



**HAL**  
open science

# Evaluation du bénéfice chez l'homme des probiotiques dans la prise en charge du syndrome de l'intestin irritable : méthodologie de l'essai contrôlé randomisé et allégations nutritionnelles et de santé

Stéphane Sadrin

► **To cite this version:**

Stéphane Sadrin. Evaluation du bénéfice chez l'homme des probiotiques dans la prise en charge du syndrome de l'intestin irritable : méthodologie de l'essai contrôlé randomisé et allégations nutritionnelles et de santé. Alimentation et Nutrition. Université de Toulon, 2017. Français. NNT : 2017TOUL0007 . tel-01806343

**HAL Id: tel-01806343**

**<https://theses.hal.science/tel-01806343>**

Submitted on 2 Jun 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE

548

**THÈSE** présentée par :

**Stéphane SADRIN**

soutenue le : 18 octobre 2017

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université des sciences de la vie et de santé

Spécialité : Physiologie et pharmacologie clinique

**Evaluation du bénéfice chez l'homme des probiotiques dans la prise en charge du syndrome de l'intestin irritable, méthodologie de l'essai contrôlé randomisé et allégations nutritionnelles et de santé**

THÈSE dirigée par :

**P<sup>r</sup> MAIXENT Jean-Michel**

Directeur de thèse, Université de Poitiers

JURY :

**P<sup>r</sup> GRILLASCA Joël**

Co-directeur de thèse, Université de Toulon

**P<sup>r</sup> JAFARI Nematollah**

Professeur des Universités-Praticien  
Hospitalier, CHU de Poitiers

**P<sup>r</sup> ARAB-TEHRANY Elmira**

Professeur des Universités, Université de  
Lorraine

**P<sup>r</sup> BUTEL Marie-José**

Professeur des Universités, Université Paris-  
Descartes

**P<sup>r</sup> SAUVANT-ROCHAT Marie-Pierre**

Professeur des Universités, Faculté de  
Pharmacie de Clermont-Ferrand

**P<sup>r</sup> BERNARD Monique**

Directeur de Recherches CNRS, Faculté de  
Médecine de Marseille, Université Aix-Marseille

**D<sup>r</sup> COSTE Thierry**

Docteur es sciences, Tours



## Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont collaboré et m'ont aidé à la réalisation de ce travail, et tout particulièrement :

Le **Professeur Jean-Michel MAIXENT** pour m'avoir accueilli tout d'abord au sein du Master Génie-Physiologie options essais cliniques et développement pharmaceutique et m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Tant sur le plan scientifique, professionnel qu'humain, je ne peux que le remercier pour la richesse de son enseignement tout au long de ma formation de doctorant, pour m'avoir fait confiance et m'avoir soutenu malgré toutes les embûches et contraintes majeures que la réalisation de ces travaux et leur aboutissement ont connu !

Le **Professeur Joël GRILLASCA** pour avoir gracieusement accepté la co-direction de cette thèse ainsi que pour la qualité de son enseignement que j'ai eu la chance de suivre au début de ma thèse.

Le **Docteur Bernard GOUT** pour m'avoir permis d'acquérir les bases fondamentales relatives à la méthodologie des essais cliniques. Je tiens particulièrement à le remercier pour ses très nombreux conseils d'expert tant sur le plan théorique que pratique ayant permis la réalisation des travaux de cette thèse. Je le remercie également pour son implication, son écoute et son soutien majeur ayant permis de m'aider à lever de nombreuses difficultés quant à la réalisation de ce présent travail.

Le **Docteur Olivier PONS** pour avoir accepté de participer à ce projet et d'avoir été un fidèle soutien depuis son démarrage jusqu'à son aboutissement. Je le remercie également pour sa qualité professionnelle d'investigateur clinique qui a représenté un rôle important dans ce travail collaboratif, pour ses qualités humaines et sa motivation contagieuse.

Le **Docteur Thierry COSTE** que je tiens à remercier pour son écoute, pour son intarrissable soutien moral et sa bonne humeur toujours de bon augure dans les périodes difficiles.

Le **Docteur Sébastien MARQUE** pour son soutien d'expert en statistiques nécessaire à l'élaboration du projet et pour ses conseils en tant que professionnel expérimenté.

**Emmanuelle JOLIVET** pour son formidable travail et pour l'énergie qu'elle a investie en tant que Data-Manager lors de la réalisation de ce projet.

Je souhaite également remercier :

Les **Docteur Céline FRANÇOIS** et **Docteur Mourad FARES** pour leurs précieux conseils et soutien qui m'a beaucoup aidé à m'accrocher grâce à leur retour d'expériences de leurs années de doctorant.

Enfin, je tiens également à remercier chaleureusement :

Mon épouse **Nataliia qui m'a énormément soutenu au quotidien ! Merci !**

Karim Zinoune pour son amitié, sa disponibilité, son aide précieuse en particulier dans le domaine des biostatistiques et bien entendu sa bonne humeur imperturbable depuis la promotion Master Génie-Physiologique 2005 !

Ma famille et Julien, Jean-Guillaume, Antoine, Alexandre, Nicolas, Didier, Sébastien, les Dr Guillaume Desmet et Dr Sovann Gnep pour leur amitié de toujours !

