Clostridium difficile : 40, 42, 173, 174, 181, 183, 186-194, 201, 203, 205, 206, 215, 216, 222-226, 234-237, 240
Colectomie : 152, 167, 192, 211

Colite hémorragique : 181, 184-186, 194, 227
Colite inflammatoire : 151, 157, 160
Colite pseudomembraneuse : 181, 187, 189, 190, 205, 235-237
Côlon irritable : 103, 239
Colonocyte : 108, 111, 115-118, 120-122, 128, 145, 153
Coloscopie : 98, 185, 186, 189
Contractions phasiques : 97, 104
Critères de Rome : 102, 103
Crypte : 40, 107-113, 115, 117, 120, 123, 126, 128, 190, 213, 230
Culture anaréobique : 23
Cytokines : 47, 48, 50, 133, 134, 136, 144, 145, 154-158, 160, 163, 165, 167, 215, 227-229, 235
Cytométrie : 15, 24-26
Cytotoxine B : 191

D

Diarrhée du voyageur : 38, 42, 206, 207, 216, 237
Diarrhées associées aux antibiotiques (DAA) : 42, 181-197, 201, 203-205, 234-236
Diarrhées associées à l'alimentation entérale : 234, 237
Diarrhées au cours du sida : 238
Diarrhées infectieuses : 171-180, 206-209
Distension abdominale : 87, 89, 91
Dyspepsie : 209, 210

E

Écosystème intestinal : 7, 14, 37, 181, 238
Effet anti-inflammatoire : 235, 239, 240
Effet de barrière : 39, 41, 172, 173, 177, 178, 181
Effet immunostimulant : 143, 234, 239, 240
Effet antisécrétoire : 233, 234, 239, 240
Effets indésirables : 39, 42, 48, 50, 53, 54
Effet trophique : 223, 230, 231, 233-235, 239, 240
Électrophorèse : 9, 15, 26, 172, 173
Endoscopie : 182, 185, 189-191
Entérobactéries : 10-12, 23, 27-30, 73, 153, 172
Entérocolopathies : 234, 235, 237

Épidémie : 30, 183, 187, 193

Épidémiologie : 181, 182, 187

Épithélium : 11, 20, 37, 40, 44, 63, 74, 107-130, 139, 145, 153, 190, 202

Escherichia coli : 6, 20, 22, 25, 28, 40, 43, 127, 132, 136, 137, 142, 143, 151-154, 162, 167, 173-177, 206-208, 210, 211, 224, 227-229

F

Facteurs de contrôle : 37-58

Facteurs de risque : 30, 38, 42, 49, 126, 164, 181-183, 187, 205, 235, 236

Flore allochtone : 19, 20, 22, 32, 172

Flore autochtone : 19, 22, 32, 38

Flore de transit : 19

Flore dominante : 22, 29, 32, 44, 136, 147, 194, 222

Flore endogène : 19, 37-39, 42, 55, 152, 167, 201

Flore fécale : 20, 22-28, 31, 32, 39, 41, 126, 135, 137, 142, 143, 153, 194

Flore glycolytique : 66

Flore hydrolytique : 65

Fonctions métaboliques : 21, 61-80, 153

Fraction cultivable : 6

Fructo-oligosaccharides (FOS) : 51, 52, 54, 55, 62

G

Gastro-entérites aiguës : 230, 234, 237

Gaz : 6, 53, 54, 61, 64, 68, 69, 78, 81-95, 99, 103, 114

Glucides : 51, 61-63, 67, 68, 71-73, 78, 83, 85, 101, 104, 114, 118, 123, 124, 203

H

Helicobacter pylori : 201, 212

Homéostasie : 19, 81, 84, 108, 109, 111, 117, 118, 128, 131, 133, 139, 143, 147, 161

Hormones stéroïdiennes : 74, 77

Hybridation : 10-13, 15, 23-27, 31

I

Immunsation : 138, 188

Immunité acquise : 133, 138

Immunité innée : 133-135

Immunodéprimé(s) : 38, 49

Immunothérapie : 193

Inflammation : 102, 133, 151, 153-155, 158-165, 186, 188, 210, 211

Intestin irritable : 37, 40, 54, 88, 97, 102, 104, 216

Intolérance au lactose : 213

K

Klebsiella oxytoca : 174, 181, 184-186, 194, 203, 235

L

Lactulose : 41, 51-54, 101, 104, 210, 214

Lamina propria : 107, 138, 145, 154, 158, 160-162, 186, 188, 190, 225

Lipides : 46, 62, 86, 89, 113, 123

Lipopolysaccharides : 48, 133, 161, 167

Lymphocytes : 47, 48, 102, 139, 141, 157, 158, 160-162, 164, 167

M

Macrophage : 48, 133, 134, 136, 145, 154, 158-161, 164, 202

Maladie de Crohn : 9, 37, 38, 47, 48, 151-154, 156, 158-167, 210, 211, 239

Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) : 151-170, 192, 210, 211, 235

