

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

Évaluation du potentiel probiotique de différentes souches de *Lactobacillus*  
*kefiranofaciens*

par  
Louis-Philippe Précourt

Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)  
en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury :	Monique Lacroix, INRS-IAF
Examineur externe :	Lucie Lamontagne, UQAM
Directeur de recherche :	François Shareck, INRS-IAF
Codirecteur de recherche :	Pierre Lemieux, Technologie Biolactis

©Droits réservés de Louis-Philippe Précourt, 2005.

## Dédicace

À Maude, évidemment... Ma famille... Et mon pépé, quelle inspiration...

## Table des matières

Dédicace.....	i
Table des matières.....	ii
Liste des tableaux.....	iv
Liste des figures.....	v
Liste des abréviations.....	vii
Sommaire.....	ix
Introduction.....	1
Revue de littérature.....	4
1. Mise en situation.....	5
2. Les bactéries probiotiques.....	5
2.1 Historique.....	5
2.2 Définitions.....	7
2.3 Fondements de l'utilisation des probiotiques.....	9
2.4 Description des microorganismes probiotiques.....	12
2.5 Propriétés recherchées.....	12
2.6 Risques et effets secondaires.....	14
3. Effets bénéfiques reconnus.....	16
3.1 Modulation de la flore intestinale.....	16
3.2 Modulation du système immunitaire.....	18
3.3 Atténuation de troubles intestinaux.....	23
3.3.1 Intolérance au lactose.....	23
3.3.2 Diarrhées.....	24
3.3.3 Syndrome du côlon irritable.....	26
3.4 Atténuation des maladies inflammatoires de l'intestin.....	27
3.4.1 Maladie de Crohn.....	29
3.4.2 Colite ulcéreuse.....	30
3.4.3 Exemples de probiotiques efficaces.....	31
3.5 Régulation du métabolisme des lipides.....	35
4. Évaluation <i>in vivo</i> du potentiel probiotique de lactobacilles.....	36
4.1 Souches à l'étude.....	37
4.2 Souche utilisée comme comparaison.....	39
4.3 Modèles animaux utilisés.....	40
4.3.1 Inflammation intestinale.....	40
4.3.2 Hyperlipidémie.....	41
5. Hypothèse.....	42
6. Objectifs.....	42
7. Moyens utilisés pour atteindre les objectifs.....	43
Méthodologie.....	44
1. Impact de <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> sur la flore intestinale.....	45
1.1 Animaux.....	45
1.2 Préparation des cultures bactériennes.....	45
1.3 Détection des coliformes dans les fèces.....	46
1.4 Détection des bactéries lactiques dans les fèces.....	46

1.5 Mesure du pH fécal.....	47
<b>2. Adhésion/colonisation <i>in vivo</i>.....</b>	<b>47</b>
2.1 Extraction d'ADN bactérien dans les fèces des souris.....	47
2.2 Amplification d'ADN par PCR.....	48
2.3 Détection sur gel d'agarose.....	49
2.4 Amorces utilisées.....	49
<b>3. Lipidémie.....</b>	<b>50</b>
3.1 Animaux.....	50
3.2 Induction d'hyperlipidémie et analyses sanguines.....	50
<b>Résultats.....</b>	<b>52</b>
1. Impact sur la flore intestinale.....	53
2. Adhésion/colonisation <i>in vivo</i> .....	57
3. Effet protecteur contre l'inflammation intestinale induite au DSS.....	60
4. Lipidémie.....	66
<b>Article.....</b>	<b>68</b>
1. Accusé de réception.....	69
2. Résumé de l'article en français.....	70
3. Contribution des auteurs.....	71
4. Article.....	73
<b>Discussion générale.....</b>	<b>99</b>
1. Critères de sélection d'une bactérie probiotique.....	100
2. Impact sur la flore intestinale, colonisation et persistance.....	101
3. Effet protecteur contre l'inflammation intestinale.....	103
4. Lipidémie.....	110
5. Perspectives.....	112
<b>Remerciements.....</b>	<b>116</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>118</b>
Annexe I : Brevet.....	119
Annexe II : Publication en préparation.....	120
Annexe III : Liste des séances d'affiches.....	121
<b>Bibliographie.....</b>	<b>122</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères de sélection d'un microorganisme comme « probiotique ». .....	14
Tableau 2 : Souches à l'étude. ....	39

## Liste des figures

Figure 1 : Espèces bactériennes dominantes au long du tube digestif humain (Adaptée de Isolauri, E. <i>et al.</i> , 2004). .....	10
Figure 2A : Recrutement et activation de cellules entraînant l'inflammation intestinale incontrôlée. ....	20
Figure 2B : Les cellules T régulatrices contrôlent l'inflammation intestinale. ....	20
Figure 3 : Facteurs environnementaux influençant le bon fonctionnement du tube digestif et le maintien d'une « inflammation contrôlée » dans l'intestin...29	29
Figure 4 : Observations macroscopiques des côlons d'une souris soumise au DSS et d'une souris saine. ....	41
Figure 5 : Dénombrement des bactéries lactiques dans les fèces des souris après 7 jours de gavage. ....	52
Figure 6 : Mesure du pH fécal chez des souris gavées durant 7 jours. ....	53
Figure 7 : Dénombrement des coliformes fécaux chez les souris après 7 jours de gavage (bactéries viables). ....	54
Figure 8 : Dénombrement des coliformes fécaux chez les souris après 7 jours de gavage (bactérie pasteurisée). ....	55
Figure 9 : Spécificité des amorces pour détecter par PCR l'ADN bactérien de <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> . ....	56
Figure 10 : Spécificité des amorces pour détecter par PCR l'ADN bactérien de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> . ....	56
Figure 11 : Détection d'ADN bactérien dans les échantillons purifiés des fèces des souris. ....	57
Figure 12 : Détection d'ADN bactérien de l'espèce <i>kefiranofaciens</i> dans les échantillons purifiés des fèces des souris. ....	58
Figure 13 : Détection d'ADN bactérien de l'espèce <i>rhamnosus</i> dans les échantillons purifiés des fèces des souris. ....	58
Figure 14 : Variation des poids durant 7 jours d'exposition au DSS et 8 jours de récupération post-inflammatoire (R2C2). ....	59

Figure 15 : Variation des poids durant 7 jours d'exposition au DSS et 8 jours de récupération post-inflammatoire (BioSP). .....	60
Figure 16 : Variation des poids durant 7 jours d'exposition au DSS et 8 jours de récupération post-inflammatoire (INIX-K2-L. GG). .....	61
Figure 17 : Scores de consistance et de présence de sang dans les fèces suite à une exposition de 4, 5, 6 et 7 jours au DSS. ....	62
Figure 18 : Taux d'hématocrite suite à une exposition de 7 jours au DSS. ....	63
Figure 19 : Mesure de la longueur du côlon (cm) chez les souris après une exposition de 7 jours au DSS et 8 jours de récupération post-inflammatoire. ....	64
Figure 20 : Taux de triglycérides sanguins (mmol/L) chez les rats après 7 jours de gavage. ....	65
Figure 21 : Taux de triglycérides sanguins (mmol/L) chez les rats 24h et 72h après l'induction d'hyperlipidémie par une injection de 300 mg de poloxamer 407. ....	66
Figure 22 : Variation des poids des souris (%) durant l'exposition au DSS et la période de récupération post-inflammatoire. ....	91
Figure 23 : Scores combinés de consistance et de présence de sang dans les fèces durant l'exposition au DSS. ....	93
Figure 24 : Longueur du côlon des souris à la fin de la période de récupération post-inflammatoire. ....	95
Figure 25 : Unités de MPO/g de tissu de côlon à la fin de la période de récupération post-inflammatoire. ....	97

## Liste des abréviations

5-ASA	5-aminosalicylate
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
CCFA	Crohn's and Colitis Foundation of America
cfu	nombre de colonies (colony forming unit)
CMC	carboxyméthyl cellulose
DC	cellule dendritique
DSS	dextran sulfate sodium
EDTA	acide éthylènediaminotétraacétique
FCMII	Fondation canadienne des maladies inflammatoires de l'intestin
GM	ganglions mésentériques
HDL	Lipoprotéines de haute densité
IDAC	International Depository Authority of Canada
IFN $\alpha$	interféron alpha
IFN $\gamma$	interféron gamma
IgA	immunoglobuline A
IgM	immunoglobuline M
IL	interleukine
i.p.	intra-péritonéale
<i>L. GG</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>
M	molaire
mg	milligramme
MII	maladies inflammatoires de l'intestin
mL	millilitre
$\mu$ g	microgramme
$\mu$ L	microlitre
mM	millimolaire

Mo	macrophage
MPM	matrice protéique malléable
MPO	myéloperoxidase
MRS	milieu de culture Mann-Rogosa-Sharpe
P-407	poloxamer 407
pb	paires de base
PBS	phosphate buffered saline (tampon salin phosphaté)
PCR	réaction de polymérisation en chaînes
p/v	poids/volume
RCW	milieu de culture Rogosa-Cheese-Whey
rpm	vitesse de rotation
SPF	« specific pathogen free »
TGF $\beta$	transforming growth factor beta
TLR	récepteur Toll-like
TNF $\alpha$	tumor necrosing factor alpha

## Sommaire

Le terme probiotique définit les microorganismes viables qui entraînent des effets bénéfiques pour la santé suite à leur ingestion. La compagnie Technologie Biolactis inc. a isolé de nouvelles souches de *Lactobacillus kefiranofaciens* des grains de kéfir, puis les a adaptées à fermenter le lactosérum pour créer une matrice protéique malléable (MPM). Des résultats obtenus avec la MPM ainsi que les effets bénéfiques traditionnellement attribués à la consommation du kéfir ont mené à une analyse plus approfondie du potentiel probiotique des différentes souches de *Lactobacillus kefiranofaciens*. L'impact de ces souches sur la flore intestinale de souris saines a été évalué, de même que leur potentiel anti-inflammatoire dans un modèle animal d'inflammation intestinale induite au dextran sulfate ainsi que leur effet dans un modèle animal d'hyperlipidémie induite au poloxamer 407.

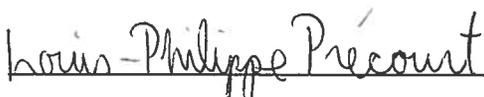
Les bactéries R2C2, INIX, BioSP et K2, de l'espèce *kefiranofaciens*, ont démontré la capacité de diminuer les coliformes fécaux, potentiellement pathogènes, d'environ 50% après sept jours de gavage. Une légère augmentation des comptes de bactéries lactiques a été observée, de même qu'une faible diminution du pH fécal. Cependant, 24 heures après l'arrêt des gavages, la présence d'ADN bactérien de l'espèce *kefiranofaciens* dans les fèces des animaux n'a pu être détectée par un test de PCR avec des amorces spécifiques. La bactérie R2C2, avec laquelle ces tests ont été réalisés, n'a donc pas semblé pouvoir coloniser l'intestin des animaux et y persister. De plus, la bactérie R2C2, lorsque pasteurisée, a perdu la capacité à moduler la flore intestinale, ce qui signifie que la viabilité de la bactérie est un facteur majeur pour cet effet.

Parmi les différentes souches évaluées, R2C2 et BioSP ont démontré des bénéfices dans le modèle d'inflammation intestinale, réduisant la perte de poids et facilitant la récupération post-inflammatoire, diminuant les scores de consistance et de présence de sang dans les fèces et préservant l'intégrité du côlon. Malgré le fait que les bactéries INIX et K2 soient très rapprochées phylogénétiquement de R2C2 et BioSP, elles se sont avérées sans effet protecteur dans le modèle d'inflammation intestinale. Ceci implique que les effets bénéfiques d'une bactérie sont spécifiques à chaque souche. De manière intéressante, la bactérie R2C2 pasteurisée a démontré des propriétés anti-inflammatoires

comparables à celles de la bactérie viable. Ceci implique que des composantes de la bactérie sont possiblement reconnues par les cellules immunitaires au long de l'intestin et entraînent ainsi la production de marqueurs anti-inflammatoires. L'effet protecteur de la bactérie R2C2 a aussi été similaire à celui du 5-ASA, un médicament très utilisé dans les maladies inflammatoires de l'intestin chez l'humain.

Les bactéries R2C2 et INIX ne se sont pas montrées en mesure de réguler le métabolisme des lipides dans le modèle animal d'hyperlipidémie. Par contre, la MPM, du lactosérum fermenté par R2C2, a réduit les niveaux de triglycérides induits au poloxamer 407. Les peptides générés durant le processus de fermentation sont possiblement responsables de cet effet.

En conclusion, la capacité de certaines des bactéries étudiées à moduler la flore intestinale ainsi que leurs propriétés anti-inflammatoires en font des candidats intéressants comme probiotiques aidant à maintenir une fonction digestive saine.

  
Étudiant : Louis-Philippe Précourt

  
Directeur : François Shareck

## **Introduction**

Des microorganismes de toutes sortes cohabitent de manière très rapprochée avec chaque être humain. Certains sont pathogènes, mais la plupart sont absolument inoffensifs, et même nécessaires au bon fonctionnement du corps. Cependant, les bactéries sont généralement considérées comme des ennemis dont il faut à tout prix éviter le contact afin de demeurer en bonne santé. Cette mentalité fait que les habitants des pays industrialisés vivent dans des conditions d'hygiène très poussées. Par de telles habitudes, ils pensent éviter les maladies, mais de nombreux problèmes autoimmuns ont fait leur apparition et sont de plus en plus présents. La dermatite atopique, le diabète, les maladies inflammatoires de l'intestin et plusieurs autres sont des problèmes de santé aujourd'hui beaucoup plus habituels qu'autrefois. Les allergies alimentaires graves sont aussi rencontrées très souvent dans la jeune population. Le dénominateur commun de toutes ces maladies est un mauvais fonctionnement du système immunitaire. En effet, le système immunitaire semble dérégulé, réagissant contre les cellules du soi et créant ainsi les troubles autoimmuns ou ne tolérant pas les simples antigènes alimentaires qui transitent dans le tube digestif. Ce dérèglement du système immunitaire pourrait être partiellement dû à une trop faible exposition à différents microorganismes, qu'ils soient pathogènes ou non; il s'agit de la théorie de l'hygiène. Cette théorie affirme que des conditions d'hygiène moins poussées et la vie dans un milieu plus rural permettent à l'individu en développement d'être exposé à de nombreux antigènes différents, ce qui donne la chance à son système immunitaire d'apprendre à faire la différence entre ce face à quoi il doit réagir, et ce qu'il doit tolérer.

Pour tenter de prévenir l'apparition des maladies autoimmunes ou d'en réduire les symptômes, l'utilisation des bactéries probiotiques semble une avenue très prometteuse. Le terme probiotique est généralement défini comme étant des microorganismes viables qui entraînent des effets bénéfiques suite à l'ingestion. Il s'agit donc de bactéries inoffensives qui sont ingérées afin d'entraîner différents bénéfices, comme le maintien d'une fonction digestive saine ou la modulation du système immunitaire. Certains probiotiques peuvent même diminuer les symptômes des maladies inflammatoires de l'intestin. D'autres peuvent, quant à eux, réguler le métabolisme des lipides en assimilant le cholestérol ou en diminuant le stockage des graisses.

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, le potentiel probiotique de différentes souches de *Lactobacillus kefiranofaciens* a été évalué dans des modèles animaux. Les souches étudiées ont été isolées des grains de kéfir, puis adaptées à fermenter le lactosérum, créant ainsi une matrice protéique malléable (MPM). L'étude préalable de la MPM a permis de lui attribuer un certain potentiel anti-inflammatoire, mais sans en connaître les composantes responsables. D'un autre côté, le kéfir est un breuvage fermenté qui est traditionnellement consommé pour régler différents troubles digestifs et métaboliques. Les bénéfices du kéfir et les ingrédients actifs responsables de ses effets sont peu connus. Les bactéries de l'espèce *kefiranofaciens*, présentes dans chacun de ces produits fermentés, sont donc possiblement responsables d'une partie des bénéfices observés. L'objectif principal de ce projet est donc d'étudier les effets de bactéries de l'espèce peu connue *kefiranofaciens* chez les animaux sains et dans différents modèles de pathologie, afin d'évaluer leur potentiel probiotique. Les recherches se sont principalement concentrées sur les bienfaits des souches au niveau intestinal, mais leur capacité à réguler le métabolisme des lipides a aussi été évaluée.

Ce mémoire débute par une revue de littérature générale traitant des bactéries probiotiques. L'historique de ce concept y est décrit, de même que l'évolution de la définition du terme probiotique. Plusieurs effets bénéfiques attribués à leur consommation y sont décrits, particulièrement par rapport au maintien d'une fonction digestive saine. Les pathologies étudiées et les modèles animaux utilisés y sont aussi expliqués. Une partie des résultats obtenus et des conclusions qui ont pu en être tirées sont exposées dans l'article : Protective effect of live or pasteurized *Lactobacillus kefiranofaciens* on dextran sulfate sodium-induced intestinal inflammation. Des résultats supplémentaires sont aussi présentés afin de permettre une meilleure compréhension des effets de ces bactéries. Une discussion générale est fournie de manière à expliquer l'impact des résultats sur le monde des probiotiques et l'avancement des connaissances.

## **Revue de littérature**

## **1. Mise en situation**

Pour l'être humain, les relations avec ses semblables, les espèces animales et végétales qui l'entourent représentent la base de la vie. Toutes ces relations lui permettent de combler ses besoins primaires. Toutefois, un très grand nombre d'interactions entre l'homme et son environnement, tout aussi importantes pour son bon développement, passent inaperçues. En effet, au sein même du corps humain, plusieurs relations symbiotiques très complexes existent. L'homme partage son corps avec une grande variété de bactéries, localisées principalement dans les différentes flores bactériennes. Ces flores sont, la plupart du temps, inoffensives pour l'hôte et jouent même des rôles plutôt bénéfiques. Par exemple, la présence de lactobacilles dans la flore vaginale permet la conservation d'un pH acide, ce qui empêche l'implantation de bactéries pathogènes ou de levures.

L'intestin est une des régions du corps les plus actives métaboliquement. La flore intestinale est composée d'une très grande quantité de microorganismes, qui entrent constamment en contact avec les aliments ingérés et les cellules épithéliales de la paroi intestinale. Les bactéries résidentes de la flore intestinale peuvent produire des nutriments en dégradant les aliments ingérés et contribuer à maintenir le système immunitaire en alerte. Le résultat de ces interactions est donc en général bénéfique. Le déséquilibre de la fine balance établie entre les bactéries et les cellules de l'hôte peut par contre entraîner différents problèmes, au niveau du tube digestif ou même systémiques. C'est pour cette raison que la communauté scientifique, particulièrement depuis la dernière décennie, s'intéresse grandement à l'étude de la flore intestinale, des pathologies qui peuvent découler de son dérèglement et aux apports bénéfiques potentiels de différentes bactéries inoffensives.

## **2. Les bactéries probiotiques**

### **2.1 Historique**

Les bactéries sont en général perçues comme étant nocives pour l'homme, qui tente de les éviter le plus possible. La majorité des gens ne connaît pas les rôles importants que les bactéries ont à jouer au sein de leur organisme. Les bactéries

pathogènes ne représentent qu'une faible proportion des bactéries existantes. Plusieurs espèces bactériennes résident dans le corps humain, y exercent des effets positifs et leur absence peut entraîner de graves problèmes de santé. La possibilité que la consommation de bactéries inoffensives exerce des effets bénéfiques pour l'être humain a été postulée d'abord en 1906, puis en 1907, respectivement par le pédiatre français Henry Tissier et par le gagnant d'un prix Nobel, Elie Metchnikoff. Tissier a observé un nombre réduit de bactéries caractérisées par une forme de Y (plus tard identifiées comme étant des bifidobactéries) dans les fèces d'enfants souffrant de diarrhées. Il a alors suggéré que l'administration de ce type de bactéries aux patients souffrant de diarrhées pourrait rétablir une flore intestinale saine et enrayer leurs symptômes (Tissier, 1906). Metchnikoff a quant à lui postulé que la longévité et la bonne santé générale des peuplades des Balkans étaient dues à leur consommation de produits laitiers fermentés, contenant de grandes quantités de bactéries inoffensives. Selon lui, la principale cause du vieillissement était les substances toxiques produites par les bactéries nocives présentes dans l'intestin. La consommation de produits fermentés pouvait aider à remplacer les bactéries nocives de l'intestin par les bactéries ingérées et ainsi diminuer la génération de ces toxines et ralentir le processus de vieillissement (Metchnikoff, 1907). Cette théorie, plus connue en raison du statut de Metchnikoff, donnait le rôle de véritable fontaine de jouvence aux bactéries lactiques que contiennent les produits fermentés. Un tel postulat peut sembler simpliste et erroné, mais les travaux subséquents faits sur les bactéries lactiques ont donné raison, du moins en partie, à Metchnikoff. En effet, sans être une fontaine de jouvence, les bactéries lactiques, consommées dans des laits fermentés, dans des yogourts ou dans des capsules sous forme lyophilisées, ont démontré qu'elles pouvaient régler certains problèmes intestinaux comme la diarrhée ou la constipation, de même que réduire l'inconfort associé à l'intolérance au lactose. Des effets de renforcement du système immunitaire leur ont aussi été attribués.

Malgré les efforts de ce scientifique reconnu et l'intérêt porté à ses travaux, la recherche sur les effets bénéfiques potentiels des bactéries lactiques a été latente durant la majeure partie du 20<sup>e</sup> siècle. Les résultats obtenus dans les premières études étaient inconstants et les effets bénéfiques associés à la consommation de bactéries inoffensives demeuraient anecdotiques. Ce n'est que vers la fin des années 80 que l'intérêt de la

communauté scientifique s'est manifesté de nouveau et que les recherches ont repris plus activement que jamais. Ces bactéries lactiques bénéfiques pour la santé sont aujourd'hui appelées «probiotiques» et une panoplie d'effets positifs peut découler de leur consommation (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, 2001).

## 2.2 Définitions

Le terme « probiotique » est composé des racines grecques *pro* et *bios* qui signifient *pour* la *vie*. Le terme est contraire à « antibiotique », qui signifie *contre* la *vie*, plus spécifiquement contre la croissance et le développement de bactéries pathogènes. Les bactéries probiotiques, globalement, sont responsables du maintien et de la prolifération des bactéries bénéfiques au niveau des flores microbiennes et d'effets positifs sur la santé suite à leur consommation.

Le mot probiotique a été utilisé pour la première fois par les chercheurs D.M. Lilly et R.H. Stilwell, en 1965. Ce terme était alors défini comme une substance ou un organisme pouvant contribuer au maintien de la balance de la flore intestinale (Lilly et Stilwell, 1965). Cette définition ne mettait donc pas en évidence les bactéries comme agents permettant la régulation ou le maintien d'une flore bactérienne saine. Ce n'est qu'en 1991 que la définition du mot probiotique cible précisément les bactéries consommées comme supplément (Fuller, 1991). De plus, on distingue désormais différentes substances pouvant influencer l'équilibre de la flore intestinale. Les *probiotiques* sont différenciés des *prébiotiques* et des *synbiotiques*. Les *prébiotiques* comprennent toute substance alimentaire qui modifie favorablement la flore bactérienne de l'intestin. Il s'agit en général d'aliments non-digestibles qui affectent l'hôte positivement en modifiant de manière plus ou moins sélective la croissance ou l'activité de certaines bactéries présentes dans le côlon (Gibson, 2002). Les probiotiques et les prébiotiques peuvent être utilisés de manière combinée, c'est ce que l'on appelle les *synbiotiques*. La viabilité des probiotiques pourrait être augmentée par leur combinaison à un substrat naturel, le prébiotique spécifique, en apportant une protection tout au cours du passage dans le tractus gastro-intestinal ou en facilitant la colonisation (Gibson, 2002).

Le terme probiotique désignait donc à ce moment tout supplément bactérien modifiant positivement la balance de la flore intestinale. Aujourd'hui, la définition qui est

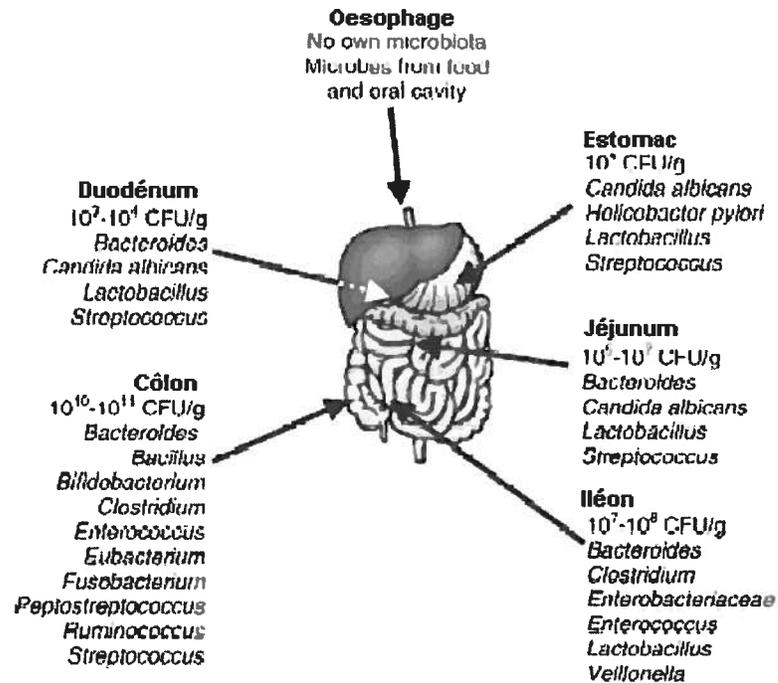
retrouvée dans la grande majorité des articles scientifiques traitant des probiotiques est quelque peu modifiée et plus générale. Les probiotiques sont maintenant définis comme des suppléments nutritionnels composés de microorganismes vivants, exerçant des effets bénéfiques pour l'hôte (Tamboli *et al.*, 2003). Cette définition ne se limite pas aux seules bactéries comme agent probiotique, mais inclue tous les microorganismes, dont les levures. De plus, elle spécifie que les microorganismes contenus dans les suppléments alimentaires doivent être vivants et viables, de façon à pouvoir exercer leurs effets bénéfiques. Cette définition laisse aussi de côté l'aspect de modulation de la flore intestinale. Il est désormais admis que les microorganismes peuvent exercer leurs effets bénéfiques de différentes façons, et non seulement en modulant la flore. En effet, des effets bénéfiques systémiques découlent de la consommation de certains probiotiques, comme la réduction des symptômes de la dermatite atopique (Isolauri, 2004). Les probiotiques peuvent aussi être utilisés au niveau de la flore vaginale, pour prévenir les infections (Reid, 1999).

Certaines des définitions les plus récentes modifient légèrement ce que sont les probiotiques. Par exemple, O. Vaarala (2003) les définit comme étant des cellules ou composantes de microorganismes ayant des effets bénéfiques pour la santé suite à l'ingestion. Cette définition est très semblable à la première, en ce sens qu'elle inclut la totalité des microorganismes et qu'elle laisse de côté l'aspect de la modulation de la flore intestinale afin d'opter pour une approche plus générale visant les effets bénéfiques globaux. Par contre, la différence se situe au niveau de la nécessité d'avoir des microorganismes viables. L'auteur, en affirmant que des composantes de microorganismes peuvent à elles seules exercer des effets bénéfiques, laisse sous-entendre que des microorganismes inactivés ou non-viables pourraient avoir une influence positive pour l'hôte. Cette affirmation est reprise dans une publication scientifique de Rachmilewitz *et al.* (2004). Cet article semble prouver rigoureusement, selon une méthode scientifique stricte, dans un modèle animal, que les probiotiques non-viables peuvent avoir des effets bénéfiques (Rachmilewitz *et al.*, 2004). Cette affirmation ne ferme aucune porte quant à l'utilisation de bactéries comme probiotiques, elle ouvre plutôt de nouvelles avenues quant aux recherches sur les mécanismes d'action. Les microorganismes, même en étant morts, pourraient avoir des effets positifs pour l'hôte.

### 2.3 Fondements de l'utilisation des probiotiques

Les bactéries sont partie intégrante du corps humain et sont particulièrement présentes au niveau du tractus gastro-intestinal. En effet, plus de 400 espèces bactériennes différentes sont représentées dans la flore intestinale (Tannock, 1999). La concentration la plus élevée en bactérie se situe au niveau du côlon, où l'on retrouve jusqu'à  $10^{12}$  bactéries par gramme de fèces. Les bactéries sont tellement nombreuses qu'elles représentent près de la totalité du nombre de cellules d'un humain (Dunne *et al.*, 2001) et environ la moitié du poids humide des fèces (Isolauri, E. *et al.*, 2004). Le pH acide et les enzymes digestives de l'estomac, de même que les sels biliaires et les enzymes pancréatiques de l'intestin grêle, ne favorisent pas la croissance microbienne. Le côlon est l'endroit le plus propice du tractus gastro-intestinal pour le développement d'une flore nombreuse et très active, le pH étant plus accueillant et les nutriments abondants (Prescott *et al.*, 1995).

La croissance de nombreuses bactéries différentes dans le tractus gastro-intestinal commence dès la naissance. En effet, par le passage du bébé par les voies naturelles, plusieurs bactéries des flores vaginale et intestinale entrent en contact avec le nouveau-né et c'est le début de la colonisation. Le lait maternel qui constitue généralement le seul aliment consommé par le bébé dans les premiers jours de la vie favorise la croissance de certaines espèces bactériennes. Il contient certains oligosaccharides spécifiques qui stimulent la croissance de bifidobactéries au niveau de l'intestin (Coppa *et al.*, 2004). Plusieurs bactéries sont aussi transmises par le contact avec la mère lors de l'allaitement. Les seins et mamelons de la mère sont un endroit très propice au développement de lactobacilles et de bifidobactéries, en raison du principal nutriment qui s'y retrouve, le lait. Par contre, ce ne sont pas tous les nouveaux-nés qui passent par les voies naturelles ou qui sont nourris avec le lait maternel. La flore bactérienne de chaque individu se développe donc de manière très différente, selon l'alimentation et l'environnement (Edwards et Parrett, 2002).



**Figure 1.** Espèces bactériennes dominantes au long du tube digestif humain (Adaptée de Isolauri *et al.*, 2004).

Les bactéries de la flore intestinale sont responsables de plusieurs fonctions métaboliques importantes et bénéfiques. Elles sont responsables de la synthèse des vitamines B et K, de la production de plusieurs nutriments, comme les acides gras à chaînes courtes, importants pour les cellules épithéliales, et peuvent aussi inactiver certaines substances cancérigènes (Cong *et al.*, 2003; Isolauri *et al.*, 2004). Le côlon représente l'organe le plus métaboliquement actif du corps avec le foie (Isolauri *et al.*, 2004), en plus d'être le site où la concentration de cellules immunitaires (Shi et Walker, 2004) est la plus importante et où une très grande quantité de cellules nerveuses sont présentes (Furness *et al.*, 1999). Toutes ces bactéries interagissent évidemment de manière très active avec les cellules de l'hôte. La flore intestinale doit donc se développer en véritable symbiose avec les réactions immunitaires de l'hôte, afin que le tout demeure équilibré. La perte de cette homéostasie peut agir conjointement avec différents facteurs de risques environnementaux ou génétiques et entraîner des pathologies autoimmunes (Danese *et al.*, 2004). La manipulation de la flore intestinale et de ses interactions avec les cellules de l'hôte par l'alimentation devient alors une avenue intéressante pour contribuer

au bien-être des gens et possiblement pour prévenir ou aider à contrôler les symptômes associés aux maladies autoimmunes (Collins et Gibson, 1999).

L'utilisation de bactéries probiotiques pour prévenir ou traiter différentes maladies repose en grande partie sur la « théorie de l'hygiène ». La théorie de l'hygiène affirme qu'une exposition réduite aux bactéries, pathogènes ou non, une diminution des cas d'infection, une diminution de la taille des familles et donc des contacts entre frères et sœurs de même que des conditions d'hygiène personnelle et environnementale très poussées ont mené à une augmentation de la prévalence des allergies et des maladies autoimmunes et atopiques (Strachan, 1989; 2000). Cette diminution de contacts avec différents microorganismes semble reliée à un mauvais développement du système immunitaire au niveau de la flore intestinale ayant des répercussions systémiques sur le statut immunitaire de l'individu (Kalliomaki et Isolauri, 2002).

Les bactéries présentes dans la flore intestinale ont d'ailleurs beaucoup plus à accomplir que simplement des rôles métaboliques; elles s'avèrent être protectrices et responsables de l'homéostasie intestinale (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). Différentes composantes bactériennes peuvent interagir avec les récepteurs « Toll-like », qui sont présents sur les cellules immunitaires de l'intestin, et déclencher la production de plusieurs marqueurs moléculaires importants dans le maintien de l'homéostasie intestinale et dans la protection des cellules épithéliales (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). Les cellules immunitaires de l'intestin et les bactéries résidentes sont en communication constante de manière à ce qu'il n'y ait pas de réaction inflammatoire dirigée contre des bactéries inoffensives, mais que les bactéries pathogènes soient prises en charge par le système immunitaire (Shi et Walker, 2004). Les aliments ingérés doivent aussi être tolérés par le système immunitaire, c'est la tolérance orale. Ces réalités entraînent un état de constante inflammation au niveau de l'intestin, mais il s'agit d'un phénomène physiologique normal hautement contrôlé. Une réponse inappropriée des cellules immunitaires envers les bactéries résidentes ou une interaction inadéquate due à des facteurs génétiques ou environnementaux peut entraîner une inflammation incontrôlée au niveau du tractus gastro-intestinal, menant aux maladies inflammatoires de l'intestin, aux allergies (perte de tolérance orale) et même possiblement à toute maladie autoimmune (Biancone *et al.*, 2002).

## 2.4 Description des microorganismes probiotiques

De nombreux genres bactériens sont considérés comme probiotiques, de même que certaines levures. Les genres de bactéries utilisés sont très variables, passant par les lactobacilles, les bifidobactéries, les entérocoques, les streptocoques et même quelques souches de l'espèce *Escherichia coli*. Pour les levures, c'est l'espèce *Saccharomyces boulardii* qui est la plus connue (Ouwehand *et al.*, 2002).

Malgré cette grande diversité, ce sont les genres lactobacille et bifidobactérie qui sont les plus étudiés. Ils font partie du groupe hétérogène des bactéries lactiques, qui ont comme caractéristique commune l'acide lactique comme produit final principal de leur métabolisme (Gionchetti *et al.*, 2002). Ce sont des bactéries présentes naturellement à de nombreux endroits, particulièrement dans les produits laitiers et les différentes flores microbiennes des animaux. Les bifidobactéries sont d'ailleurs très présentes dans le côlon chez l'humain, alors que les lactobacilles sont représentées tout au long du tractus gastro-intestinal (Isolauri *et al.*, 2004). En général, les lactobacilles sont des bactéries en forme de bâtonnet, Gram positives et microaérophiles. Elles ont des conditions optimales de croissance aux environs de 35 à 45°C. Elles sont souvent regroupées en chaînes de lactobacilles, mais certaines souches peuvent aussi former d'importants agrégats, sans structure constante. De plus, lorsque cultivées dans des conditions précises, certaines souches peuvent produire des polysaccharides extracellulaires, appelés exopolysaccharides, qui pourraient, dans certains cas, être responsables des effets bénéfiques de telles bactéries.

## 2.5 Propriétés recherchées

Comme exposé précédemment, la définition du terme probiotique a grandement évolué au cours des dernières années. La plupart des articles scientifiques les décrivent comme un supplément nutritionnel composé de microorganismes vivants exerçant des effets santé bénéfiques. Par contre, certains auteurs modifient cette définition et, pour cette raison, un regroupement de chercheurs dans le domaine des probiotiques a tenté d'établir un consensus sur des critères de sélection plus précis (Dunne *et al.*, 1999).

Le critère le plus important est sans aucun doute les effets bénéfiques que doit posséder la bactérie, comme la modulation du système immunitaire ou de la flore

intestinale de l'hôte (de Roos et Katan, 2000). Allant de paire avec le premier critère, la consommation des bactéries ne doit comporter aucun risque, elle doit être absolument sans danger (Young et Huffman, 2003). Ces deux critères sont les plus importants et pourraient même être suffisants pour affirmer qu'un microorganisme est probiotique.

Par contre, d'autres critères ont été énoncés pour différencier les microorganismes probiotiques des autres. Comme la majorité des scientifiques s'entend sur le fait que les bactéries doivent atteindre le côlon en étant viables, elles doivent donc avoir la capacité de survivre au pH stomacal très acide ainsi qu'aux enzymes digestives et de résister aux sels biliaries et enzymes pancréatiques présentes au long de l'intestin grêle (Dunne *et al.*, 1999). Cependant, cette capacité peut s'avérer superflue si pour l'utilisation de certaines bactéries, dans des pathologies spécifiques, l'efficacité des bactéries non-viables est démontrée.

