

Probiotiques, bactéries probiotiques, levains

Survie et effets chez l'homme des bactéries ingérées dans les laits fermentés

Y Bouhnik

INSERM U290, hôpital Saint-Lazare, 107 bis, rue du Faubourg-Saint-Denis,
75475 Paris Cedex 10, France

Résumé — Les bactéries lactiques constituent un apport majeur de probiotiques dans les pays industrialisés. Pour exercer leurs effets sur l'hôte, il est nécessaire qu'ils atteignent vivants leur site d'action à un niveau de population suffisant, de l'ordre de 10^7 bactéries/ml. Excepté au moment de la naissance, les facteurs de défense de l'hôte s'opposent efficacement à l'implantation durable de toute bactérie exogène dans la flore colique dominante. Cependant, ce «rejet» des bactéries exogènes n'est pas incompatible avec l'expression d'activités métaboliques des bactéries en transit, à condition que leur administration soit poursuivie. Après son ingestion dans un lait fermenté, *Bifidobacterium* sp présente une survie remarquable, lui permettant d'atteindre des concentrations coliques supérieures à 10^9 bact/ml, ie compatibles avec l'expression d'effets probiotiques. Plusieurs travaux ont démontré que *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* amélioraient la digestibilité du lactose chez les sujets intolérants à ce disaccharide. L'ingestion de *Lactobacillus* sp et de *Bifidobacterium* sp entraîne des modifications quantitatives et qualitatives de la flore bactérienne colique comme la diminution de certaines bactéries endogènes potentiellement pathogènes ou la diminution de certaines activités enzymatiques bactériennes fécales incriminées dans la cancérogénèse rectocolique. Cependant, la signification de ces effets et les principaux mécanismes d'action des probiotiques ne sont pas connus.

bifidobactérie / lactobacille / lait fermenté / probiotique

Summary — **Survival and effects of bacteria ingested in fermented milk in man.** *Lactic acid bacteria constitute a significant proportion of probiotics in developed countries. The prerequisite to exert a probiotic effect on the host is that they reach their site of action alive and at a sufficiently high population level, ie 10^7 bact/ml in the environment where they will be active. Exogenous bacteria cannot colonize the intestinal tract because of the barrier effect exerted by indigenous intestinal microflora, except in the newborn. However, even in the absence of intestinal colonization, exogenous bacteria can exert significant probiotic effects, provided they are in continuous transit in the gut. Following its ingestion in fermented milk, exogenous Bifidobacterium sp reach a fecal level higher than 10^9 bact/ml, ie compatible with metabolic probiotic activities. Several works have demonstrated that yogurt bacteria, Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus, improve lactose digestibility in lactase deficient subjects. Lactobacillus sp and Bifidobacterium sp ingestion leads to quantitative and qualitative alterations in colonic flora, such as a drop in fecal counts of potentially harmful bacteria and a decrease in fecal bacterial enzymatic activities which play a role in colonic carcinogenesis. However, the significance of such effects and the mechanisms of action of probiotics are still unknown.*

bifidobacteria / lactobacillus / fermented milk / probiotics

INTRODUCTION

Dans les pays industrialisés, les laits fermentés constituent une part importante et croissante de la consommation alimentaire, apportant 10^9 à 10^{10} bactéries vivantes pour 100 g de produit. Depuis les théories de Metchnikoff sur les effets bénéfiques des bactéries lactiques sur la santé (Metchnikoff, 1908), l'attention s'est portée sur ces micro-organismes et de nombreux travaux, résumés dans plusieurs articles récents, ont été effectués afin d'apprécier leurs effets, (Hitchins et McDonough, 1989; Gorbach, 1990; Marteau *et al*, sous presse). Les laits fermentés constituent un apport majeur de probiotiques, récemment redéfinis comme des «*suppléments alimentaires microbiens exerçant un effet bénéfique sur l'hôte en améliorant son écosystème intestinal*» (Fuller, 1991). Cette définition ne fait pas la distinction entre les micro-organismes qui ne font que transiter dans le tube digestif, et ceux, s'il en existe, capables de s'implanter à un niveau de population suffisant pour exprimer des activités métaboliques. Cette notion de niveau de population est fondamentale pour l'expression d'une activité métabolique décelable, et concerne aussi bien les bactéries autochtones que les bac-

téries en transit. Le seuil limite est difficile à préciser, car il dépend probablement du segment intestinal où l'effet est recherché, mais doit être de l'ordre de 10^6 à 10^7 micro-organismes/g de contenu intestinal. Il est regrettable que la majorité des études sur les effets probiotiques des micro-organismes ne prennent pas en considération ces paramètres. La composition et l'origine des principaux probiotiques utilisés chez l'homme est rapportée dans le tableau I. Il faut souligner que l'origine du probiotique, si elle est fondamentale pour permettre une implantation durable (spécificité d'espèce), ne conditionne pas la survenue des effets des micro-organismes, qui ne font que transiter dans l'intestin.