Médicament probiotique : 221, 235, 240

Mégacôlon : 189, 191

Métabolisme : 61, 63, 64, 67, 68, 70-77, 81, 82, 84, 114, 115, 119, 121, 123, 124, 146, 173, 181, 201, 233

Méthanogenèse : 69

Méthodes moléculaires : 12, 15, 19, 23, 24, 31

Métronidazole : 42, 154, 187, 191, 192, 194, 205, 206, 211, 237

Microflore saprophyte : 171-173, 175-178

Molécules « signal » : 124, 125, 128

Motricité colique : 97-106

Motricité intestinale : 40, 54, 95

Mucines : 40, 62, 63, 66, 114, 118, 153, 202

N

Nutrition entérale : 234, 238

Nutrition parentérale : 115

P

PCR : 15, 156

Perméabilité intestinale : 162, 209, 210, 225

Pharmacocinétique : 42-45, 55, 201, 221

Pharmacologie : 201, 202, 224

Plaques de Peyer : 140, 145

Pneumatose kystique : 81, 90-92

Polyamines : 47, 73, 74, 114, 118, 119, 125, 126, 231-234

Prébiotique : 37, 39, 51-55, 100
Prévention : 38, 42, 46, 52, 124, 126, 203-206, 208, 209, 211, 213, 214, 225, 234, 236-240
Probiotique : 20, 37-39, 42-51, 55, 100, 103, 104, 126, 127, 137, 142, 144-147, 152, 171, 177, 178, 184, 192, 194, 201-221, 240
Prolifération : 97, 107, 108, 110, 112, 113, 115-118, 120, 125, 127, 155, 156, 181, 203, 205, 213, 214
Propionate : 52, 61, 64, 67, 68, 72, 78, 99, 101, 104, 114, 234
Protéases : 61, 71, 72, 193, 224, 225, 231
Provocation gazeuse : 85-90
Pullulation : 22, 49, 214, 229

R

Rechutes : 152, 153, 192-194, 205, 206, 211, 216, 222, 235, 236, 239
Récidives : 152, 159, 167, 188, 192, 193, 201, 205, 206, 211, 235, 236
Rectocolite hémorragique : 50, 118, 145, 151-153, 156, 158, 159, 161, 162, 211, 239
Réponse humorale : 133, 134, 138
Rétention gazeuse : 85, 87, 89, 92
Rotavirus : 47, 48, 142, 176, 177, 207-209, 215, 216

S

Saccharase : 46, 214, 230, 232, 234
Salmonelle (*Salmonella*) : 40, 145, 174, 183, 203
Sensibilité colique : 102
Shigella : 174, 176

Sida : 40, 238
Sondes : 10-13, 23-27, 31, 98, 182
Sondes oligonucléotidiques : 10, 172
Stérols : 62, 63, 74, 78
Suc pancréatique : 39, 63, 201
Sulfato-réduction : 69
Survie : 39, 43-45, 47, 155, 224
Symbiose : 107, 123
Symbiotique : 19, 51, 131
Système immunitaire intestinal : 28, 31, 40, 131, 139-143, 145, 147

T

Test respiratoire : 41, 83, 88, 91, 101, 212
TNF α : 48, 133, 136, 156, 158, 163-165, 167, 229
Tolérance orale : 139, 140, 143, 144, 214
Transit : 19-21, 37, 44, 45, 55, 71, 82, 84-86, 88-90, 92, 99-101, 103, 104, 114, 132, 184, 192, 194, 201, 204, 223, 231, 237, 240
Transmission nosocomiale : 205
Troubles fonctionnels intestinaux (TFI) : 54, 87, 209

U

Ulcérations : 49, 151, 152, 154, 159, 185, 190, 210

V

Vancomycine : 49, 51, 187, 191, 192, 205, 206, 236, 237
Vibrio cholerae : 175, 224, 225