La capacité d'adhérer à la muqueuse ou à l'épithélium intestinal pourrait aussi être importante de manière à ce que les bactéries puissent interagir directement avec les cellules de l'hôte et ainsi avoir la possibilité d'exercer des bénéfices. Afin que leurs effets bénéfiques soient de plus longue durée que simplement les quelques heures suivant leur consommation, les bactéries probiotiques devraient être en mesure de coloniser le tractus gastro-intestinal et d'y persister, même si ce n'est que pour de courtes périodes de temps (Alander *et al.*, 1999). En fait, il est préférable que les bactéries ne persistent pas à très long terme dans la flore intestinale de l'hôte, car elles pourraient ainsi moduler sa composition de manière permanente alors que l'objectif est généralement de la moduler temporairement pour contrer un quelconque problème de santé (Isolauri *et al.*, 2004). S'il s'agit d'un problème de santé chronique, il est préférable qu'un individu prenne des doses régulières d'un probiotique choisi plutôt qu'une seule dose modifiant la flore de manière permanente. Les risques d'effets secondaires néfastes sont ainsi grandement diminués.

La capacité à produire des substances antimicrobiennes, comme certains acides ou des bactériocines, pourrait aider les bactéries probiotiques à moduler de manière positive la flore intestinale en réduisant le nombre de bactéries pathogènes (Reid, 1999).

Finalement, il est souhaitable que les bactéries utilisées comme probiotiques soient d'origine humaine, c'est-à-dire qu'elles aient été isolées chez un humain en bonne santé (Dunne *et al.*, 2001), de façon à assurer leur innocuité pour la consommation et pour

avoir une plus grande possibilité d'interaction avec les cellules épithéliales ou muco-sales de l'hôte. Cependant, il faut faire attention avec ce dernier critère. Aucune bactérie n'a comme réelle origine une flore microbienne humaine. Chacune a dû y être introduite à un certain moment au cours de l'évolution de la race humaine. Les souches retrouvées chez l'humain comportent donc certains avantages par rapport aux absentes, mais ce critère ne devrait pas être limitant dans la sélection d'une bactérie probiotique.

D'un côté plus pratique, les bactéries devraient posséder de bonnes qualités industrielles, comme des cultures faciles et productives, dans un milieu peu coûteux (Dunne *et al.*, 1999).

<b>Critères de sélection d'un probiotique</b>
Microorganisme d'origine humaine
Non-pathogène
Propriétés industrielles favorables
Résistance à l'acide gastrique et aux sels biliaires
Capacité d'adhérer à l'épithélium intestinal
Capacité à persister temporairement
Production de substances antimicrobiennes
Modulation de la réponse immunitaire
Influences sur les activités métaboliques

**Tableau 1.** Critères de sélection d'un microorganisme comme « probiotique » (Dunne *et al.*, 1999).

## 2.6 Risques et effets secondaires

Le fait de consommer des bactéries en grand nombre dans le but d'améliorer la santé peut sembler farfelu pour notre société aseptisée, et la crainte des complications associées à une telle pratique est très présente. C'est pourquoi les autorités médicales suivent de très près les effets néfastes possibles entraînés par une consommation importante de probiotiques, particulièrement dans les pays scandinaves (Salminen *et al.*, 2002). Mais, les probiotiques ne sont pas reconnus comme des organismes pathogènes

(pas même opportunistes) ou dangereux et le statut « GRAS » (Generally Recognized As Safe) leur est conféré, ce qui signifie donc que les risques associés à leur consommation sont très faibles. Seule la possibilité de translocation bactérienne pourrait entraîner des effets néfastes pour la santé. La translocation bactérienne est le passage de microorganismes du tractus gastro-intestinal vers d'autres parties du corps, comme les nodules lymphatiques, le sang, le foie ou la rate (Marteau et Shanahan, 2003). La translocation bactérienne peut entraîner une infection et une perte de fonction des organes atteints. S'il y a perte d'intégrité au niveau de l'épithélium intestinal, n'importe quelle bactérie présente dans la flore peut atteindre le sang ou certains organes et entraîner des effets néfastes. La crainte est qu'une consommation excessive de probiotiques accentue ce phénomène et en aggrave les conséquences. Cependant, pour ce qui est de la consommation de probiotiques, les complications observées sont très rares et ne semblent se produire que dans des cas très particuliers, chez des patients âgés et malades. Même lorsque la translocation de bactéries probiotiques ingérées se produit, peu d'effets néfastes ont été observés (Ishibashi et Yamazaki, 2001). Finalement, les probiotiques ne semblent pas causer de danger pour les consommateurs, mais il faut tout de même surveiller certains cas particuliers, comme les personnes âgées ou immunosupprimés, les femmes enceintes ou les gens ayant de graves problèmes intestinaux (Marteau et Shanahan, 2003; Isolauri *et al.*, 2004).

Afin d'avoir un effet bénéfique maximal et des risques minimaux, des doses précises, ainsi que la fréquence des «traitements», doivent être déterminées. Selon Ouwehand *et al.* (2002), les doses ingérées devraient se situer aux alentours de  $10^9$  bactéries par jour. De plus, les bactéries ne devraient pas servir de thérapie directe pour des maladies sévères, comme en cas de lésions intestinales, en raison du risque accru de translocation bactérienne (Tamboli *et al.*, 2003).

### 3. Effets bénéfiques reconnus

#### 3.1 Modulation de la flore intestinale

L'effet fondamental des bactéries probiotiques se produit au niveau de la flore intestinale. La consommation de bactéries probiotiques, pour les individus en bonne santé, doit d'abord aider à maintenir l'équilibre dans les différentes populations de bactéries résidentes de la flore intestinale. Ainsi, elles permettent à l'hôte de maintenir un processus de digestion sain et un système immunitaire prêt à réprimer l'invasion d'un pathogène. Les bactéries consommées pour leurs effets bénéfiques doivent donc traverser le tube digestif et atteindre le côlon, la partie la plus largement peuplée, préférablement en demeurant viables, afin d'y influencer la flore. L'adhésion à la muqueuse ou à l'épithélium intestinal est aussi souhaitable afin que la flore soit modulée à plus long terme (Jacobsen *et al.*, 1999). La modulation de la flore intestinale correspond au bénéfice «classique» associé à la consommation de bactéries probiotiques. L'aspect de modulation de la flore intestinale était d'ailleurs partie intégrante des premières définitions du terme probiotique. Plusieurs mécanismes d'action peuvent expliquer cette modulation. Les bactéries probiotiques s'implantant dans la flore peuvent produire de l'acide lactique, ce qui réduit le pH du côlon et ainsi empêche la croissance de certaines espèces (Young et Huffman, 2003). Les probiotiques peuvent aussi compétitionner pour les sites d'attachement et récepteurs disponibles sur la muqueuse intestinale et ainsi entraîner le déplacement des populations bactériennes (Collins et Gibson, 1999). La compétition pour les nutriments et les facteurs de croissance entre les probiotiques et les bactéries résidentes peut mener à la diminution de certaines espèces (Collins et Gibson, 1999). Certains probiotiques réduisent directement le nombre de bactéries d'espèces précises dans la flore par l'effet de substances antimicrobiennes qu'ils produisent (Collins et Gibson, 1999). Le système immunitaire de l'hôte peut aussi être stimulé par la bactérie probiotique ou ses composantes et ainsi augmenter la réponse aux pathogènes (Young et Huffman, 2003).

Différentes bactéries ont démontré la capacité de moduler la flore intestinale ce qui permettrait de leur rattacher une panoplie d'effets bénéfiques, comme l'exclusion d'un organisme potentiellement pathogène. Plusieurs souches du groupe des bactéries lactiques ont prouvé qu'elles pouvaient moduler la flore intestinale de manière bénéfique. La consommation de yogourt contenant  $10^7$  bactéries viables par mL de la souche

*Bifidobacterium bifidum* a augmenté le ratio de bifidobactéries par rapport aux coliformes. De plus, la souche ingérée a survécu au passage dans le tube digestif et proliférée durant plus de 8 jours au sein de la flore intestinale (Chen *et al.*, 1999). Cette souche de *Bifidobacterium bifidum* peut donc potentiellement diminuer les coliformes, une espèce de bactérie potentiellement pathogène, ce qui permet à l'hôte d'obtenir une fonction digestive plus saine. La consommation d'une souche d'une autre espèce de bifidobactérie, *Bifidobacterium longum*, semble aussi pouvoir moduler positivement la flore intestinale, en réduisant des espèces potentiellement nocives comme *Clostridium* et *Bacteroides*. De plus, la consommation de cette bactérie a réduit le pH intestinal, ce qui peut apporter une protection contre l'invasion de bactéries pathogènes (Benno et Mitsuoka, 1992). Plusieurs souches de lactobacilles semblent aussi pouvoir moduler positivement la flore intestinale. Des souris ayant reçu par gavage des doses de  $10^9$  bactéries par jour pendant 16 semaines de la souche *Lactobacillus salivarius ssp. salivarius* UCC118 ont montré une réduction significative des entérocoques et des coliformes fécaux, associés à différents effets bénéfiques (O'Mahony *et al.*, 2001).

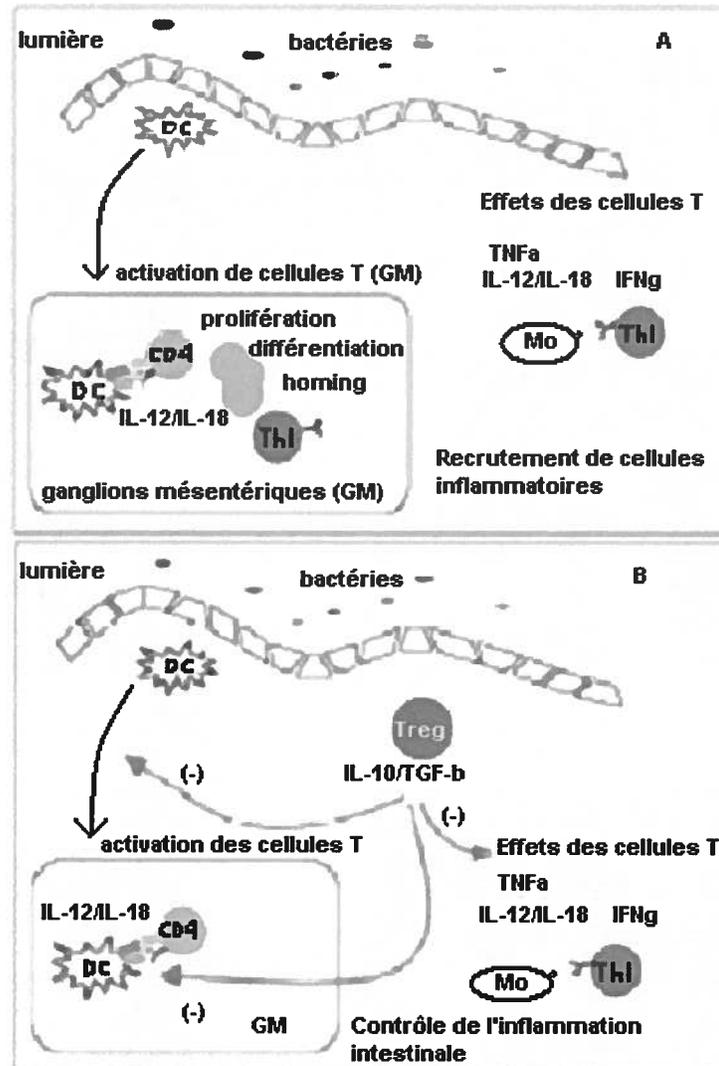
Finalement, les bactéries probiotiques peuvent influencer de manière positive la fine balance qui existe au niveau de la flore intestinale. Chaque adulte a une flore intestinale qui lui est propre et elle semble être particulièrement stable tout au long de sa vie (Isolauri *et al.*, 2004). Cependant, elle peut être modifiée par la prise d'antibiotiques, qui réduisent les populations bactériennes, ou modulée par la prise de probiotiques. Cette modulation, même si elle n'est que temporaire, peut mettre un terme à une inflammation incontrôlée déclenchée par un déséquilibre au niveau de la flore. Par contre, les bénéfices associés à la consommation de certains probiotiques ne sont probablement pas seulement reliés à leurs effets sur la flore intestinale. Le potentiel immunomodulateur des probiotiques est aussi très important, puisque les bactéries ou leurs composantes entrent en contact avec les nombreuses cellules immunitaires présentes dans le tube digestif. L'immunomodulation peut donc leur permettre d'exercer plusieurs effets santé.

### 3.2 Modulation du système immunitaire

La composition de la flore intestinale est un facteur majeur pouvant modifier la réponse immunitaire, tout comme le système immunitaire de l'hôte peut modifier la composition de la flore intestinale (Vaarala, 2003). L'intestin est l'organe qui contient la plus grande quantité de cellules immunitaires (Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 2004), localisées principalement dans différents tissus lymphoïdes, comme les plaques de Peyer, les ganglions mésentériques, mais aussi sous forme de lymphocytes dispersés tout au long de l'intestin dans l'épithélium et la muqueuse intestinale (Shi et Walker, 2004). Les tissus immunitaires associés à l'intestin sont généralement appelés « GALT », ce qui signifie « Gut-Associated Lymphoid Tissues ». La fonction principale et la plus importante des « GALT » est de distinguer, parmi tous les antigènes qui passent par le tractus gastro-intestinal, ceux qui sont à risque et envers lesquels une réponse inflammatoire doit être déclenchée, et ceux qui sont sans danger, comme les bactéries indigènes de la flore intestinale et les composantes alimentaires, qui doivent être tolérées (Shi et Walker, 2004). Une réponse inflammatoire inappropriée face à tous ces antigènes peut entraîner d'importants problèmes de santé, comme les maladies inflammatoires de l'intestin.

L'équilibre du système immunitaire, au niveau de l'intestin, est maintenu par plusieurs intervenants importants. Les lymphocytes  $T_H$  se divisent en deux catégories principales, les  $T_{H1}$  (système immunitaire inné) et les  $T_{H2}$  (système immunitaire acquis). Les cellules  $T_{H1}$  produisent des marqueurs à vocation pro-inflammatoire, alors que la branche  $T_{H2}$  est plutôt responsable de la production d'anticorps pour répondre à une éventuelle menace. L'équilibre  $T_{H1}/T_{H2}$  doit être conservé afin que l'intestin demeure en état d'homéostasie. Un troisième type de cellules peut aussi intervenir, les  $T_{H3}$ , généralement appelées cellules T régulatrices. Bien que leur nombre soit moins élevé, elles peuvent contrecarrer une réponse inflammatoire trop forte et inappropriée et sont donc en grande partie responsable du phénomène de la tolérance orale. Elles pourraient aussi moduler le développement de maladies autoimmunes (Shi et Walker, 2004). Toutes ces cellules sécrètent plusieurs cytokines venant influencer le déroulement de la réponse inflammatoire, en activant ou en recrutant certains types de cellules immunitaires et en permettant leur différenciation. Une surproduction de cytokines comme l'IFN- $\gamma$ , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12 ou le TNF- $\alpha$  semble être associée à des pathologies comme les

maladies inflammatoires de l'intestin (Rogler et Andus, 1998). Elles sont produites par les cellules de type T<sub>H</sub>1 et attirent au site inflammatoire les polymorphonucléaires (PMNs) et ensuite les macrophages, qui poursuivent le processus. L'activation de la voie NF- $\kappa$ B peut aussi mener à la production de telles cytokines. Les principales cytokines anti-inflammatoires sont quant à elles l'IL-4, l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , principalement produites par les cellules T<sub>H</sub>2 et les T régulatrices.



**Figure 2A.** Recrutement et activation de cellules entraînant l'inflammation intestinale incontrôlée. Les cellules dendritiques (DC) migrent vers les ganglions mésentériques (GM) et activent des cellules  $T_H1$ , qui produisent des marqueurs pro-inflammatoires et recrutent des cellules qui aggravent l'inflammation, comme les macrophages (Mo). **2B.** Les cellules T régulatrices contrôlent l'inflammation intestinale. Les cellules T régulatrices produisent de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ , ce qui inhibe la migration des cellules dendritiques vers les ganglions mésentériques et qui diminue par le fait même l'activation des cellules  $T_H1$ , puis elles diminuent les effets des cellules  $T_H1$  déjà activées (Adaptée de Singh *et al.*, 2001).

Les interrelations entre les cellules immunitaires de l'intestin et les bactéries résidentes de la flore sont continues et extrêmement nombreuses. Les cellules de l'hôte doivent être en mesure de reconnaître les pathogènes et de répondre de manière appropriée, tout en tolérant les souches indigènes. Une bonne partie de cette reconnaissance s'effectue via les récepteurs « Toll-like » (TLR). Il y a plusieurs types de TLR, mais qui partagent tous une fonction semblable, soit de reconnaître différentes composantes bactériennes et de déclencher une réponse immunitaire. La reconnaissance de composantes bactériennes par les TLR peut entraîner la production de peptides antimicrobiens, fortifier la barrière intestinale et augmenter la prolifération des cellules épithéliales. La signalisation des TLR est aussi essentielle pour le processus de régénération des tissus (Abreu *et al.*, 2005).

L'intestin contient aussi une grande quantité de cellules productrices d'IgA, qui permettent à l'hôte de se protéger des infections (Cong *et al.*, 2003). De plus, les défensines sont des peptides antimicrobiens produits par les cellules épithéliales de l'intestin qui peuvent agir contre les bactéries pathogènes, les champignons et même certains types de virus (Wehkamp *et al.*, 2004). Comme l'intestin est un organe très actif sur le plan immunitaire, toutes les principales cellules pour défendre l'organisme y sont présentes. L'intestin est donc un système très complexe sur le plan immunitaire, en raison de la grande quantité de bactéries qui y résident et de leurs interactions avec les cellules de l'hôte, en plus des nombreux antigènes d'origine alimentaire qui y transitent. Les probiotiques deviennent donc des molécules de choix pour moduler la réponse immunitaire au niveau de l'intestin, par la production de substances antimicrobiennes, par la modulation de la flore résidente ou par l'interaction spécifique de certaines de leurs composantes avec des récepteurs ou des cellules.

Les bactéries probiotiques peuvent exercer de nombreux effets d'immunomodulation. L'impact de ces effets est principalement localisé au niveau du tube digestif, mais peut aussi avoir des répercussions systémiques. De plus, chaque bactérie module différemment le système immunitaire. Des souches de *L. lactis*, *L. acidophilus* et *L. plantarum* ont démontré la capacité d'augmenter la quantité de cellules productrices d'IgM. Ces mêmes souches, en plus de certaines *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus* et *S. thermophilus*, ont aussi démontré la capacité d'augmenter les cellules

sécrétant les IgA. De plus, les souches de *L. casei* et *L. plantarum* testées augmentent la quantité de cellules T CD4+ (T<sub>H</sub>) (Perdigon *et al.*, 1999). Parmi toutes les souches augmentant les IgA au niveau de la muqueuse intestinale, seule *L. acidophilus* n'augmentait pas aussi les IgA de la muqueuse bronchique. Ceci implique donc que la stimulation du système immunitaire de l'intestin peut avoir des effets systémiques, particulièrement pour les autres muqueuses (Perdigon *et al.*, 1999).

Les probiotiques peuvent aussi moduler la réponse des différentes populations de cellules T. Certains favorisent le développement d'une réponse principalement axée sur les cellules T<sub>H</sub>1, alors que d'autres stimulent la voie T<sub>H</sub>2. La bactérie *L. casei* favorise la voie T<sub>H</sub>1 chez la souris en inhibant la sécrétion d'IL-4 et d'IL-5, mais engendre la production d'IFN- $\gamma$  (Shida *et al.*, 1998). La co-culture de cellules de la muqueuse intestinale isolées chez des volontaires avec *L. casei* DN-114 001, *L. casei* DN-114 056 ou *L. casei* ATCC-334 a diminué la production du TNF- $\alpha$ , favorisant ainsi la branche T<sub>H</sub>2. La présence de *L. bulgaricus* LB-10 dans la culture n'a cependant pas modifié la production de TNF- $\alpha$ , et contrairement, la souche non-pathogène *E. coli* ECOR-26 a quant à elle augmenté la quantité de TNF- $\alpha$  dans le milieu (Borrueel *et al.*, 2003). De plus, la souche *L. casei* DN114-001 a pu prévenir l'augmentation du TNF- $\alpha$  en présence de la souche non-pathogène de *E. coli* (Borrueel *et al.*, 2003).

Les probiotiques peuvent aussi modifier la réponse inflammatoire en favorisant la suppression par les cellules T régulatrices. En effet, dans un modèle d'inflammation intestinale, des souris traitées au mélange probiotique VSL#3 montrent une augmentation de la proportion de cellules T régulatrices produisant du TGF- $\beta$  et de l'IL-10, et les symptômes sont parallèlement réduits (Di Giacinto *et al.*, 2005).

La modulation immunitaire possiblement entraînée par la consommation de probiotiques peut aussi se produire via les récepteurs Toll-like (TLR), des intervenants très importants pour le maintien de l'équilibre entre les bactéries de la flore intestinale, les bactéries pathogènes et les cellules de l'hôte. En effet, les souris déficientes pour la réponse des TLR soumises à de faibles doses de « dextran sulfate sodium » (DSS), un agent chimique provoquant des lésions au niveau du côlon, montrent des symptômes beaucoup plus importants que les souris normales. De plus, les souris ayant subi une déplétion de la flore intestinale par les antibiotiques montrent aussi des symptômes plus

importants que les souris normales (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). L'interaction des bactéries inoffensives avec les TLR est donc cruciale pour enclencher les processus de réparation tissulaire et protéger de l'inflammation intestinale incontrôlée (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). Plus spécifiquement, le récepteur Toll-like 9 (TLR9) est aussi impliqué comme facteur de protection face à l'inflammation intestinale (Rachmilewitz *et al.*, 2004). Le mécanisme d'action de certains probiotiques semblerait en effet passer par des motifs CpG retrouvés sur leur ADN et reconnus par le TLR9. Cette reconnaissance active les voies de NF- $\kappa$ B et JNK, ce qui mène à la production d'IL-12 et d'IL-6 et pourrait augmenter la proportion de cellules T régulatrices (Rachmilewitz *et al.*, 2004). La souche *E. coli* Nissle 1917 entraîne aussi une immunomodulation bénéfique réduisant les symptômes de l'inflammation intestinale. Elle réduit l'expression de l'IFN- $\gamma$  et de MIP-2, une protéine inflammatoire des macrophages. De plus, l'ADN de la bactérie s'est avéré aussi efficace que la bactérie entière pour réduire les symptômes, il est donc possible que l'effet soit encore une fois dépendant du TLR9 (Kamada *et al.*, 2005).

### 3.3 Atténuation de troubles intestinaux

#### 3.3.1 Intolérance au lactose

L'intolérance au lactose est le résultat d'une mauvaise digestion de ce sucre. Les personnes qui en souffrent accusent une déficience en lactase, l'enzyme qui permet de digérer le lactose et de le convertir en glucose et en galactose afin qu'il soit absorbé par l'intestin. L'intolérance au lactose n'est donc pas une allergie, ses causes ne sont pas immunitaires et sa gravité est donc limitée. Cependant, le lactose qui n'est pas assimilé par l'intestin fermente et entraîne un inconfort plus ou moins important, causant des douleurs abdominales, des crampes, des ballonnements, de la diarrhée, des flatulences ou de la nausée (Ouwehand *et al.*, 2002). En général, les individus intolérants au lactose ne ressentent aucun inconfort suite à la consommation de laits fermentés, puisque la plupart des bactéries utilisées pour fermenter le lait produisent de la  $\beta$ -galactosidase. La consommation de bactéries probiotiques peut donc diminuer les symptômes associés à l'intolérance au lactose en fournissant l'enzyme digestive nécessaire (Marteau *et al.*, 2001). L'efficacité de plusieurs probiotiques a déjà été démontrée, dont *Bifidobacterium bifidus*, *Lactobacillus bulgaricus* et de nombreux autres (Martini *et al.*, 1991).

### 3.3.2 Diarrhées

La consommation de bactéries probiotiques peut aider à prévenir l'apparition de plusieurs formes de diarrhée. La diarrhée peut être déclenchée par de multiples causes, mais qui reviennent toutes à un déséquilibre au niveau de la flore intestinale. Par exemple, dans les intoxications alimentaires et dans la diarrhée du voyageur, le problème est causé par la consommation de bactéries nocives qui viennent s'implanter temporairement dans la flore et exercent leurs effets néfastes, avant d'être prises en charge par le système immunitaire. De la même façon, la diarrhée peut être causée par le *Clostridium difficile* ou le rotavirus. La déplétion des bactéries résidentes de la flore intestinale par un traitement aux antibiotiques peut aussi permettre la croissance de bactéries nocives et entraîner des diarrhées.

Les intoxications alimentaires sont des infections digestives dues à l'ingestion d'aliments contaminés par des bactéries. Lorsque les aliments sont contaminés, conservés trop longtemps ou manière inappropriée, les bactéries se multiplient. Lors de la consommation d'aliments contaminés, les bactéries nocives peuvent s'implanter dans l'intestin et causer la diarrhée. Cependant, la prise de bactéries probiotiques peut prévenir un tel problème par la compétition exercée pour les nutriments ou les sites d'attachement à la muqueuse intestinale. Certains probiotiques produisent aussi des bactériocines qui peuvent inactiver les bactéries nocives contenues dans les aliments avariés.

La diarrhée du voyageur, communément appelée « turista », se produit chez environ la moitié des individus fréquentant des pays à risque (Marteau *et al.*, 2001). La diarrhée se déclare en général en raison de la consommation de bactéries pathogènes de *E. coli*, *Shigella* ou *Salmonella* (Sanders et Tribble, 2001). Différents probiotiques ont démontré la capacité de réduire les cas de diarrhée du voyageur, pour certaines destinations précises, et les résultats sont parfois contradictoires. La consommation du probiotique *Lactobacillus rhamnosus* GG, chez des voyageurs visitant la Turquie, a permis de réduire l'incidence de la diarrhée, mais seulement pour une destination spécifique (Oksanen *et al.*, 1990). La consommation d'un mélange de lactobacilles, de bifidobactéries et de streptocoques a aussi permis de réduire l'incidence de la diarrhée chez un groupe de touristes visitant l'Égypte (Black, 1989). Plusieurs autres études ont

été faites sur la prévention de la diarrhée du voyageur par les probiotiques et les résultats varient selon la ou les souches utilisées, le provenance des touristes et la destination.

Des symptômes aigus de gastro-entérite (caractérisés par des vomissements et de la diarrhée) peuvent être déclenchés par des agents infectieux. La cause de ce type de diarrhée la plus souvent rencontrée chez les enfants et la plus meurtrière est le rotavirus (de Roos et Katan, 2000). Le rotavirus envahit la muqueuse intestinale et s'y reproduit, ce qui cause des dommages à la membrane et en augmente la perméabilité (Ouwehand *et al.*, 2002). Des évidences démontrent clairement la capacité de différents probiotiques pour réduire la durée de l'infection tout en diminuant les symptômes (de Roos et Katan, 2000). La consommation de *Lactobacillus* GG peut réduire le risque de développer une gastro-entérite au rotavirus chez les enfants hospitalisés (Szajewska *et al.*, 2001). La combinaison de *Bifidobacterium bifidum* et de *Streptococcus thermophilus* a aussi aidé à prévenir l'apparition de la gastro-entérite au rotavirus chez les enfants admis à l'hôpital (Saavedra *et al.*, 1994). Plusieurs autres études ont aussi été faites pour la prévention et le traitement par les probiotiques des infections au rotavirus et les résultats varient selon la ou les souches utilisées.

La flore intestinale saine possède une certaine résistance face à l'invasion par des bactéries pathogènes. L'équilibre de la flore est totalement perturbé lors de la prise d'antibiotiques. Les populations de bactéries inoffensives sont décimées, ce qui rend la place et les nutriments disponibles pour la colonisation de bactéries pathogènes, comme le *Clostridium difficile* (Surawicz, 2003). De telles infections sont souvent contractées en milieu hospitalier, ce qui augmente la durée de l'hospitalisation et le coût des traitements (Plummer *et al.*, 2004). La prévention ou le traitement avec des bactéries probiotiques permettraient un maintien plus important de la balance de la flore intestinale et ainsi empêcher la colonisation du *C. difficile* ou y mettre un terme. Différentes bactéries ont démontré des bénéfices face aux diarrhées associées à la prise d'antibiotiques. Un rôle de prévention a été attribué à une combinaison de *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium bifidum* consommée par des personnes du troisième âge en milieu hospitalier (Plummer *et al.*, 2004). La levure *Saccharomyces boulardii* a aussi démontré la capacité de traiter les diarrhées associées à la colonisation de *Clostridium difficile* suite à la prise d'antibiotiques (McFarland *et al.*, 1994). Plusieurs autres études ont aussi été

publiées sur les bénéfices potentiels de différentes bactéries probiotiques pour prévenir ou traiter les problèmes reliés au *Clostridium difficile*.

Finalement, les causes principales des diarrhées sont généralement reliées à l'implantation de bactéries pathogènes au niveau de la flore intestinale. Certaines bactéries probiotiques peuvent aider à prévenir ou traiter ces infections. Les probiotiques peuvent stimuler le système immunitaire, augmentant ainsi la réponse aux pathogènes, ils compétitionnent pour les nutriments et les sites d'attachement disponibles, ce qui rend la colonisation des pathogènes plus fastidieuse, ils réduisent le pH intestinal et produisent des substances antimicrobiennes, ce qui empêche la croissance des pathogènes (Surawicz, 2003; Sullivan et Nord, 2005). Cependant, ce ne sont pas nécessairement toutes les bactéries probiotiques qui peuvent exercer des effets bénéfiques contre les diarrhées, chaque déclaration de bénéfice d'une bactérie doit être démontré clairement.

### 3.3.3 Syndrome du côlon irritable

Dans le syndrome du côlon irritable, l'intestin est plus sensible et réagit trop fortement à certains aliments ou est affecté par le stress. Il en résulte un désordre au niveau du transit intestinal, entraînant des symptômes comme les crampes, la constipation, la diarrhée, les flatulences et les ballonnements. Un déséquilibre de la flore intestinale pourrait être partiellement responsable de ce trouble digestif (Verdu et Collins, 2004). Des personnes atteintes du syndrome du côlon irritable ont vu leurs symptômes améliorés suite à la consommation de *Lactobacillus plantarum* (DSM 9843). Cette amélioration s'expliquerait par la modulation de la flore intestinale, car certaines espèces, par des processus de fermentation, ont plus tendance à produire des gaz entraînant des flatulences que d'autres, donc leur diminution au sein de la flore pourrait expliquer l'amélioration des ballonnements et des douleurs abdominales (Nobaek *et al.*, 2000). Le syndrome du côlon irritable semble souvent lié à une altération de la flore intestinale par rapport à celle des individus en santé. Le rétablissement de la flore par la consommation de certains probiotiques permettrait d'améliorer les complications de ce trouble digestif. La consommation de la souche *Lactobacillus plantarum* 299v ou du mélange VSL#3, contenant plusieurs souches de lactobacilles et de bifidobactéries, a permis d'atténuer les gonflements, les douleurs abdominales et de réguler la fréquence de défécation chez les patients atteints du syndrome du côlon irritable (Verdu et Collins, 2004). Cependant, les

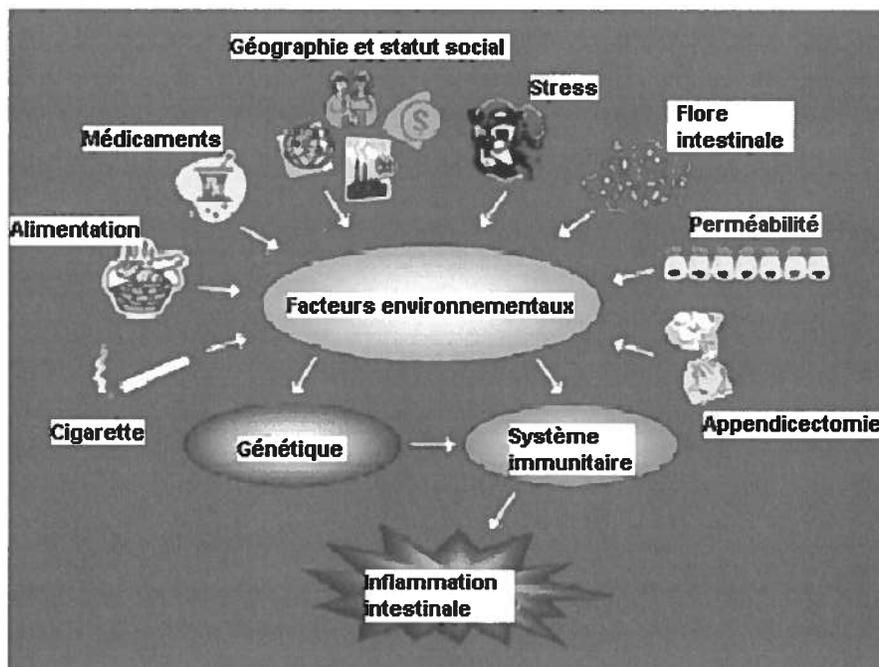
études des bénéfices des probiotiques sur le côlon irritable sont souvent contradictoires. Selon une autre étude, la consommation de *Lactobacillus plantarum* 299v ne semblait pas améliorer les symptômes associés à ce problème intestinal (Sen *et al.*, 2002). Un processus inflammatoire léger semble aussi être impliqué dans les causes de ce syndrome. En effet, un ratio plus élevé de cytokines T<sub>H</sub>1 par rapport aux T<sub>H</sub>2 semble être présent chez les personnes souffrant du côlon irritable. La normalisation de cette balance T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 par la consommation de *Bifidobacterium infantis* 35624 a permis de réduire les symptômes des sujets atteints (O'Mahony *et al.*, 2005).

### 3.4 Atténuation des maladies inflammatoires de l'intestin

Les maladies inflammatoires de l'intestin désignent deux maladies semblables, la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Il s'agit de maladies autoimmunes qui semblent déclenchées par une combinaison de facteurs génétiques, immunitaires et environnementaux. Elles touchent environ 0,2% de la population des pays occidentaux (Singh *et al.*, 2001). La théorie de l'hygiène tente d'expliquer la forte augmentation de l'incidence des maladies autoimmunes et des maladies inflammatoires de l'intestin. Comme mentionné précédemment, la théorie de l'hygiène affirme que ce sont l'exposition réduite aux bactéries, lié à une diminution des cas d'infection, la diminution de la taille des familles et donc des contacts entre frères et sœurs de même que les conditions d'hygiène personnelle et environnementale très poussées qui ont mené à cette augmentation des cas de maladies autoimmunes et atopiques (Strachan, 1989; 2000). Dans les maladies inflammatoires de l'intestin, il y a perte de l'homéostasie au niveau du tube digestif causée par plusieurs facteurs auxquels le corps n'a pas su s'adapter (Danese *et al.*, 2004). La location géographique et le statut social semblent être parmi les facteurs les plus importants dans le développement des maladies inflammatoires de l'intestin. En effet, la prévalence des maladies inflammatoires de l'intestin est beaucoup plus importante dans les pays occidentaux et industrialisés. Dans ces pays, elle atteint aussi plus souvent les individus de groupes sociaux économiques élevés (Danese *et al.*, 2004). Ce facteur de risque semble être relié de très près à la théorie de l'hygiène, puisque c'est dans les pays occidentaux que les conditions d'hygiène sont les plus poussées, que les familles sont les moins nombreuses et que les infections sont les moins répandues.

Des mutations sur certains gènes semblent aussi être en partie responsables du développement des maladies inflammatoires de l'intestin. Des polymorphismes sur les gènes codant pour les récepteurs Toll-like et les protéines NOD2 sont présents chez une grande proportion de patients souffrant de ces problèmes de santé (Abreu *et al.*, 2005). Ces polymorphismes pourraient entraîner une réponse inflammatoire inadaptée envers les bactéries résidentes de la flore intestinale.

L'exposition réduite aux bactéries, le déséquilibre de la flore intestinale ainsi que des mutations sur des gènes responsables de la réponse inflammatoire face aux bactéries résidentes sont tous des facteurs majeurs dans le développement des maladies inflammatoires de l'intestin. Certains probiotiques pourraient être une solution intéressante pour diminuer les symptômes de l'inflammation intestinale, puisqu'ils peuvent moduler la flore intestinale et le système immunitaire.