## Table des matières

Publications .....	8
Liste des abréviations .....	9
Table des illustrations .....	11
<i>Liste des figures</i> .....	11
<i>Liste des tableaux</i> .....	11
AVANT PROPOS .....	12
<b>1 INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Le syndrome de l'intestin irritable (SII).....</b>	<b>13</b>
1.1.1 Définition et critères diagnostiques .....	13
1.1.2 Symptômes et approche diagnostique .....	15
1.1.3 Tests de diagnostic .....	16
1.1.4 Epidémiologie .....	18
1.1.4.1 Incidence .....	18
1.1.4.2 Prévalence globale .....	19
1.1.4.3 Prévalence en soins primaires .....	20
1.1.5 Marqueurs et facteurs de risque .....	21
1.1.6 Enjeux de santé publique .....	22
<b>1.2 Rôle physiopathologique du microbiote intestinal.....</b>	<b>23</b>
1.2.1 Méthodes d'étude du microbiote intestinal .....	23
1.2.2 Composition du microbiote intestinal humain .....	25
1.2.3 Fonctions physiologiques du microbiote intestinal.....	28
1.2.3.1 Fonctions métaboliques .....	28
1.2.3.1.1 Métabolisme nutritionnel .....	28
1.2.3.1.2 Métabolisme des xénobiotiques.....	30
1.2.3.2 Microbiote et homéostasie intestinale .....	30
1.2.3.2.1 Interactions du microbiote avec l'épithélium intestinal .....	30
1.2.3.2.2 Récepteurs PRR et homéostasie intestinale.....	33
1.2.3.2.3 Mécanismes PRR/MAMP-dépendants et homéostasie intestinale .....	33
1.2.3.2.4 Microbiote et immunomodulation .....	35
1.2.3.2.4.1 Microbiote et système immunitaire inné .....	35
1.2.3.2.4.2 Microbiote et système immunitaire adaptatif .....	38
1.2.3.2.5 Microbiote et maintien de la fonction de barrière .....	40
1.2.3.2.6 Microbiote et homéostasie intestinale par des mécanismes non PRR- dépendants .....	40
1.2.3.3 Axe cerveau-intestin-microbiote .....	42
1.2.3.3.1 Description de l'axe cerveau-intestin et rôle du microbiote .....	42
1.2.3.3.2 Mécanismes d'interaction de l'axe cerveau-intestin-microbiote .....	44
1.2.3.3.2.1 Du microbiote intestinal vers le cerveau .....	44
1.2.3.3.2.2 Du cerveau au microbiote intestinal.....	45

1.2.4 Mécanismes physiopathologiques du SII .....	46
1.2.4.1 Dysrégulation de l'axe cerveau-intestin-microbiote .....	46
1.2.4.2 Dysbiose.....	48
1.2.4.2.1 Altération de la composition du microbiote intestinal .....	48
1.2.4.2.2 Altération de l'activité métabolique du microbiote intestinal.....	50
1.2.4.3 Activation de l'immunité mucoale et de l'inflammation .....	50
1.2.4.4 Altération de la barrière épithéliale .....	51
1.2.4.5 Perturbations des fonctions sensori-motrices .....	51
1.2.4.5.1 Hypersensibilité viscérale.....	51
1.2.4.5.2 Altérations de la motilité gastro-intestinale.....	52
<b>1.3 Stratégies de prise en charge du SII .....</b>	<b>53</b>
1.3.1 Mesures générales .....	54
1.3.2 Modifications du régime alimentaire .....	54
1.3.3 Approches thérapeutiques pharmacologiques .....	56
1.3.3.1 Approches pharmacologiques du SII-C.....	56
1.3.3.2 Approches pharmacologiques du SII-D.....	56
1.3.3.3 Approches pharmacologiques de la douleur abdominale et/ou ballonnements.....	57
1.3.4 Approches thérapeutiques non-pharmacologiques .....	57
1.3.4.1 Comportementales .....	57
1.3.4.2 Acupuncture .....	58
1.3.4.3 Phytothérapie .....	58
1.3.4.4 Prébiotiques.....	58
<b>1.4 Probiotiques et prise en charge du SII .....</b>	<b>59</b>
1.4.1 Historique des probiotiques .....	59
1.4.2 Définitions des probiotiques.....	60
1.4.3 Aspects critiques de l'interaction probiotiques – organisme hôte .....	60
1.4.3.1 Viabilité des souches probiotiques .....	60
1.4.3.2 Identification des probiotiques.....	61
1.4.3.3 Doses .....	62
1.4.3.4 Type de bénéfice et population cible .....	62
1.4.3.5 Sécurité .....	63
1.4.3.6 Propriétés souhaitables des probiotiques .....	63
1.4.4 Mécanismes de l'interaction entre les probiotiques et l'organisme hôte.....	63
1.4.5 Principaux genres et espèces microbiens aux propriétés probiotiques.....	65
1.4.6 Métabolisme et effets probiotiques des bactéries lactiques (LAB) .....	66
1.4.7 Rationnel d'utilisation des probiotiques en santé humaine.....	67
1.4.7.1 Pathologies intestinales.....	67
1.4.7.2 Pathologies extra-intestinales .....	68