FLORE BACTÉRIENNE COLIQUE

Dans les premières heures qui suivent la naissance, l'intestin, initialement stérile est rapidement colonisé par les bactéries de l'environnement, principalement d'origine maternelle, et la flore intestinale ainsi constituée va rester relativement stable tout au long de la vie de l'individu (Keusch et Gorbach, 1985). Cette stabilité est assurée par plusieurs facteurs physico-chimiques et par

Tableau I. Composition des probiotiques.

	Origine		
	Humaine	Animale	Végétale
<i>Streptococcus thermophilus</i>		X	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>		X	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	X	X	
<i>Lactobacillus casei</i> (GG)	X		
<i>Bifidobacterium longum</i>	X		
<i>Bifidobacterium breve</i>	X		
<i>Bifidobacterium animalis</i>		X	
<i>Streptococcus faecium</i>	X		
<i>Saccharomyces boulardii</i>			X
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			X

les bactéries indigènes de la flore colique qui exercent vis-à-vis des micro-organismes exogènes un effet de barrière permissif ou drastique aboutissant à leur élimination (Ducruzeau, 1989). Ces mécanismes semblent extrêmement puissants et spécifiques et la possibilité d'implanter une bactérie exogène non pathogène dans la flore dominante de l'homme n'a pas été démontrée de façon convaincante.

Les mécanismes responsables de la survenue de l'effet de barrière sont mal connus, mais l'on sait que les interactions et la densité bactériennes coliques jouent un rôle important (Keusch et Gorbach, 1985).

L'administration d'antibiotiques (rifampicine : 300 mg x 3/j et streptomycine : 1000 mg x 1/j) pendant 6 j associés, à partir du 3^e j, à une souche de *Bifidobacterium* sp résistante à ces antibiotiques n'a pas permis, chez 6 volontaires sains, l'implantation de la souche ingérée qui n'était plus détectée dans les selles quelques jours après l'arrêt de son administration (Bouhnik *et al*, 1992a). L'administration de soluté osmotique diminuant globalement la masse bactérienne colique n'a non plus eu d'effets (Bouhnik *et al*, 1991).

En fait, le seul moment privilégié pour implanter dans la flore de l'homme un micro-organisme exogène semble être la naissance alors que l'intestin est relativement stérile et les mécanismes de défense, notamment le système immunitaire, encore immatures. Un succès a ainsi été obtenu en utilisant des souches de *E coli* dépourvues de plasmides (Duval-Iflah *et al*, 1982) et, plus récemment, dans près de 20% des cas avec une souche de *Bifidobacterium bifidum* (Hudault *et al*, in press).

SURVIE DES BACTÉRIES LACTIQUES EN TRANSIT

L'absence d'implantation de bactéries exogènes n'est cependant pas incompatible

avec la survenue d'éventuels effets, pourvu que ces micro-organismes atteignent vivants un niveau de concentration suffisant sur leur site d'action. La grande majorité des probiotiques utilisés chez l'homme agissent selon ce mécanisme.

Les bactéries du yaourt

Lactobacillus bulgaricus et *Streptococcus thermophilus* ont une faible capacité de résistance à l'acide. Cependant, lorsqu'elles sont ingérées dans un yaourt, le transporteur exerce un effet tampon qui améliore leur survie. Après ingestion de yaourt, *L bulgaricus* atteint des concentrations duodénales supérieures à 10^5 CFU/ml, correspondant à un pourcentage de survie de l'ordre de 1% (Pochart *et al*, 1989). Dans les selles, les bactéries du yaourt ne sont pas détectées après leur ingestion.