**Figure 3.** Facteurs environnementaux influençant le bon fonctionnement du tube digestif et le maintien d'une « inflammation contrôlée » dans l'intestin. L'action combinée de ces différents facteurs peut se manifester par une inflammation chronique non contrôlée menant aux maladies inflammatoires de l'intestin (Adaptée de Danese *et al.*, 2004).

### 3.4.1 Maladie de Crohn

La maladie de Crohn est l'un des deux principaux problèmes de santé que comprennent les maladies inflammatoires de l'intestin. La maladie de Crohn est un trouble chronique qui peut atteindre n'importe quelle partie du tube digestif, de la bouche à l'anus. L'inflammation se situe à quelques sites précis, entrecoupés de tissu sain, où des lésions se forment. Les lésions inflammatoires peuvent traverser la totalité de la paroi intestinale. Les principaux facteurs de risques sont illustrés dans la partie précédente. Il semblerait qu'une réponse immunitaire inappropriée soit déclenchée contre des antigènes normalement tolérés, comme la nourriture ingérée ou les bactéries résidentes. Différentes populations de cellules immunitaires envahissent donc la paroi intestinale et alimentent l'inflammation chronique. Les personnes atteintes souffrent de symptômes variés, les plus

fréquents étant des douleurs abdominales, de la diarrhée souvent sanguinolente et la perte de poids. La perte de poids est entraînée par une diminution de l'appétit et la malabsorption des nutriments ingérés. Des complications nécessitant la chirurgie peuvent parfois se produire, comme la formation de fistules, d'abcès ou des perforations. Les symptômes de la maladie de Crohn ne sont pas toujours présents, ils se manifestent à intervalles plus ou moins longs, séparés par des périodes de rémission. Puisque les causes de la maladie ne sont pas encore identifiées clairement, il n'y a pas de traitement pour guérir complètement la maladie. Des médicaments anti-inflammatoires et la chirurgie peuvent cependant aider à contrôler les symptômes, à atteindre la rémission et à la maintenir le plus longtemps possible. Le médicament le plus utilisé pour traiter les symptômes modérés de la maladie de Crohn et maintenir les périodes de rémission est le 5-aminosalicylate (5-ASA). Les corticostéroïdes et les immunosuppresseurs sont utilisés lorsque l'activité de la maladie est intense, mais leur utilisation est limitée puisqu'ils affectent le système immunitaire en entier entraînant de nombreux effets secondaires. (Fondation canadienne des maladies inflammatoires de l'intestin (FCMII), 2001) (Crohn's and Colitis Foundation of America (CCFA), 2005)

#### 3.4.2 Colite ulcéreuse

La colite ulcéreuse diffère de la maladie de Crohn en raison de deux de ses caractéristiques principales. D'abord, elle n'atteint que le côlon et se manifeste généralement au niveau du rectum. Ensuite, les lésions qui se forment ne sont pas discontinues et n'atteignent que la couche la plus superficielle de la paroi intestinale, la muqueuse. Plusieurs petits ulcères peuvent se former sur le tissu inflammé et produire du pus et du mucus. L'irritation de la muqueuse inflammée par la nourriture ingérée peut facilement entraîner des saignements. La colite ulcéreuse se déclare elle aussi de manière épisodique, avec des périodes de rémission entre chaque poussée inflammatoire. Les épisodes de la maladie se caractérisent par des crampes abdominales et des selles nombreuses et plus ou moins liquides, souvent constituées de pus, de sang et de mucus. Les pertes d'appétit et de poids sont aussi fréquentes. Les complications de la maladie sont des ulcérations très répandues entraînant des saignements importants et la perforation. Les facteurs de risque sont les mêmes que pour la maladie de Crohn, et la maladie se manifeste aussi en raison du dérèglement du système immunitaire qui

déclenche une réaction inflammatoire en réponse à des antigènes normalement tolérés. Les principaux traitements visent encore une fois à contrôler les symptômes et à ce que le patient demeure le plus longtemps possible en période de rémission. Le 5-ASA est un des médicaments les plus utilisés pour soulager des symptômes et il s'avère particulièrement utile pour maintenir la période de rémission. Les corticostéroïdes et les immunosuppresseurs peuvent aussi être utilisés efficacement, mais de préférence durant de courtes périodes, car ils entraînent des effets secondaires. Comparativement à la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse peut être guérie, par l'ablation totale du côlon, puisque la maladie ne se déclare qu'en ce site anatomique. Il faut alors former une « poche » avec les intestins pour recueillir les matières fécales ou avoir recours à un sac externe. Cette poche peut elle aussi s'inflammer et le patient souffre alors de pouchite. (FCMII, 2001) (CCFA, 2005)

#### 3.4.3 Exemples de probiotiques efficaces

Les maladies inflammatoires de l'intestin sont mal comprises et les causes exactes de leur développement demeurent encore inconnues. Comme expliqué précédemment, les bactéries résidentes de la flore intestinale, l'environnement, la génétique et le déséquilibre du système immunitaire semblent être impliqués de très près. La thérapie par les probiotiques, ou, à tout le moins, le soulagement des symptômes et le maintien des périodes de rémission, devient intéressante en raison des propriétés de certaines de ces bactéries bénéfiques. Certains probiotiques pourraient en effet soulager des maladies inflammatoires de l'intestin, possiblement par leur capacité à moduler la flore intestinale et la réponse immunitaire.

Plusieurs bactéries probiotiques différentes ont démontré la capacité de réduire les symptômes associés aux maladies inflammatoires de l'intestin, dans des expériences animales et même dans des études cliniques chez l'humain. Encore une fois, les résultats ne sont pas concluants pour toutes les bactéries testées et peuvent varier d'une étude à l'autre, selon le modèle utilisé, les doses testées et les paramètres suivis.

L'étude des effets protecteurs conférés par la consommation de bactéries probiotiques peut être réalisée selon plusieurs modèles animaux. L'inflammation intestinale peut être provoquée par des agents chimiques, par la modification du système immunitaire ou par l'utilisation d'animaux déficients pour certains gènes (Pizarro *et al.*,

2003). Toutes ces techniques pour générer l'inflammation au niveau de l'intestin ont leurs propres caractéristiques et représentent plus ou moins la séquence d'événements rencontrés lors d'une rechute de maladie inflammatoire intestinale chez l'humain ou lors de problèmes chroniques. L'inflammation intestinale induite chimiquement est parmi les méthodes les plus utilisées. Elle peut, entre autres, être induite par l'administration de « trinitrobenzene sulfonic acid » (TNBS), de « dextran sulfate sodium » (DSS) ou d'oxalozone. Chacun de ces produits chimiques entraîne l'inflammation par la suractivation de certaines populations de cellules immunitaires ou par des dommages directs à la paroi intestinale (Hibi *et al.*, 2002). Les animaux modifiés génétiquement déficients pour le gène de la cytokine IL-10 sont aussi grandement utilisés. Cette cytokine est responsable de maintenir l'équilibre de l'état d'inflammation contrôlée au niveau de l'intestin (O'Mahony *et al.*, 2001). La protection que pourrait potentiellement apporter la consommation de probiotiques a été évaluée principalement dans ces modèles animaux.

La bactérie *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius* UCC118 a démontré la capacité d'améliorer les symptômes de l'inflammation intestinale chez des souris déficientes pour le gène de l'IL-10. Le fait de traiter les souris avec cette bactérie a réduit les populations de coliformes et d'entérocoques de la flore intestinale. De plus, l'atteinte inflammatoire au niveau du côlon était plus faible pour le groupe traité avec la bactérie et associé avec une survie complète du groupe, alors que 20% des souris périssaient suite à une inflammation intestinale trop prononcée dans le groupe contrôle. Il a été postulé que la bactérie pouvait restaurer la balance  $T_H1/T_H2$  chez les souris déficiente en IL-10, ce qui expliquerait l'effet anti-inflammatoire (O'Mahony *et al.*, 2001). Dans ce même modèle, la combinaison des bactéries *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius* 433118 et *Bifidobacterium infantis* 35624 a, elle aussi, démontré la capacité de réduire le degré d'inflammation par rapport à un placebo. Pour le groupe nourri avec cette combinaison de probiotiques, la production de cytokines pro-inflammatoires était réduite et les niveaux de TGF- $\beta$  maintenus (McCarthy *et al.*, 2003). Toujours dans ce même modèle animal, la consommation de la bactérie *Lactobacillus plantarum* 299v a aussi aidé à atténuer l'inflammation intestinale, principalement en réduisant la production de cytokines inflammatoires comme l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  (Schultz *et al.*, 2002).

Parmi les modèles animaux d'inflammation intestinale induite chimiquement, celui utilisant le « dextran sulfate sodium » (DSS) est le plus souvent rencontré. Plusieurs bactéries probiotiques ont démontré la capacité d'améliorer les symptômes de l'inflammation intestinale induite par le DSS, notamment par des pertes de poids moins importantes et par la réduction des diarrhées et des saignements rectaux. Des rats soumis au DSS et traités avec des acides gras à chaînes courtes produits par *Clostridium butyricum* ont montré moins de dommages au niveau de la muqueuse intestinale et les diarrhées sanguinolentes étaient elles aussi réduites (Araki *et al.*, 2004). Les acides gras à chaînes courtes sont des nutriments normalement produits par les bactéries de la flore et sont importants pour le maintien des cellules intestinales. L'effet protecteur potentiel de trois souches de lactobacilles et de deux souches de bifidobactéries dans le modèle induit au DSS a été évalué par Osman *et al.* (2004). Parmi les cinq bactéries testées, trois se sont avérées les plus efficaces, apportant une protection supérieure par la réduction du « score d'inflammation » (basé sur le niveau de diarrhée, la présence de sang dans les fèces et la perte de poids) et en diminuant la translocation bactérienne vers des sites extra-intestinaux. Les bactéries testées sont *Lactobacillus paracasei* DSM 13434, *Lactobacillus gasseri* 5B3, *Lactobacillus plantarum* 299v, *Bifidobacterium* sp. 3B1 et *Bifidobacterium infantis* DSM 15158, ces trois dernières étant les plus efficaces (Osman *et al.*, 2004). Cette expérience démontre clairement que ce ne sont pas toutes les souches de probiotiques qui peuvent améliorer les symptômes de l'inflammation intestinale et qu'une sélection rigoureuse doit être faite. Le modèle d'inflammation au DSS a été utilisé chez des souris stériles, mais inoculées avec trois souches de *Bacteroides vulgatus* isolées de patients souffrant de colite ulcéreuse. Les bactéries de l'espèce *Bacteroides* sont potentiellement responsables du déclenchement et du maintien du processus inflammatoire. En contre partie, l'intestin d'un groupe de souris a aussi été inoculé avec une combinaison de *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum* et *Bifidobacterium longum*. La présence des bifidobactéries dans leur intestin a permis de réduire les populations de *Bacteroides* et de diminuer l'importance de l'inflammation induite par le DSS (Setoyama *et al.*, 2003).

Quelques bactéries différentes ont démontré la capacité d'améliorer les symptômes de l'inflammation intestinale induite par le DSS. Cependant, peu de

publications discutent des mécanismes d'action précis responsables de cette amélioration ou des composantes bactériennes qui entraînent de tels effets. Un groupe de chercheurs a démontré l'efficacité du mélange probiotiques VSL#3 (composé de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* et *Bifidobacterium infantis*) pour atténuer la sévérité de l'inflammation intestinale induite par le DSS, alors que les bactéries étaient utilisées sous forme non-viable. Les probiotiques inactivés par irradiation ce sont avérés aussi efficaces que les viables. De plus, l'ADN isolé de ces bactéries et administré aux souris a aussi réduit l'intensité des symptômes. En effet, les motifs CpG non-méthylés présents dans l'ADN bactérien sont reconnus au niveau de l'intestin par les récepteurs Toll-like 9 (TLR9), ce qui pourrait augmenter la proportion de cellules T régulatrices, diminuant ainsi l'inflammation (Rachmilewitz *et al.*, 2004). Un second groupe de chercheurs a aussi démontré l'efficacité de la bactérie *Escherichia coli* Nissle 1917 pour réduire les symptômes de l'inflammation intestinale induite par le DSS, aussi bien par la bactérie viable, inactivée par la chaleur ou par son ADN isolé (Kamada *et al.*, 2005).

Plusieurs bactéries différentes ont aussi démontré la capacité de réduire les symptômes des maladies inflammatoires de l'intestin dans des études cliniques chez l'humain. Des patients souffrant de la colite ulcéreuse ont consommé 100 mL par jour d'un lait fermenté contenant les bactéries viables *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus acidophilus*. Une période de rémission était d'abord induite par une médication appropriée, puis les patients sélectionnés consommaient le cocktail de bactéries ou un placebo, en plus de leur médication régulière, et la réponse à la thérapie était suivie durant 12 semaines. Dans cette étude, la supplémentation avec un lait fermenté semblait efficace pour réduire les symptômes associés à la colite ulcéreuse modérée et maintenir la période de rémission (Kato *et al.*, 2004). Chez des patients souffrant de colite ulcéreuse, la combinaison du probiotique *Bifidobacterium longum* avec un prébiotique favorable à sa croissance (Synergy 1) a elle aussi permis de réduire l'inflammation chronique comparativement à un groupe placebo. Les niveaux d'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 étaient réduits par le traitement avec le synbiotique (Furrie *et al.*, 2005). Un autre

probiotique, *Escherichia coli* Nissle 1917, s'est montré aussi efficace que la mesalazine pour maintenir la période de rémission chez des patients souffrant de colite ulcéreuse (Kruis *et al.*, 2004). La combinaison de trois souches de probiotiques (*Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) a elle aussi démontré la capacité d'améliorer la condition de patients souffrant de colite ulcéreuse. La consommation de ce mélange bactérien viables activait la voie NF- $\kappa$ B, réduisait les niveaux de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-1) et augmentait la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) (Cui *et al.*, 2004). Une dose quotidienne du mélange probiotique VSL#3 (décrit précédemment) a aussi permis à une majorité de patients souffrant de pouchite de demeurer en rémission, comparativement au groupe placebo (Mimura *et al.*, 2004).

La plupart des études cliniques présentées sont très récentes (2004 ou 2005) et se concentrent sur la colite ulcéreuse. En effet, les risques de translocation bactérienne sont plus faibles dans la colite ulcéreuse que dans la maladie de Crohn, puisque les lésions inflammatoires n'atteignent que les couches superficielles de la paroi intestinale.

### 3.5 Régulation du métabolisme des lipides

Les problèmes cardiovasculaires sont responsables d'une grande proportion des décès prématurés dans les sociétés industrialisées. De nombreux produits pharmaceutiques sont mis sur le marché pour tenter de diminuer le phénomène d'obésité et d'aider à maîtriser les taux de cholestérol ou de triglycérides élevés, afin de réduire les accidents cardiovasculaires. Certains suppléments alimentaires comme des laits fermentés ou des bactéries probiotiques pourraient agir conjointement avec ces médicaments pour contrôler les problèmes de santé associés à des taux de lipides élevés. En effet, certaines bactéries peuvent déconjuguer le cholestérol des sels biliaires, ce qui diminue sa réabsorption. Certaines composantes de la paroi cellulaire des bactéries peuvent aussi lier le cholestérol, ce qui augmente son excrétion (Lovegrove et Jackson, 2004). Les bactéries peuvent aussi fermenter des fibres alimentaires non-digérées, ce qui entraîne la création d'acides gras à chaînes courtes. Certains de ces acides gras à chaînes courtes peuvent entrer en circulation et influencer de manière bénéfique le métabolisme des lipides (Naruszewicz *et al.*, 2002).

Différents produits probiotiques ont démontré la capacité d'influencer positivement les niveaux de lipides sanguins. Chez les rats, la consommation d'un lait fermenté avec *Lactobacillus casei* TMC0409 et *Streptococcus thermophilus* TMC1543 et contenant des protéines de lactosérum a permis de réduire le niveau de cholestérol total ainsi que le niveau de triglycérides. De plus, une hausse du High-Density-Lipoprotein cholesterol (HDL), reconnu comme le « bon » cholestérol, a été observée (Kawase *et al.*, 2000). La consommation d'un yogourt produit avec une souche d'*Enterococcus faecium* et deux souches de *Streptococcus thermophilus* semble pouvoir diminuer de 4% le niveau de cholestérol total chez l'humain (Agerholm-Larsen *et al.*, 2000). La consommation du probiotique *Lactobacillus plantarum* 299v par des fumeurs a permis de réduire leur pression artérielle (Naruszewicz *et al.*, 2002). Des souris soumises à une diète riche en gras consommant des suppléments de *Lactobacillus reuteri* CRL1098 ont montré une diminution de 22% du cholestérol total et de 33% des triglycérides (Taranto *et al.*, 2000).

Des expériences ont déjà été réalisées sur les propriétés hypolipémiantes du kéfir et de certaines de ses composantes. La consommation du kéfir entier par des hommes ayant des niveaux de lipides élevés n'a pas permis d'améliorer leur condition (St-Onge *et al.*, 2002). Par contre, l'exopolysaccharide kéfiran, produit par *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B a permis de diminuer la pression de rats hypertendus et de réduire leur niveau de cholestérol total et de triglycérides (Maeda *et al.*, 2004).

#### **4. Évaluation *in vivo* du potentiel probiotique de lactobacilles**

Plusieurs critères ont été proposés afin de conférer le titre de « probiotique » à une souche bactérienne. (Voir Tableau 2) Ces critères représentent principalement des propriétés observables *in vitro*, comme l'adhésion aux cellules intestinales, la survie en solutions gastrique et intestinale ou la production de substances antimicrobiennes (Collins et Gibson, 1999; Dunne *et al.*, 1999). Ces propriétés sont souhaitables pour une bactérie probiotique, mais ne lui confèrent pas automatiquement des effets bénéfiques *in vivo*. En effet, comme mentionné précédemment, ce sont les bénéfices observés *in vivo*, conjointement à l'absence d'effets nocifs qui doivent prévaloir dans la sélection d'un microorganisme probiotique. La démonstration de la modulation de populations de globules blancs ou du niveau d'expression de différentes cytokines chez l'animal

démontre avec beaucoup plus de fiabilité que les bactéries ont un véritable effet. De la même façon, la démonstration que la bactérie étudiée peut moduler la flore intestinale *in vivo* a plus de valeur que la simple inhibition de la croissance de bactéries pathogènes *in vitro*. Suite à l'investigation de tels paramètres, il est possible d'évaluer avec plus de confiance le potentiel probiotique des bactéries à l'étude dans des modèles animaux de pathologies ciblées.

L'évaluation du potentiel probiotique de toute bactérie doit se faire de manière indépendante. Les effets observés sont différents d'une souche à l'autre, même pour des bactéries de la même espèce (Marteau et Shanahan, 2003; Dunne *et al.*, 2001). De plus, il n'y a pas de souche probiotique « miraculeuse » pouvant prévenir ou régler les symptômes de tous les problèmes intestinaux ou des maladies autoimmunes. Chaque bénéfice attribué à un probiotique doit être démontré scientifiquement afin que l'utilisation de la souche soit bien définie. Le potentiel probiotique de nombreuses souches bactériennes reste encore à évaluer. Par exemple, malgré la consommation traditionnelle du kéfir, les connaissances sur l'espèce *Lactobacillus kefiranofaciens* sont limitées (Santos *et al.*, 2003). Cependant, l'utilisation de souches de bactéries de cette espèce comme probiotiques semble très prometteuse. Le kéfir a déjà démontré la capacité de moduler le système immunitaire, sans que la ou les composantes responsables de ces effets, une bactérie spécifique, les exopolysaccharides, les peptides ou un effet de synergie, soient identifiées (Vinderola *et al.*, 2005). La consommation de kéfir par des souris semble faciliter le développement d'une réponse de type  $T_H2$ , en augmentant le nombre de cellules sécrétrices d'IgA et la production d'IL-4 et d'IL-10 (Vinderola *et al.*, 2005).

#### 4.1 Souches à l'étude

Les laits fermentés sont traditionnellement consommés dans plusieurs pays d'Europe de l'Est. Le kéfir est un produit fermenté qui fait partie de l'alimentation des habitants de la région du Caucase depuis des générations. Le kéfir est consommé pour remédier à certains problèmes au niveau du tube digestif ou pour traiter différents troubles métaboliques (St-Onge *et al.*, 2002). Les grains de kéfir, utilisés pour la fermentation du lait, contiennent de nombreuses espèces différentes de bactéries lactiques, de levures et plusieurs autres (Toba *et al.*, 1990), la composition pouvant varier

selon la provenance. Le kéfir est généralement reconnu comme un produit de médecine alternative puisque ses effets bénéfiques n'ont pas été clairement démontrés scientifiquement dans des études animales ou cliniques. Malgré cette consommation traditionnelle répandue, les connaissances sont faibles sur les effets précis du kéfir et principalement sur les effets des bactéries qu'il contient. Jusqu'à maintenant, une seule étude scientifique évalue le potentiel probiotique de différentes souches bactériennes isolées des grains kéfir, dont quelques souches de l'espèce *kefiranofaciens*. Cependant, le potentiel probiotique des souches est strictement évalué *in vitro* (Santos *et al.*, 2003). Les effets protecteurs au niveau du tractus gastro-intestinal et contre certains troubles métaboliques traditionnellement associés à la consommation de kéfir et les faibles connaissances sur les composantes responsables de ces effets ont mené à la recherche sur les bénéfices potentiels des bactéries de l'espèce *Lactobacillus kefiranofaciens*.

Les bactéries *Lactobacillus kefiranofaciens* sont homofermentaires, leur métabolisme produit donc presque strictement de l'acide lactique. Ce sont des bactéries Gram positives microaérophiles qui montrent une bonne croissance à des températures entre 30 et 37°C. Elles sont en forme de bâtonnet et peuvent s'assembler en chaînes plus ou moins longues ou en agrégats de différentes grosseurs. Certaines souches peuvent aussi produire des exopolysaccharides (EPS).

Nom	Identification	Provenance	Caractéristiques
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> R2C2	IDAC 041202-3	Technologie Biolactis	Utilisée dans la fermentation du lactosérum
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> INIX	IDAC 041202-4	Technologie Biolactis	Surproductrice d'exopolysaccharides
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> BioSP	ATCC 51647	ATCC	Forme des agrégats de grande taille
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> K2	IDAC 041202-1	Technologie Biolactis	Forme des agrégats de petite taille
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	ATCC 53103	ATCC	Probiotique reconnu et commercialisé

**Tableau 2.** Souches à l'étude. Dans ce projet de recherche, quatre différentes souches de lactobacilles de l'espèce *kefiranofaciens* sont étudiées plus en profondeur quant à leur potentiel probiotique, et comparées à un probiotique reconnu, *L. rhamnosus* GG.

ATCC : American Type Culture Collection

IDAC : International Depository Authority of Canada

#### 4.2 Souche utilisée comme comparaison

La bactérie *Lactobacillus rhamnosus* GG est une des souches de probiotiques les plus largement étudiées (Alander *et al.*, 1999). Plusieurs effets bénéfiques ont été attribués à ce probiotique, dans des expériences faites *in vitro*, dans différents modèles animaux et même dans des études cliniques. Les propriétés de base recherchées chez un bon probiotique (voir Tableau 1) ont toutes été démontrées pour cette bactérie. En effet, *L. rhamnosus* GG a été isolée de la flore intestinale d'un volontaire en santé et elle produit une substance antimicrobienne ayant une activité contre différentes bactéries anaérobies (Silva *et al.*, 1987). Elle a aussi démontré la capacité de résister à l'acidité stomacale et aux sels biliaires, puisqu'elle a pu être retrouvée sous forme viable dans les

fèces ou le côlon de volontaires sains et ce, même plus d'une semaine après l'arrêt de sa consommation. Par le fait même, ceci confirme sa capacité à adhérer à la muqueuse intestinale et à coloniser temporairement la flore intestinale (Alander *et al.*, 1999).

*L. rhamnosus* GG a aussi plusieurs effets bénéfiques reconnus dans différentes pathologies. Par exemple, ce probiotique semble pouvoir prévenir les cas de diarrhées nosocomiales développées par les jeunes enfants en milieu hospitalier (Szajewska *et al.* 2001) de même que les diarrhées du voyageur (Oksanen *et al.*, 1990). Les résultats sont plus contradictoires en ce qui a trait aux bénéfices potentiels sur les maladies inflammatoires de l'intestin. La consommation quotidienne de *L. rhamnosus* GG semble pouvoir retarder les rechutes de pouchite (Gosselink *et al.*, 2004). Les effets bénéfiques de sa consommation sont par contre opposés par rapport à la maladie de Crohn. Dans une étude pilote, *L. rhamnosus* GG a semblé améliorer la barrière intestinale et réduire les symptômes associés à la maladie de Crohn (Gupta *et al.*, 2000), mais il n'a cependant eu aucun effet ni pour induire et maintenir la rémission (Schultz *et al.*, 2004) ni pour réduire les symptômes (Prantera *et al.*, 2002) dans d'autres tests cliniques.

#### 4.3 Modèles animaux utilisés

##### 4.3.1 Inflammation intestinale

Il existe plusieurs manières de simuler les maladies inflammatoires de l'intestin chez l'animal. En effet, plusieurs produits chimiques peuvent entraîner des lésions plus ou moins importantes au niveau du tube digestif et les souris déficientes pour l'IL-10 développent spontanément de l'inflammation intestinale. Chaque modèle a ses particularités, ses avantages et ses inconvénients. Le modèle d'inflammation intestinale provoquée par le « dextran sulfate sodium » (DSS) est jugé fiable pour démontrer une preuve de concept quant à la validité d'un traitement ou d'une intervention (Pizarro *et al.*, 2003). Les principaux symptômes causés par le DSS sont la perte de poids rapide, la rupture de l'épithélium intestinal, ce qui entraîne de la translocation bactérienne, de la diarrhée ainsi que des fèces sanguinolentes. Une grande quantité de neutrophiles et d'autres cellules immunitaires sont aussi attirées vers le côlon en raison des bactéries qui infiltrent les lésions (Hibi *et al.*, 2002). L'inflammation intestinale au DSS entraîne aussi un raccourcissement de la longueur du côlon ainsi que l'épaississement de sa paroi

(Okayasu *et al.*, 1990). Les rats et les souris sont des espèces sensibles à l'action du DSS. Cependant, l'intensité des effets varie selon la souche de souris utilisée. Par exemple, les C57BL/6 développent un maximum de symptômes après sept jours d'exposition au DSS, alors qu'il en faut au moins dix pour les BALB/c (Siegmund *et al.*, 2001). Ce modèle animal d'inflammation intestinale a souvent été utilisé pour démontrer l'efficacité de différents probiotiques à prévenir ou réduire les symptômes et pour élucider les mécanismes d'action.



**Figure 4.** Observations macroscopiques du côlon d'une souris soumise au DSS (en haut) et d'une souris saine (en bas). Les lésions au niveau de l'intestin rendent les fèces sanguinolentes et plus ou moins liquides. Le côlon a aussi tendance à raccourcir et sa paroi épaisit (Tirée de Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004).

#### 4.3.2 Hyperlipidémie

Les modèles animaux utilisés pour entraîner des augmentations des niveaux de lipides sanguins sont nombreux. Cependant, plusieurs de ces modèles s'échelonnent sur de longues périodes, les animaux étant soumis pendant des mois à des diètes riches en gras ou en sucres. De plus, lorsque les animaux sont déficients pour certains gènes et développent spontanément des problèmes d'hyperlipidémie ou une haute pression artérielle, les expériences sont très coûteuses. Le modèle d'hyperlipidémie induite au poloxamer 407 comporte les avantages d'être rapide, fiable et peu coûteux. En effet, une simple injection de ce produit peut augmenter les niveaux de triglycérides jusqu'à 60 fois et les niveaux de cholestérol jusqu'à 8 fois, selon la dose. L'induction d'hyperlipidémie est transitoire, elle est à son niveau le plus élevé 12 heures après l'injection et les niveaux reviennent à la normale après 120 heures (Johnston, 2004). Les niveaux de triglycérides sanguins augmentent en raison de la forte inhibition de la lipoprotéine lipase (LPL), la

principale enzyme responsable de l'hydrolyse des triglycérides (Johnston, 2004). Quant au cholestérol, l'activité de l'enzyme responsable de sa synthèse, l'hépatique 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase, est augmentée par le poloxamer 407 (Johnston, 2004).

Ce modèle animal produit des augmentations drastiques des lipides sanguins et n'a jamais été utilisé pour évaluer le potentiel hypolipémiant de suppléments alimentaires comme les laits fermentés ou les probiotiques.

## 5. Hypothèse

Le kéfir est une boisson de lait fermenté traditionnellement consommée dans les pays de l'Est. Historiquement, plusieurs bienfaits lui sont attribués, particulièrement pour atténuer différents troubles digestifs. Par contre, les effets réels du kéfir de même que les composantes responsables de ses bienfaits sont peu connus. Les différentes souches de *Lactobacillus kefiranofaciens* à l'étude dans le projet, soit R2C2, INIX, BioSP et K2, ont été isolées des grains de kéfir et sont potentiellement responsables des bénéfices. De plus, des études préliminaires obtenues *in vitro* avec la MPM, un produit de lactosérum fermenté avec la souche *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2, ont démontré un potentiel anti-inflammatoire et hypolipémiant.

L'hypothèse de ce travail est que les différentes souches de *Lactobacillus kefiranofaciens* sont de bonnes candidates pour avoir un impact positif sur la santé et être considérées comme probiotiques, en particulier pour atténuer les symptômes de l'inflammation intestinale et réguler le métabolisme des lipides.

## 6. Objectifs

1) Évaluer l'impact de souches de *Lactobacillus kefiranofaciens* (R2C2, INIX, BioSP et K2) sur la flore intestinale de souris.

2) Mesurer le potentiel anti-inflammatoire de souches de *Lactobacillus kefiranofaciens* (R2C2, INIX, BioSP et K2) dans l'inflammation intestinale.

3) Évaluer la capacité de souches de *Lactobacillus kefiranofaciens* pré-sélectionnées (R2C2 et INIX) à réguler le métabolisme des lipides.

## 7. Moyens utilisés pour atteindre les objectifs

1) L'impact des souches R2C2, INIX, BioSP et K2 de *Lactobacillus kefiranofaciens* sera évalué sur la flore intestinale de souris, par l'analyse du pH fécal, des populations de coliformes et de bactéries lactiques. Puis, leur capacité à coloniser et à persister dans l'intestin sera vérifiée par PCR. Une souche probiotique aux effets reconnus, *Lactobacillus rhamnosus* GG (Alander *et al.*, 1999), sera utilisée comme comparaison.

2) Le potentiel anti-inflammatoire des souches R2C2, INIX, BioSP et K2 de *Lactobacillus kefiranofaciens* sera évalué à l'aide du modèle animal d'inflammation intestinale induite par le DSS, car il permet de suivre aisément le développement de la maladie en étudiant plusieurs paramètres cliniques (Pizzaro *et al.*, 2003). Les effets des bactéries viables seront aussi comparés à ceux des bactéries pasteurisées. Le 5-ASA, un médicament anti-inflammatoire grandement utilisé (Rumi *et al.*, 2004), de même que *Lactobacillus rhamnosus* GG, un probiotique reconnu (Gupta *et al.*, 2000), seront employés comme comparaison dans ces expériences.

3) La capacité des souches de *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2 et INIX à réguler le métabolisme des lipides sera aussi évaluée dans un modèle animal d'hyperlipidémie induite au poloxamer 407, car il permet de vérifier de manière fiable l'effet d'un produit sur les lipides sanguins, en plus d'être rapide peu coûteux (Johnston, 2004). Dans ce modèle, l'effet de ces deux souches sera comparé à ceux de la MPM et de la niacine (Nash *et al.*, 1996).

## **Méthodologie**

## 1. Impact de *Lactobacillus kefiranofaciens* sur la flore intestinale

### 1.1 Animaux

Des souris femelles C57BL/6, âgées de 6 à 8 semaines (Charles River Canada), ont été utilisées pour l'expérience visant à déterminer l'impact de gavages à différentes bactéries lactiques sur la flore intestinale. Les souris ont d'abord été randomisées selon le poids, puis individuellement identifiées par poinçonnage des oreilles. Durant toute la période de l'expérience, elles ont été maintenues dans des conditions SPF (specific pathogen free), à température contrôlée et soumises à un cycle lumière/noirceur de 12 heures/12 heures.

Les souris ont été gavées durant sept jours avec différentes bactéries lactiques (suspensions à  $10^9$  bactéries/mL, 100  $\mu$ L/jour). Elles ont reçu la souche R2C2, sous forme viable ou pasteurisée, alors que les bactéries INIX, BioSP, K2 et *L. GG* ont seulement été données sous forme viable. Un groupe recevant seulement du PBS stérile (Invitrogen) a été utilisé comme contrôle négatif. À la fin des expériences, les souris ont été tuées par dislocation cervicale sous anesthésie à la kétamine/xylazine (CDMV).

### 1.2 Préparation des cultures bactériennes

Pour la préparation du milieu de culture RCW, 65 grammes de poudre de lactosérum doux de cheddar ont été ajoutés pour chaque litre d'eau distillée. La solution obtenue a été chauffée avec agitation durant 30 minutes, jusqu'à faible ébullition, afin de faire précipiter les protéines. La solution a ensuite été centrifugée à 9000 rpm durant 15 minutes et le surnageant a été passé sur un papier filtre de grade 202 (Whatman) à l'aide d'une trompe à vide. Puis, le filtrat a été autoclavé pour assurer une précipitation maximale des protéines. Une autre étape de centrifugation à 9000 rpm durant 15 minutes a été réalisée et le surnageant a encore été passé sur un papier filtre de grade 202 (Whatman) à l'aide d'une trompe à vide. Pour chaque litre de filtrat recueilli, 59,7 grammes de poudre pour le milieu Rogosa (Difco) ont été ajoutés ainsi que 1,32 mL d'acide acétique glacial. Pour la stérilisation, le milieu a été porté à ébullition durant trois minutes. Le milieu de culture RCW a été conservé à 4°C.

Pour la préparation du milieu de culture MRS, 55 grammes de poudre pour milieu de culture Lactobacilli MRS (Difco) ont été ajoutés pour chaque litre d'eau distillée. La solution a été chauffée afin d'assurer une dissolution optimale, puis autoclavée pour la stérilisation. Le milieu de culture MRS a été conservé à 4°C.

Toutes les cultures bactériennes ont été réalisées dans les milieux de culture RCW ou MRS. Les bactéries ont été repiquées quotidiennement et incubées à 37°C durant 24 heures. Suite à l'incubation, les cultures ont été centrifugées à 4000 rpm (Jouan, BR4i, rotor S40) pendant huit minutes et resuspendues dans le PBS stérile (Invitrogen). Une seconde centrifugation à 4000 rpm pendant huit minutes a ensuite été réalisée, et les bactéries ont été resuspendues dans le PBS stérile à une concentration de  $10^9$  bactéries/mL, ajustée par spectrophotométrie, pour les gavages. Pour le groupe R2C2 pasteurisée, les cultures ont été soumises aux mêmes étapes, puis une pasteurisation à 75°C durant 30 minutes a été réalisée.

### 1.3 Détection des coliformes dans les fèces

Suite à une période de sept jours de gavage, quelques fèces de chaque animal ont été récoltées dans un microtube de plastique conique de 1,5 mL. Les fèces ont été pesées, suspendues dans 1 mL d'eau peptonée 0,1% (Bacto™ Peptone, Difco) et homogénéisées à l'aide d'un potter. Une dilution 1/100 dans 1 mL d'eau peptonée 0,1% a ensuite été réalisée de manière à avoir un nombre de colonies facilement déchiffrable en culture. Les homogénats de fèces dilués ont été inoculés sur des Petrifilm™ numération des coliformes (3M) et incubées à 37°C avec humidité durant 24 heures. Suite à l'incubation, les colonies ont été dénombrées et les coliformes fécaux exprimés en cfu/mg de fèces.

### 1.4 Détection des bactéries lactiques dans les fèces

Suite à une période de sept jours de gavage, quelques fèces de chaque animal ont été récoltées dans un microtube de plastique conique de 1,5 mL (Sarstedt). Les fèces ont été pesées, suspendues dans 1 mL d'eau peptonée 0,1% (Bacto™ Peptone, Difco) et homogénéisées à l'aide d'un potter. Une dilution  $10^{-3}$  dans 1 mL d'eau peptonée 0,1% a ensuite été réalisée, puis une dilution  $10^{-3}$  dans 1 mL de milieu de culture MRS. Le facteur final de dilution est  $10^{-6}$  et a été réalisé afin d'avoir un nombre de colonies facilement déchiffrable en culture. Les homogénats de fèces dilués ont été inoculés sur

des Petrifilm™ numération des bactéries aérobies (3M) et incubées en condition anaérobie à 34°C durant 48 heures. Le milieu MRS ainsi que l'incubation en condition anaérobie permettent la culture sélective des bactéries lactiques. Suite à l'incubation, les colonies ont été dénombrées et les bactéries lactiques exprimées en cfu/mg de fèces.