1.4.8	Rationnel d'utilisation des probiotiques dans le SII .....	68
1.4.8.1	Revue systématique et méta-analyse .....	68
1.4.8.2	Les études cliniques individuelles de haute qualité méthodologique .....	73
1.4.8.3	Rationnel d'utilisation des souches probiotiques dans les sous-types du SII .....	74
1.4.8.3.1	Probiotiques et SII-D .....	74
1.4.8.3.2	Probiotiques et SII-C .....	75
1.4.8.3.3	Probiotiques chez les enfants diagnostiqués pour un SII associé ou non à une DAF .....	75
1.4.8.4	Symbiotiques et prise en charge du SII .....	76
1.4.8.5	Mécanismes d'action des probiotiques et cibles physiopathologiques du SII .....	77
1.4.8.5.1	Modifications du microbiote intestinal et du métabolisme luminal .....	77
1.4.8.5.2	Hypersensibilité viscérale .....	78
1.4.8.5.3	Motilité intestinale .....	78
1.4.8.5.4	Immunité muqueuse et barrière intestinale .....	79
1.4.8.5.5	Dysrégulation de l'axe cerveau-intestin .....	79
<b>1.5</b>	<b>Complément alimentaire et justification scientifique de l'effet probiotique .....</b>	<b>80</b>
1.5.1	Définition et cadre réglementaire des compléments alimentaires en Europe et en France .....	80
1.5.2	Les allégations nutritionnelles et de santé en Europe .....	81
1.5.3	La justification scientifique des allégations des aliments et ingrédients santé .....	81
1.5.4	La démarche PASSCLAIM .....	81
1.5.5	Législation communautaire et rôle de l'EFSA .....	82
1.5.6	La justification scientifique d'un effet probiotique .....	83
1.5.7	Contexte scientifique de l'étude .....	83
<b>2</b>	<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>84</b>
	<b>Article 1 .....</b>	<b>84</b>
<b>3</b>	<b>DISCUSSION / LIMITATIONS DU PROTOCOLE .....</b>	<b>84</b>
	<b>Article 1 .....</b>	<b>84</b>
<b>4</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>84</b>
	<b>Article 2 .....</b>	<b>84</b>
	ARTICLE 1 .....	85
	ARTICLE 2 .....	96
<b>5</b>	<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>116</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>REFERENCES .....</b>	<b>123</b>
	RESUME / ABSTRACT .....	171

## **Publications**

### **Articles en cours de publication:**

Sadrin S, Sennoune SR, Gout B, Marque S, Moreau J, Zinoune K, Grillasca J, Pons O, Maixent JM. *Lactobacillus acidophilus* versus placebo in the symptomatic treatment of irritable bowel syndrome: LAPIBSS randomized trial results. *Manuscrit en cours de soumission*.

Sadrin S, Gout B, Grillasca J, Pons O, Maixent JM. Food supplement formulation (Oméga Cholestérol<sup>®</sup>) in the management of hypercholesterolemia treated or not with statin: a study protocol for a randomized, double blind, placebo-controlled trial. *A soumettre*.

Fares M, François C, Sadrin S, Maixent JM. Protective effect of a new “deglet noor” date fruits (phoenix dactylifera) water extract on porcine renal epithelial cells LLC-PK1 exposed to hypoxia and reoxygenation. *A soumettre - Confidentiel (enveloppe Soleau)*.

### **Articles publiés:**

Battault S, Whiting SJ, Peltier SL, Sadrin S, Gerber G, Maixent JM. Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. *Eur J Nutr*. 2013 Mar;52(2):429-41. doi: 10.1007/s00394-012-0430-5. Epub 2012 Aug 12.

Sadrin S, Sennoune SR, Gout B, Marque S, Moreau J, Grillasca J, Pons O, Maixent JM. *Lactobacillus acidophilus* versus placebo in the symptomatic treatment of irritable bowel syndrome: the LAPIBSS randomized trial. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. doi: 10.14715/cmb/2017.63.9.21. Epub 2017 Sep 30.

## Liste des abréviations

### A

**AA** : Acide Aminé  
**ACTH** : Adrenocorticotropique Hormone  
**ADN** : Acide Désoxyribonucléique  
**ADNr** : Acide Désoxyribonucléique ribosomiale  
**AFSSA** : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments  
**AGCC** : Acide Gras à Courte Chaîne  
**AGPI** : Acide Gras Polyinsaturé  
**AhR** : Aryl hydrocarbon Receptor  
**AINS** : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien  
**AMG** : Amygdales  
**AMP** : Anti-Microbial Peptide  
**ANSES** : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail  
**APRIL** : A Proliferation-Inducing Ligand  
**ARN** : Acide Ribonucléique  
**ARNr** : Acide Ribonucléique ribosomiale  
**ATC** : Antidépresseur Tricyclique  
**ATP** : Adénosine Triphosphate

### B

**BAFF** : B-cell Activating factor of the tumour-necrosis-Factor Family  
**BDNF** : Brain-Derived Neurotrophic Factor  
**BF** : Ballonnement Fonctionnel

### C

**CA** : Complément Alimentaire  
**CCI** : Constipation Chronique Idiopathique  
**CD** : Cluster de Différenciation  
**CFU** : Colony-Forming Unit  
**CI** : Cerveau-Intestin  
**CIM** : Cerveau-Intestin-Microbiote  
**CLA** : Conjugated Linoleic Acid  
**CPA** : Cellule Présentatrice d'Antigène  
**CRF** : Corticotropin-Releasing Factor  
**CRP** : C-Reactive Protein