Lactobacillus acidophilus

In vitro, la résistance intrinsèque de *L acidophilus* est nettement supérieure à celle de *L bulgaricus*, bien que des différences existent entre les souches (Conway *et al*, 1987). La survie dans l'estomac de *L acidophilus* dépend du pH et est augmenté lors de son administration avec du lait (Conway *et al*, 1987). En utilisant des perfusions intestinales, Marteau *et al* (1992) ont montré que l'administration de *L acidophilus* dans un lait fermenté entraînait une augmentation des concentrations iléales des lactobacilles de l'ordre de 10^3 par rapport à l'administration d'un lait fermenté pasteurisé; ce flux se maintenait relativement constant pendant près de 5 h; la récupération de l'inoculum était de 1,5% et les concentrations moyennes des lactobacilles transitant dans le grêle de l'ordre de 10^6 UFC/ml, ie compatibles avec l'expression d'activités métaboliques. Dans les

selles, l'ingestion de *L acidophilus* entraîne une augmentation des concentrations des lactobacilles totaux (Lidbeck *et al*, 1987).

Bifidobacterium sp

La résistance des bifidobactéries à l'acidité gastrique est élevée, bien que des différences notables existent entre les espèces (Berrada *et al*, 1991). En utilisant les perfusions intestinales, la survie à l'iléon de deux souches de *Bifidobacterium* sp ingérées dans des laits fermentés était respectivement de 23,5 et 37,5%, et les concentrations iléales moyennes de bifidobactéries étaient de 6,4 log UFC/ml (Pochart *et al*, 1992). Au niveau des selles, l'ingestion d'un lait fermenté à bifides a entraîné une augmentation significative des concentrations des bifidobactéries, mais la méthodologie utilisée ne permettait pas de distinguer les bifides exogènes des bifides endogènes, naturellement présents dans la flore colique, et l'hypothèse d'une augmentation des bifides totaux, en rapport avec un «hypothétique facteur de croissance des bifidobactéries» ne pouvait être éliminée (Pochart *et al*, 1990). L'utilisation d'une souche de *Bifidobacterium* sp reconnaissable des bifides endogènes sur des caractères de résistance à certains antibiotiques a permis de montrer que lorsque les bifidobactéries étaient ingérées dans un lait fermenté, elles étaient récupérées dans les selles à un niveau de population moyen de 8,8 + 0,1 log UFC/g. Après arrêt de l'administration du lait fermenté, les concentrations fécales des bifides exogènes diminuaient rapidement et ces derniers n'étaient plus retrouvés dans les selles 8 j plus tard; la cinétique d'élimination des bifides exogènes était parallèle à celle d'un marqueur du transit, permettant de montrer que les bifides exogènes

étaient éliminés par un effet de barrière bactériostatique (fig 1) (Bouhnik *et al*, 1992b). La récupération de la totalité des selles a permis de calculer le débit quotidien d'excrétion fécale des bifidobactéries exogènes qui représentait, pendant la phase d'équilibre, 70% des bifides totaux (fig 2). Ce taux de survie élevé fait des bifi-

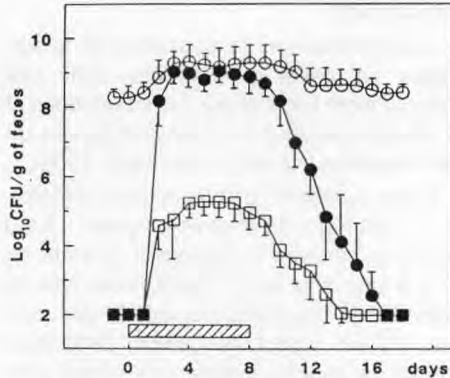


Fig 1. Effets de l'administration pendant 8 j d'un lait fermenté apportant 5×10^{11} bifides exogènes/j sur les concentrations fécales des bifidobactéries; $n = 8$, $m \pm ES$ (Bouhnik *et al*, 1992b).

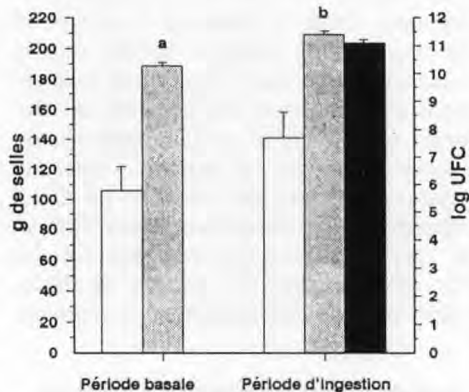


Fig 2. Débits quotidiens d'excrétion fécale des bifidobactéries pendant l'administration d'un lait fermenté apportant 5×10^{11} bifides exogènes/j. □ Poids des selles; ▨ bifides totaux; ■ bifides exogènes; $n = 8$, $m \pm ES$; $a \neq b$; $p < 0,01$.

dobactéries un vecteur potentiel privilégié pour la recherche d'effets probiotiques

EFFETS PROBIOTIQUES

Les principales études de survie semblent montrer que les micro-organismes ingérés sont rapidement éliminés de l'organisme après arrêt de leur ingestion. Il en est de même pour les effets observés, qui ne sont généralement notés que pendant la période d'ingestion des micro-organismes.