### 1.5 Mesure du pH fécal

Suite à une période de sept jours de gavage, plusieurs fèces de chaque animal ont été récoltées dans un microtube de plastique conique de 1,5 mL. La quantité de fèces récoltée pour chaque était environ de 80 à 100 mg. Les fèces ont été pesées et suspendues dans l'eau distillée (5 mL/100 mg), puis homogénéisées à l'aide d'un potter. Le pH fécal a ensuite été mesuré à l'aide d'un pHmètre (Fisher Scientific).

Pour les analyses statistiques, les groupes ont été comparés entre eux à l'aide du test de T de Student.

## 2. Adhésion/colonisation *in vivo*

### 2.1 Extraction d'ADN bactérien dans les fèces des souris

L'ADN bactérien a été isolé des fèces de souris femelles C57BL/6, 24 heures après la fin d'une période de sept jours de gavage, afin de tenter de détecter la présence des espèces *kefiranofaciens* ou *rhamnosus* par PCR spécifique. Pour ce faire, le QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen) a été utilisé. Les échantillons de fèces peuvent contenir plusieurs composantes risquant de dégrader l'ADN ou d'inhiber les réactions enzymatiques subséquentes. L'utilisation de ce produit permet de retirer ces composantes et d'obtenir de l'ADN bactérien purifié.

La quantité de fèces utilisée pour l'extraction peut aller jusqu'à 220 mg, elles peuvent être fraîches ou congelées. Si les fèces sont congelées, il faut les conserver sur glace jusqu'au début des manipulations. 1,4 mL de tampon ASL a été ajouté à chaque échantillon de fèces, puis ils ont été homogénéisés en vortexant une minute et à l'aide d'un potter. Une incubation à 95°C a ensuite été réalisée pour maximiser la lyse des bactéries Gram-positives. Suite à l'incubation, les échantillons ont été centrifugés à 14000 rpm (Jouan, BR4i, rotor AB 2.14) durant une minute afin d'éliminer les débris de fèces. Le surnageant a été conservé dans un nouveau microtube de plastique conique de 1,5 mL.

(Sarstedt) et une pastille InhibitEX a été ajoutée à chaque échantillon afin d'éliminer les composantes risquant de dégrader l'ADN ou d'inhiber les réactions enzymatiques subséquentes. Après une minute d'incubation à température pièce avec la pastille, les échantillons ont été centrifugés trois minutes à 14000 rpm à deux reprises et 200 µL de surnageant ont été recueillis dans un nouveau microtube de plastique conique de 1,5 mL. Ensuite, 15 µL de protéinase K et 200 µL de tampon AL ont été ajoutés au surnageant et les échantillons ont été incubés à 70°C, permettant de dénaturer les protéines contaminantes. 200 µL d'éthanol 95% ont été ajoutés à chaque échantillon, qui ont par la suite été placés sur des colonnes QIAamp. Une centrifugation d'une minute à 14000 rpm a été réalisée afin de permettre à l'ADN bactérien de se lier sur la colonne. Deux étapes de lavage ont ensuite été réalisées. D'abord, 500 µL de tampon AW1 ont été ajoutés à la colonne et une centrifugation d'une minute à 14000 rpm a été réalisée. Puis, 500 µL de tampon AW2 ont été ajoutés à la colonne et une centrifugation de trois minutes à 14000 rpm a été réalisée. 200 µL du tampon d'éluion AE ont finalement été ajoutés à la colonne et une centrifugation d'une minute à 14000 rpm a été réalisée afin de recueillir l'ADN bactérien purifié. Les échantillons ont été conservés à -20°C.

## 2.2 Amplification d'ADN par PCR

L'amplification d'ADN par PCR a été utilisée pour tenter de détecter la présence d'ADN bactérien des espèces *kefiranofaciens* ou *rhamnosus* dans les fèces des animaux, à différents temps après l'arrêt des gavages. Le kit de PCR de la compagnie BD Biosciences a été utilisé (Titanium™ *Taq* PCR Kits). Un mélange réactionnel de 25 µL a été préparé dans un microtube en plastique de 0,5 mL (Sarstedt). Pour chaque réaction, 18,5 µL d'eau de grade PCR ont été mélangés à 2,5 µL de tampon de PCR 10X, 0,5 µL du mélange de dNTPs 50X (10 mM), 0,5 µL de chacune des amorces (à une concentration de 10 pmol/µL) et finalement 0,5 µL de la polymérase *Taq*. Le mélange a ensuite été réparti dans des microtubes en plastique de 0,2 mL, dans lesquels 2 µL de chaque échantillon à analyser avaient été ajoutés au préalable.

Les microtubes de 0,2 mL ont ensuite été placés dans le thermocycleur (Biometra), pour y être soumis au programme suivant :

- 1- 10 minutes de dénaturation à 94°C
- 2- 30 secondes de dénaturation à 94°C
- 3- 30 secondes à la température d'hybridation optimale des amorces utilisées
- 4- 1 minute d'élongation à 72°C
- 5- 10 minutes d'élongation supplémentaires à 72°C.

Les étapes 2, 3 et 4 ont été répétées à 35 reprises avant la suite à l'étape 5. L'appareil a conservé les échantillons à 4°C aussitôt le programme terminé, puis les réactions de PCR ont été conservées à -20°C avant la détection sur gel d'agarose.

### 2.3 Détection sur gel d'agarose

Pour visualiser les fragments d'ADN de 200 à 1000 pb amplifiés par PCR, un gel d'agarose de 2% p/v a été utilisé. L'agarose a été dissout par chauffage dans du TAE 1X (Tampon Tris-Acetate-EDTA, 0,04 M Tris acetate et 0,001 M EDTA, pH 8,3) (Sigma). La solution a ensuite été refroidie (environ 50°C) et du bromure d'éthidium (Sigma) a été ajouté à une concentration finale de 0,5 µg/mL pour permettre la visualisation des bandes d'ADN. Le gel a solidifié durant environ 15 minutes, puis a été déposé dans une cuve « DNA Sub Cell » (BioRad) et recouvert de tampon TAE 1X.

5 µL de tampon de chargement (0,25 % de bleu de bromophénol, 50 % d'eau stérile, 50 % de glycérol et 0,02 % d'EDTA 0,5 M) ont été ajoutés à chaque échantillon à analyser, et 10 µL de ce mélange ont été déposés dans les puits du gel. Le marqueur de poids moléculaire Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) a été utilisé. La migration a été effectuée sous une tension de 80 V durant environ 45 minutes et les bandes correspondant aux fragments d'ADN amplifiés par PCR ont été visualisées sous ultraviolets.

### 2.4 Amorces utilisées

Amorces spécifiques à *L. rhamnosus* :

F- 5' CTT GCA TCT TGA TTT AAT TTT G 3'

R- 5' CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT 3'

Température d'hybridation : 60°C

Amorces spécifiques à *L. kefiranofaciens* :

F- 5' TAA GAA AGC AGT TCG CAT GAA CAG 3'

R- 5' GGG ACT TTG TAT CTC TAC AAA TGG 3'

Température d'hybridation : 69°C

Amorces universelles pour l'ADN codant pour l'ARN 16S bactérien :

F- 5' AGA GTT TGA TC(C/A) TGG CTC AG 3'

R- 5' AAG GAG GTG ATC CA(G/A) CCG CA 3'

Température d'hybridation : 55°C

### 3. Lipidémie

#### 3.1 Animaux

Des rats femelles Wistar, âgées de sept semaines et pesant entre 125 et 150 grammes (Charles River Canada), ont été utilisés pour l'expérience visant à déterminer l'impact de gavages aux bactéries R2C2 ou INIX et au produit de lactosérum fermenté, la MPM, sur la régulation du métabolisme des lipides. Les rats ont d'abord été randomisés selon le poids, puis individuellement identifiés par marquage des oreilles. Durant toute la période de l'expérience, ils ont été maintenus dans des conditions SPF, à température contrôlée et soumis à un cycle lumière/noirceur de 12 heures/12 heures.

Les rats ont été gavés durant sept jours avec les bactéries R2C2 ou INIX (solutions à 10<sup>9</sup> bactéries/mL, 1 mL/jour) sous forme viable et avec la MPM (5 mL/kg). Deux contrôles ont été utilisés, un premier groupe ne recevant que du PBS (1 mL/jour), et un autre recevant un produit aux effets connus sur le métabolisme des lipides, la niacine (Sigma), à une dose de 100 mg/kg dans un volume de 1 mL d'eau distillée (Nash, V.J. *et al.*, 1996). La bactérie R2C2 a été préparée quotidiennement tel que décrit précédemment. À la fin des expériences, les rats ont été tués par asphyxie, par exposition au dioxyde de carbone.

#### 3.2 Induction d'hyperlipidémie et analyses sanguines

Après une période sept jours de prétraitement, une injection i.p. de poloxamer 407 pluronic F-127 (BASF corporation) a été réalisée afin d'induire l'hyperlipidémie chez les

animaux. Ils ont reçu une dose de 1 mL, à une concentration de 300 mg/mL d'eau stérile. La solution de poloxamer 407 doit être préparée à 4°C afin de permettre une dissolution optimale du produit dans l'eau stérile et doit être maintenue sur glace tout au long des manipulations.

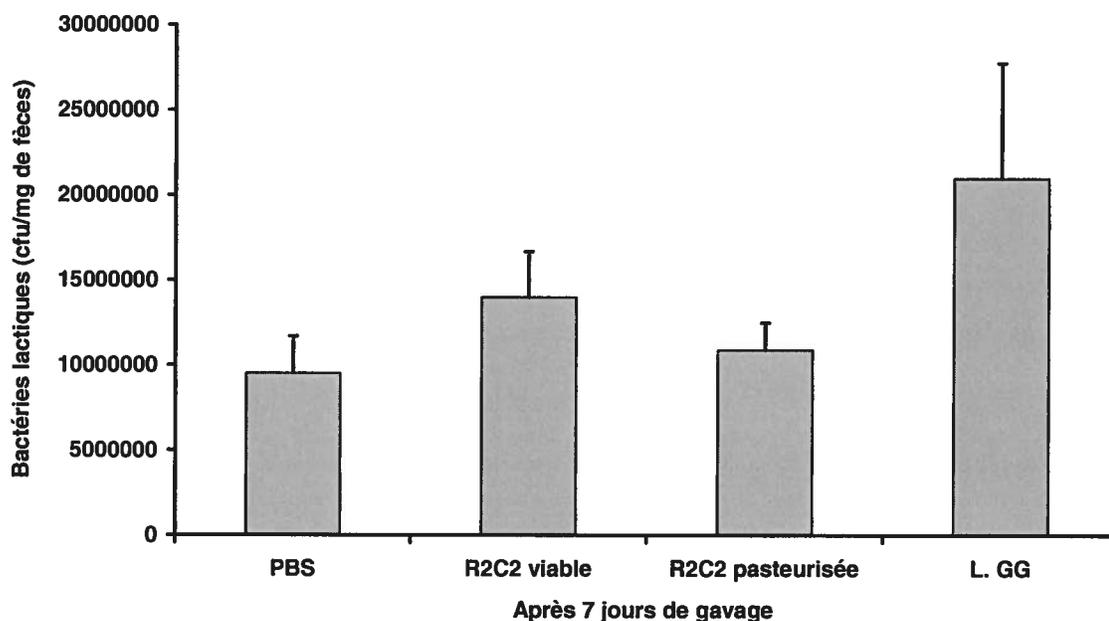
Des saignées ont été réalisées à différents moments afin de vérifier l'impact des traitements sur la régulation du métabolisme des lipides. D'abord, une saignée a été faite après le prétraitement de sept jours, avant l'injection de poloxamer 407. Puis, des saignées ont été réalisées 24 heures et 72 heures après l'induction de l'hyperlipidémie. Pour les saignées, les rats ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane USP (AErrane, Baxter Corporation), puis le sang a été récolté par la veine jugulaire et placé dans des tubes de plastique de 2 mL héparinés au lithium (Sarstedt). Le plasma et les composantes cellulaires du sang ont ensuite été séparés par centrifugation à 4000 rpm durant deux minutes et le tout a été conservé séparément à -80°C. Les échantillons de plasma ont été envoyés à Laboratoire médical Biron (Brossard, Québec, Canada) pour analyse du bilan lipidique, incluant le cholestérol total, les triglycérides et la fraction HDL du cholestérol.

Pour les analyses statistiques, les groupes ont été comparés entre eux à l'aide du test de T de Student.

## **Résultats**

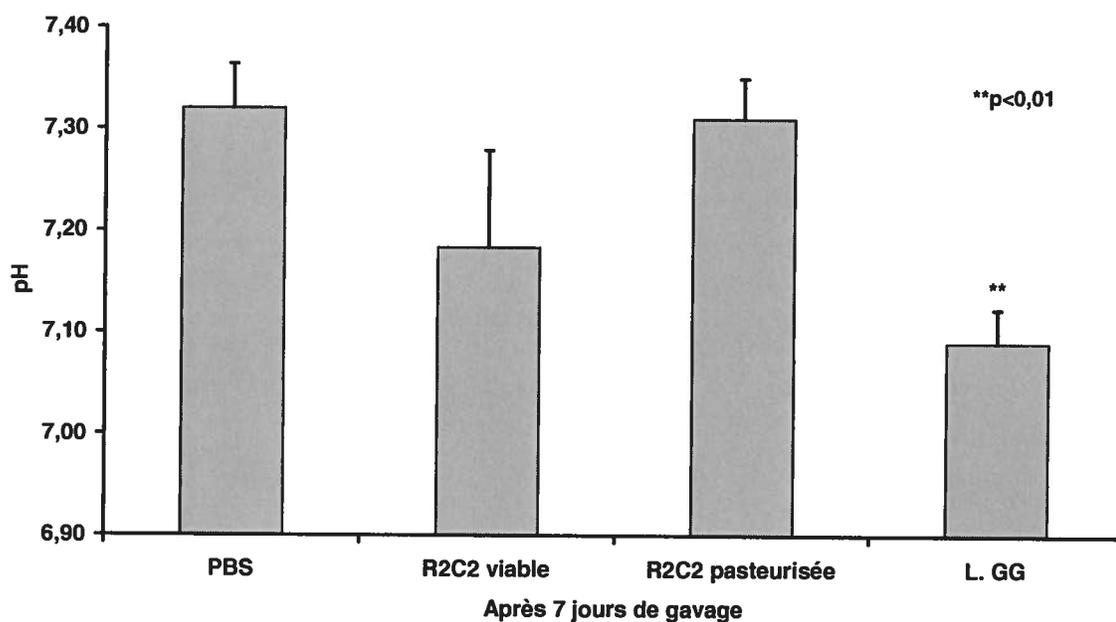
## 1. Impact sur la flore intestinale

L'impact de sept jours de gavage sur la flore intestinale des souris saines a été évalué. Le dénombrement des bactéries lactiques dans les fèces montre une légère augmentation pour les animaux gavés avec R2C2 viable ( $1,4 \times 10^7 \pm 2,7 \times 10^6$  cfu/mg de fèces) par rapport au groupe contrôle PBS ( $9,5 \times 10^6 \pm 2,2 \times 10^6$  cfu/mg de fèces), alors que le nombre demeure équivalent dans le groupe recevant R2C2 pasteurisée ( $1,1 \times 10^7 \pm 1,6 \times 10^6$  cfu/mg de fèces) (Figure 5). Une forte augmentation est observée pour le groupe gavé à *L. GG* ( $2,1 \times 10^7 \pm 6,8 \times 10^6$  cfu/mg de fèces,  $p=0,10$ ) par rapport au contrôle. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes.



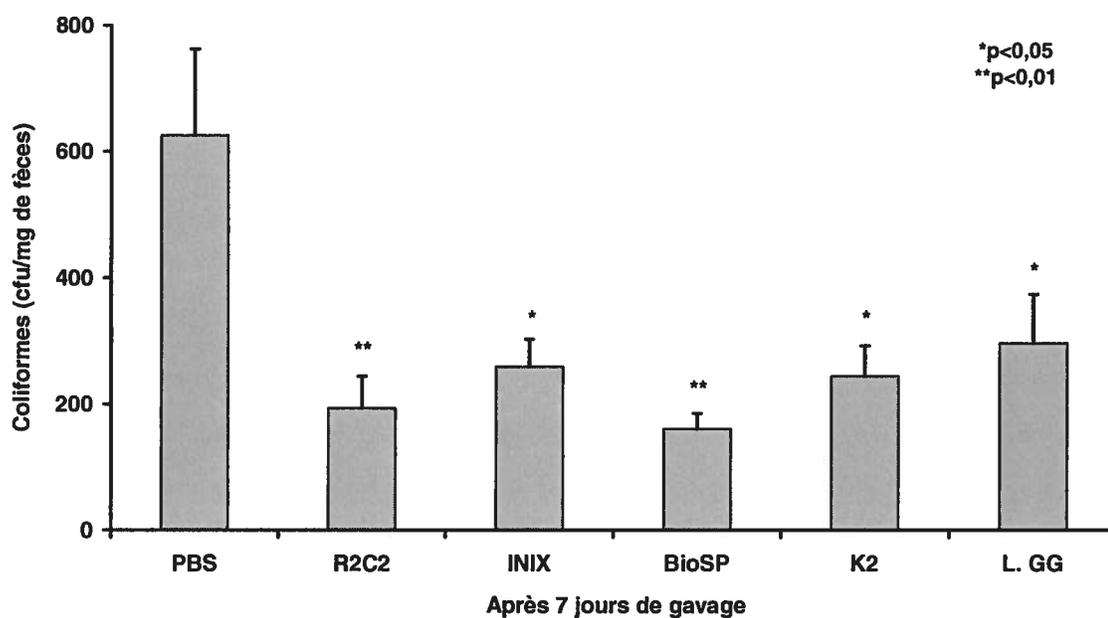
**Figure 5.** Dénombrement des bactéries lactiques dans les fèces des souris (n=5) après 7 jours de gavage. Les souris ont été traitées au PBS, à R2C2 viable, R2C2 pasteurisée ou *Lactobacillus rhamnosus* GG.

L'impact de sept jours de gavage sur le pH fécal des souris saines a été évalué. Le groupe recevant R2C2 viable ( $7,18 \pm 0,10$ ) montre une légère diminution par rapport au groupe contrôle PBS ( $7,32 \pm 0,04$ ), alors que la valeur du pH demeure équivalente dans le groupe recevant R2C2 pasteurisée ( $7,31 \pm 0,04$ ) (Figure 6). Une diminution significative du pH fécal est observée pour le groupe gavé à *L. GG* ( $7,09 \pm 0,03$ ).



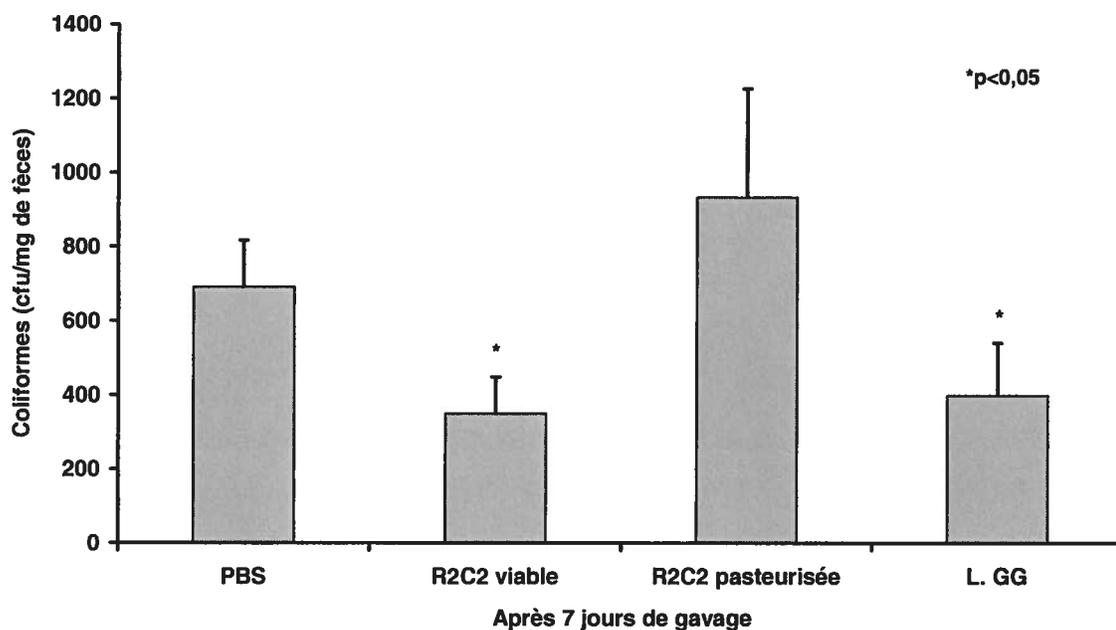
**Figure 6.** Mesure du pH fécal chez des souris ( $n=5$ ) gavées durant 7 jours au PBS, à R2C2 viable, R2C2 pasteurisée ou *Lactobacillus rhamnosus* GG. \*\*,  $p < 0,01$  comparativement au groupe contrôle PBS.

La capacité de différentes bactéries à moduler positivement la flore intestinale de souris saines a été évaluée suite à sept jours de gavage. Une diminution significative du nombre de coliformes fécaux, espèce potentiellement pathogène, a été observée dans les groupes gavés à R2C2 ( $193,17 \pm 50,28$  cfu/mg de fèces), INIX ( $258,64 \pm 43,84$  cfu/mg de fèces), BioSP ( $160,71 \pm 24,32$  cfu/mg de fèces), K2 ( $244,19 \pm 48,23$  cfu/mg de fèces) et *L. GG* ( $296,39 \pm 77,90$  cfu/mg de fèces), comparativement au groupe contrôle PBS ( $635,24 \pm 137,35$  cfu/mg de fèces) (Figure 7). Les bactéries ont été administrées sous forme viable.



**Figure 7.** Dénombrement des coliformes fécaux chez les souris ( $n > 10$ ) après 7 jours de gavage au PBS, à R2C2, INIX, BioSP, K2 ou *Lactobacillus rhamnosus* GG. \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$  comparativement au groupe contrôle PBS.

L'importance de la viabilité des bactéries pour la modulation de la flore intestinale de souris saines a été évaluée suite à sept jours de gavage. Une diminution significative du nombre de coliformes fécaux a été observée dans les groupes gavés à R2C2 viable (349,63±98,60 cfu/mg de fèces) et *L. GG* (397,99±141,95 cfu/mg de fèces), comparativement au groupe contrôle PBS (691,56±125,17 cfu/mg de fèces) (Figure 8). Le groupe recevant R2C2 pasteurisée (933,03±292,69 cfu/mg de fèces) n'a montré aucune différence significative par rapport au groupe PBS pour le nombre de coliformes fécaux.



**Figure 8.** Dénombrement des coliformes fécaux chez les souris (n=5) après 7 jours de gavage au PBS, à R2C2 viable, R2C2 pasteurisée ou *Lactobacillus rhamnosus* GG. \*, p<0,05 comparativement au groupe contrôle PBS.

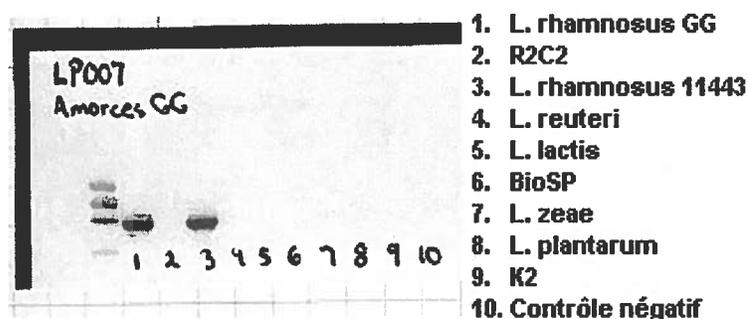
## 2. Adhésion/colonisation *in vivo*

La spécificité d'amorces synthétisées pour la détection de l'espèce *kefiranofaciens* a été démontrée par l'essai d'amplification par PCR de l'ADN de différentes espèces de lactobacilles. L'ADN de souches de *Lactobacillus rhamnosus*, *reuteri*, *plantarum*, *lactis* et *zeae* a été purifié et aucune amplification n'a été obtenue par PCR, alors que l'ADN des souches de *kefiranofaciens* R2C2, INIX, BioSP (kéfir granum) K2 et ES.1 a été détecté (Figure 9).



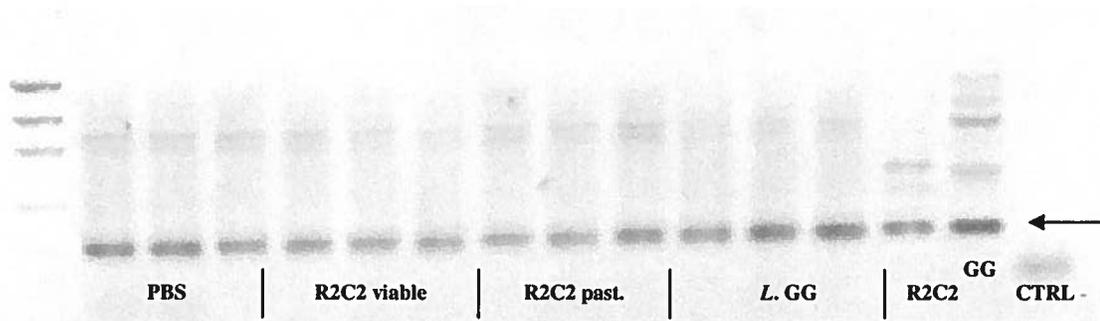
**Figure 9.** Spécificité des amorces pour détecter par PCR l'ADN bactérien de *Lactobacillus kefiranofaciens*.

La spécificité d'amorces pour la détection de l'espèce *rhamnosus* a été démontrée par l'essai d'amplification par PCR de l'ADN de différentes espèces de lactobacilles. L'ADN de souches de *Lactobacillus kefiranofaciens*, *reuteri*, *plantarum*, *lactis* et *zeae* a été purifié et aucune amplification n'a été obtenue par PCR, alors que les souches de *rhamnosus* GG et ATCC 11443 ont été détectées (Figure 10).



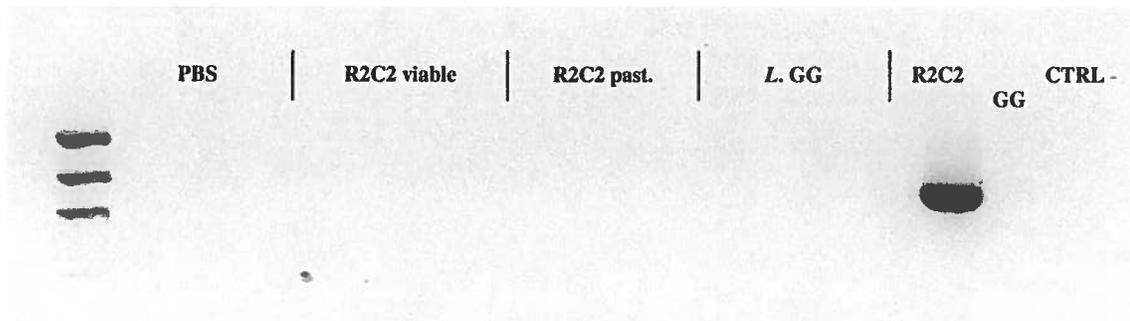
**Figure 10.** Spécificité des amorces pour détecter par PCR l'ADN bactérien de *Lactobacillus rhamnosus*.

L'ADN bactérien a été extrait des fèces des souris 24 heures après la fin d'une période de sept jours de gavage. L'amplification par PCR réalisée à l'aide d'amorces universelles à l'ADN bactérien a permis une détection dans tous les échantillons de fèces (Figure 11).

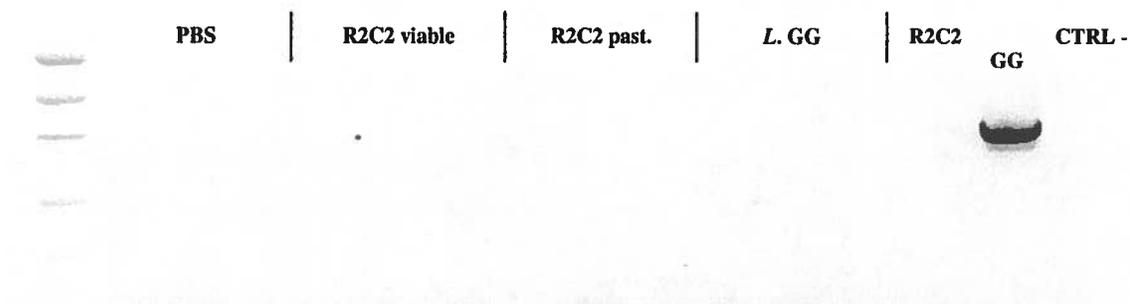


**Figure 11.** Détection d'ADN bactérien dans les échantillons purifiés des fèces des souris (n=3) traitées au PBS, à R2C2 viable, à R2C2 pasteurisée ou à *L. GG*. Des contrôles d'extraction d'ADN bactérien de cultures pures de R2C2 et *L. GG* sont utilisés, en plus d'un contrôle négatif pour la réaction de PCR.

L'amplification par PCR de l'ADN bactérien extrait des fèces des souris 24 heures après la fin d'une période de sept jours de gavage n'a permis aucune détection des espèces *kefiranofaciens* ou *rhamnosus*. L'analyse a été faite sur des groupes de souris (n=3) gavés au PBS, à R2C2 viable, R2C2 pasteurisée ou *L. GG* (Figure 12 et 13).



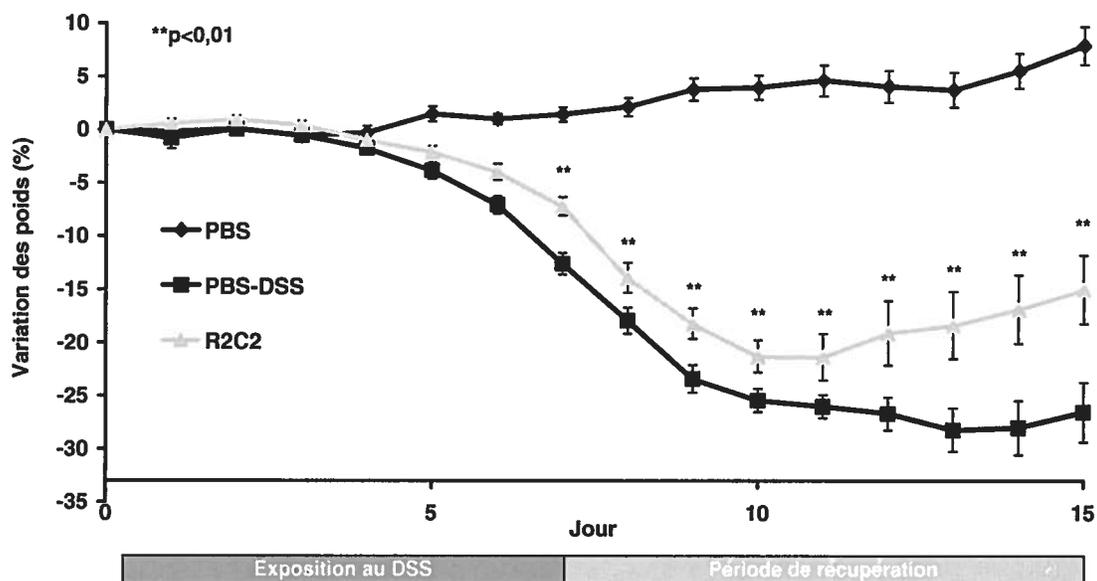
**Figure 12.** Détection d'ADN bactérien de l'espèce *kefiranofaciens* dans les échantillons purifiés des fèces des souris (n=3) traitées au PBS, à R2C2 viable, à R2C2 pasteurisée ou à *L. GG*. Des contrôles d'extraction d'ADN bactérien de cultures pures de R2C2 et *L. GG* sont utilisés, en plus d'un contrôle négatif pour la réaction de PCR.



**Figure 13.** Détection d'ADN bactérien de l'espèce *rhamnosus* dans les échantillons purifiés des fèces des souris (n=3) traitées au PBS, à R2C2 viable, à R2C2 pasteurisée ou à *L. GG*. Des contrôles d'extraction d'ADN bactérien de cultures pures de R2C2 et *L. GG* sont utilisés, en plus d'un contrôle négatif pour la réaction de PCR.

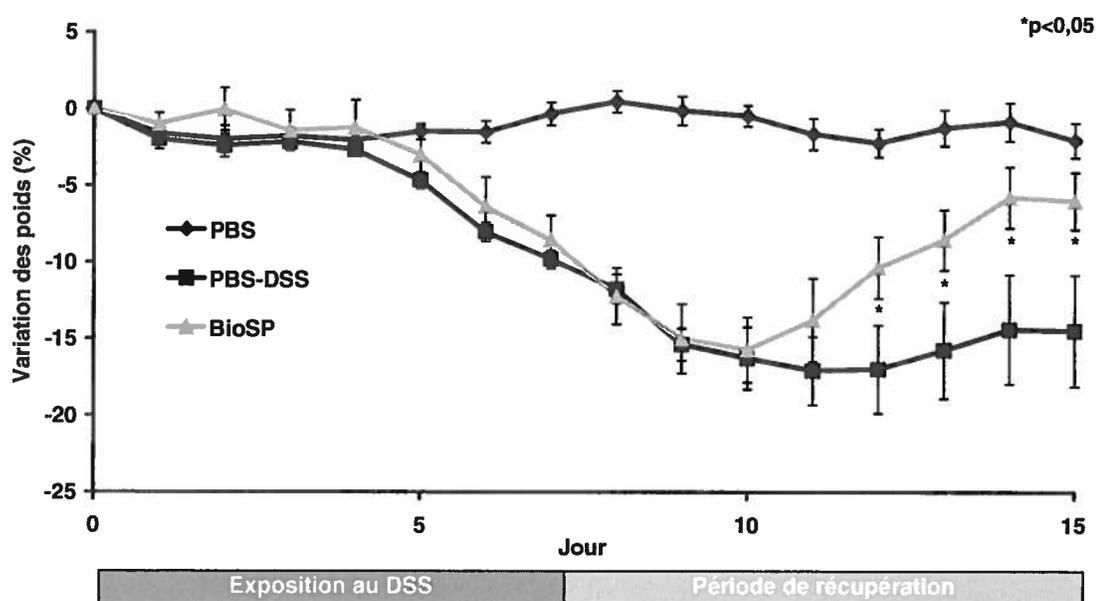
### 3. Effet protecteur contre l'inflammation intestinale induite au DSS

L'effet protecteur potentiel de la bactérie R2C2 dans le modèle animal d'inflammation intestinale induite au DSS a été évalué. La variation des poids (%) a été ramenée à 0% au début de la période d'exposition au DSS, puis suivie durant les sept jours de l'exposition et huit jours de récupération post-inflammatoire. La perte de poids pour le groupe traité avec R2C2 a été significativement plus faible lors de la dernière journée de l'exposition au DSS (jour 7), comparativement au groupe contrôle PBS-DSS. De plus, durant toute la période de récupération post-inflammatoire, la perte de poids a été moins prononcée dans le groupe traité avec R2C2 que dans le groupe contrôle PBS-DSS (Figure 14).