### D

**DAF** : Douleur Abdominale Fonctionnelle  
**DC** : Dendritic Cell  
**DF** : Diarrhée Fonctionnelle  
**DGCCRF** : Direction Générale de la Concurrence, Consommation et de la Répression des Fraudes  
**DGGE** : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis  
**DAF** : Douleur Abdominale Fonctionnelle  
**DC** : Dendritic Cell

### E

**ECR** : Essai Contrôlé Randomisé

**EFSA** : European Food Safety Agency  
**EGF** : Epidermal Growth Factor  
**EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor  
**EI** : Evènement Indésirable  
**ERK** : Extracellular signal-Regulated Kinases  
**EVA** : Echelle Visuelle Analogique

### F

**FAO** : Food and Agriculture Organization of the United Nations  
**FDA** : Food and Drug Administration  
**FODMAP** : Fermentable Oligo-, Di-, Mono-saccharides And Polyols  
**FOS** : Fructo-Oligo-Saccharides  
**FISH** : Fluorescence In Situ Hybridization  
**FXR** : Farnesoid X Receptor

### G

**GABA** : Gamma-Amino-Butyric Acid  
**GALT** : Gut-Associated Lymphoid Tissue  
**GI** : Gastro-Intestinal  
**GOS** : Galacto-Oligo-Saccharides  
**GPCR** : G Protein-Coupled Receptor  
**GRAS** : Generally Recognized As Safe  
**GT-ACG-SII** : Groupe de Travail de l'American College of Gastroenterology sur le SII

### H

**HHS** : Hypothalamo-Hypophysaire Surrénalien  
**HIPP** : Hippocampe  
**HMP** : Human Microbiome Project  
**HRQOL** : Health-Related Quality Of Life  
**HSP** : Heat Shock Protein  
**HTS** : High-Throughput Sequencing  
**HYP** : Hypothalamus  
**5-HT** : 5-Hydroxy-Tryptamine (sérotonine)

### I

**IBS** : Irritable Bowel Syndrom  
**IBS-QOL** : Irritable Bowel Syndrom – Quality Of Life  
**IEC** : Intestinal Epithelial Cell  
**IEL** : Intraepithelial Lymphocyte  
**IESC** : Intestinal Epithelial Stem Cell  
**IFN- $\gamma$**  : Interferon- $\gamma$   
**IgA** : Immunoglobuline A  
**IgAs** : Immunoglobuline A sécrétoire  
**IgE** : Immunoglobuline E  
**IgG** : Immunoglobuline G  
**I $\kappa$ B** : NF- $\kappa$ B Inhibitor  
**IKK** : Inhibitory Kappa B Kinase

**IL** : Interleukine

**ILC** : Innate Lymphoid cell

**ISRS** : Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de la Sérotonine

**ICHPPC** : International Classification of Health Problems in Primary Care

## **L**

**LAB**: Lactic Acid Bacteria

**LP**: Lamina Propria

**LPL**: Lipoprotein Lipase

**LPS** : Lipopolysaccharide

**LTA** : Lipoteichoic Acid

## **M**

**MAMP** : Microbe-Associated Molecular Patterns

**MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinase

**MetaHIT** : Metagenomics of the Human Intestinal Tract

**MICI** : Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales

## **N**

**NBS** : Narcotic Bowel Syndrom

**NEMO** : NF $\kappa$ B Essential Modulator

**NF $\kappa$ B** : Nuclear Factor-kappa B

**NGS** : Next Generation Sequencing

**NLR** : NOD-Like Receptors

**NO** : Nitric Oxide

**NOD** : Nucleotide Oligomerization Domain

**NT** : Neutrotransmetteur

**NST** : Nombre de Sujet à Traiter

## **P**

**PAMP** : Pathogen-Associated Molecular Patterns

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PFGE** : Pulsed Field Gel Electrophoresis