Les principaux effets probiotiques démontrés chez l'homme ont été récapitulés dans une revue générale récente, et nous n'en détaillerons que quelques uns (Marteau *et al*, sous presse). Les effets de l'administration de micro-organismes vivants sur les bactéries de la flore indigène ont été peu étudiés *in vivo*; les quelques résultats obtenus montrent une diminution, inconstante, des *E coli*, des *Bacteroides* sp et des *Clostridium* sp. La signification de ces effets est tout à fait inconnue.

Des travaux plus intéressants ont cherché à apprécier la survenue d'effets probiotiques sur l'activité métabolique de la flore indigène. Il a été montré que certaines activités enzymatiques bactériennes retrouvées dans les selles étaient incriminées dans le cancer colique induit par la diméthylhydrazine chez le rat, et que l'administration d'une souche de *Lactobacillus* sp diminuait ces activités et retardait le délai d'apparition de la tumeur (Goldin et Gorbach, 1976). Les principaux travaux évaluant ces effets chez l'homme sont rapportés dans le tableau II. Bien qu'inconstants, l'ensemble de ces résultats montre qu'il existe un effet, mais sa signification chez l'homme reste indéterminée.

L'amélioration de la digestibilité du lactose chez les alactasiques en cas d'administration de yaourt vivant par rapport au lait ou au yaourt thermisé est bien démontré et constitue probablement l'un des effets probiotiques les plus consistants (Kolars *et al*, 1984). L'activité lactasique au niveau de l'iléon est plus élevée en cas d'administration de yaourt vivant que de

Tableau II. Effets de l'ingestion de laits fermentés sur certaines activités enzymatiques bactériennes fécales chez l'homme.

Bactéries ingérées	Quantités/j	Sujets	Azoreductase	Nitroreductase	Glucuronidase	Réf
<i>L acidophilus</i> ^a	10 ⁹	12	NF	NF	↓ ^b	Ayebo <i>et al</i> , 1980
<i>L acidophilus</i> ^a	10 ⁹	21	↓ ^b	↓ ^b	↓ ^b	Goldin, 1984
<i>L acidophilus</i> ^a	10 ⁹	7	↓ ^b	↓ ^b	↓ ^b	Pedrosa, 1990
<i>L bulgaricus</i> et <i>S thermophilus</i>	5.10 ⁸	9 ^b	- ^c	- ^c	- ^c	Pedrosa, 1990
<i>L acidophilus</i> + <i>Bifidobacterium</i> sp + <i>Streptococcus</i> spp	10 ⁹ -10 ¹⁰	9 ^b	- ^c	↓ ^b	- ^c	Marteau <i>et al</i> , 1990
<i>Bifidobacterium</i> sp	10 ¹⁰	6	- ^c	↓ ^b	↓ ^b	Bouhnik (non publié)

NF : non fait; ^a : pas d'effet avec le lactose des bactéries tuées; ^b : $p < 0,05$; ^c : pas d'effet.

yaourt thermisé et, corollaire de cela, la concentration de lactose arrivant au côlon est plus élevée en cas d'administration de bactéries tuées (Marteau *et al*, 1990).

Ainsi, même s'il est bien démontré que certains micro-organismes possèdent une survie remarquable dans le tractus intestinal et présentent, de ce fait, les conditions nécessaires pour exercer d'éventuelles activités biologiques, il est encore difficile de se faire une opinion précise des effets chez l'homme de l'administration de ces bactéries. En effet, des résultats reproductibles ont été observés mais pour la majorité d'entre eux, on ignore leur signification et les mécanismes d'action demeurent largement méconnus. L'introduction des techniques de génie génétique permettra probablement de mieux appréhender le mode d'action de ces micro-organismes.