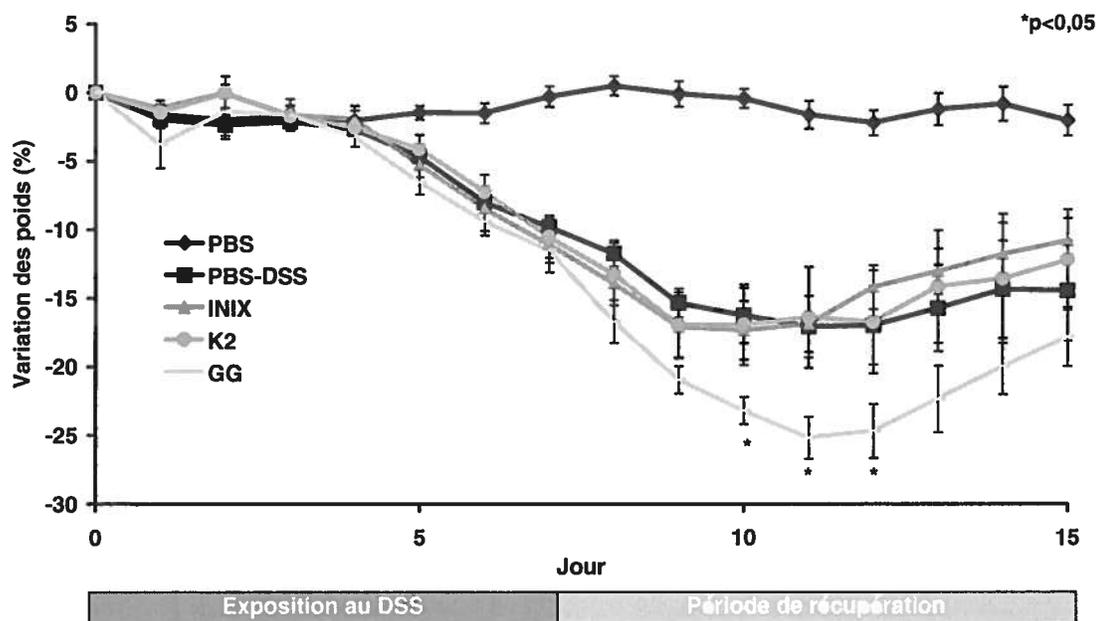
**Figure 14.** Variation des poids durant 7 jours d'exposition au DSS et 8 jours de récupération post-inflammatoire. Deux groupes de souris (n=15) ont été traités au PBS (avec ou sans exposition au DSS) et un groupe a reçu la bactérie R2C2 sous forme viable. \*\*, p<0,01 comparativement au groupe contrôle PBS-DSS.

L'effet protecteur potentiel de la bactérie BioSP dans le modèle animal d'inflammation intestinale induite au DSS a été évalué. La variation des poids (%) a été ramenée à 0% au début de la période d'exposition au DSS, puis suivie durant les sept jours de l'exposition et huit jours de récupération post-inflammatoire. La perte de poids pour le groupe traité à BioSP a été significativement moins importante durant la période de récupération post-inflammatoire, du jour 12 au jour 15, comparativement au groupe contrôle PBS-DSS (Figure 15).



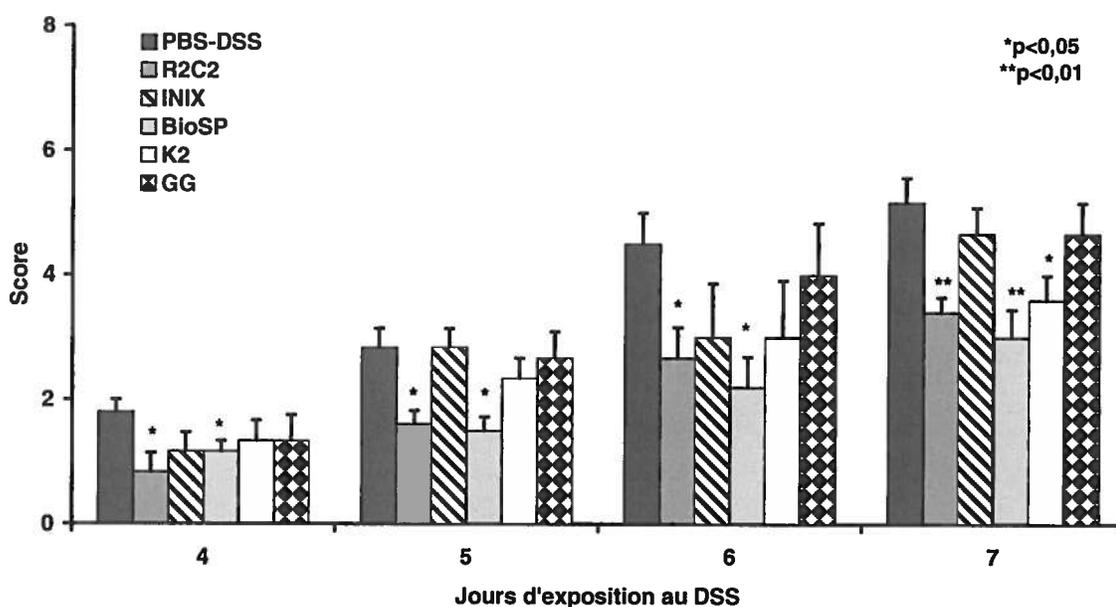
**Figure 15.** Variation des poids durant 7 jours d'exposition au DSS et 8 jours de récupération post-inflammatoire. Deux groupes de souris (n=6) ont été traités au PBS (avec ou sans exposition au DSS) et un groupe a reçu la bactérie BioSP sous forme viable. \*, p<0,05 comparativement au groupe contrôle PBS-DSS.

L'effet protecteur potentiel des bactéries INIX, K2 et *L. GG* dans le modèle animal d'inflammation intestinale induite au DSS a été évalué. La variation des poids (%) a été ramenée à 0% au début de la période d'exposition au DSS, puis suivie durant les sept jours de l'exposition et huit jours de récupération post-inflammatoire. Les groupes traités à INIX et K2 ont perdu autant de poids que le contrôle PBS-DSS et la récupération s'est aussi déroulée de manière équivalente. Par contre, la perte de poids a été significativement plus importante dans le groupe recevant *L. GG*, entre les jours 10 et 12 (Figure 16).



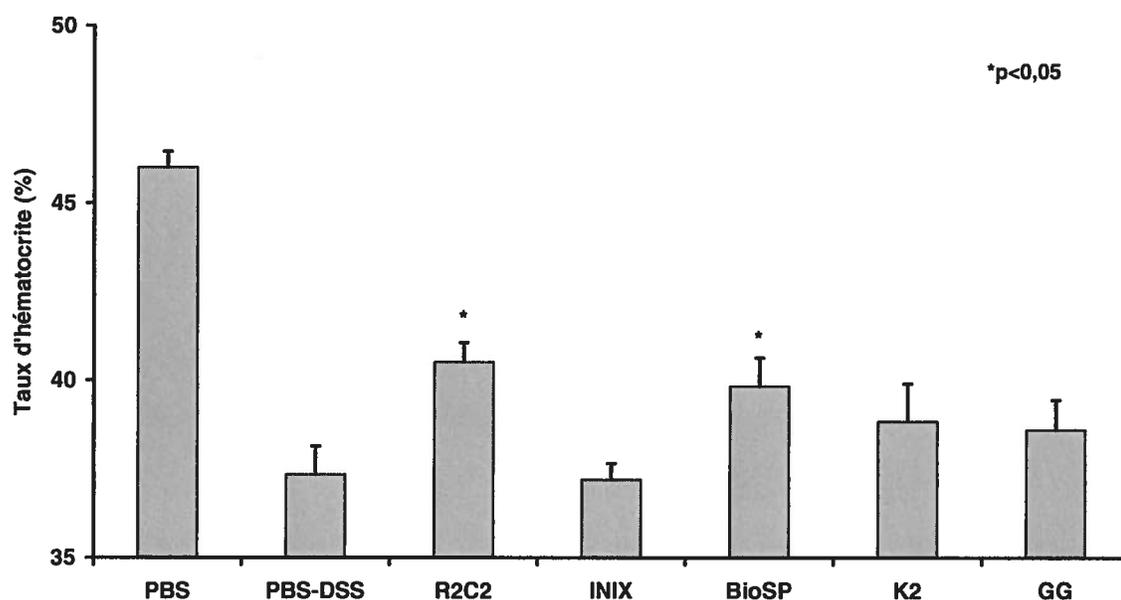
**Figure 16.** Variation des poids durant 7 jours d'exposition au DSS et 8 jours de récupération post-inflammatoire. Deux groupes de souris (n=6) ont été traités au PBS (avec ou sans exposition au DSS) et les autres groupes ont reçu les bactéries INIX, K2 ou *Lactobacillus rhamnosus* GG sous forme viable. \*, p<0,05 comparativement au groupe contrôle PBS-DSS.

Les scores de consistance et de présence de sang dans les fèces des animaux ont été évalués durant la période d'exposition au DSS. Chaque paramètre est évalué sur une échelle de 0 à 4, 0 étant l'absence de diarrhée et de sang, puis les valeurs sont additionnées. Les résultats pour les jours 4 à 7 de l'exposition au DSS sont présentés, pour des groupes traités au PBS (avec DSS), à R2C2, INIX, BioSP, K2 ou *L. GG* (Figure 17). Les scores de consistance et de présence de sang dans les fèces sont significativement plus faibles dans les groupes traités à R2C2 ou BioSP, du jour 4 au jour 7, comparativement au groupe contrôle PBS-DSS. Aucune différence significative n'est observée entre le groupe contrôle PBS-DSS et les groupes traités à INIX, K2 ou *L. GG*, sauf pour le groupe traité à K2, au jour 7.



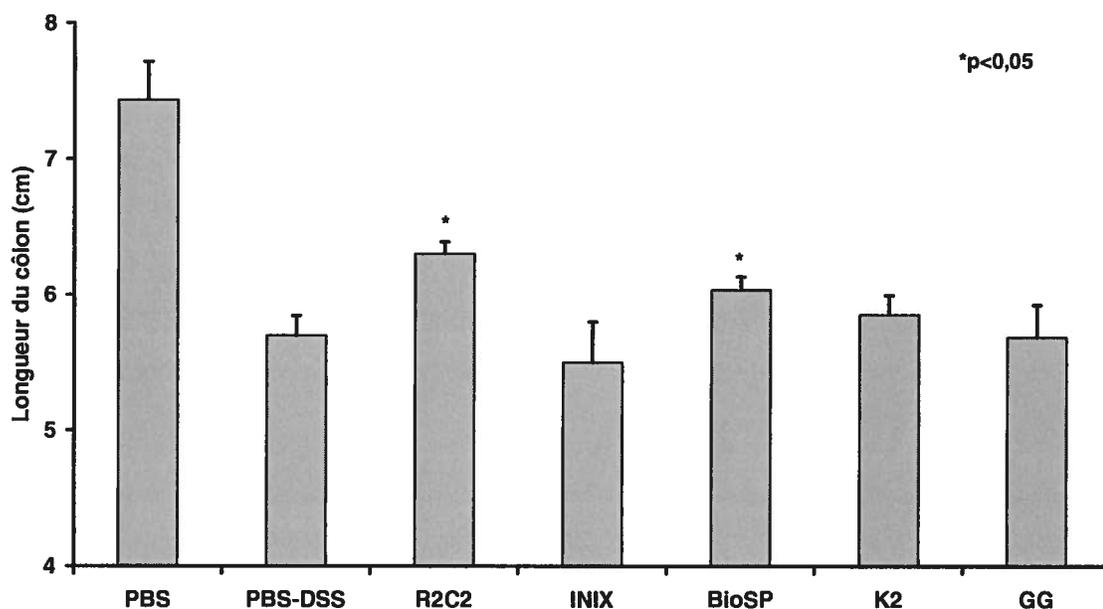
**Figure 17.** Scores de consistance et de présence de sang dans les fèces suite à une exposition de 4, 5, 6 et 7 jours au DSS. Les souris (n=6) ont été traitées au PBS, à R2C2, INIX, BioSP, K2 ou *Lactobacillus rhamnosus* GG. \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$  comparativement au groupe contrôle PBS-DSS.

Le taux d'hématocrite a été mesuré suite à sept jours d'exposition au DSS. La valeur moyenne d'une souris saine est illustrée par le groupe contrôle PBS ( $46,00 \pm 0,45$  %). Les valeurs des groupes traités à R2C2 ( $40,50 \pm 0,56$  %), INIX ( $37,20 \pm 0,44$  %), BioSP ( $39,83 \pm 0,79$  %), K2 ( $38,83 \pm 1,07$  %) ou *L. GG* ( $38,60 \pm 0,85$  %) et celle du groupe contrôle PBS-DSS ( $37,33 \pm 0,80$  %) est clairement plus basse que celle du groupe de souris saines PBS (Figure 18). Cependant, les groupes traités à R2C2 ou BioSP ont des taux d'hématocrite significativement plus élevés que ceux du groupe contrôle PBS-DSS. Aucune différence significative n'est observée entre les groupes traités à INIX, K2 ou *L. GG* comparativement au groupe contrôle PBS-DSS.



**Figure 18.** Taux d'hématocrite suite à une exposition de 7 jours au DSS. Les souris (n=6) ont été traitées au PBS (avec ou sans DSS), à R2C2, INIX, BioSP, K2 ou *Lactobacillus rhamnosus GG*. \*,  $p < 0,05$  comparativement au groupe contrôle PBS-DSS.

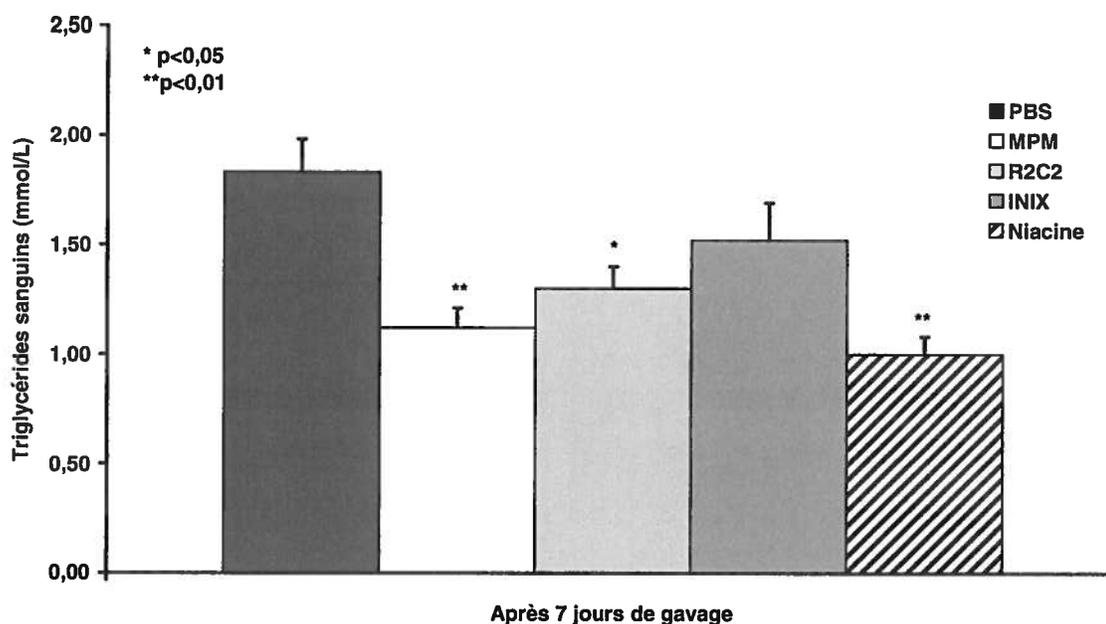
La longueur du côlon des souris a été mesurée à la fin de la période de récupération post-inflammatoire. La mesure moyenne du côlon d'une souris saine est illustrée par le groupe contrôle PBS ( $7,43 \pm 0,28$  cm). Les valeurs des groupes traités à R2C2 ( $6,30 \pm 0,09$  cm), INIX ( $5,50 \pm 0,30$  cm), BioSP ( $6,03 \pm 0,10$  cm), K2 ( $5,85 \pm 0,14$  cm) ou *L. GG* ( $5,68 \pm 0,24$  cm) et celle du groupe contrôle PBS-DSS ( $5,70 \pm 0,15$  cm) sont clairement plus basses que celle du groupe de souris saines PBS (Figure 19). Par contre, les groupes traités à R2C2 ou BioSP ont des côlons significativement plus longs que ceux du groupe contrôle PBS-DSS. Aucune différence significative n'est observée entre les groupes traités à INIX, K2 ou *L. GG* comparativement au groupe contrôle PBS-DSS.



**Figure 19.** Mesure de la longueur du côlon (cm) chez les souris (n=6) après une exposition de 7 jours au DSS et 8 jours de récupération post-inflammatoire. Les souris ont été traitées au PBS (avec ou sans DSS), à R2C2, INIX, BioSP, K2 ou *Lactobacillus rhamnosus* GG. \*,  $p < 0,05$  comparativement au groupe contrôle PBS-DSS.

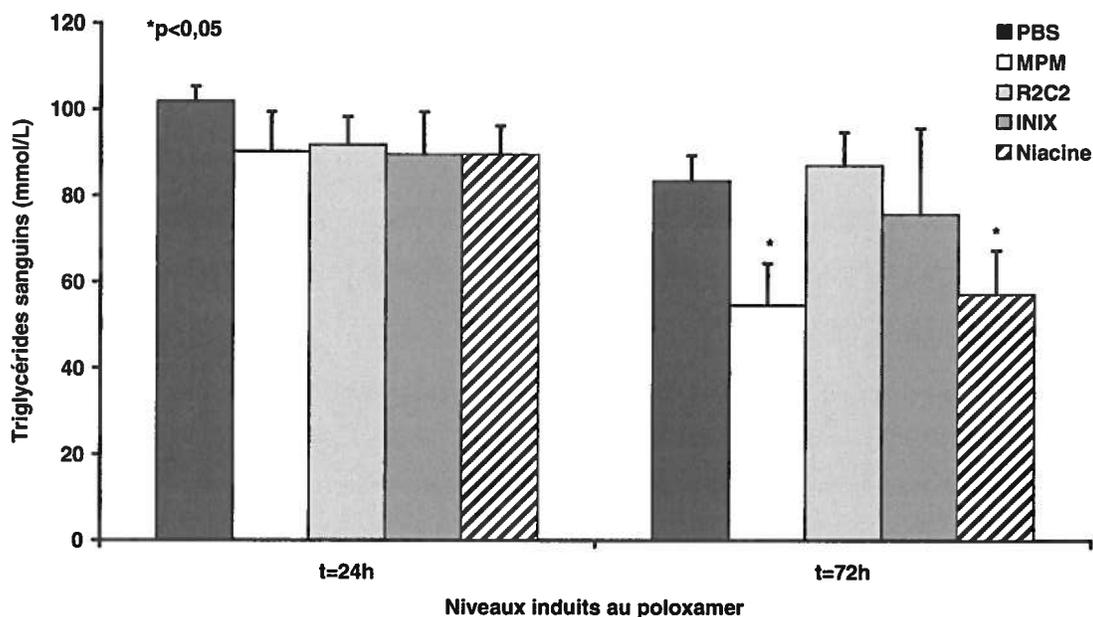
#### 4. Lipidémie

Les niveaux de triglycérides sanguins ont été déterminés suite à sept jours de gavage. Ils sont significativement plus bas dans les groupes traités à la MPM ( $1,12 \pm 0,09$  mmol/L), à R2C2 ( $1,30 \pm 0,10$  mmol/L) ou à la niacine ( $1,00 \pm 0,08$  mmol/L), comparativement au groupe contrôle PBS ( $1,83 \pm 0,15$  mmol/L). Une légère réduction non-significative est aussi observée dans le groupe traité à INIX ( $1,52 \pm 0,17$  mmol/L) (Figure 20).



**Figure 20.** Taux de triglycérides sanguins (mmol/L) chez les rats ( $n > 6$ ) après 7 jours de gavage au PBS, à la MPM, à R2C2, à INIX ou à la niacine. \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$  comparativement au groupe contrôle PBS.

Les niveaux de triglycérides sanguins ont été déterminés 24 et 72 heures après l'induction d'hyperlipidémie au poloxamer 407. Les rats avaient été soumis à sept jours de gavage comme prétraitement. Les triglycérides à t=24h sont légèrement plus bas dans les groupes traités à la MPM ( $90,29 \pm 9,16$  mmol/L), à R2C2 ( $91,82 \pm 6,52$  mmol/L), à INIX ( $89,58 \pm 9,84$  mmol/L) ou à la niacine ( $89,53 \pm 6,67$  mmol/L), mais sans différence significative, comparativement au groupe contrôle PBS ( $101,96 \pm 3,38$  mmol/L) (Figure 21). Ils sont par contre significativement plus bas à t=72h dans les groupes traités à la MPM ( $54,63 \pm 9,59$  mmol/L) ou à la niacine ( $57,14 \pm 10,24$  mmol/L), comparativement au groupe contrôle PBS ( $83,49 \pm 5,86$  mmol/L). Les niveaux dans les groupes traités à R2C2 ( $87,05 \pm 7,69$  mmol/L) ou à INIX ( $75,70 \pm 19,98$  mmol/L) sont équivalents à ceux du groupe contrôle PBS.



**Figure 21.** Taux de triglycérides sanguins (mmol/L) chez les rats ( $n > 6$ ) 24h et 72h après l'induction d'hyperlipidémie par une injection de 300 mg de poloxamer 407. Les rats ont été traités au PBS, à la MPM, à R2C2, à INIX ou à la niacine. \*,  $p < 0,05$  comparativement au groupe contrôle PBS.

## **Article**

**Protective Effect of Live or Pasteurized *Lactobacillus kefiranofaciens* on Dextran Sulfate Sodium-Induced Intestinal Inflammation**

## 1. Accusé de réception

-----Message d'origine-----

De : scn@uga.edu

Envoyé : 26 octobre 2005 12:49

À : Shareck, Francois

Objet : Journal of Dairy Science- Manuscript JDS-05-0751

Please complete and return the mandatory manuscript submission and copyright form if you have not done so already.

October 26th, 2005

Dear Prof. Shareck:

The manuscript you submitted to the Journal of Dairy Science, "Protective effect of live or pasteurized *Lactobacillus kefiranofaciens* on dextran sulfate sodium-induced intestinal inflammation," has been successfully uploaded to Manuscript Central.

As the corresponding author, you will receive future communications via e-mail. Your manuscript number is JDS-05-0751. We appreciate your consideration of the Journal of Dairy Science to publish your research.

Please be sure to save the word processing and graphics files from your manuscript. You will need them when you revise your manuscript and will be asked to submit these files for production if your manuscript is accepted.

Please make a note of the manuscript number and include it in all future communications. This number will also appear in an e-mail from Journal of Dairy Science Manuscript Central within 24 hours after the end of this process, confirming receipt of your submission. This process will serve to validate the e-mail address that you have provided.

Don't forget that we also need a copyright release form. You can download a copy from the "Instructions and Forms" link in this site or at [www.adsa.org/jds](http://www.adsa.org/jds). All authors must sign the form; if authors are at different locations more than one form may be used and submitted separately. Please fax, or mail the form per the instructions.

You can keep track of your manuscript by logging on periodically to Journal of Dairy Science Manuscript Central (<http://jds.manuscriptcentral.com>), where the status will be displayed in your Author Center and also the name and e-mail address of the Editor in charge of your review.

You may submit your comments regarding Manuscript Central access to [jeremyh@assoqh.org](mailto:jeremyh@assoqh.org). We appreciate your comments and concerns regarding the online submission system.

Again, Thank you for your interest in the Journal of Dairy Science.

Steve Nickerson  
Editor in Chief  
Journal of Dairy Science

## 2. Résumé de l'article en français

Les bénéfices associés à la consommation de bactéries probiotiques sont nombreux. Plus spécifiquement, différentes bactéries probiotiques ont démontré la capacité de réduire les symptômes des maladies inflammatoires de l'intestin dans des modèles animaux.

Les souches de l'espèce *Lactobacillus kefiranofaciens* sont très peu connues. Pourtant, elles ont été isolées des grains de kéfir, et ce produit fermenté est traditionnellement consommé dans les pays soviétiques en raison de ses bénéfices sur la fonction gastro-intestinale. Les connaissances des bienfaits du kéfir dans les problèmes digestifs de même que le peu de notions quant au potentiel probiotique de l'espèce *kefiranofaciens* ont mené à l'évaluation des effets de la bactérie *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2 dans un modèle animal d'inflammation intestinale.

Pour ce faire, des souris C57BL/6 ont été soumises au « dextran sulfate sodium » durant sept jours, puis à une période de récupération post-inflammatoire de huit jours. Les souris ont été traitées avec R2C2 sous forme viable ou pasteurisée, au 5-ASA, un médicament largement utilisé dans les maladies inflammatoires de l'intestin de l'humain, et au PBS comme contrôles.

La bactérie *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2 a démontré la capacité de réduire la perte de poids durant l'exposition au DSS et de faciliter la récupération post-inflammatoire. Les scores de consistance et de présence de sang dans les fèces ont aussi été réduits de près de 50% pendant l'exposition au DSS et une inflammation moins importante au niveau du côlon a été observée. De manière intéressante, les bactéries R2C2 inactivées par pasteurisation ont démontré des propriétés anti-inflammatoires semblables à celles des bactéries R2C2 données sous forme viable. De plus, une protection comparable a été observée chez les groupes traités avec le 5-ASA et les bactéries R2C2 viables ou pasteurisées.

En conclusion, la capacité de *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2 à réduire les symptômes de l'inflammation intestinale en fait un candidat intéressant comme probiotique permettant de maintenir une fonction digestive saine. De plus, l'efficacité de la bactérie pasteurisée dans l'inflammation intestinale pourrait maximiser la compliance des patients et réduire le risque de translocation bactérienne.

### 3. Contribution des auteurs

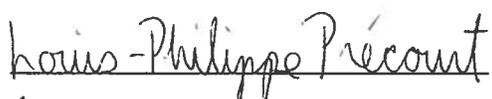
Le projet de maîtrise a été réalisé sous la supervision du professeur François Shareck, en collaboration avec la compagnie Technologie Biolactis, où Pierre Lemieux a assuré la fonction de codirecteur. Les travaux présentés dans l'article représentent l'aboutissement des recherches sur les effets de bactéries lactiques de l'espèce *kefiranofaciens* dans l'inflammation intestinale. L'avancement des travaux a été possible grâce à un suivi continu de la littérature sur les bactéries probiotiques, ce qui a facilité les décisions quant à la direction à donner aux expériences. De plus, l'interaction avec les membres du groupe de recherche a permis d'apporter de nouvelles idées au projet.

La manipulation des animaux de laboratoire a été effectuée par Louis-Philippe Précourt, de même que le suivi quotidien de nombreux paramètres. L'analyse de l'activité de la myéloperoxidase dans le côlon a aussi été faite par M. Précourt. Mme Josée Beaulieu avait d'abord adapté le protocole pour ses propres expériences. Mme Beaulieu a aussi participé aux sacrifices des animaux, à la fin des expériences, et au prélèvement de plusieurs organes qui ont servi à l'analyse de différents paramètres.

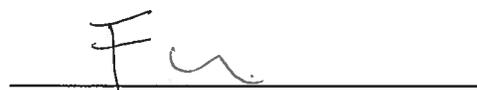
La totalité de la rédaction de l'article, comprenant la préparation des résultats, les analyses statistiques et l'interprétation des données, a été assurée par M. Précourt. Le travail de révision et de correction a été assuré par le Dr. Philippe Goyette et le professeur François Shareck. Les travaux ont été réalisés sous la supervision du professeur Claude Dupont, gestionnaire du projet, ainsi que par le professeur François Shareck, le Dr. Pierre Lemieux et Éric Simard.

Pour ce qui est de l'avancement des connaissances, les résultats obtenus au cours du projet de recherche, et principalement ceux exposés dans l'article, semblaient innovateurs, puisque les connaissances sur l'espèce *kefiranofaciens* sont mineures et que très peu d'articles scientifiques démontrent l'efficacité de bactéries mortes pour diminuer les symptômes de l'inflammation intestinale expérimentale. La recherche sur les bénéfices associés aux bactéries probiotiques est actuellement très active. Cependant, plusieurs controverses demeurent quant aux critères de sélection d'une bactérie probiotique, et plus particulièrement sur la nécessité d'utiliser les bactéries sous forme viable. En effet, une majorité de chercheurs considère que seules les bactéries viables peuvent être efficaces. Ceci implique donc qu'elles agiraient par des mécanismes d'action

classiques, comme l'influence de la perméabilité intestinale ou l'implantation et la modulation de la flore. Par contre, des effets immunomodulateurs ont déjà été observés pour des bactéries non-viables. L'efficacité de la souche R2C2 pasteurisée pour apporter une protection dans l'inflammation intestinale ouvre donc la voie à de nouveaux mécanismes d'action, comme la régulation immunitaire spécifique possiblement via les récepteurs Toll-like et la modulation de l'activité des cellules T régulatrices. L'article présente donc des résultats nouveaux et prend position sur des questions controversées du monde des probiotiques.



Étudiant : Louis-Philippe Précourt



Directeur : François Shareck

**4. Article***KEFIRANOFACIENS* PROTECTS FROM COLITIS**Protective Effect of Live or Pasteurized *Lactobacillus kefiranofaciens* on Dextran Sulfate Sodium-Induced Intestinal Inflammation**

**L. P. Précourt<sup>\*,†</sup>, J. Beaulieu<sup>\*,†</sup>, P. Goyette<sup>†</sup>, E. Simard<sup>\*,†</sup>, C. Dupont<sup>\*</sup>,  
P. Lemieux<sup>†</sup>, F. Shareck<sup>\*,1</sup>**

<sup>\*</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, Institut national de la recherche scientifique, Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada

<sup>†</sup>Technologie Biolactis Inc., 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada

<sup>1</sup> Corresponding author : François Shareck

INRS-Institut Armand-Frappier

Université du Québec

531 boul. des Prairies

Laval, Québec, Canada

H7V 1B7

Phone: 1-450-687-5010, ext. 4274

Fax: 1-450-686-5501

francois.shareck@iaf.inrs.ca

## ABSTRACT

Probiotic bacteria have been shown to exert several health benefits, and more specifically help in the management of serious illnesses such as inflammatory bowel disease (IBD). The strain *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2 presented herein was isolated from kefir grains. Kefir consumption has traditionally been believed to promote gastrointestinal health, which prompted the investigation of the biological contributions of this newly isolated *Lactobacillus* strain. In an animal model of intestinal inflammation, chemically-induced with dextran sulfate sodium (DSS), *L. kefiranofaciens* R2C2 significantly reduced rectal bleedings and diarrhoea by close to 50%. Treatment with *L. kefiranofaciens* R2C2 also significantly reduced weight loss, while facilitating recovery towards normal weight and better colon integrity was observed. Interestingly, bacteria inactivated by pasteurization have shown protective effects comparable to those obtained with live bacteria in all observations monitored in the intestinal inflammation model. The overall protective effect of *L. kefiranofaciens* R2C2 was also similar to that of 5-ASA, a widely used drug for the treatment of inflammatory bowel disease. In conclusion, the capacity of *L. kefiranofaciens* R2C2 to improve symptoms of intestinal inflammation makes it a good candidate as a probiotic promoting gastrointestinal health. Moreover, the use of pasteurized bacteria as an adjunct therapy for IBD could maximise compliance and reduce the risk of bacterial translocation.

**(Key words :** *Lactobacillus kefiranofaciens*, probiotic, intestinal inflammation)

**Abbreviation key :** IBD= inflammatory bowel disease CD= Crohn's disease, UC= ulcerative colitis DSS= dextran sulfate sodium, 5-ASA= 5-amino salicylic acid, CMC= carboxymethyl cellulose, PBS= phosphate buffered saline, TLR= Toll-like receptor

## INTRODUCTION

The pathogenesis of inflammatory bowel disease (**IBD**), including Crohn's disease (**CD**) and ulcerative colitis (**UC**) is still unknown and its etiology is complex and multifactorial. The prevalence of IBD is about 0,2% of the population in industrialized countries (Singh et al., 2001) and yearly, more and more individuals are diagnosed with such health problems. Treatments for IBD are currently mainly targeting symptoms and relapses are occurring in a majority of patients, ultimately leading to surgery in most cases. CD is genetically associated with mutations of the Nod2 gene, which could lead to inflammation by abnormal bacterial sensing (Danese et al., 2004). Toll-like receptors (**TLR**) are also responsible for bacterial sensing, detecting molecular products of microorganisms and initiating inflammatory and immune responses (Rakoff-Nahoum et al., 2004). A disturbed balance of the T helper type 1 vs T helper type 2 immune response, favoring type 1 cells could also lead to IBD (Siegmund et al., 2001).

However, environmental risk factors seem to play a major role in the increased incidence of IBD in occidental population, as described by the "hygiene hypothesis" (Danese et al., 2004). This theory states that the eradication of infectious diseases and better public health measures have led to a reduction of bacterial exposure and consequently to an increased incidence of atopic and autoimmune diseases such as IBD (Shi and Walker, 2004; Strachan, 2000). This theory increases awareness to the importance of host-microbial interactions, particularly in the intestine, in normal human immune system development (Tamboli et al., 2003). Favorable bacterial exposures, obtained with the use of well-selected probiotic bacteria, could protect against IBD by educating the immune system to develop tolerance (Shi and Walker, 2004).

Probiotics are generally defined as "nutritional supplements composed of living microorganisms which exert beneficial effects on the host" (Guarner and Shaafsma, 1998), but newer definitions have recently been proposed, such as "microbial cell preparations or components of microbial cells that have a beneficial effect on the health and well-being of the host" (Vaarala, 2003). The second definition does not specify if the bacteria have to be alive and suggests that only bacterial "components" can exert beneficial effects. Probiotic bacteria have shown various health benefits, particularly for

the gastrointestinal tract, and many different strains have been shown to reduce the symptoms of intestinal inflammation in animal models and clinical studies (Sullivan and Nord, 2005).

Knowledge on probiotic bacteria has increased a lot in recent years, but fermented milks such as kefir represent the origins of all the promises of probiotic bacteria. Kefir has been traditionally consumed in Soviet countries and was provided as a clinical treatment for gastrointestinal tract disorders and metabolic diseases (Koroleva, 1988). Kefir grains are composed of many different lactic acid bacteria, acetic acid bacteria, yeasts and other microorganisms (Toba et al., 1990). Kefir is recognized as a product of alternative medicine since most of its health benefits have not been demonstrated in animal or human studies. Kefir has been known and consumed for many years with alleged beneficial effects, but there is still very poor knowledge on the contribution of some of the bacteria it contains. Up to date, only Santos et al. (2003) suggested potential probiotic properties of different *Lactobacillus kefiranofaciens* strains isolated from kefir grains. Recently, a new strain was isolated from kefir grains, called R2C2, and identified as *Lactobacillus kefiranofaciens* based on the 16S DNA sequence. Traditional knowledge of kefir benefits on gastrointestinal health has led to a further investigation of the possible protective effect of the bacteria *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2 in an animal model of chemically-induced intestinal inflammation.

The present study was performed to investigate the potential protective effect of this newly isolated *L. kefiranofaciens* strain in the dextran sulfate sodium (DSS)-induced intestinal inflammation animal model. *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2 was fed as live and as pasteurized bacteria to laboratory animals to investigate the effect of both live and dead bacteria in that model. Furthermore, protective effect of the strain against intestinal inflammation was compared to the effect obtained with a commonly used drug in patients suffering from IBD, 5-amino salicylic acid (5-ASA).

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and Treatments

For the experiment, female C57BL/6 mice, 6 to 8 weeks old were purchased from Charles River Canada (Saubermann et al. 2002). Mice were randomized according to body weight, in 5 different groups. All animals consumed standard diet and received water *ad libitum*. They were housed under specific pathogen-free conditions and maintained in a 12 hours light/dark cycle. Experiments were repeated at least twice, with 5 to 10 mice per group. The data displayed provides a summary of the results.

The bacterial strain investigated in this study for its potential anti-inflammatory properties was isolated from kefir grains. The strain R2C2 was identified as a *Lactobacillus* of the *kefiranofaciens* species using the ribosomal 16S DNA sequence. The strain was adapted to grow in whey in order to produce a fermented product.

Before induction of intestinal inflammation, animals were pre-treated *per os* once daily for 7 days with various products : 100 uL of phosphate buffered saline (PBS) (Invitrogen) (for the 2 control groups, with or without DSS in drinking water), 100 uL of a bacterial suspension of live *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2 in PBS (containing  $10^9$  bacteria/mL), 100 uL of a bacterial suspension of pasteurized *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2 in PBS (containing  $10^9$  bacteria/mL) or the drug 5-ASA (at a dose of 150 mg/kg) (MP Biomedicals) prepared in 0,5% of carboxymethyl cellulose (CMC) (Sigma) (Rumi et al., 2004). Feedings with the different products continued during 7 days of exposition to DSS and were then stopped for an 8-day post-inflammatory recovery period. At the end of the experiment, animals were killed by cervical dislocation under anesthesia.

The bacterial strain *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2 was routinely cultured in Man Rogosa Sharpe broth (BD Biosciences) at 37°C for a period of 24h. Bacteria were then pelleted by centrifugation at 4000×g for 8 minutes and re-suspended at a concentration of  $10^9$  cells/mL in sterile PBS (Invitrogen), using a standard curve of optical density at 640 nm. For the pasteurization process, bacteria were heated at 75°C for 30 minutes and immediately placed at 4°C. All procedures for the feedings and for the

induction of intestinal inflammation with DSS were in accordance with the institution's guide for the care and use of laboratory animals and accepted by the ethic committee.