**PGN** : Peptidoglycane

**pIgR** : polymeric Immunoglobulin Receptor

**PNN** : Polynucléaires Neutrophiles

**PKC** : Protéine Kinase C

**PPAR** : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

**PRR** : Pattern Recognition Receptors

## **Q**

**qPCR** : quantitative Polymerase Chain Reaction

**QPS** : Qualified Presumption of Safety

## **R**

**RA** : Retinoic Acid

**Raf** : Rapidly accelerated fibrosarcoma

**RAPD** : Random Amplified Polymorphic DNA

**RIG-I**: Retinoic acid-Inducible Gene-I

**RLR** : RIG-I-like Receptors

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**RR**: Risque Relatif

## **S**

**SFCA**: Short Fatty Chain Acid

**SIBO** : Small Intestinal Bacterial Overgrowth

**SII**: Syndrome de l'Intestin Irritable

**SII-C**: SII avec constipation prédominante

**SII-D**: SII avec diarrhée prédominante

**SII-M**: SII-Mixte

**SNA**: Système Nerveux Autonome

**SNC** : Système Nerveux Central

**SNE** : Système Nerveux Entérique

**STAT**: Signal Transducer and Activator of Transcription

## **T**

**TFF3** : Trefoil Factor 3

**TFI** : Troubles Fonctionnels Intestinaux

**TGF $\beta$**  : Transforming Growth Factor  $\beta$

**TGGE** : Temperature Gradient Gel Electrophoresis

**TGR** : Transmembrane G protein-coupled Receptor

**Th** : T-helper

**TLR** : Toll-Like Receptors

**TNF- $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

**TPH1** : Tryptophan Hydroxylase 1

**T-reg** : Cellule T régulatrice

**T-RFLP** : Terminal Restriction Fragment Length

Polymorphism

**Trp** : Tryptophane

**TSLP** : Thymic Stromal Lymphopoietin

## **W**

**WONCA** : World Organization of Family Doctors

**WHO** : World Health Organization

## Table des illustrations

### Liste des figures

FIGURE 1. PREVALENCE MONDIALE DU SYNDROME DE L'INTESTIN IRRITABLE (SII) PAR PAYS..	19
FIGURE 2. DISTRIBUTION DES GENRES BACTERIENS COMPOSANT LE MICROBIOTE INTESTINAL DU SUJET SAIN. ....	27
FIGURE 3. GROUPES PHYLOGENETIQUES ET FONCTIONNELS DES BACTERIES INTESTINALES IMPLIQUEES DANS LE METABOLISME DES ACIDES GRAS A COURTE CHAINE (AGCC).....	29
FIGURE 4. LA BARRIERE DE CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES (IEC).....	31
FIGURE 5. LA RECONNAISSANCE MICROBIENNE CONTRIBUE A LA SANTE ET LA FONCTION DES IEC.....	34
FIGURE 6. LES PRR PARTAGENT LES VOIES DE SIGNALISATION IMMUNITAIRE. ....	36
FIGURE 7. L'AXE BIDIRECTIONNEL CERVEAU-INTESTIN-MICROBIOTE.....	43
FIGURE 8. INFLUENCE DU MICROBIOTE INTESTINAL SUR LA COMMUNICATION BIDIRECTIONNELLE ENTRE LE SNE ET LE SNC, MODULANT LE DEVELOPPEMENT INTESTINAL ET PLUSIEURS FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES, INCLUANT MOTILITE, SENSIBILITE, SECRETION ET IMMUNITE INTESTINALE. ....	47
FIGURE 9. ROLE PHYSIOPATHOLOGIQUE SUPPOSE DU MICROBIOTE DANS LE SYNDROME DE L'INTESTIN IRRITABLE .....	48
FIGURE 10. LES MECANISMES DES PROBIOTIQUES DANS LE TRACTUS GASTRO-INTESTINAL HUMAIN.....	65
FIGURE 11. REPONDEURS AUX THERAPIES BASES SUR LE SCORE DE DOULEUR ABDOMINALE....	71
FIGURE 12. TAILLE D'EFFET INDIVIDUELLE ET COMBINEE DE LA MOYENNE STANDARDISEE POUR LA DOULEUR ABDOMINALE DANS LES ETUDES COMPARANT LES PROBIOTIQUES AU PLACEBO CHEZ DES PATIENTS AVEC UN SYNDROME DE L'INTESTIN IRRITABLE.....	71

### Liste des tableaux

TABLEAU 1. CRITERES DE ROME III DU SYNDROME DE L'INTESTIN IRRITABLE (SII). ....	14
TABLEAU 2. LES SOUS-GROUPES DU SYNDROME DE L'INTESTIN IRRITABLE SII DEFINIS PAR LES CRITERES DE ROME III.....	14
TABLEAU 3. DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL DU SII.....	16
TABLEAU 4. RECOMMANDATIONS DU GROUPE DE TRAVAIL ACG-SII POUR LES TESTS DE DIAGNOSTIC. ....	17
TABLEAU 5. PREVALENCE ESTIMEE DU SII PAR PAYS : LIMITES ET ANALYSES PAR PAYS. ....	20
TABLEAU 6. PRINCIPAUX MECANISMES DE L'AXE BIDIRECTIONNEL CERVEAU-INTESTIN-MICROBIOTE. ....	43
TABLEAU 7. SYNTHESE NON EXHAUSTIVE DES ETUDES DU MICROBIOTE INTESTINAL DES PATIENTS AVEC UN SYNDROME DE L'INTESTIN IRRITABLE DIAGNOSTIQUES D'APRES LES CRITERES DE ROME II ET III. ....	49
TABLEAU 8. SYNTHESE DES ETUDES DE HAUTE QUALITE METHODOLOGIQUE EVALUANT L'EFFICACITE DES PROBIOTIQUES DANS LE SYNDROME DE L'INTESTIN IRRITABLE.....	70

## AVANT PROPOS

Le cadre réglementaire des aliments santé au niveau Européen depuis 2002, et notamment celui des compléments alimentaires depuis 2006, nécessite d'engager des travaux chez l'homme afin d'apporter la démonstration scientifique d'allégations de santé destinées aux consommateurs. C'est dans ce contexte que le Laboratoire Denel-Codifra s'est engagé dans un programme de recherche à l'innovation se traduisant par le financement également d'une thèse de doctorat dans le cadre de la formation continue universitaire. Ainsi, le Laboratoire Denel-Codifra est le promoteur d'une étude clinique évaluant les bénéfices d'un complément alimentaire à base de souches « probiotiques » dans les troubles fonctionnels intestinaux, en particulier sur le syndrome de l'intestin irritable, et ceci avec une haute-qualité méthodologique contrairement à une majorité de travaux cliniques précédemment publiés. Ce projet de thèse comportait 2 étapes.