RÉFÉRENCES

- Ayebo AD, Angelo IA, Shahani KM (1980) Effect of ingesting *Lactobacillus acidophilus* milk upon fecal flora and enzyme activity in humans. *Milchwissenschaft* 35, 730-733
- Berrada N, Lemeland JF, Laroche G, Thouvenot P, Piaia M (1991) *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *J Dairy Sci* 74, 409-413
- Bouhnik Y, Pochart P, Marteau P, Flourié B, Goderel I, Rambaud JC (1991) Effect of intestinal microflora modifications on the clearance of an exogenous *Bifidobacterium* sp ingested in a fermented dairy product. *Gastroenterology* 100, A516
- Bouhnik Y, Mangin I, Pochart P, Bisetti N, Simonet JM, Decaris B, Rambaud, JC (1992a) Can exogenous bacteria colonize the colonic flora? An *in vivo* study in man. *Gastroenterology* 102, A598
- Bouhnik Y, Pochart P, Marteau P, Arlet G, Goderel I, Rambaud JC (1992b) Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* sp ingested in fermented milk. *Gastroenterology* 102, 875-878
- Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR (1987) Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci* 70, 1-12
- Ducluzeau R (1989) Role of experimental microbial ecology in gastroenterology. In: *Microbial ecology and intestinal infections* (Bergogne-Bérézin E, ed). Springer-Verlag, Paris
- Duval-Ifrah Y, Ouriet MF, Moreau C, Daniel N, Gabilan JC, Raibaud, P (1982) Implantation précoce d'une souche de *Escherichia coli* dans l'intestin de nouveaux-nés humains : effet de barrière vis-à-vis de souches de *E coli* antibiotorésistantes. *Ann Microbiol (Inst Pasteur)* 133A, 393-408
- Fuller R (1991) Probiotics in human medicine. *Gut* 32, 439-442
- Goldin BR, Gorbach SL (1976) The relationship between diet and rat fecal bacterial enzymes implicated in colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 25, 371-375
- Goldin BR, Gorbach SL (1984) The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am J Clin Nutr* 39, 756-761
- Gorbach SL (1990) Lactic acid bacteria and human health. *Ann Med* 22, 37-41
- Hitehins AD, McDonough FE (1991) Prophylactic and therapeutic aspects of fermented milk. *Am J Clin Nutr* 49, 675-684
- Hudault S, Bridonneau C, Raibaud P, Chatanet C, Vial MF (in press) Establishment of *Bifidobacterium bifidum* in the intestine of human neonates: relationship with the bifidus-factors found in the stools. *Br Nutr Soc*
- Keusch GT, Gorbach SL (1985) Ecology of the gastrointestinal tract. In: *Gastroenterology*, 4th ed (Berk JE, ed). Saunders, Philadelphia
- Kolars JC, Levitt MD, Aouji M, Savaiano DA (1984) Yogurt: an autodigesting source of lactose. *N Engl J Med* 310, 1-3
- Lidbeck A, Gustafsson JA, Nord KE (1987) Impact of *Lactobacillus acidophilus* supplements on the human oropharyngeal and intestinal microflora. *Scand J Infect Dis* 19, 531-537
- Marteau P, Flourié B, Pochart P, Chastang C, Desjeux JF, Rambaud JC (1990) 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* 64, 71-79

- Marteau P, Pochart P, Bouhnik Y, Zidi S, Goderel I, Rambaud JC (1992) Survie dans l'intestin grêle de *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium* sp ingérés dans un lait fermenté : une base rationnelle à l'utilisation de probiotiques chez l'homme. *Gastroenterol Clin Biol* 16, 25-28
- Marteau P, Pochart P, Bouhnik Y, Rambaud JC (in press) Fate and effects of some ingested non pathogenic micro-organisms transiting through the human gut. In: *World review of nutrition and dietetics* (Bourne GH, ed). S Karger, Basel
- Metchnikoff E (1977) *The prolongation of Live*. Arno, New York, 1908
- Pedrosa MC, Golner B, Goldin B, Baroket S, Dallal G, Russel RM (1990) Effect of *Lactobacillus acidophilus* of yogurt feeding on bacterial fecal enzymes in the elderly. *Gastroenterology* 98, A439.
- Pochart P, Dewit O, Desjeux JF, Bourlioux, P (1989) Viable starter culture, 13-galactosidase activity, and lactose in duodenum after yogurt ingestion in lactase deficient humans. *Am J Clin Nutr* 49, 828-831
- Pochart P, Marteau P, Bisetti N, Goderel I, Bourlioux P, Rambaud, JC (1990) Isolement des bifidobactéries dans les selles après ingestion prolongée de lait au bifidus. *Med Mal Infect* 20, 75-78
- Pochart P, Marteau P, Bouhnik Y, Goderel I, Bourlioux P, Rambaud JC (1992). Survival of Bifidobacteria ingested in a fermented milk during their passage in the human small intestine: an *in vivo* study using intestinal perfusion. *Am J Clin Nutr* 55, 78-80