### **Induction of Intestinal Inflammation**

Intestinal inflammation was chemically-induced using DSS (molecular weight=36000-50000) (MP biomedical). Following 7 days of pre-treatment with the different products, DSS was dissolved in drinking water at a concentration of 2,5% (wt/vol) and animals had free access to it for 7 days (Hibi et al., 2002; Pizzaro et al., 2003). Water supplemented with DSS was then replaced by sterile water and treatments were stopped for a recovery period of 8 days.

### **Observation of Clinical Signs**

The severity of intestinal inflammation was assessed daily by following multiple observations. The clinical signs followed are comprehensive functional measures that are analogous to clinical symptoms observed in human CD and UC (Osman et al., 2004). DSS-induced intestinal inflammation is associated with a rapid weight loss and bloody diarrhoeas (Pizzaro et al., 2003). Consequently, weight variation, rectal bleedings and feces consistency were monitored daily. Hemocult II (Beckman Coulter) serial test slides of routine screening for fecal occult blood were used to evaluate rectal bleedings on a scale of 0-4, defined as follows : **0**- No blood, **4**- Feces like blood. Feces consistency was also evaluated on a scale of 0-4, defined as follows : **0**- Normal consistency, **4**- Liquid feces (Osman et al., 2004). Feces consistency and rectal bleedings values were combined and defined as the "clinical score". Scores were given by a blinded evaluator. At the end of the recovery process, other measurements were taken to assess the severity of the disease. Postmortem, the entire colon was removed, from the caecum to the anus, and it was measured as a marker of the deterioration caused by inflammation (Siegmond et al., 2001) and myeloperoxidase activity was determined.

### **Determination of Myeloperoxidase Activity**

Colons were snap-frozen and conserved at -80°C before analysis of myeloperoxidase (MPO) activity. Tissues were weighed while still frozen, cut into small

pieces and placed in 1 mL of 50 mM potassium-phosphate buffer (pH 6.0) containing 0,5% of hexadecyltrimethylammonium bromide. Tissues were then sonicated on ice 3 times for 10 seconds, with a 30 seconds pause between each sonication. Tissues were freeze-thawed 3 times before 2 other sonication cycles. A centrifugation of 15 minutes at 10 000×g was performed and an aliquot of the supernatant was taken for determination of the MPO activity according to the method described by Bradley et al. (1982).

### **Statistical Analysis**

Statistical analysis was performed using the Student's t test. *P* values < 0.05 were considered significant. Error bars represent ± standard error means.

## RESULTS

### Weight Loss and Recovery

All DSS-treated animals started consistently losing weight after 4 days of exposition. Weight variation was comparable for all groups until day 7, the last day of exposition to DSS, where treatments with live R2C2 ( $P < 0.01$ ,  $-7.19 \pm 0.88\%$ ), pasteurized R2C2 ( $P < 0.01$ ,  $-7.64 \pm 0.81\%$ ) or 5-ASA/CMC ( $P < 0.01$ ,  $-8.06 \pm 0.50\%$ ) significantly prevented weight loss, compared to PBS-DSS controls ( $-12.60 \pm 1.03\%$ ) (Figure 22). Weight loss stopped on day 10 for groups treated with live R2C2, pasteurized R2C2 or 5-ASA/CMC, 3 days earlier than for the PBS-DSS control group. Recovery was comparable for groups treated with live R2C2, pasteurized R2C2 or 5-ASA/CMC, no significant difference was found. However, animals in these groups recovered more rapidly compared to the PBS-DSS control group, each showing statistically significant ( $P < 0.01$ ) weight variation through days 8 to 15.

### Clinical Score

The clinical score represents combined results of rectal bleedings and diarrhoea. Detectable occult blood appears after 4 days of exposition to DSS, when feces also start to be watery. Protection was observed as soon as day 4 of exposition to DSS for groups treated with live R2C2 ( $P < 0.05$ ,  $1.71 \pm 0.16$ ), pasteurized R2C2 ( $P < 0.05$ ,  $1.69 \pm 0.21$ ) or 5-ASA/CMC ( $P < 0.01$ ,  $1.11 \pm 0.31$ ), compared to the PBS-DSS control group ( $2.29 \pm 0.22$ ) (Figure 23). Clinical score was significantly lower on day 5 for the live R2C2 group ( $P < 0.01$ ,  $2.14 \pm 0.24$ ), pasteurized R2C2 group ( $P < 0.01$ ,  $2.69 \pm 0.24$ ) and 5-ASA/CMC group ( $P < 0.05$ ,  $2.63 \pm 0.50$ ), compared to PBS-DSS controls ( $3.92 \pm 0.29$ ). On day 6, scores were still lower for groups treated with live R2C2 ( $P < 0.01$ ,  $3.92 \pm 0.32$ ), pasteurized R2C2 ( $P < 0.01$ ,  $3.00 \pm 0.37$ ) or 5-ASA/CMC ( $P < 0.01$ ,  $4.13 \pm 0.23$ ), compared to the PBS-DSS control group ( $5.69 \pm 0.26$ ). On day 7, scores were significantly lower for groups treated with live ( $P < 0.01$ ,  $5.25 \pm 0.22$ ) or pasteurized R2C2 ( $P < 0.01$ ,  $4.83 \pm 0.30$ ), but not for the 5-ASA/CMC group ( $5.88 \pm 0.35$ ), compared to PBS-DSS controls ( $6.58 \pm 0.25$ ). Statistical differences were observed between the 5-ASA/CMC groups and both R2C2 groups on day 4, R2C2 groups being slightly higher,

and on day 7, R2C2 groups being slightly lower. On day 6, the pasteurized R2C2 groups was significantly lower than groups treated with live R2C2 or 5-ASA/CMC. However, the general tendency showed a significant and similar protection conferred by treatments with live R2C2, pasteurized R2C2 or 5-ASA/CMC, compared to PBS-DSS controls.

### **Colon Length**

Shortening of the intestine is a common feature of the DSS-induced intestinal inflammation animal model and correlates with the intensity of the disease (Siegmond et al., 2001). Colon length was thus measured at the end of the recovery period as a marker of inflammation. Normal colon length of 6-8 weeks old C57BL/6 mice is represented by the PBS control group ( $7.17 \pm 0.14$  cm). Colon length was dramatically reduced after 7 days of exposition to DSS and 8 days of recovery, particularly for the PBS-DSS control group ( $4.79 \pm 0.22$  cm). Colon length reduction seemed partially prevented in groups treated with live R2C2 ( $P < 0.01$ ,  $5.86 \pm 0.13$  cm), pasteurized R2C2 ( $P < 0.01$ ,  $6.06 \pm 0.16$  cm) or 5-ASA/CMC ( $P < 0.01$ ,  $5.81 \pm 0.13$  cm) compared to PBS-DSS controls (Figure 24). No statistical difference was observed between groups treated with live R2C2, pasteurized R2C2 or 5-ASA/CMC.

### **MPO Activity**

MPO is a naturally occurring constituent of neutrophils and its quantification is representative of the intensity of the disease process (Bradley et al., 1982). MPO activity was measured at the end of the experiment, after an 8-day recovery period, so values were expected to be low or equal to the healthy mice group. But even after 8 days of recovery, differences were observed between groups. Mice that received live R2C2 ( $P < 0.05$ ,  $0.082 \pm 0.025$  units/g of tissue), pasteurized R2C2 ( $P < 0.05$ ,  $0.066 \pm 0.024$  units/g of tissue) or 5-ASA/CMC ( $P < 0.05$ ,  $0.043 \pm 0.004$  units/g of tissue) had levels significantly lower compared to that of the PBS-DSS group ( $0.226 \pm 0.088$  units/g of tissue), but similar to that of the PBS control group ( $0.056 \pm 0.007$  units/g of tissue) (Figure 25).

## DISCUSSION

There are many reports indicating the efficacy of several probiotic bacteria to protect or reduce symptoms in animal models of experimental colitis (Osman et al., 2004; Kamada et al., 2005). However, precise mechanisms of action of probiotics remain unclear and the efficacy of dead bacteria is still controversial. Conventional mechanisms of action of probiotic bacteria to protect against intestinal inflammation include exclusion of pathogenic species by competition for nutrients or production of antibacterial factors (O'Mahony et al., 2001) and enhancement of intestinal barrier function (Madsen et al., 2001). New mechanisms of action were recently identified, suggesting beneficial impact of dead bacteria through immunomodulation mediated by its own DNA (Rachmilewitz et al., 2004; Kamada et al., 2005).

There are no reports on the anti-inflammatory potential of bacterial strains of the *kefiranofaciens* species. There is only one publication showing probiotic characteristics of a *kefiranofaciens* strain, *Lactobacillus kefiranofaciens* CYC 10058. This strain showed good adhesion, resistance to acidic pH values and bile salts and inhibited some pathogenic bacteria (Santos et al., 2003). Kefir has been traditionally provided for clinical treatment of gastrointestinal tract and metabolic diseases in eastern Europe (Koroleva, 1988), and some of the bacteria it contains might be responsible of its beneficial effects. The strain *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2, isolated from kefir grains, was evaluated for its potential as a probiotic promoting gastrointestinal health, mainly for its anti-inflammatory properties. The effect of live and dead R2C2 in intestinal inflammation were evaluated in order to elucidate and clarify the mechanism of action.

Many chemically-induced colitis animal models exist, but the DSS-induced intestinal inflammation seems to be a fast and reliable animal model that recapitulates the events that lead to acute mucosal injury (Pizzaro et al., 2003). It allows a close survey of many events occurring in human IBD (Pizzaro et al., 2003). The DSS-induced intestinal inflammation animal model is characterized by epithelial disruption resulting in luminal bacterial translocation, mucosal ulcers and infiltration of neutrophils and other acute immune cells. DSS-induced intestinal inflammation is also associated with rapid body weight loss, bloody diarrhoea, hematochezia and shortening of the intestine (Hibi et al.,

2002). This animal model has shown useful in providing proof of concept for therapeutic interventions in a simple and relatively inexpensive setting (Pizzaro et al., 2003), particularly with probiotic bacteria (Shibolet et al., 2002; Osman et al., 2004). However, not every probiotic necessarily has beneficial effects in animal models of intestinal inflammation. Each and every beneficial effect alleged to specific bacteria has to be clearly demonstrated and cannot be attributed to any strain of the same species (Marteau and Shanahan, 2003).

### **Reduction of Symptoms by Live or Pasteurized R2C2**

Live *L. kefiranofaciens* R2C2 fed as treatment against chemically-induced intestinal inflammation significantly reduced weight loss and facilitated post-inflammatory recovery. After 7 days of exposition to DSS, weight loss was less pronounced in the group treated with live R2C2, demonstrating a protective effect in acute intestinal inflammation. Clinical scores of rectal bleedings and diarrhoea throughout exposition to DSS were also significantly lower than in the placebo group, suggesting a protection from DSS-induced injury to the intestinal wall. Human acute colitis or relapses of CD and UC are characterized by weight loss and bloody diarrhoea. In this animal experiment of intestinal inflammation, live R2C2 reduced these symptoms significantly, by almost 50%. Moreover, weight gain during the post-inflammatory recovery period started 3 days earlier in the live R2C2 group and continued significantly more rapidly than for the PBS-DSS control group. Since no more probiotic feedings were given during the post-inflammatory recovery period, the protective effect conferred by R2C2 treatment during the acute phase of experimental intestinal inflammation is confirmed. Results of the clinical score during the recovery period were not presented because they diminished rapidly for all groups (data not shown). The better recovery process is also confirmed by post-mortem colon length. Thickening and shortening of the colon is a common feature of intestinal inflammation (Siegmond et al., 2001). Colons of the live R2C2-treated group were shorter than those of healthy animals but were significantly longer than those of the PBS-DSS control group, suggesting a less intense inflammatory process. This was also confirmed by determination of the MPO activity, representative of the infiltration of inflammatory cells in the colonic wall. MPO levels were slightly higher in the live R2C2-

treated group than in the healthy mice group, but no statistical difference was observed, suggesting a near finished inflammatory process. However, MPO levels were significantly higher in the PBS-DSS control group, indicating that the inflammatory process was still active after 8 days of recovery.

Interestingly, pasteurized *L. kefiranofaciens* R2C2 fed as treatment against chemically-induced intestinal inflammation significantly reduced weight loss and facilitated post-inflammatory recovery, with no statistical difference with live R2C2. Similarly to the live R2C2-treated group, mice treated with pasteurized R2C2 showed a significant reduction in clinical score and better post-mortem colon integrity demonstrated by its length and reduced MPO activity.

The efficacy of live as well as pasteurized R2C2 to protect against chemically-induced intestinal inflammation suggests that for specific strains and associated benefits, viability of the bacteria might be an important factor, as for others, inactivated cultures could have the same beneficial effects (Mottet and Michetti, 2005). Few studies have demonstrated the efficacy of dead bacteria to protect against intestinal inflammation. Rachmilewitz et al. (2004) demonstrated that the protective effects of the probiotic mixture VSL#3, in DSS-induced intestinal inflammation, are mediated by their own DNA and that consequently live microorganisms are not required. In that study, live VSL#3 reduced symptoms, but the heat-killed (30 minutes, 100°C) probiotic mixture had no effect. Beneficial effects were only maintained when the probiotics were inactivated by irradiation. Furthermore, purified bacterial DNA from the VSL#3 mixture showed a comparable efficacy than that obtained with live bacteria (Rachmilewitz et al., 2004). Kamada et al. (2005) demonstrated that the protective effect of *Escherichia coli* Nissle1917 in DSS-induced intestinal inflammation could be obtained by using heat-killed (30 minutes, 60°C) bacteria. Moreover, its purified genomic DNA also attenuated colitis. However, live *Lactobacillus crispatus* M247 reduced the severity of DSS colitis, but heat-killed (time and temperature not precised) bacteria had no effect (Castagliuolo et al., 2005). Arguably, treatment at 100°C might expose bacterial DNA to a too intense heat and that might explain the loss of the protective effect, in comparison to the study of Kamada et al. (2005) and the experiment presented herein, where bacteria was heated at 75°C for 30 minutes.

Results of these studies show that beneficial effects produced by probiotic consumption can be mediated by specific components and thus dead bacteria can be efficient, while in other cases, viability seems to be a major factor. Consequently, for specific uses, probiotic strains do not necessarily have to survive stomach acidity, digestive and pancreatic enzymes and bile salts. Moreover, probiotic bacteria might not have to adhere to intestinal epithelial cells and colonize the gastrointestinal tract, because cell components could trigger immunological processes possibly responsible for anti-inflammatory effects.

Conventional mechanisms of action of a probiotic bacteria include exclusion of pathogenic species (O'Mahony et al., 2001), production of antibacterial factors and enhancement of intestinal barrier function (Madsen et al., 2001). Viability is logically a major factor for such effects to take place. The bacteria thus have to resist acid pH, digestive enzymes and bile salts in order to reach the distal parts of the digestive tract. They can then adhere to intestinal cells, at least transiently colonize the tractus and interact with the immune system. A reduction in fecal coliforms and enterococci levels in a probiotic-fed group was found to reduce intestinal inflammatory activity, showing that the modulation of the microflora might help reduce symptoms of colitis (O'Mahony et al., 2001). Live R2C2 demonstrated the capacity to reduce fecal coliforms, while pasteurized R2C2 did not but still reduced symptoms of intestinal inflammation (data not shown). Modulation of the microflora is certainly a desirable feature of live R2C2, but does not seem to be necessary for its beneficial impact on DSS-induced colitis.

The efficacy of pasteurized R2C2 to reduce symptoms of intestinal inflammation suggests that specific components of the bacteria interact with immune or epithelial cells along the gastrointestinal tract, possibly regulating the expression of inflammatory cytokines or restoring the Th1/Th2 balance (Siegmund et al., 2001; O'Mahony et al., 2001). However, the most documented mechanism of action for dead bacteria is mediated by their own DNA. Unmethylated CpG dinucleotides within consensus sequences, called CpG motifs, are present in high number on bacterial DNA, but are underrepresented in mammalian DNA (Rachmilewitz et al., 2004). Recognition of bacterial components, such as CpG motifs, by Toll-like receptors (TLR) is partially responsible for maintenance of intestinal homeostasis and necessary for the healing process of injured epithelium (Abreu

et al., 2005; Rakoff-Nahoum et al., 2004). TLR9 recognizes CpG motifs present in bacterial DNA which can lead to an increased expression of pro-inflammatory cytokines including IL-6, IL-12 and TNF $\alpha$  and to the activation of the NF- $\kappa$ B pathway (Waston and McKay, in press). These effects should normally worsen the inflammatory activity, but symptoms are ameliorated in animal experiments (Rachmilewitz et al., 2004; Kamada et al., 2005). Recognition of bacterial CpG motifs by TLR9 could possibly lead to an increase of regulatory T cells, that can control inflammation by expression of anti-inflammatory cytokines like IL-10 and TGF $\beta$  (Singh et al., 2001), through production of IFN $\alpha$  by dendritic cells (Waston and McKay, in press).

### **Comparison of the Anti-Inflammatory Effect of *L. kefiranofaciens* R2C2 to that of 5-ASA**

5-ASA is a standard anti-inflammatory drug for human IBD and its beneficial effects were demonstrated in DSS-induced colitis in animals (Rumi et al., 2004). 5-ASA has shown the capacity to prevent the loss of body weight and colon shortening and reduce scores of diarrhoea and rectal bleedings (Rumi et al., 2004). In the present experiment, 5-ASA significantly prevented weight loss and facilitated post-inflammatory recovery, reduced the clinical score based on rectal bleedings and diarrhoea and better colon integrity was observed, based on MPO activity and length. The protective effects observed with live or pasteurized *L. kefiranofaciens* R2C2 were also comparable to those of 5-ASA, for all clinical signs monitored. These results demonstrated that probiotic supplementation, in laboratory animals, could have a similar impact to a commonly used drug in human.

In conclusion, supplementation with live or pasteurized *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2 demonstrated a protective effect on DSS-induced intestinal inflammation. Live or pasteurized R2C2 reduced weight loss, facilitated post-inflammatory recovery, reduced rectal bleedings and diarrhoea and partially preserved colon integrity. Protective effect obtained with R2C2 was comparable to that of 5-ASA. Efficacy of pasteurized bacteria against IBD suggests new mechanisms of action for probiotics, including immunomodulation by specific components such as CpG motifs in

bacterial DNA. Use of dead bacteria as probiotic preparations in active IBD would minimize the risks associated with bacterial translocation and maximise compliance. Moreover, because of the capacity of the bacteria to ferment whey, functional ingredients with anti-inflammatory properties could be commercialized.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

The project was supported by a Strategic grant (STP 246405-01) from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) in collaboration with Technologie Biolactis inc. L. P. Précourt is a fellow of industrial scholarship of NSERC. This report was taken in part from a dissertation to be submitted by L. P. Précourt to the INRS-Institut Armand-Frappier, in partial fulfillment of the requirements for the M.Sc. degree.

## REFERENCES

- Abreu, M.T., M. Fukata and M. Arditi. 2005. TLR signaling in the gut in health and disease. *J. Immunol.* 174(8):4453-4460.
- Bradley, P.P., D.A. Priebat, R.D. Christensen and G. Rothstein. 1982. Measurement of cutaneous inflammation : estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* 78(3):206-209.
- Castagliuolo, I., F. Galeazzi, S. Ferrari, M. Elli, P. Brun, A. Cavaggioni, D. Tormen, G.C. Sturniolo, L. Morelli and G. Palu. 2005. Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 43(2):197-204.
- Danese, S., M. Sans and C. Fiocchi. 2004. Inflammatory bowel disease : the role of environmental factors. *Autoimmun. Rev.* 3(5):394-400.
- Guarner, F. and G.J. Shaafsma. 1998. Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 39(3):238-239.
- Hibi, T., H. Ogata and A. Sakuraba. 2002. Animal models of inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* 37(6): 409-417.
- Kamada, N., N. Inoue, T. Hisamatsu, S. Okamoto, K. Matsuoka, T. Sato, H. Chinen, K.S. Hong, T. Yamada, Y. Suzuki, N. Watanabe, K. Tsuchimoto and T. Hibi. 2005. Nonpathogenic *Escherichia coli* strain Nissle1917 prevents murine acute and chronic colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 11(5):455-463.
- Koroleva, N.S. 1988. Technology of kefir and kumys. *Fed. Int. Laiterie Int. Dairy Fed. Bull.* 227:96-100.
- Madsen, K., A. Cornish, P. Soper, C. McKaigney, H. Jiton, C. Yachimec, J. Doyle, L. Jewell and C. De Simone. 2001. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology.* 121(3):580-591.
- Marteau, P. and F. Shanahan. 2003. Basic aspects and pharmacology of probiotics : an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17(5):725-740.
- Mottet, C. and P. Michetti. 2005. Probiotics: wanted dead or alive. *Dig. Liv. Dis.* 37(1):3-6.
- O'Mahony, L., M. Feeney, S. O'Halloran, L. Murphy, B. Kiely, J. Fitzgibbon, G. Lee, G. O'Sullivan, F. Shanahan and J.K. Collins. 2001. Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumor development in IL-10 knockout mice. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15(8):1219-1225.

- Osman, N., D. Adawi, S. Ahrne, B. Jeppsson and G. Molin. 2004. Modulation of the effect of dextran sulfate sodium-induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Dig. Dis. Sci.* 49(2):320-327.
- Pizzaro, T.T., K.O. Arseneau, G. Bamias and F. Cominelli. 2003. Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends Mol. Med.* 9(5):218-222.
- Rachmilewitz, D., K. Katakura, F. Karmeli, T. Hayashi, C. Reinus, B. Rudensky, S. Akira, K. Takeda, J. Lee, K. Takabayashi and E. Raz. 2004. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology.* 126(2):520-528.
- Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg and R. Medzhitov. 2004. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* 118(2):229-241.
- Rumi, G., R. Tsubouchi, M. Okayama, S. Kato, G. Mozsik and K. Takeuchi. 2004. Protective effect of lactulose on dextran sulfate sodium induced colonic inflammation in rats. *Dig. Dis. Sci.* 49(9):1466-1472.
- Santos, A., M. San Mauro, A. Sanchez, J.M. Torres and D. Marquina. 2003. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *System. Appl. Microbiol.* 26(3):434-437.
- Saubermann, L.J., A. Nakajima, K. Wada, S. Zhao, Y. Terauchi, T. Kadowaki, H. Aburatani, N. Matsushashi, R. Nagai and R.S. Blumberg. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 8(5):330-339.
- Shi, H.N. and A. Walker. 2004. Bacterial colonization and the development of intestinal defences. *Can. J. Gastroenterol.* 18(8):493-500.
- Shibolet, O., F. Karmeli, R. Eliakim, E. Swennen, P. Brigidi, P. Gionchetti, M. Campieri, S. Morgenstern and D. Rachmilewitz. 2002. Variable response to probiotics in two models of experimental colitis in rats, *Inflamm. Bowel Dis.*, 8(6):399-406.
- Siegmund, B., G. Fantuzzi, F. Rieder, F. Gamboni-Robertson, H.A. Lehr, G. Hartmann, C.A. Dinarello, S. Endres and A. Eigler. 2001. Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281(4):R1264-R1273.
- Singh, B. S. Read, C. Asseman, V. Malmstrom, C. Mottet, L.A. Stephens, R. Stepankova, H. Tlaskalova and F. Powrie. 2001. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol. Rev.* 182:190-200.
- Strachan, D.P. (2000) Family size, infection and atopy : the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax.* 55(Suppl. 1):S2-S10.

Sullivan, A. and C.E. Nord. 2005. Probiotics and gastrointestinal diseases. *J. Intern. Med.* 257(1):78-92.

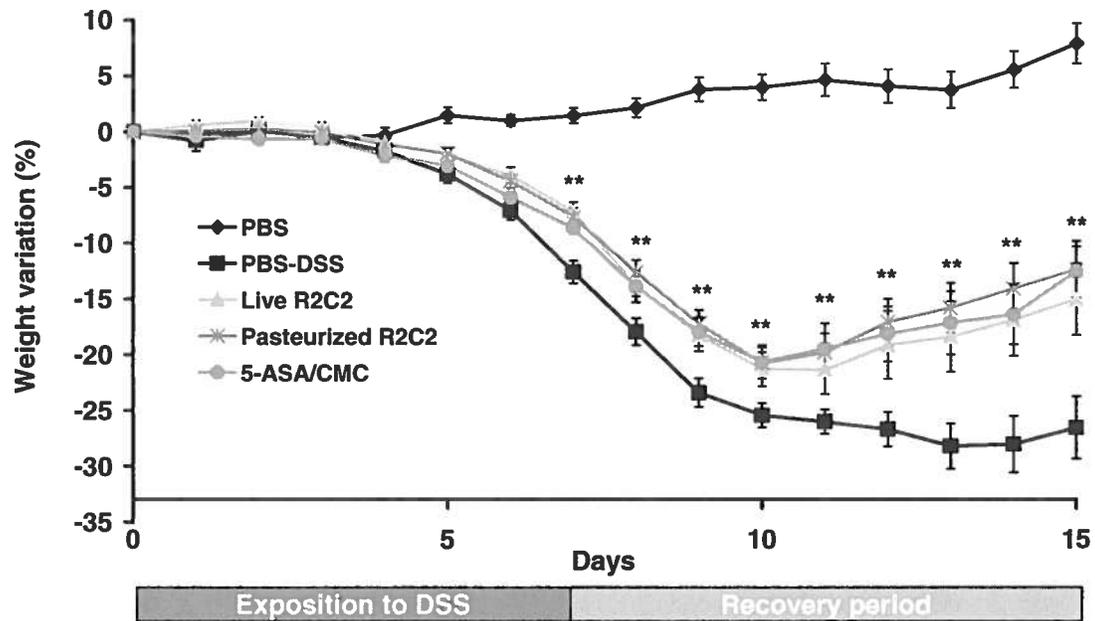
Tamboli, C.P., C. Caucheteux, A. Cortot, J.F. Colombel and P. Desreumaux. 2003. Probiotics in inflammatory bowel disease: a critical review. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17(5):805-820.

Toba, T., K. Arihara, and S. Adachi. 1990. Distribution of microorganisms with particular reference to encapsulated bacteria in kefir grains. *Int. J. Food Microbiol.* 10(3-4):219-224.

Vaarala, O. 2003. Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli. *Clin. Exp. Allergy.* 33(12):1634-1640.

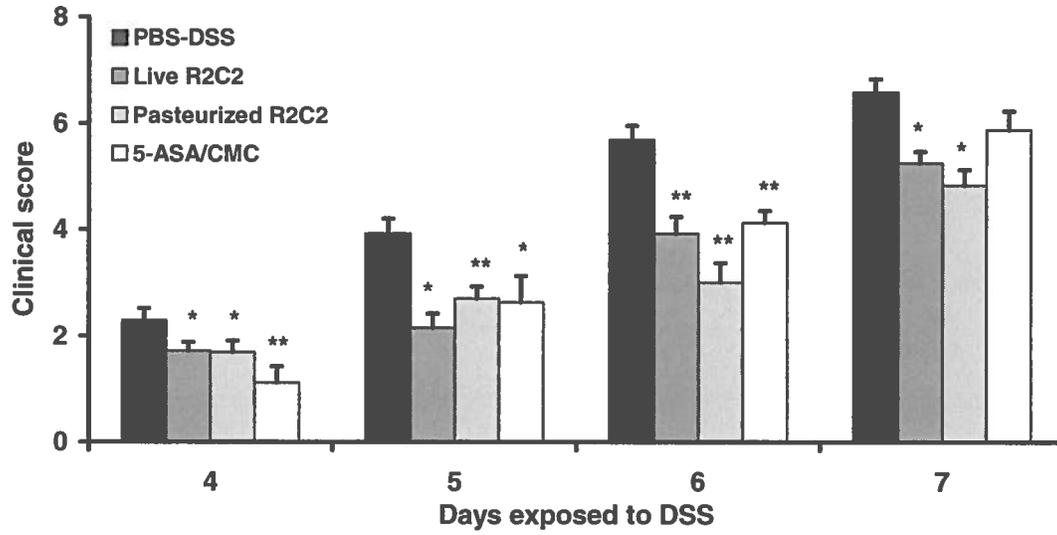
Watson, J.L. and D.M. McKay. Article in press. The immunophysiological impact of bacterial CpG DNA on the gut. *Clin. Chim. Acta.*

**Figure 22.** Body weight variation for groups treated with live or pasteurized *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2 compared to the PBS-DSS control group and the 5-ASA/CMC group, during 7 days of exposition to 2,5% of DSS in drinking water and 8 days of post-inflammatory recovery. Animals were pre-treated for 7 days and feedings continued during exposition to DSS, but stopped at the beginning of the recovery period. Body weight is shown as percentage of the body weight just before DSS administration. \*\*, Statistically significant,  $P < 0.01$ , for both R2C2-treated groups and the 5-ASA-treated group, compared to the PBS-DSS control group (using the Student's t test). No statistical difference was observed between the groups treated with live R2C2, pasteurized R2C2 or 5-ASA/CMC.



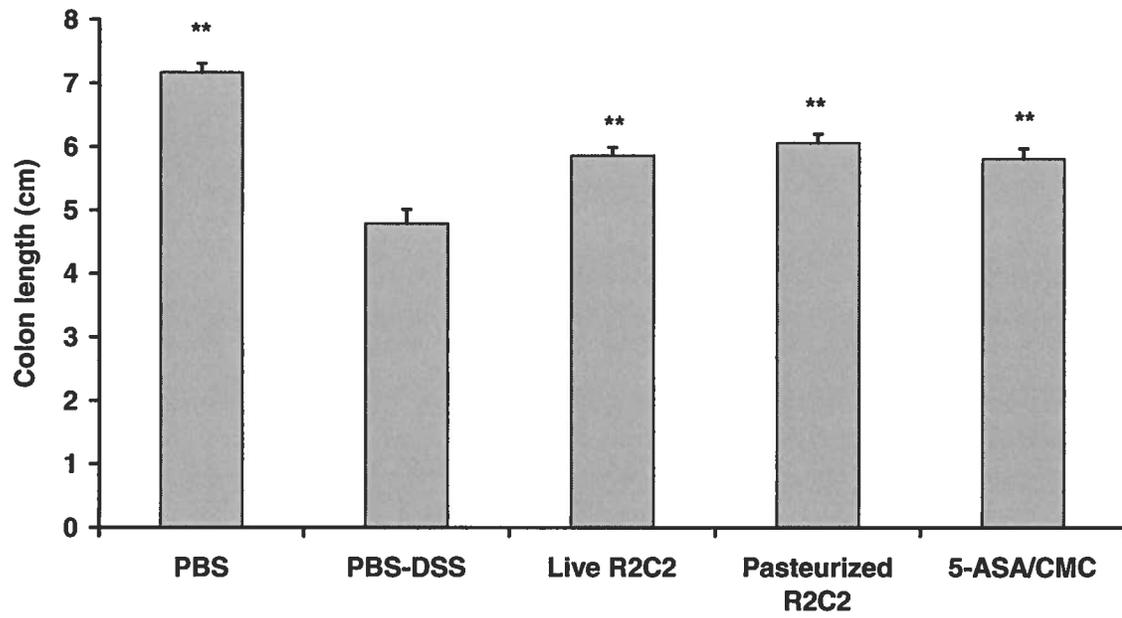
**Figure 22.** Variation des poids des souris (%) durant l'exposition au DSS et la période de récupération post-inflammatoire.

**Figure 23.** Clinical score (rectal bleedings and feces consistency) for animals treated with live *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2, pasteurized R2C2 or 5-ASA/CMC and compared to the PBS-DSS control group (days 4, 5, 6 and 7 of exposition to DSS). \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$  Statistically significant compared to the PBS-DSS control group (using the Student's t test).



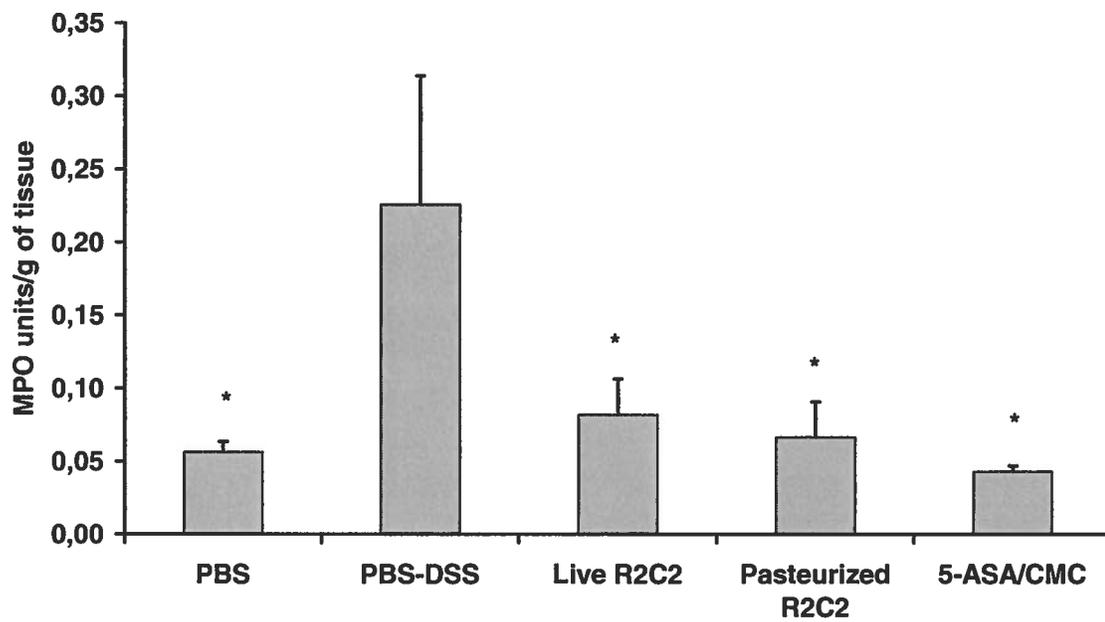
**Figure 23.** Scores combinés de consistance et de présence de sang dans les fèces durant l'exposition au DSS.

**Figure 24.** Colon length for groups treated with live or pasteurized *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2 and compared to the PBS-DSS control group. Colon length is measured at the end of the experiment, after the recovery period. The length of a healthy colon from a C57BL/6 mice, from the caecum to the anus, is represented by the PBS control group. No statistical difference was observed between R2C2-treated groups and the 5-ASA/CMC group. \*\*,  $P < 0.01$  Statistically significant compared to the PBS-DSS control group (using the Student's t test).



**Figure 24.** Longueur du côlon des souris à la fin de la période de récupération post-inflammatoire.

**Figure 25.** Myeloperoxidase (MPO) activity in the colon at the end of the experiment, after 7 days of exposition to DSS and 8 days of post-inflammatory recovery. The MPO activity represents the extent of inflammatory cells infiltration in the colonic wall. No statistical difference was observed between *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2-treated groups, the 5-ASA/CMC group and the PBS control group, but MPO activity was significantly higher in the PBS-DSS group. \*,  $P < 0.05$ , Statistically significant compared to the PBS-DSS control group (using the Student's t test).



**Figure 25.** Unités de MPO/g de tissu de côlon à la fin de la période de récupération post-inflammatoire.

## **Discussion générale**

## 1. Critères de sélection d'une bactérie probiotique

Le but premier du projet de recherche est de déterminer le potentiel probiotique de différentes souches de *Lactobacillus kefiranofaciens*. Les nombreux bénéfices associés à la consommation du kéfir et des résultats préliminaires obtenus *in vitro* avec la MPM permettent de croire que les bactéries lactiques de l'espèce *kefiranofaciens* sont possiblement actives. Plusieurs critères ont été énoncés de manière à reconnaître la propriété probiotique d'une bactérie (voir Tableau 1, p. 14). Ils doivent donc être considérés avant l'attribution du qualificatif « probiotique » aux différentes souches de l'espèce *kefiranofaciens* à l'étude. La définition même du terme « probiotique », suppléments nutritionnels composés de microorganismes vivants exerçant des effets bénéfiques pour l'hôte (Tamboli *et al.*, 2003), contient un critère très important : les bactéries doivent être viables. Pour pouvoir atteindre les parties distales de l'intestin sous forme viable, elles doivent aussi avoir la capacité de résister aux pH acide de l'estomac, aux enzymes digestives et pancréatiques ainsi qu'aux sels biliaires. La capacité des bactéries à adhérer à la paroi intestinale, à coloniser la flore et à y persister au moins temporairement sont aussi des propriétés souhaitables (Dunne *et al.*, 1999).