La 1<sup>ère</sup> phase a consisté à concevoir une formulation à base de souches probiotiques en se basant sur les données bibliographiques existantes et rédiger un protocole d'étude clinique de haute-qualité méthodologique et innovant destiné à être approuvé par les autorités réglementaires ainsi que par le comité d'éthique afin d'être enregistré dans une base dédiée aux essais cliniques et internationalement reconnue.

La 2<sup>ème</sup> phase, conditionnée par l'approbation de l'ANSM et du comité d'éthique attribué, a consisté à réaliser l'essai clinique et exploiter les résultats afin d'évaluer le bénéfice du mélange des souches probiotiques employées en comparaison au groupe placebo dans le syndrome de l'intestin irritable.

# 1 INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

## 1.1 Le syndrome de l'intestin irritable (SII)

### 1.1.1 Définition et critères diagnostiques

Les troubles fonctionnels intestinaux (TFI) désignent un groupe de troubles gastro-intestinaux (GI) caractérisés par des symptômes attribués à la partie médiane et inférieure du tractus GI ne pouvant être expliqués par des anomalies organiques et/ou biochimiques [1]. Les TFI incluent le syndrome de l'intestin irritable (SII), douleur abdominale fonctionnelle (DAF), ballonnement fonctionnel (BF), constipation chronique idiopathique (CCI) et des diarrhées fonctionnelles (DF) [1]. Le SII, ou IBS (Irritable Bowel Syndrome), est un TFI chronique se caractérisant par la présence d'une douleur abdominale accompagnée d'altérations du transit intestinal [1]. Plusieurs critères basés sur les symptômes ont été employés pour le diagnostic du SII principalement dans la recherche clinique [2]. En général, ces critères incluent la présence d'une douleur ou d'un inconfort abdominale chronique ou récurrent accompagné d'altérations du transit GI [2]. En 1978, les critères diagnostiques définis par Manning et al. (1978) ont été les premiers proposés et identifiaient les symptômes de douleur abdominale soulagée après défécation, de selles plus molles et plus fréquentes à la survenue de la douleur, de passage de mucus, de vidange incomplète du rectum et de distension abdominale comme étant les caractéristiques principales du SII [3]. Cette définition ne mentionnant aucune notion de durée des symptômes, les critères développés par Kruis et al. (1984) ont alors proposé une durée de 2 années et l'intégration dans le processus de diagnostic de résultats négatifs pour l'examen physique et les tests sanguins (vitesse de sédimentation et hémogramme complet) [4]. En 1990, le Comité de Rome pour la Classification des TFI a défini les critères de Rome qui excluaient les résultats d'un test sanguin négatif et d'un examen physique général car ces critères préalablement développés pour les besoins de la recherche clinique ont pour objectif d'obtenir des échantillons de population plus homogènes [2]. La plus récente version en 2006 de ces critères correspond à ceux de « Rome III » et définit le SII comme étant un trouble chronique caractérisé par une douleur, ou un inconfort abdominal, associée à des troubles de la défécation (Tableau 1) [1]. L'inconfort désigne une sensation inconfortable qui n'est pas décrite comme une douleur. De plus, ces critères doivent être observés sur les 3 derniers mois précédant le diagnostic conjointement à une survenue des symptômes au moins 6 mois avant le diagnostic [1]. Les critères de ROME III définissent également 4 sous-types de patients SII dont la classification s'établit selon la consistance des selles (Tableau 2) [1]. Par ailleurs, les lignes directrices ou *guidelines* du groupe de travail sur le SII de l'American College of Gastroenterology (GT-ACG-SII) mettaient l'accent dès 2002 sur une approche orientée cliniquement du SII en le définissant comme une douleur ou un inconfort abdominale bas accompagné d'altérations de la défécation [5]. En 2009, la position du

GT-ACG-SII indiquait qu'aucun critère basé sur les symptômes ne possédait une précision idéale pour le diagnostic du SII. Celui-ci a alors été défini comme une douleur ou inconfort abdominal qui survient en association avec un transit intestinal altéré depuis au moins 3 mois [6].

**Les critères\* diagnostiques doivent inclure à la fois :**

- **Douleur ou inconfort\*\* abdominale associé avec au moins deux des trois critères suivants au moins 25% du temps :**
  - a) **Amélioration avec défécation**
  - b) **Survenue associée à une modification de la fréquence des selles**
  - c) **Survenue associée à une modification de la consistance/aspect des selles**
- **Absence d'un processus inflammatoire, anatomique, métabolique ou néoplasique pouvant expliquer les symptômes du sujet.**

\*Critères remplis au moins 3 jours par mois durant les 3 mois précédant le diagnostic avec une survenue des symptômes au moins 6 mois avant le diagnostic

\*\* « Inconfort » désigne une sensation inconfortable non décrite comme une douleur