Il faut aussi mentionner que la capacité des différentes souches à fermenter le lactosérum pour ainsi générer un produit d'apparence semblable au yogourt est une propriété intéressante d'un point de vue commercial. En effet, les différentes souches de l'espèce *kefiranofaciens* pourraient être mises en marché dans des produits de lactosérum fermenté, ce qui serait plus attirant pour le consommateur.

La capacité des bactéries de l'espèce *kefiranofaciens* à remplir plusieurs de ces critères a été évaluée. Pour ce qui est de la nécessité de la viabilité des bactéries pour qu'elles puissent entraîner des bénéfices, il s'agit d'une question controversée. Si les bactéries mortes peuvent avoir les mêmes effets que les bactéries viables, elles n'ont pas à survivre tout au long du tube digestif. De plus, les critères les plus importants à considérer pour qu'une bactérie soit probiotique devraient être les bénéfices associés à sa consommation, de même que l'absence d'effets secondaires. Les critères de sélection d'un probiotique devraient donc pouvoir varier en fonction des effets obtenus avec une bactérie spécifique, et la définition devrait englober les bénéfices dus à la consommation de suppléments de bactéries viables et mortes.

## 2. Impact sur la flore intestinale, colonisation et persistance

La capacité des bactéries à adhérer à la paroi intestinale et à y coloniser la flore semble être d'une importance capitale pour entraîner des effets bénéfiques. En effet, l'adhésion des probiotiques aux cellules intestinales pourrait permettre une interaction maximale avec l'hôte, et entraîner des bénéfices via une reconnaissance par des récepteurs spécifiques et l'activation de certaines cascades immunitaires (Ouwehand *et al.*, 2002). La capacité à adhérer pourrait aussi maximiser les possibilités de la bactérie à coloniser l'intestin et à moduler la flore, en lui permettant de compétitionner pour les nutriments et les sites d'attachement.

La capacité des bactéries de l'espèce *kefiranofaciens* à moduler, coloniser et à persister dans la flore intestinale a donc été évaluée. Une souche contrôle bien connue pour son habileté à coloniser l'intestin a été utilisée, *Lactobacillus rhamnosus* GG (Alander *et al.*, 1999). Un dénombrement des bactéries lactiques a été réalisé dans les fèces des animaux suite à sept jours de gavage. Une forte augmentation du nombre de bactéries lactiques totales a été observée pour le groupe recevant *L. GG*. Ceci est représentatif de sa capacité à coloniser l'intestin, décrite dans la littérature (Alander *et al.*, 1999; Jacobsen *et al.*, 1999). Les gavages avec R2C2 n'ont pas semblé avoir le même impact sur les bactéries lactiques. Le groupe traité avec R2C2 viable a montré une légère augmentation, alors que le niveau du groupe recevant R2C2 pasteurisée était comparable à celui du groupe contrôle PBS. Par contre, il est possible que R2C2 colonise quand même, mais en déplaçant des bactéries lactiques indigènes, déjà présentes dans la flore, ce qui expliquerait l'absence d'impact visible sur ce dénombrement.

L'effet des gavages sur le pH fécal a aussi été mesuré, afin de fournir une information de plus quant à la capacité des bactéries à s'implanter dans la flore intestinale. En effet, une plus grande concentration de bactéries lactiques devrait normalement réduire le pH fécal, puisque le principal produit de leur métabolisme est l'acide lactique (Romond *et al.*, 1998). L'augmentation du nombre de bactéries lactiques suite à des gavages à *L. GG* a effectivement eu des répercussions sur la valeur du pH fécal. Par contre, les impacts réels de la diminution observée sont probablement mineurs, puisque le pH demeure aux environs de la neutralité. Pour ce qui est du groupe recevant R2C2 viables, une faible diminution du pH fécal a été observée, ce qui est cohérent avec

la faible augmentation des bactéries lactiques. Aucun impact sur le pH fécal n'a été observé pour le groupe traité à R2C2 pasteurisée. Ces résultats semblaient encore une fois confirmer la capacité de *L. GG* à coloniser la flore intestinale, alors que l'impact de R2C2 semblait plutôt faible, et présent seulement lorsque la bactérie était viable.

Afin de confirmer les résultats précédents sur la colonisation et de vérifier la persistance des bactéries R2C2 et *L. GG* au niveau de la flore intestinale, des essais de détection par PCR ont été réalisés à l'aide d'amorces spécifiques à chacune des espèces. Une extraction d'ADN bactérien dans les fèces des animaux gavés a été réalisée, 24 heures après le dernier gavage. La détection d'ADN de *L. GG* dans les fèces était attendue en raison de l'augmentation du nombre de bactéries lactiques et de la baisse du pH fécal. Cependant, aucune détection n'a été obtenue. L'efficacité de la méthode d'extraction d'ADN a pourtant été confirmée par l'utilisation d'amorces universelles à l'ADN 16S bactérien. Il semble donc que *L. GG* ne soit pas présente dans les fèces dès 24 heures après l'arrêt des gavages. Les gavages à *L. GG* peuvent aussi simplement avoir tendance à faciliter la croissance d'autres espèces de bactéries lactiques dans le tube digestif, sans nécessairement le coloniser. Il est tout de même possible que les bactéries aient colonisé plus en amont du tube digestif ou que la méthode de détection ne soit pas assez sensible. Aucune détection n'a été obtenue dans les groupes gavés à R2C2, viable ou pasteurisée, ce qui est représentatif des résultats de dénombrement de bactéries lactiques et de pH fécal.

Finalement, les résultats montrent que la bactérie R2C2 n'a pas semblé coloniser en grande quantité la flore intestinale des animaux sains. Une légère augmentation du nombre de bactéries lactiques et une faible diminution du pH fécal chez les animaux gavés à R2C2 viable pourraient quand même laisser croire à une certaine implantation dans l'intestin. L'absence de détection par PCR pourrait alors signifier que la colonisation est transitoire et demeure seulement si les gavages sont continus. Ceci n'est pas une propriété indésirable puisqu'il n'y a ainsi que peu de risques de modifier à long terme l'équilibre de la flore intestinale. Il serait aussi possible que la méthode ne soit pas assez sensible pour distinguer la petite quantité d'ADN de *kefiranofaciens* parmi tout l'ADN bactérien présent dans les fèces ou que la colonisation se produit à un autre endroit du tube digestif. Il est néanmoins intéressant de noter que la faible colonisation semble ne se

produire que si la bactérie est donnée sous forme viable, aucun changement n'étant observé chez les groupes recevant R2C2 pasteurisée.

Malgré le fait que la colonisation et la persistance dans le tube digestif ne semblent pas être des propriétés majeures de R2C2, celle-ci semble être en mesure de moduler positivement la flore intestinale. En effet, suite à sept jours de gavage avec R2C2 sous forme viable, les populations de coliformes fécaux ont diminué d'environ 50%. D'autres bactéries de l'espèce *kefiranofaciens*, INIX, BioSP et K2, ont démontré des propriétés similaires, tout comme *L. GG*. Ces bactéries peuvent donc possiblement produire des substances inhibant la croissance des coliformes, ou compétitionner pour les sites d'attachement et les nutriments durant leur transit dans l'intestin. Cet effet est très intéressant puisque les coliformes sont potentiellement pathogènes et qu'ils peuvent être responsables de différents troubles gastro-intestinaux comme des diarrhées et des intoxications alimentaires (Qadri *et al.*, 2005).

De manière intéressante, le groupe traité à R2C2 pasteurisée n'a montré aucune diminution des coliformes fécaux. Il semblerait donc qu'une bactérie doit absolument être viable pour exercer ce type d'effet. Ceci confirme que les bactéries déplacent probablement les populations de coliformes par la production de substances antimicrobiennes ou par compétition, et qu'une immunomodulation suite à la reconnaissance de différentes composantes de bactéries mortes ne semble pas pouvoir moduler la flore intestinale.

### **3. Effet protecteur contre l'inflammation intestinale**

Le kéfir est une boisson fermentée traditionnellement consommée pour ses bienfaits dans les troubles digestifs. De plus, la capacité des différentes souches de *Lactobacillus kefiranofaciens* isolées des grains de kéfir à moduler la flore intestinale permettait de croire en un impact bénéfique de leur consommation dans l'inflammation intestinale. Des données préliminaires préalablement obtenues *in vitro* avec la MPM démontraient aussi un potentiel anti-inflammatoire de la bactérie R2C2. Le modèle animal d'inflammation intestinale induite par le DSS a donc été sélectionné pour tester le potentiel anti-inflammatoire des différentes bactéries de l'espèce *kefiranofaciens*, car il permet de suivre aisément le développement de la maladie en étudiant différents

paramètres représentatifs des événements se produisant dans la phase aiguë des maladies inflammatoires de l'intestin (Pizzaro *et al.*, 2003).

Il est important de vérifier les effets de chacune des souches à l'étude de manière individuelle (Marteau et Shanahan, 2003). En effet, toutes les souches peuvent avoir des effets distincts, même si elles sont de la même espèce et très rapprochées phylogénétiquement. Il est aussi important de mentionner qu'il n'y a pas de souche miracle pouvant régler tous les problèmes inflammatoires ou autoimmuns. Chaque effet attribué à un probiotique doit être démontré par des recherches scientifiques rigoureuses (Dunne *et al.*, 2001).

Dans le cadre du projet de recherche, quatre différentes souches de *Lactobacillus kefiranofaciens* ont été étudiées quant à leur potentiel probiotique. De manière intéressante, ces souches ont démontré des effets différents dans le modèle animal d'inflammation intestinale. Les souches R2C2 et BioSP ont semblé apporter une certaine protection aux animaux, en réduisant plusieurs symptômes majeurs causés par le DSS. Les souris traitées à R2C2 ont perdu moins de poids durant l'exposition au DSS et la récupération post-inflammatoire a été plus hâtive et rapide. Dans le cas de BioSP, seulement la récupération post-inflammatoire s'est avérée plus rapide. Par contre, les gavages aux bactéries INIX ou K2 se sont avérés sans effet protecteur au niveau de la perte de poids et de la récupération post-inflammatoire, les résultats étant très similaires à ceux du groupe contrôle PBS-DSS. Ces résultats démontrent clairement que même des souches très rapprochées phylogénétiquement peuvent avoir des effets très différents.

La souche très étudiée *Lactobacillus rhamnosus* GG a encore une fois été utilisée comme comparaison, dans le modèle d'inflammation intestinale. Les bienfaits de cette souche dans les maladies inflammatoires de l'intestin sont plutôt controversés, différentes études n'arrivant pas aux mêmes conclusions (Bousvaros *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2000; Prantera *et al.*, 2002). Cependant, il s'agit de la souche probiotique la plus connue, et une panoplie de bénéfices lui sont attribués, dont plusieurs au niveau de la santé intestinale (Gorbach, 2002). Les résultats obtenus dans le cadre du projet de recherche tendent à démontrer que *L. GG* ne peut pas réduire les symptômes de l'inflammation intestinale, et elle aggrave même légèrement la perte de poids. Ces résultats prouvent encore une fois que chaque souche doit être étudiée individuellement, et aussi que les effets peuvent

varier selon le modèle expérimental utilisé. Dans le modèle d'inflammation intestinale induite au DSS, les effets obtenus sont très différents selon la souche utilisée, alors que R2C2 et BioSP ont semblé plutôt protectrices, INIX et K2 ont été sans effet et *L. GG* a semblé aggraver la perte de poids.

Dans ce modèle d'inflammation intestinale, de nombreux autres paramètres ont confirmé les effets protecteurs observés au niveau de la perte de poids avec les différentes souches étudiées. En effet, durant l'exposition au DSS, les scores de consistance et de présence de sang dans les fèces sont moins élevés dans les groupes traités à R2C2 ou BioSP, et aucune différence n'est observée dans les groupes recevant INIX, K2 ou *L. GG*, comparativement au contrôle PBS-DSS. Le taux d'hématocrite des animaux après sept jours d'exposition au DSS a aussi démontré la protection apportée par R2C2 ou BioSP, et son absence chez les groupes traités à INIX, K2 ou *L. GG*. Dans ce modèle animal, le taux d'hématocrite diminue lors de l'exposition au DSS en raison des importantes pertes sanguines dans les fèces (Hibi *et al.*, 2002). La diminution du taux d'hématocrite dans les groupes traités à R2C2 et BioSP est moins importante que pour le contrôle PBS-DSS. Les résultats obtenus par ces deux paramètres signifient que les lésions au niveau du côlon sont moins répandues et que les pertes sanguines sont moins importantes, et par conséquent, qu'une certaine protection est apportée par R2C2 ou BioSP durant l'exposition au DSS. Un autre paramètre qui permet d'évaluer la gravité de l'atteinte inflammatoire est la longueur du côlon, qui a tendance à diminuer dans cette situation (Siegmond *et al.*, 2001.). Cette mesure a elle aussi confirmé l'effet protecteur des bactéries R2C2 et BioSP. Une diminution moins importante de la longueur du côlon a en effet été observée à la fin de la période de récupération post-inflammatoire dans ces deux groupes, comparativement au contrôle PBS-DSS. Les bactéries INIX, K2 et *L. GG* se sont encore avérées sans effet protecteur, étant incapables de prévenir cette réduction.

Parmi toutes les bactéries testées, la meilleure protection dans le modèle animal d'inflammation intestinale a été obtenue avec la souche R2C2. De plus, il s'agit de la souche la plus robuste sur le plan industriel et c'est pour cette raison qu'elle est utilisée dans le processus de fermentation du lactosérum en MPM. Les effets de cette souche dans l'inflammation intestinale ont donc été évalués plus en profondeur. Les recherches ont visé à déterminer l'importance de la viabilité de la bactérie pour apporter une protection

dans ce modèle, pour ainsi tenter de mieux comprendre les mécanismes d'action responsables de ces effets. Le degré de protection apporté par R2C2 a aussi été comparé à celui du 5-ASA, un médicament couramment utilisé dans les maladies inflammatoires de l'intestin (Harell et Hanauer, 2004).

Dans le modèle animal d'inflammation intestinale, les effets protecteurs obtenus par l'utilisation de R2C2 pasteurisée se sont avérés équivalents à ceux obtenus avec la bactérie donnée sous forme viable. En effet, le traitement avec R2C2 pasteurisée a lui aussi réduit la perte de poids durant l'exposition au DSS et a facilité la récupération post-inflammatoire. Les scores de consistance et de sang dans les fèces ont aussi été réduits. À la fin de l'expérience, les côlons étaient plus longs et l'inflammation moins importante, tel que démontré par les valeurs plus basses de MPO. La MPO est un constituant des neutrophiles et son dosage représente donc l'importance de l'infiltration de ces cellules immunitaires dans les lésions au niveau de l'intestin (Bradley *et al.*, 1982). Les valeurs de MPO sont équivalentes à celles du groupe contrôle PBS pour les groupes R2C2 viable et R2C2 pasteurisée, alors que l'activité de la MPO dans les côlons du groupe PBS-DSS est plus élevée. Ceci indique que le processus inflammatoire est pratiquement terminé dans les deux groupes traités à R2C2, alors qu'il est encore actif même après huit jours de récupération dans le groupe PBS-DSS. Dans le groupe contrôle PBS-DSS, les lésions sont donc probablement plus répandues que dans les groupes traités à R2C2 durant l'exposition au DSS, comme les scores de consistance et de sang dans les fèces l'ont indiqué, ce qui expliquerait la récupération plus tardive. Les traitements à R2C2 pourraient donc faciliter la récupération en raison d'une inflammation réduite durant la période d'exposition au DSS, ou simplement agir en aidant le processus de réparation des tissus lésés.

Les effets bénéfiques de la bactérie morte dans l'inflammation intestinale précisent un peu plus les mécanismes d'action par lesquels elle peut agir. Certaines études ont suggéré que la modulation de la flore intestinale, et particulièrement la diminution des populations de coliformes, pouvait réduire les symptômes de l'inflammation intestinale (O'Mahony *et al.*, 2001). Dans le cadre du projet de recherche, il a été démontré que R2C2 sous forme viable pouvait réduire les coliformes, mais que la bactérie morte n'avait aucun effet. Par contre, des bénéfices similaires sont observés dans l'inflammation

intestinale, que la bactérie soit viable ou non. Les mécanismes d'action classiques des probiotiques, comme la modulation de la flore intestinale, ne semblent donc pas d'une importance majeure pour l'effet anti-inflammatoire de R2C2. Une autre possibilité à considérer serait que la bactérie soit en mesure de dégrader ou d'assimiler le DSS lorsqu'elle transite dans le tube digestif. Par contre, le fait que la bactérie morte réduise elle aussi les symptômes diminue la crainte que l'effet protecteur soit dû à la simple assimilation du DSS par la bactérie, puisque sous forme viable, elle perdrait probablement cette capacité.

Le fait que R2C2 morte soit en mesure de réduire la gravité de l'inflammation intestinale ne signifie pas que toutes les bactéries ayant des effets anti-inflammatoires sous forme viable vont entraîner les mêmes bénéfices en étant mortes. Chaque bactérie a ses particularités et chaque effet qui lui est associé doit être démontré individuellement (Dunne *et al.*, 2001). Par exemple, Castagliuolo *et al.* ont démontré l'efficacité de *Lactobacillus crispatus* M247 viable pour réduire la sévérité de l'inflammation intestinale induite par le DSS, alors que cette même bactérie inactivée par la chaleur (température non-précisée) perdait son effet. Cependant, la température à laquelle la bactérie a été soumise pour son inactivation a probablement aussi de l'importance. Dans l'étude de Rachmilewitz *et al.* (2004), le mélange probiotique VSL#3 inactivé par traitement à 100°C perdait son efficacité alors que la protection était conservée lorsqu'il était inactivé par irradiation. Kamada *et al.* (2005) ont quant à eux démontré l'efficacité de la bactérie *E. coli* Nissle1917 inactivée par la chaleur, mais elle était soumise à une température de 60°C. Dans le cadre du présent projet de recherche, la bactérie a été pasteurisée à 75°C durant 30 minutes et l'effet protecteur a été conservé. Une inactivation à une chaleur trop intense pourrait donc dégrader les composantes bactériennes responsables de l'effet anti-inflammatoire.

Les études de Rachmilewitz *et al.* (2004) et de Kamada *et al.* (2005) sont parmi le peu d'études scientifiques ayant démontré l'efficacité de bactéries mortes dans l'inflammation intestinale. La plupart des experts en probiotiques affirme qu'une bactérie doit absolument être viable pour entraîner des bénéfices (Dunne *et al.*, 1999). C'est avec des études bien conçues allant au-delà des principes établis que de nouveaux mécanismes d'action pourront être élucidés et qu'une meilleure utilisation des probiotiques pourra être

faite. Pour la protection apportée par la bactérie R2C2 dans l'inflammation intestinale expérimentale, la viabilité ne semble clairement pas être un facteur déterminant. Les résultats du projet de recherche démontrent que la viabilité de R2C2 est un facteur important pour obtenir certains bénéfices, comme la modulation de la flore intestinale, mais que la bactérie morte semble être aussi efficace que la viable pour protéger partiellement de l'inflammation intestinale. D'autres études ont aussi démontré que certaines bactéries irradiées (de Léséleuc *et al.*, 2002) ou pasteurisées (He *et al.*, 2005) pouvaient conserver la capacité de moduler le système immunitaire, et qu'une solution de *E. coli* lysée pouvaient atténuer l'inflammation intestinale (Konrad, A. *et al.*, 2003). La définition du terme « probiotique » acceptée par la communauté scientifique devrait donc être celle de Varaala (2003), qui affirme que des composantes bactériennes peuvent être responsables des bénéfices observés. La définition ne devrait pas affirmer que la viabilité des microorganismes est un facteur déterminant pour qu'ils puissent entraîner des effets, mais qu'elle est nécessaire pour certains bénéfices spécifiques.

Rachmilewitz *et al.* (2004) ont démontré que les bactéries mortes peuvent être efficaces pour réduire les symptômes de l'inflammation intestinale, tout comme Kamada *et al.* (2005). Dans les deux cas, l'ADN purifié donné en tant que traitement s'est avéré apporter une protection contre l'inflammation intestinale. L'étude de Rachmilewitz *et al.* (2004) suggère que l'effet protecteur passe possiblement via la reconnaissance des motifs CpG de l'ADN bactérien par le TLR9. Cependant, l'activation du TLR9 mène normalement à la production de cytokines pro-inflammatoires de la voie T<sub>H</sub>1. Il a d'ailleurs déjà été démontré que les motifs CpG de l'ADN bactérien pouvaient aggraver les symptômes de l'inflammation intestinale lorsque donnés durant l'inflammation (Obermeier *et al.*, 2002). Par contre, ce même groupe de recherche a démontré que lorsque les motifs CpG sont donnés aux animaux en prétraitement, ils peuvent réduire les symptômes de l'inflammation intestinale (Obermeier *et al.*, 2003). Pour expliquer les bienfaits entraînés par les motifs CpG, il semblerait que l'activation du TLR9 pourrait aussi mener à la sécrétion d'IFN $\alpha$  et conséquemment à une activité accrue des cellules T régulatrices, de même qu'à la production de cytokines régulatrices comme l'IL-10 et le TGF $\beta$  (Watson et McKay, 2005).

Dans le cas de R2C2, comme la bactérie morte est efficace, l'effet est probablement entraîné par des composantes bactériennes. Il est possible que l'ADN de R2C2 soit responsable de l'effet anti-inflammatoire observé, tout comme dans les études de Rachmilewitz *et al.* (2004) et de Kamada *et al.* (2005). L'effet pourrait alors être dû à l'atténuation du processus inflammatoire par l'activité accrue des cellules T régulatrices (Watson et McKay, 2005). Cependant, d'autres composantes peuvent aussi être responsables des effets observés. Il est possible que des éléments de la paroi ou des protéines de R2C2 demeurent intacts lors de la pasteurisation et soient reconnus au niveau de l'intestin pour ainsi déclencher certaines cascades immunitaires menant à la production de marqueurs anti-inflammatoires. Les symptômes pourraient aussi être réduits par la régulation de la balance  $T_H1/T_H2$  (Cong *et al.*, 2003). En effet, la production de cytokines anti-inflammatoires de la voie  $T_H2$  pourrait être facilitée et la production de cytokines pro-inflammatoires de la voie  $T_H1$ , comme le  $TNF\alpha$ , l' $IFN\gamma$ , l'IL-6 et l'IL-12, pourrait être inhibée (O'Mahony *et al.*, 2001). Une étude de l'expression de ces différentes cytokines au niveau intestinal pourrait permettre de mieux comprendre les effets immunomodulateurs de R2C2.

L'effet protecteur obtenu avec la bactérie R2C2 dans le modèle d'inflammation intestinale a été comparé à celui du 5-ASA, un médicament anti-inflammatoire couramment utilisé dans les maladies inflammatoires de l'intestin (Harell et Hanauer, 2004). Le 5-ASA a démontré la capacité de légèrement réduire la perte de poids durant l'exposition au DSS et de faciliter la récupération post-inflammatoire. De plus, les scores de consistance et de sang dans les fèces ont été réduits durant l'exposition au DSS, les côlons étaient plus longs que ceux du groupe PBS-DSS et les valeurs de MPO étaient revenues au même niveau que pour le groupe contrôle PBS. Les effets anti-inflammatoires connus du 5-ASA ont donc été confirmés dans le modèle d'inflammation intestinale induite par le DSS (Rumi *et al.*, 2000). Cet effet protecteur conféré par le 5-ASA ne s'est cependant pas avéré plus important que celui de la bactérie R2C2. En effet, pour la majorité des paramètres suivis, il n'y avait pas de différence significative entre les groupes traités à R2C2 viable ou pasteurisée et le groupe recevant du 5-ASA. Ces résultats démontrent que, dans un modèle animal expérimental, une simple bactérie peut

s'avérer aussi efficace qu'un médicament pour réduire les principaux symptômes de l'inflammation intestinale.

Finalement, les gavages avec différentes souches de bactéries ont donné des résultats très différents dans le modèle animal d'inflammation intestinale. Parmi les quatre souches individuelles de *Lactobacillus kefiranofaciens* testées, R2C2 et BioSP ont montré des bénéfices alors qu'INIX et K2 étaient sans effet. La souche *Lactobacillus rhamnosus* GG utilisée comme contrôle en raison des nombreuses démonstrations de ses bénéfices sur la santé intestinale (Gorbach, 2002) s'est avérée avoir des effets néfastes, aggravant légèrement la perte de poids. L'effet protecteur apporté par les souches R2C2 et BioSP est supporté par de nombreux paramètres, tous cohérents les uns par rapport aux autres. De plus, la démonstration de l'efficacité de R2C2 pasteurisée pour réduire les symptômes de l'inflammation intestinale permet de faire partiellement la lumière sur le mécanisme d'action responsable de ses effets. En fait, les bénéfices observés sont potentiellement dus à la reconnaissance de composantes bactériennes par des récepteurs spécifiques, déclenchant ainsi des cascades immunitaires responsables de l'effet anti-inflammatoire. Selon les rares études sur l'efficacité des bactéries mortes pour réduire les symptômes de l'inflammation intestinale, il pourrait s'agir de la reconnaissance des motifs CpG de l'ADN bactérien par le TLR9. De plus, l'effet protecteur obtenu avec R2C2 a été comparé à celui du 5-ASA, et les deux traitements se sont avérés équivalents.

#### **4. Lipidémie**

Plusieurs bactéries lactiques ont la capacité de réguler le métabolisme des lipides. La consommation de la bactérie *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 a permis de réduire le cholestérol et les triglycérides chez les souris soumises à une diète riche en gras (Taranto *et al.*, 2000). *Lactobacillus plantarum* 299v a quant à elle démontré la capacité de réduire le taux du LDL-cholestérol et la pression systolique chez des patients légèrement hyperlipidémiques (Bukowska *et al.*, 1997; Naruszewicz *et al.*, 2002). Les effets des bactéries de l'espèce *kefiranofaciens* sur le métabolisme des lipides n'ont jamais été évalués. Cependant, les effets du kéfiran, produit par les souches de *kefiranofaciens*, ont été étudiés. Ce polysaccharide a démontré la capacité de réduire la pression systolique de

même que le cholestérol total (Maeda *et al.*, 2004). De plus, la consommation de différents produits laitiers fermentés, dont certains contenant des protéines de lactosérum (Kawase *et al.*, 2000), semble pouvoir entraîner des bénéfices sur les taux de lipides sanguins, même si les résultats ne sont pas toujours concluants dans le cas du kéfir (St-Onge *et al.*, 2002). Toutes ces données permettaient de croire en un certain potentiel des bactéries de l'espèce *kefiranofaciens*, ou à tout le moins de leur produit de fermentation du lactosérum, la MPM, pour réguler le métabolisme des lipides.

Le modèle d'hyperlipidémie induite au poloxamer 407 a été sélectionné pour évaluer ces effets (Johnston, 2004). La niacine a été utilisée comme contrôle positif en raison de ses bénéfices connus sur la lipidémie et démontrés dans le modèle du poloxamer (Nash *et al.*, 1996).

La MPM a montré la capacité de réduire les niveaux de triglycérides sanguins après sept jours de gavage, et de contrôler l'induction des niveaux de triglycérides, tel que démontré par les données recueillies 72 heures après l'injection du poloxamer. Ces résultats étaient attendus en raison des nombreux constituants de la MPM ayant des effets bénéfiques documentés sur les lipides sanguins, dont les bactéries lactiques (de Roos et Katan, 2000). En effet, en plus des bactéries lactiques, des bénéfices par rapport au contrôle de la lipidémie sont attribués aux protéines de lactosérum (Walzem *et al.*, 2002), aux peptides pouvant être générés durant le processus de fermentation (Gobbetti *et al.*, 2000) ainsi qu'au calcium (Zemel, 2002).

Dans le modèle animal d'hyperlipidémie induite au poloxamer, des groupes ont aussi reçu la bactérie R2C2 seule afin d'investiguer l'importance de son impact quant aux effets obtenus avec la MPM. La bactérie INIX a aussi été donnée comme traitement aux animaux en raison de sa capacité à surproduire l'exopolysaccharide kéfiran. Chacune des bactéries testées s'est avérée avoir peu d'impact pour réguler le métabolisme des lipides. Les résultats ont en effet démontré que R2C2 seulement avait un certain impact sur les niveaux de triglycérides, après sept jours de gavage. Cependant, suite à l'induction de l'hyperlipidémie par le poloxamer, R2C2 a perdu la capacité de réduire les triglycérides sanguins, les niveaux étant équivalents à ceux du groupe contrôle PBS, 24 et 72 heures après l'injection. Les gavages avec la bactérie INIX, malgré sa grande production de kéfiran, se sont avérés sans effet régulateur sur les taux de triglycérides. Les quantités de

kéfiran dans les suspensions bactériennes données par gavage aux animaux sont possiblement trop faibles pour avoir un impact sur les lipides sanguins. Il est aussi possible que le modèle animal d'induction d'hyperlipidémie par le poloxamer soit trop agressif et que les bénéfices potentiels de la consommation des bactéries R2C2 et INIX ne soient pas identifiables dans ces conditions. L'effet régulateur observé chez les animaux suite à la consommation de la MPM ne semble donc pas principalement médié par les nombreuses bactéries qu'elle contient, mais plutôt par une autre composante ou par une synergie entre les différents constituants.

Dans ces expériences, d'autres paramètres importants ont été suivis, mais sans donner de résultats intéressants. Les valeurs de cholestérol total et de HDL-cholestérol ont été recueillies après 7 jours de gavage, puis 24 et 72 heures après l'induction de l'hyperlipidémie. Les niveaux de ces deux paramètres se sont avérés équivalents dans chacun des groupes expérimentaux pour tous les temps.

L'effet bénéfique majeur obtenu à l'aide de ce modèle est donc la modulation des niveaux de triglycérides sanguins par la MPM. Tous les traitements se sont avérés sans effet sur le cholestérol total et sur la fraction HDL et les gavages avec les bactéries R2C2 et INIX n'ont eu que peu d'impact sur les triglycérides. Il faut cependant faire attention puisque la corrélation entre ce qui est observé dans le modèle animal d'hyperlipidémie induite au poloxamer et chez l'humain n'est pas toujours parfaite. En effet, l'efficacité de différentes statines, des médicaments utilisés pour les patients souffrant d'hypercholestérolémie, a été démontrée dans le modèle du poloxamer, mais seuls les triglycérides étaient diminués chez les animaux, alors que c'est le cholestérol qui est réduit chez l'humain (Johnston, 2004). Dans l'éventualité d'une étude clinique sur les effets de la MPM chez des patients hyperlipidémiques, il faudrait porter une grande attention autant envers les niveaux de triglycérides que de cholestérol.

## **5. Perspectives**

Afin de gagner en crédibilité et de répandre l'usage des bactéries probiotiques en tant qu'agents thérapeutiques adjoints pour différents problèmes de santé, des comités d'experts se sont rencontrés et ont établi des critères de sélection précis à respecter pour obtenir le qualificatif « probiotique » (Dunne *et al.*, 1999). Cependant, les connaissances

dans le monde des probiotiques progressent, et certains critères devraient être révisés. Au cours du projet de recherche, il a été démontré que la viabilité de la bactérie est importante pour l'obtention de certains effets, mais qu'elle est accessoire pour d'autres bénéfiques. La communauté scientifique devrait faire preuve d'ouverture face à de tels résultats, ce qui permettrait de continuer à avancer dans la compréhension des mécanismes d'action des bactéries probiotiques et c'est ainsi que leur utilisation pourrait se répandre et que de la crédibilité se gagnerait aux yeux des cliniciens.

Le projet de recherche a aussi démontré qu'une bactérie peut avoir des propriétés intéressantes malgré sa faible capacité à coloniser l'intestin et à y persister. Les expériences réalisées à l'aide du modèle animal d'inflammation intestinale ont permis de mettre en évidence les propriétés anti-inflammatoires des bactéries R2C2 et BioSP. L'efficacité de R2C2 pasteurisée suggère de nouveaux mécanismes d'action pour les bactéries probiotiques dans l'inflammation intestinale. C'est précisément cet aspect qu'il faudrait approfondir. Pour la suite du projet, il faudrait d'abord purifier l'ADN bactérien de R2C2 et tester l'efficacité de cette composante dans l'inflammation intestinale expérimentale. Selon la littérature, l'ADN bactérien pourrait s'avérer efficace via la reconnaissance par le TLR9 (Rachmilewitz *et al.*, 2004; Kamada *et al.*, 2005). Il serait ensuite intéressant d'étudier l'expression de différentes cytokines produites par l'activation des TLRs et de clarifier leurs rôles dans la protection apportée par R2C2. Si l'ADN bactérien ne s'avérait pas efficace, il faudrait alors tenter d'identifier la composante bactérienne responsable de l'effet observé. Pour compléter les résultats déjà obtenus, il serait aussi intéressant de doser l'activité de la MPO dans les côlons au sommet de l'inflammation, à la septième journée d'exposition au DSS. Ceci permettrait de confirmer par une mesure précise que le processus inflammatoire est réellement diminué par un traitement à R2C2 par rapport à un groupe contrôle PBS, et que ce n'est pas simplement la récupération qui est facilitée. Dans un autre ordre d'idée, de nouveaux groupes expérimentaux pourraient être ajoutés aux expériences futures afin de tenter de répondre à différentes questions. La bactérie R2C2 pourrait être combinée avec d'autres bactéries aux bienfaits connus sur l'inflammation ou même avec le 5-ASA, afin d'évaluer si une synergie est possible, ce qui donnerait un effet protecteur encore plus important. Il serait aussi intéressant d'utiliser la bactérie R2C2 en mode thérapeutique, donc en

commençant les traitements au même moment que l'exposition au DSS, afin de vérifier si la bactérie conserverait son effet protecteur. Ceci pourrait permettre de clarifier la controverse sur les effets positifs (Rachmilewitz *et al.*, 2004) ou négatifs (Obermeier *et al.*, 2002) des motifs CpG dans l'inflammation intestinale.

Pour l'aspect régulation du métabolisme des lipides, l'objectif suivant devrait être de tester de manière individuelle les différentes composantes potentiellement responsables des effets observés. Comme la bactérie R2C2 seule a peu d'effet, il faudrait entre autres évaluer les effets du calcium et de certains peptides isolés. La MPM et la bactérie R2C2 demeurent tout de même des aliments ayant un grand potentiel pour aider à contrôler les symptômes du syndrome métabolique humain, caractérisé par un surplus de poids, des taux de glucose élevés, des lipides sanguins élevés et de l'hypertension (Mardarowicz *et al.*, 2003). Son impact sur les lipides sanguins serait sans doute bénéfique pour de tels patients. Il serait aussi intéressant d'analyser les effets de la MPM et des bactéries sur les autres symptômes de ce syndrome.

Le projet de recherche réalisé a permis d'établir que certaines des bactéries de l'espèce *kefiranofaciens* testées ont des propriétés probiotiques intéressantes, de part leur capacité à moduler la flore ou à diminuer les symptômes de l'inflammation intestinale. De nombreuses questions demeurent tout de même sans réponse quant au potentiel probiotique des souches à l'étude. Il serait intéressant de tester les effets des souches dans un autre modèle animal d'inflammation, mais qui se situe à un site distal de l'intestin. Un modèle de dermatite atopique de contact pourrait être indiqué, car la réaction inflammatoire se produit au niveau de l'oreille. Ceci permettrait d'étudier l'impact systémique des bactéries sur un problème inflammatoire. Les mécanismes d'action des bactéries pourraient aussi être étudiés plus en profondeur par l'utilisation d'un tel modèle. De nombreuses autres applications potentielles pourraient aussi être évaluées. Il a récemment été démontré qu'un processus inflammatoire léger était impliqué dans les troubles rencontrés dans le syndrome du côlon irritable (O'Mahony *et al.*, 2005). En raison des bénéfices démontrés de R2C2 et BioSP dans l'inflammation intestinale, il serait intéressant d'étudier leurs effets chez des patients souffrant de ce syndrome. Des modèles animaux de diarrhées dues à un déséquilibre de la flore intestinale par des coliformes pathogènes pourraient être utilisés pour vérifier si la capacité des souches à

réduire les coliformes fécaux est maintenue en situation pathologique. Finalement, les souches de l'espèce *kefiranofaciens* étudiées ont démontré des propriétés probiotiques intéressantes, mais beaucoup de travail reste à faire afin d'évaluer leur plein potentiel.

## **Remerciements**

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur, François Shareck, pour ses conseils et sa vision de la recherche qu'il a su m'inculquer au cours de mon passage à l'Institut Armand-Frappier. La compagnie Technologie Biolactis m'a été d'un grand support avant et pendant ma maîtrise. L'expérience a été très enrichissante pour moi. Je tiens à remercier Pierre Lemieux, mon superviseur chez Biolactis, ainsi que Philippe Goyette, ancien directeur du laboratoire, qui m'ont aidé à bâtir un très beau projet. Tout le groupe de recherche a aussi été d'un support fort appréciable.