**Tableau 1. Critères de Rome III du syndrome de l'intestin irritable (SII) (d'après Longstreth et al., 2006) [1].**

**SII avec constipation prédominante (SII-C) :**

Bristol 1-2  $\geq$  25 % du temps

Bristol 6-7  $\leq$  25 % du temps\*

**SII avec diarrhée prédominante (SII-D) :**

Bristol 6-7  $\geq$  25 % du temps

Bristol 1-2  $\leq$  25 % du temps\*

**SII avec alternance diarrhée-constipation (SII-M) :**

Bristol 1-2  $\geq$  25 % du temps

Bristol 6-7  $\geq$  25 % du temps\*

**SII non spécifié :** absence de critères suffisants pour répondre aux critères du SII-C, SII-D ou SII-M.

\*En l'absence d'antidiarrhéiques et de laxatifs

**Tableau 2. Les sous-groupes du syndrome de l'intestin irritable SII définis par les critères de Rome III. L'échelle de Bristol comprend 7 échelons (d'après Longstreth et al., 2006) [1].**

La consistance des selles est définie par l'échelle de Bristol allant du type 1 (selles dures et morcelées) au type 7 (selles totalement liquides) et dont le type 4 correspond au type normal [7].

### 1.1.2 Symptômes et approche diagnostique

En dépit de l'hétérogénéité du SII catégorisé en sous-types selon le transit intestinal prédominant, la douleur abdominale constitue le symptôme caractéristique du SII [2]. En effet, il s'agit pour le patient du symptôme clé associé à une diminution de la qualité de vie liée à la santé, à la sévérité de la pathologie et au recours à des soins de santé [8-10]. Cette douleur abdominale est augmentée par la prise alimentaire [2]. De ce fait, une partie importante de la population adulte générale estimée à 20 % à 45 % pense souffrir d'intolérance alimentaire et une majorité des patients avec un SII estimée à 70 % attribue leur symptôme à des événements indésirables (EI) liés à l'alimentation [11, 12]. Dans ce cas, la douleur, de nature continue, non liée à une modification du transit intestinal, et ne pouvant être expliquée par une maladie organique, s'apparente davantage à une DAF qu'à un SII [13]. Egalement, dans la mesure où la douleur est caractéristique d'un SII, des épisodes chroniques de diarrhée et/ou constipation sans douleur s'apparentent plutôt à des diarrhées et/ou constipations fonctionnelles [1]. D'après les critères Rome III, d'autres symptômes supportant le diagnostic du SII mais ne faisant pas partie des critères diagnostiques incluent :

- a) Fréquence de selles anormale ( $\leq 3$  défécations par semaine ou  $> 3$  défécations par jour)
- b) Aspect des selles anormales avec 2 modalités possibles : grumeleuses/dures ou molles/liquides
- c) Défécation anormale (effort, urgence, évacuation incomplète)
- d) Passage de mucus
- e) Ballonnements ou sensation de distension abdominale

Parmi ces symptômes, les ballonnements constituent un symptôme prédominant rapporté par une importante majorité des patients avec un SII estimée à 96 % [1]. De plus, la prévalence de symptômes extra-intestinaux chez les patients avec un SII est plus élevée que celle estimée chez les sujets contrôles, incluant céphalées, fatigue, myalgie, dyspareunie, fréquence urinaire ou autres symptômes urinaires, étourdissements et symptômes psychiatriques [14]. Ces symptômes sont courants au sein des patients les plus symptomatiques du SII et pourraient être dues à des conditions pathologiques chevauchantes telles que la fibromyalgie, le syndrome de fatigue chronique ou la douleur pelvienne chronique [14-16]. L'association mise en évidence par Heitkemper et al. (2003) entre la symptomatologie du SII et la menstruation ou d'autres affections gynécologiques telles que la dyspareunie, augmente la complexité du diagnostic du SII et entraîne des actes médicaux invasifs ou chirurgicaux supplémentaires mais inutiles [17,18]. Un diagnostic efficace du SII démarre avec un interrogatoire des antécédents médicaux afin de différencier les symptômes fonctionnels des pathologies organiques et de rechercher les symptômes et signes d'alerte amenant immédiatement l'investigateur à considérer un diagnostic alternatif au SII, tel qu'une MICI ou un cancer du côlon [19-24]. Ces « drapeaux rouges » incluent une apparition des symptômes à 50 ans et plus, perte de

poids non-intentionnelle, diarrhées nocturnes, anémie, sang dans les selles, antécédent familial de MICI, cancer colique ou maladie cœliaque [2, 19-24]. Ces signaux d’alerte ne concerneraient néanmoins qu’une minorité de patients (estimée à 3 %) avec une suspicion de SII [25].

### 1.1.3 Tests de diagnostic

Tout sujet avec une suspicion de SII doit faire l’objet d’un examen clinique complet et à l’exception d’une légère sensibilité au dessus du colon sigmoïde, cet examen doit être normal [19]. Toute autre anomalie détectée lors de cet examen exclut un SII dont le diagnostic différentiel des symptômes est large et peut mener à de multiples tests de diagnostic généralement inutiles (Tableau 3) [2, 19].