Des remerciements spéciaux vont à Josée Beaulieu et Marie-Hélène Mondou, pour leur support et leur présence, sans quoi j'aurais été pas mal seul au monde...entre quatre murs...dans le sous-sol...sans fenêtre... Josée a aussi été d'une grande générosité pour l'apprentissage de plusieurs techniques pour les expériences animales. Je crois avoir été un bon élève...

Bien sûr, Maude, ma famille...même ceux qui ne sont plus là... Vous me donnez la force de continuer...

## **Annexes**

## Annexe I : Brevet

Simard, É., L.P. Précourt et P. Lemieux. 11 février 2005. Use of *Lactobacillus kefiranofaciens* as a probiotic, US Patent Application No. 60/651,657.

Contribution des inventeurs :

La rédaction de ce brevet a été assurée en grande partie par L.P. Précourt, sous la supervision de É. Simard et P. Lemieux. Les aspects administratifs et légaux reliés au dépôt d'un brevet ont été couverts par P. Lemieux. Les travaux présentés dans ce document ont principalement été réalisés par É. Simard et L.P. Précourt. É. Simard a été responsable de la partie isolation, identification et caractérisation des souches, incluant les profils de fermentation et l'identification par séquençage de l'ADN 16S. La plupart des expériences visant à identifier des propriétés probiotiques aux souches de *kefiranofaciens* ont été faites par L.P. Précourt, incluant les essais d'adhésion/colonisation *in vivo*, la modulation de la flore intestinale, l'atténuation de l'inflammation intestinale, les effets sur l'hyperlipidémie et certains effets d'immunomodulation.

## **Annexe II : Publication en préparation**

Précourt, L.P., J. Beaulieu, P. Goyette, P. Lemieux, F. Shareck et C. Dupont. 2005. Regulatory function a novel fermented whey product in hyperlipidemia and hypertension.

Contribution des auteurs :

Cet article porte principalement sur les effets de la MPM pour réguler le métabolisme des lipides dans le modèle d'hyperlipidémie induite au poloxamer et pour contrôler la pression artérielle de rats hypertendus. Les manipulations pour le modèle du poloxamer ont été faites par Louis-Philippe Précourt et Kathy Hince, technicienne en santé animale. Un bon coup de main a aussi été donné par Josée Beaulieu. La compilation et l'interprétation des résultats ainsi que la rédaction de cette partie ont été faites en totalité par L.P. Précourt. Les expériences sur l'hypertension ont été planifiées par Claude Dupont et réalisées par Liliane Geerts, technicienne en santé animale. La compilation et la rédaction de cette partie ont été faites par C. Dupont. La finalisation de cet article sera assurée par L.P. Précourt.

### Annexe III : Liste des séances d'affiches

Mondou, M.H., N. Beaudet, P. Goyette, **L.P. Précourt**, C. Dupont et \*P. Lemieux. 21-22 février 2004. Nutrilactis : a Multifunctional Bioactive Ingredient Having Lactoceutical Properties, Natural Health Product Research Conference, Montréal, Québec, Canada.

\***Précourt, L.P.**, P. Goyette, J. Beaulieu, É. Simard, C. Dupont, P. Lemieux et F. Shareck. 28-29 octobre 2004, Lactobacillus « Probiolactis » : a New Strain with a Probiotic Potential on Gastrointestinal Health. Symposium international de Montréal, La santé par les probiotiques : Applications dans ce troisième millénaire, Montréal, Québec, Canada.

\***Précourt, L.P.**, J. Beaulieu, P. Goyette, É. Simard, C. Dupont, P. Lemieux et F. Shareck. 10-14 septembre 2005, Protective Role of a Lactobacillus kefiranofaciens Strain in an Inflammatory Bowel Disease Animal Model. World Congress of Gastroenterology, Montréal, Québec, Canada.

\*Simard, É., J. Beaulieu, **L.P. Précourt**, C. Dupont, F. Shareck et P. Lemieux. 11-14 septembre 2005. Nutritional Biochemistry and Functional Properties of a Novel Fermented Whey-Based Product Described as a Malleable Protein Matrix (Wheygurt™). International Whey Conference, Chicago, Illinois, États-Unis.

\***Précourt, L.P.**, C. Dupont, J. Beaulieu, P. Goyette, F. Shareck et P. Lemieux. 3-5 novembre 2005, Rôle Protecteur d'une Matrice Protéique Malléable (MPM), un Nouveau Produit de Lactosérum Fermenté, dans la Modulation de l'Hyperlipidémie et de l'Hypertension. Congrès Armand-Frappier, St-Alexis-des-Monts, Québec, Canada.

### Bibliographie

ABREU, M.T., M. Fukata et M. Arditi. 2005. TLR Signaling in the Gut in Health and Disease, The Journal of Immunology, vol. 174, no. 8, p. 4453-4460.

ALANDER, M., R. Satokari, R. Korpela, M. Saxelin, T. Vilpponen-Salmela, T. Mattila-Sandholm et A. Von Wright. 1999. Persistence of Colonization of Human Colonic Mucosa by a Probiotic Strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after Oral Consumption, Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, no. 1, p. 351-354.

AGERHOLM-LARSEN, L., M.L. Bell, G.K. Grunwald et A. Astrup. 2000. The Effect of a Probiotic Milk on Plasma Cholesterol : a Meta-Analysis of Short-Term Intervention Studies, European Journal of Clinical Nutrition, vol. 54, no. 11, p. 856-860.

ARAKI, Y., A. Andoh, J. Takizawa, W. Takizawa et Y. Fujiyama. 2004. *Clostridium butyricum*, a Probiotic Derivative, Suppresses Dextran Sulfate Sodium-Induced Experimental Colitis in Rats, International Journal of Molecular Medecine, vol. 13, no. 4, p. 577-580.

BENNO, Y. et T. Mitsuoka. 1992. Impact of *Bifidobacterium longum* on Human Fecal Microflora, Microbiology and Immunology, vol. 36, no. 7, p. 683-94.

BIANCONE, L., I. Monteleone, G. Del Vecchio Blanco, P. Vavassori et F. Pallone. 2002. Resident Bacterial Flora and Immune System, Digestive and Liver Disease, vol. 34, suppl. 2, p. S37-S43.

BLACK, F.T. 1989. Prophylactic Efficacy of Lactobacilli on Traveler's Diarrhea, Traveler Medecine, vol. 7, p. 333-335.

BORRUEL, N., F. Casellas, M. Antolin, M. Llopis, M. Carol, E. Espiin, J. Naval, F. Guarner et J.R. Malagelada. 2003. Effects of Nonpathogenic Bacteria on Cytokine Secretion by Human Intestinal Mucosa, The American Journal of Gastroenterology, vol. 98, no. 4, p. 865-870.

BOUSVAROS, A., S. Guandalini, R.N. Baldassano, C. Botelho, J. Evans, G.D. Ferry, B. Goldin, L. Hartigan, S. Kugathan, J. Levy, K.F. Murray, M. Olivia-Hemker, J.R. Rosh, V. Tolia, A. Zholudev, J.A. Vanderhoof et P.L. Hibberd. 2005. A Randomized, Double-Blind Trial of *Lactobacillus* GG Versus Placebo in Addition to Standard Maintenance Therapy for Children with Crohn's Disease, Inflammatory Bowel Disease, vol. 11, no. 9, p. 833-839.

BRADLEY, P.P., D.A. Priebat, R.D. Christensen and G. Rothstein. 1982. Measurement of Cutaneous Inflammation : Estimation of Neutrophil Content with an Enzyme Marker. Journal of Investigative Dermatology, vol. 78, no. 3, p. 206-209.

BUKOWSKA, H., J. Pieczul-Mroz, M. Jastrzebska, K. Chelstowski et M. Naruszewicz. 1997. Decrease in Fibrinogen and LDL-Cholesterol Levels upon Supplementation of Diet with *Lactobacillus plantarum* in Subjects with Moderately Elevated Cholesterol, Atherosclerosis, vol. 137, p. 437-438.

CASTAGLIUOLO, I., F. Galeazzi, S. Ferrari, M. Elli, P. Brun, A. Cavaggioni, D. Tormen, G.C. Sturniolo, L. Morelli et G. Palu. 2005. Beneficial Effect of Auto-Aggregating *Lactobacillus crispatus* on Experimentally Induced Colitis in Mice, FEMS Immunology and Medical Microbiology, vol. 43, no. 2, p. 197-204.

CHEN, R.M., J.J. Wu, S.C. Lee, A.H. Huang et H.M. Wu. 1999. Increase of Intestinal *Bifidobacterium* and Suppression of Coliform Bacteria with Short-Term Yogurt Ingestion, Journal of Dairy Science, vol. 82, p. 2308-2314.

COLLINS, M.D. et G.R. Gibson. 1999. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics : Approaches for Modulating the Microbial Ecology of the Gut, American Journal of Clinical Nutrition, vol. 69 (suppl.), p. 1052S-1057S.

CONG, Y., A. Konrad, N. Iqbal et C.O. Elson. 2003. Probiotics and Immune Regulation of Inflammatory Bowel Disease, Current Drug Targets, vol. 2, p. 145-154.

COPPA, G.V., S. Bruni, L. Morelli, S. Soldi et O. Gabrielli. 2004. The First Prebiotics in Humans : Human Milk Oligosaccharides, Journal of Clinical Gastroenterology, vol. 38, no. 6 (Suppl.), p. S80-S83.

CROHN'S AND COLITIS FOUNDATION OF AMERICA. 2005. Introduction to Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. Crohn's and Colitis Foundation of America.

CUI, H.H., C.L. Chen, J.D. Wang, Y.J. Yang, Y. Cun, J.B. Wu, Y.H. Liu, H.L. Dan, Y.T. Jian et X.Q. Chen. 2004. Effects of Probiotic on Intestinal Mucosa of Patients with Ulcerative Colitis, World Journal of Gastroenterology, vol. 10, no. 10, p. 1521-1525.

DANESE, S., M. Sans et C. Fiocchi. 2004. Inflammatory Bowel Disease : the Role of Environmental Factors, Autoimmunity Reviews, vol. 3, p. 394-400.

DE LÉSÉLEUC, L., S. Chabot, D. Cloutier, D. Roy, M. Lacroix et D. Oth. 2002. Quantitative Aspects in Pro-Inflammatory Cytokines and Gamma Interferon (IFN- $\gamma$ ) Production Capacities among Various Lactic Acid Bacteria (LAB), Milchwissenschaft, vol. 57, no. 6, p. 316-319.

DE ROOS, N.M. et M.B. Katan. 2000. Effects of Probiotic Bacteria on Diarrhea, Lipid Metabolism, and Carcinogenesis : a Review of Papers Published Between 1988 and 1998, American Journal of Clinical Nutrition, vol. 71, no. 2, p. 405-411.

DI GIACINTO, C., M. Marinaro, M. Sanchez, W. Strober et M. Boirivant. 2005. Probiotics Ameliorate Recurrent Th1-Mediated Murine Colitis by Inducing IL-10 and IL-10-Dependent TGF- $\beta$ -Bearing Regulatory Cells, The Journal of Immunology, vol. 174, no. 6, p. 3237-3246.

DUNNE, C., L. Murphy, S. Lynn, L. O'Mahony, S. O'Halloran, M. Feeney, D. Morissey, G. Thornton, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, E.M. Quigley, G.C. O'Sullivan, F. Shanahan et J.K. Collins. 1999. Probiotics: from Myth to Reality. Demonstration of Functionality in Animal Models of Disease and in Human Clinical Trials. Antonie van Leeuwenhoek, vol. 76, no. 1-4, p. 279-292.

DUNNE, C., L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G.C. O'Sullivan, F. Shanahan et J.K. Collins. 2001. *In vitro* Selection Criteria for Probiotic Bacteria of Human Origin : Correlation with *in vivo* Findings, American Journal of Clinical Nutrition, vol. 73 (suppl.), p. 386S-392S.

EDWARDS, C.A. et A.M. Parrett. 2002. Intestinal Flora During the First Months of Life: New Perspectives, British Journal of Nutrition, vol. 78, suppl. 1, p. S11-S18.

FONDATION CANADIENNE DES MALADIES INFLAMMATOIRES DE L'INTESTIN. 2001. Toute la vérité sur les maladies inflammatoires de l'intestin. Fondation Canadienne des Maladies Inflammatoires de l'Intestin.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. and World Health Organization. 2001. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization.

FULLER, R. 1991. Probiotics in Human Medecine, Gut, vol. 32, p. 439-442.

FURNESS, J.B., W.A. Kunze et N. Clerc. 1999. Nutrient Tasting and Signaling Mechanisms in the Gut II. The Intestine as a Sensory Organ : Neural, Endocrine, and Immune Responses, American Journal of Physiology, vol. 277, no. 5, part. 1, p. G922-G928.

FURRIE, E., S. Macfarlane, A. Kennedy, J.H. Cummings, S.V. Walsh, D.A. O'neil et G.T. Macfarlane. 2005. Synbiotic Therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) Initiates Resolution of Inflammation in Patients with Active Ulcerative Colitis : a Randomised Controlled Pilot Trial, Gut, vol. 54, no. 2, p. 242-249.

GIBSON, G.R. 2002. Effects of Prebiotics on Human Gut Health. Dans HART, A., A.J. Stagg, H. Graeffner, H. Glise, P. Falk et M.A. Kamm. Gut Ecology, Londres, éd. Martin Dunitz, p.81-88.

GIONCHETTI, P. 2002. Inflammatory Bowel Disease and Probiotics. Dans HART, A., A.J. Stagg, H. Graeffner, H. Glise, P. Falk et M.A. Kamm. Gut Ecology, Londres, éd. Martin Dunitz, p.147-155.

GOBBETTI, M., P. Ferranti, E. Smacchi, F. Goffredi et F. Addeo. 2000. Production of Angiotensin-I-Converting-Enzyme-Inhibitory Peptides in Fermented Milks Started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4, Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, no. 9, p. 3898-904.

GORBACH, S.L. 2002. Probiotics in the Third Millenium, Digestive and Liver Diseases, vol. 34, suppl. 2, p. S2-S7.

GOSSELINK, M.P., W.R. Schouten, L.M. van Lieshout, W.C. Hop, J.D. Laman et J.G. Ruseler-van Embden. 2004. Delay of the First Onset of Pouchitis by Oral Intake of the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG, Diseases of the Colon & Rectum, vol. 47, no. 6, p. 876-884.

GUPTA, P., H. Andrew, B.S. Kirschner et S. Guandalini. 2000. Is *Lactobacillus* GG Helpful in Children with Crohn's Disease? Results of a Preliminary, Open-Label Study, Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, vol. 31, no. 4, p. 453-457.

HARELL, L.E. et S.B. Hanauer. 2004. Mesalamine Derivatives in the Treatment of Crohn's Disease, Gastroenterology Clinics of North America, vol. 33, no. 2, p. 303-317.

HE, F., H. Morita, A. Kubota, A.C. Ouwehand, M. Hosoda, M. Hiramatsu et J. Kurisaki. 2005. Effect of Orally Administered Non-Viable *Lactobacillus* Cells on Murine Humoral Immune Response, Microbiology and Immunology, vol. 49, no. 11, p. 993-997.

HIBI, T., H. Ogata et A. Sakuraba. 2002. Animal Models of Inflammatory Bowel Disease, Journal of Gastroenterology, vol. 37, no. 6, p. 409-417.

ISHIBASHI, N. et S. Yamazaki. 2001. Probiotics and Safety, American Journal of Clinical Nutrition, vol. 73 (suppl.), p. 465S-470S.

ISOLAURI, E., S. Salminen et A.C. Ouwehand. 2004. Probiotics, Best Practice and Research Clinical Gastroenterology, vol. 18, no. 2, p. 299-313.

ISOLAURI, E. 2004. Dietary Modification of Atopic Disease : Use of Probiotics in the Prevention of Atopic Dermatitis, Current Allergy and Asthma Reports, vol. 4, no. 4, p. 270-275.

JACOBSEN, C.N., V. Rosenfeldt Nielsen, A.E. Hayford, P.L. Moller, K.F. Michaelsen, A. Paerregaard, B. Sandstrom, M. Tvede et M. Jakobsen. 1999. Screening of Probiotic Activities of forty-seven Strains of *Lactobacillus* spp. by *In Vitro* Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of five Selected Strains in Humans. Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, no. 11, p. 4949-4956.

JOHNSTON, T.P. 2004. The P-407-Induced Murine Model of Dose-Controlled Hyperlipidemia and Atherosclerosis : a Review of Findings to Date, Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 43, no. 4, p. 595-606.

KALLIOMAKI, M. et E. Isolauri. 2002. Pandemic of Atopic Disease-A Lack of Microbial Exposure in Early Infancy ?, Current Drug Targets : Infectious Disorders, vol. 2, no. 3, p. 193-199.

KAMADA, N., N. Inoue, T. Hisamatsu, S. Okamoto, K. Matsuoka, T. Sato, H. Chinen, K.S. Hong, T. Yamada, Y. Suzuki, N. Watanabe, K. Tsuchimoto et T. Hibi. 2005. Nonpathogenic *Escherichia coli* Nissle 1917 Prevents Murine Acute and Chronic Colitis, Inflammatory Bowel Disease, vol. 11, no. 5, p. 455-463.

KATO, K., S. Mizuno, Y. Umesaki, Y. Ishii, M. Sugitani, A. Imaoka, M. Otsuoka, O. Hasunuma, R. Kurihara, A. Iwasaki et Y. Arakawa. 2004. Randomized Placebo-Controlled Trial Assessing the Effect of Bifidobacteria-Fermented Milk on Active Ulcerative Colitis, Alimentary Pharmacology and Therapeutics, vol. 20, no. 10, p. 1133-1141.

KAWASE, M., H. Hashimoto, M. Hosoda, H. Morita et A. Hosono. 2000. Effect of Administration of Fermented Milk Containing Whey Protein Concentrate to Rats and Healthy Men on Serum Lipids and Blood Pressure, Journal of Dairy Science, vol. 83, p. 255-263.

KONRAD, A., M. Mahler, B. Flogerzi, M.B. Kalousek, J. Lange, L. Varga et F. Seibold. 2003. Amelioration of Murine Colitis by Feeding a Solution of Lysed *Escherichia coli*, Scandinavian Journal of Gastroenterology, vol. 38, no. 2, p. 172-179.

KRUIS, W., P. Eric, J. Pokrotnieks, M. Lukas, B. Fixa, M. Kascak, M.A. Kamm, J. Weismueller, C. Beglinger, M. Stolte, C. Wolff et J. Schulze. 2004. Maintaining Remission of Ulcerative Colitis with the Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Is as Effective as with Standard Mesalazine, Gut, vol. 53, no. 11, p. 1617-1623.

LILLY, D.M. et R.H. Stilwell. 1965. Probiotics : Growth Promoting Factors Produced by Microorganisms. Science, vol. 47, p. 747-748.

LOVEGROVE, J.A. et K.G. Jackson. 2004. Functional Food, Blood Lipids and Cardiovascular Disease. Part 1-Probiotics, AgroFOOD Industry High-Tech, January/February, p. 50-52.

MAEDA, H., X. Zhu, S. Suzuki, K. Suzuki et S. Kitamura. 2004. Structural Characterization and Biological Activities of an Exopolysaccharide Kefiran Produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 53, p. 5533-5538.

MARDAROWICZ, G., J. Lopatynski et T. Nicer. 2003. Metabolic Syndrome, Annals University Mariae Curie Sklodowska, vol. 58, no. 1, p. 426-431.

MARTEAU, P., M. de Vrese, C.J. Cellier et J. Schrezenmeir. 2001. Protection from Gastrointestinal Diseases with the Use of Probiotics, American Journal of Clinical Nutrition, vol. 73, suppl. 2, p. 430S-436S.

MARTEAU, P. et F. Shanahan. 2003. Basic Aspects and Pharmacology of Probiotics : an Overview of Pharmacokinetics, Mechanisms of Action and Side-Effects, Best Practice and Research Clinical Gastroenterology, vol. 17, no. 5, p. 725-740.

MARTINI, M.C., E.C. Lerebours, W.J. Lin, S.K. Harlander, N.M. Berrada, J.M. Antoine et D.A. Savaiano. 1991. Strains and Species of Lactic Acid Bacteria in Fermented Milks (Yogurts) : Effect on *In Vivo* Lactose Digestion, American Journal of Clinical Nutrition, vol. 54, no.6, p. 1041-1046.

MCCARTHY, J., L. O'Mahony, L. O'Callaghan, B. Sheil, E.E. Vaughan, N. Fitzsimons, J. Fitzgibbon, G.C. O'Sullivan, B. Kiely, J.K. Collins et F. Shanahan. 2003. Double Blind, Placebo Controlled Trial of Two Probiotic Strains in Interleukin 10 Knockout Mice and Mechanistic Link with Cytokine Balance, Gut, vol. 52, no. 7, p. 975-980.

MCFARLAND, L.V., C.M. Surawicz, R.N. Greenberg, R. Fekety, G.W. Elmer, K.A. Moyer, S.A. Melcher, K.E. Bowen, J.L. Cox et Z. Noorani. 1994. A Randomized Placebo-Controlled Trial of *Saccharomyces boulardii* in Combination with Standard Antibiotics for *Clostridium difficile* Disease, Journal of the American Medicine Association, vol. 271, no. 24, p. 1913-1918.

METCHNIKOFF, E. 1907. The prolongation of life : optimistic studies. Dans C. Mitchell, Prolongation of life. Londres, éd. William Heinemann, p. 161-183.

MIMURA, T., F. Rizzello, U. Helwig, G. Poggioli, S. Schreiber, I.C. Talbot, R.J. Nicholls, P. Gionchetti, M. Campieri et M.A. Kamm. 2004. Once Daily High Dose Probiotic Therapy (VSL#3) for Maintaining Remission in Recurrent or Refractory Pouchitis, Gut, vol. 53, no. 1, p. 108-114.

NARUSZEWICZ, M., M.L. Johansson, D. Zapolska-Downar et H. Bukowska. 2002. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on Cardiovascular Disease Risk Factors in Smokers, American Journal of Clinical Nutrition, vol. 76, p. 1249-1255.

NASH, V.J., T.P. Johnston et W.K. Palmer. 1996. Effect of Nicotinic Acid on Poloxamer 407-Induced Hyperlipidemia, Pharmacotherapy, vol. 16, no. 1, p. 10-15.

NOBAEK, S., M.L. Johansson, G. Molin, S. Ahrne et B. Jeppsson. 2000. Alteration of Intestinal Microflora is Associated with Reduction in Abdominal Bloating and Pain in Patients with Irritable Bowel Syndrome, American Journal of Gastroenterology, vol. 95, no.5, p. 1231-1238.

OBERMEIER, F., N. Dunger, L. Deml, H. Herfarth, J. Scholmerich et W. Falk. 2002. CpG Motifs of Bacterial DNA Exacerbate Colitis of Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice, European Journal of Immunology, vol. 32, no. 7, p. 2084-2092.

OBERMEIER, F., N. Dunger, U.G. Strauch, N. Grunwald, H. Herfarth, J. Scholmerich et W. Falk. 2003. Contrasting Activity of Cytosin-Guanosin Dinucleotide Oligonucleotides in Mice with Experimental Colitis, Clinical and Experimental Immunology, vol. 134, no. 2, p. 217-224.

OKAYASU, I., S. Hatakeyama, M. Yamada, T. Ohkusa, Y. Inagaki et R. Nakaya. 1990. A Novel Method in the Induction of Reliable Experimental Acute and Chronic Ulcerative Colitis in Mice, Gastroenterology, vol. 98, p. 694-702.

OKSANEN, P.J., S. Salminen, M. Saxelin, P. Hamalainen, A. Ihantola-Vormisto, L. Muurasniemi-Isoviita, S. Nikkari, T. Oksanen, I. Porsti et E. Salminen. 1990. Prevention of Traveller's Diarrhoea by *Lactobacillus* GG, Annals of Medicine, vol. 22, no. 1, p. 53-56.

O'MAHONY, L., M. Feeney, S. O'Halloran, L. Murphy, B. Kiely, J. Fitzgibbon, G. Lee, G.C. O'Sullivan, F. Shanahan et J.K. Collins. 2001. Probiotic Impact on Microbial Flora, Inflammation and Tumor Development in IL-10 Knockout Mice, Alimentary Pharmacology and Therapeutics, vol. 15, no. 8, p. 1219-1225.

O'MAHONY, L., J. McCarthy, P. Kelly, G. Hurley, F. Luo, K. Chen, G.C. O'Sullivan, B. Kiely, J.K. Collins, F. Shanahan et E.M. Quigley. 2005. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in Irritable Bowel Syndrome : Symptom Responses and Relationship to Cytokine Profile, Gastroenterology, vol. 128, no. 3, p. 541-551.

OSMAN, N., D. Adawi, S. Ahrne, B. Jeppsson et G. Molin. 2004. Modulation of the Effect of Dextran Sulfate Sodium-Induced Acute Colitis by the Administration of Different Probiotic Strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, Digestive Diseases and Sciences, vol. 49, no. 2, p. 320-327.

OUWEHAND, A. C., S. Salminen et E. Isolauri. 2002. Probiotics: an Overview of Beneficial Effects, Antonie van Leeuwenhoek, vol. 82, no. 1-4, 279-289.

PERDIGON, G., E. Vintini, S. Alvarez, M. Medina et M. Medici. 1999. Study of the Possible Mechanisms Involved in the Mucosal Immune System Activation by Lactic Acid Bacteria, Journal of Dairy Science, vol. 82, no. 6, p. 1108-1114.

PIZARRO, T.T., K.O. Arseneau, G. Bamias et F. Cominelli. 2003. Mouse Models for the Study of Crohn's Disease, Trends in Molecular Medicine, vol. 9, no. 5, p. 218-222.

PLUMMER, S., M.A. Weaver, J.C. Harris, P. Dee et J. Hunter. 2004. *Clostridium difficile* Pilot Study : Effects of Probiotic Supplementation on the Incidence of *C. difficile* Diarrhoea, International Microbiology, vol. 7, no. 1, p. 59-62.

PRANTERA, C., M.L. Scribano, G. Falasco, A. Andreoli et C. Luzi. 2002. Ineffectiveness of Probiotics in Preventing Recurrence After Curative Resection for Crohn's Disease : a Randomised Controlled Trial with *Lactobacillus* GG, Gut, vol. 51, p. 405-409.

PRESCOTT, L., Harley, J.P. et Klein, D.A. 1995. Microbiologie, éd. De Boeck Université, Belgique, 1014 p.

QADRI, F., A.M. Svennerholm, A.S. Faruque et R.B. Sack. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries : Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention, Clinical Microbiology Reviews, vol. 18, no. 3, p. 465-483.

RACHMILEWITZ, D., K. Katakura, F. Karmeli, T. Hayashi, C. Reinus, B. Rudensky, S. Akira, K. Takeda, J. Lee, K. Takabayashi et E. Raz. 2004. Toll-Like Receptor 9 Signaling Mediates the Anti-inflammatory Effects of Probiotics in Murine Experimental Colitis, Gastroenterology, vol. 126, p. 520-528.

RAKOFF-NAHOUM, S., J. Pagliano, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg et R. Medzhitov. 2004. Recognition of Commensal Microflora by Toll-like Receptors is Required for Intestinal Homeostasis, Cell, vol. 118, p. 229-241.

REID, G. 1999. The Scientific Basis for Probiotic Strains of *Lactobacillus*, Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, no.9, p. 3763-3766.

ROMOND, M.B., A. Ais, F. Guillemot, R. Bounouader, A. Cortot et C. Romond. 1998. Cell-Free Whey from Milk Fermented with *Bifidobacterium breve* C50 Used to Modify the Colonic Microflora of Healthy Subjects, Journal of Dairy Science, vol. 81, p. 1229-1235.

RUMI, G., R. Tsubouchi, M. Okayama, S. Kato, G. Mozsik et K. Takeuchi. 2004. Protective Effect of Lactulose on Dextran Sulfate Sodium Induced Colonic Inflammation in Rats, Digestive Diseases and Sciences, vol. 49, no. 9, p. 1466-1472.

SAAVEDRA, J.M., N.A. Baumann, I. Oung, J.A. Perman et R.H. Yolken. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to Infants in Hospital for Prevention of Diarrhoea and Shedding of Rotavirus, Lancet, vol. 344, no. 8929, p. 1046-1049.

SALMINEN, M.K., S. Tynkkynen, H. Rautelin, M. Saxelin, M. Vaara, P. Ruutu, S. Sarna, V. Valtonen et A. Jarvinen. 2002. *Lactobacillus* Bacteremia During a Rapid Increase in Probiotic Use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland, Clinical Infectious Disease, vol. 35, no. 10, p. 1155-1160.

SANDERS, J.W. et D.R. Tribble. 2001. Diarrhea in the Returned Traveler, Current Gastroenterology Reports, vol. 3, no. 4, p. 304-314.

SANTOS, A., M. San Mauro, A. Sanchez, J.M. Torres et D. Marquina. 2003. The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* spp. Isolated From Kefir, Systematic and Applied Microbiology, vol. 26, no. 3, p. 434-437.

SCHULTZ, M., C. Veltkamp, L.A. Dieleman, W.B. Grenther, P.B. Wyrick, S.L. Tonkonogy et R.B. Sartor. 2002. *Lactobacillus plantarum* 299v in the Treatment and Prevention of Spontaneous Colitis in Interleukin-10-Deficient Mice, Inflammatory Bowel Disease, vol. 8, no. 2, p. 71-80.

SCHULTZ, M., A. Timmer, H.H. Herfarth, R.B. Sartor, J.A. Vanderhoof et H.C. Rath. 2004. *Lactobacillus* GG in Inducing and Maintaining Remission of Crohn's Disease, BMC Gastroenterology, vol 4, no. 5, p. 1-4.

SEN, S., N.M. Muller, T.J. Parker, J.T. Woolneer, S.A. Tarry et J.O. Hunter. 2002. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on Colonic Fermentation and Symptoms of Irritable Bowel Syndrome, Digestive Diseases and Sciences, vol. 47, no. 11, p. 2615-2620.

SETOYAMA, H., A. Imaoka, H. Ishikawa et Y. Umesaki. 2003. Prevention of Gut Inflammation by *Bifidobacterium* in Dextran Sulfate-Treated Gnotobiotic Mice Associated with *Bacteroides* Strains Isolated from Ulcerative Colitis Patients, Microbes and Infection, vol. 5, no. 2, p. 115-122.

SHI, H.N. et A. Walker. 2004. Bacterial Colonization and the Development of Intestinal Defenses, Canadian Journal of Gastroenterology, vol. 18, no. 8, p. 493-500.

SHIDA, K., K. Makino, A. Morishita, K. Takamizawa, S. Hachimura, A. Ametani, T. Sato, Y. Kumagai, S. Habu et S. Kaminogawa. 1998. *Lactobacillus casei* Inhibits Antigen-Induced IgE Secretion through Regulation of Cytokine Production in Murine Splenocyte Cultures, International Archives of Allergy and Immunology, vol. 115, no. 4, p. 278-287.

SIEGMUND, B., G. Fantuzzi, F. Rieder, F. Gamboni-Robertson, H.A. Lehr, G. Hartmann, C.A. Dinarello, S. Endres et A. Eigler. 2001. Neutralization of Interleukin-18 Reduces the Severity in Murine Colitis and Intestinal IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  Production, American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, vol. 281, p. R1264-R1273.

SINGH, B., S. Read, C. Asseman, V. Malmstrom, C. Mottet, L.A. Stephens, R. Stepankova, H. Tlaskalova et F. Powrie. 2001. Control of Intestinal Inflammation by Regulatory T Cells, Immunological Reviews, vol. 182, p. 190-200.

ST-ONGE, M.P., E.R. Farnworth, T. Savard, D. Chabot, A. Mafu et P.J. Jones. 2002. Kefir Consumption Does not Alter Plasma Lipid Levels or Cholesterol Fractional Synthesis Rates Relative to Milk in Hyperlipidemic Men : a Randomized Controlled Trial, BMC Complementary and Alternative Medicine, vol. 2, no. 1, 1.

STRACHAN, D.P. 1989. Hay Fever, Hygiene and Household Size, British Medical Journal, vol. 299, no. 6710, p. 1259-1260.

STRACHAN, D.P. 2000. Family Size, Infection and Atopy : the First Decade of the "Hygiene Hypothesis", Thorax, vol. 55, suppl. 1, p. S2-S10.

SULLIVAN, A. et C.E. Nord. 2005. Probiotics and Gastrointestinal Diseases, Journal of Internal Medicine, vol. 257, no. 1, p.78-92.

SURAWICZ, C.M. 2003. Probiotics, Antibiotics-Associated Diarrhoea and *Clostridium difficile* Diarrhoea in Humans, Best Practice and Research Clinical Gastroenterology, vol. 17, no. 5, p. 775-783.

SZAJEWSKA, H., M. Kotowska, J.Z. Mrukowicz, M. Armanska et W. Mikolajczyk. 2001. Efficacy of *Lactobacillus* GG in Prevention of Nosocomial Diarrhea in Infants, Journal of Pediatrics, vol. 138, no. 3, p.361-365.

TAMBOLI, C.P., C. Caucheteux, A. Cortot, J.F. Colombel et P. Desreumaux. 2003. Probiotics in Inflammatory Bowel Disease : a Critical Review, Best Practice and Research Clinical Gastroenterology, vol. 17, no. 5, p. 805-820.

TANNOCK, G.W. 1999. Analysis of the Intestinal Microflora : a Renaissance, Antonie van Leeuwenhoek, vol. 76, p. 265-278.

TARANTO, M.P., M. Medici, G. Perdigon, A.P. Ruiz Holgado et G.F. Valdez. 2000. Effect of *Lactobacillus reuteri* on the Prevention of Hypercholesterolemia in Mice, Journal of Dairy Science, vol. 83, p. 401-403.

TISSIER, H. 1906. Traitement des Infections Intestinales par la Méthode de la Flore Bactérienne de l'Intestin, CR. Soc. Biol., vol. 60, p. 359-361.

TLASKALOVA-HOGENOVA, H., R. Stepankova, T. Hudcovic, L. Tuckova, B. Cukrowska, R. Lodinova-Zadnikova, H. Kozakova, P. Rossmann, J. Bartova, D. Sokol, D.P. Funda, D. Borovska, Z. Rehakova, J. Sinkora, J. Hofman, P. Drastich et A. Kokesova. 2004. Commensal Bacteria (Normal Microflora), Mucosal Immunity and Chronic Inflammatory and Autoimmune Diseases, Immunology Letters, vol. 93, p. 97-108.

TOBA, T., K. Arihara et S. Adachi. 1990. Distribution of microorganisms with Particular Reference to Encapsulated Bacteria in Kefir Grains, International Journal of Food Microbiology, vol. 10, no. 3-4, p. 219-224.

VAARALA, O. 2003. Immunological Effects of Probiotics with Special Reference to Lactobacilli, Clinical Experimental Allergy, vol. 33, no. 12, p. 1634-1640.

VERDU, E.F. et S.M. Collins. 2004. Irritable Bowel Syndrome, Best Practice and Research Clinical Gastroenterology, vol. 18, no. 2, p. 315-321.

WALZEM, R.L., C.J. Dillard et J.B. German. 2002. Whey Components : Millenia of Evolution Create Functionalities for Mammalian Nutrition: What we Know and What we Might be Overlooking, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, vol. 42, no. 4, p. 353-375.

WATSON, J.L. et D.M. McKay. Sous presse. The Immunophysiological Impact of Bacterial CpG DNA on the Gut. Clinica Chimica Acta.

WEHKAMP, J., J. Harder, K. Wehkamp, B. Wehkamp-von Weissner, M. Schlee, C. Enders, U. Sonnenborn, S. Nuding, S. Bengmark, K. Fellermann, J.M. Schroder et E.F. Stange. 2004. NF- $\kappa$ B and AP-1-Mediated Induction of Human Beta Defensin-2 in Intestinal Epithelial Cells by *Escherichia coli* Nissle 1917 : a Novel Effect of a Probiotic Bacterium, Infection and Immunity, vol. 72, no. 10, p. 5750-5758.

YOUNG, R.J. et S. Huffman. 2003. Probiotics Use in Children, Journal of Pediatric Health Care, vol. 17, no. 6, p. 277-283.

ZEMEL, M.B. 2002. Regulation of Adiposity and Obesity Risk by Dietary Calcium : Mechanisms and Implications, Journal of the American College of Nutrition, vol. 21, no. 2, p. 146S-151S.