<b>Symptômes gastro-intestinaux liés aux traitements médicamenteux</b>	<b>Pathologies endocriniennes ou métaboliques</b>	<b>MICI ou autres troubles intestinaux organiques</b>
Antibiotiques Chimiothérapie Opiacés Antidépresseurs AINS Inhibiteur de la pompe à protons Bloqueurs du canal calcique	Troubles de la thyroïde Diabète sucré Tumeurs endocriniennes pancréatiques Hypercalcémie Porphyrurie intermittente aigue	Maladie de Crohn Rectocolite hémorragique Colite microscopique Maladie cœliaque Colite ischémique Occlusion intestinale Insuffisance pancréatique Troubles de la vésicule biliaire Troubles après gastrectomie
<b>Infections causées par</b>	<b>Alimentation et régime</b>	<b>Autres troubles fonctionnels intestinaux</b>
Parasites HIV et infections associées Gastroentérite virale Amibes Giardase	Intolérance au lactose ou fructose Régime riches en graisses Alcool ou Caféine Allergie alimentaire Edulcorants de synthèse	Douleur abdominale fonctionnelle Dyspepsie fonctionnelle Diarrhée fonctionnelle Constipation fonctionnelle
<b>Pathologies gynécologiques</b>	<b>Pathologies Neurologiques</b>	<b>Pathologies psychiatriques</b>
Endométriose Dysménorrhée Cancer ovarien	Pathologie de la moelle épinière Sclérose en plaques Maladie de Parkinson	Trouble de panique Somatisation Trouble d’anxiété

**Tableau 3. Diagnostic différentiel du SII** (d’après Kahn et al., 2010) [2].

Ces tests diagnostiques de routine sont davantage préconisés par les cliniciens considérant que le diagnostic du SII doit être mené par un « diagnostic d’exclusion » et qui, d’après l’étude de Spiegel et al. (2010), ont eu recours en moyenne aux tests de routine 1,6 fois plus que leurs confrères ne partageant pas cet avis [26]. Un excès de dépense de 364US\$ a été calculé pour établir ce diagnostic [26]. En 2009, la revue publiée par le GT-ACG-SII a établi les recommandations concernant les tests de diagnostic du SII en indiquant que les tests de diagnostic de routine ne doivent pas être menés pour les patients avec les symptômes spécifiques du SII sans les caractéristiques d’alarme (Tableau 4) [6]. En effet, à l’exception des tests pour l’intolérance au lactose et la maladie cœliaque, la prévalence des anomalies pour les autres tests de diagnostic n’est pas significativement différente entre les patients avec un SII sans les signaux d’alarme et les sujets témoins [6]. Une

revue systématique suivie d'une méta-analyse portant sur 4 204 sujets a conclu que la prévalence de la maladie cœliaque, confirmée par biopsie chez les patients qui remplissent les critères de Rome III, est 4 fois supérieure à celle des sujets témoins correspondant [27].

Tests de diagnostic	Recommandations
Tests sanguins courants (hémogramme complet, chimie du sang, fonction thyroïdienne, recherche d'œufs et parasites dans les selles)	Ne doivent être réalisés que si les signes d'alerte sont présents
Tests sérologiques de la maladie cœliaque	Recommandé dans le SII-D et SII-M
Imagerie radiologique abdominale	Ne doit être réalisée que si les signes d'alerte sont présents
Colonoscopie	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recommandé si les signes d'alerte sont présents pour écarter une pathologie organique</li> <li>- Recommandé chez les patients âgés <math>\geq 50</math> ans pour un dépistage de routine</li> <li>- Non recommandé en l'absence des signes d'alerte chez les patients âgés <math>&lt; 50</math> ans avec les symptômes spécifiques du SII</li> <li>- Recommandée en cas de SII-D pour exclure une colite microscopique</li> </ul>
Test respiratoire pour écarter une intolérance au lactose	Recommandé uniquement en cas de suspicion clinique élevée et d'échec du régime d'exclusion
Test respiratoire pour le SIBO	Non recommandé en raison de données insuffisantes

**Tableau 4. Recommandations du groupe de travail ACG-SII pour les tests de diagnostic** (d'après Kahn et al., 2010) [2].

Egalement, la prévalence de l'intolérance au lactose chez les patients avec un SII est supérieure à celle des sujets témoins (38 % versus 26 % ; OR=2,57 ; IC 95 % : 1,27-5,22) et la recommandation du GT-ACG-SII consiste à proposer un test respiratoire à l'hydrogène seulement en cas de suspicion clinique élevée après un régime alimentaire d'exclusion [6]. Cependant, les lignes directrices émises par la Société Britannique de Gastroentérologie (SBG) recommandent un hémogramme complet chez les patients âgés de plus de 50 ans à leur première consultation et un hémogramme complet accompagné d'une vitesse de sédimentation et d'un dosage de CRP chez les patients avec une apparition récente d'un SII-D [28]. De plus, alors que le GT-ACG-SII ne recommande pas l'usage d'un test respiratoire pour la prolifération bactérienne de l'intestin grêle (SIBO) chez les patients avec un SII en raison de données insuffisantes, la SBG le recommande dans le cas de diarrhées aiguës et en particulier si celles-ci entraînent un réveil durant le sommeil [6, 28]. L'utilisation extensive de tests qui ne sont pas nécessaires pourrait être diminuée par le développement d'un biomarqueur sensible, spécifique et largement disponible pour un diagnostic

efficace du SII dans la pratique clinique courante [2]. A ce jour, plusieurs biomarqueurs du SII ont été développés pour améliorer son diagnostic, le différencier des maladies organiques et pour différencier les sous-types [29]. Le développement de ces biomarqueurs a reposé sur l'utilisation de marqueurs sérologiques, fécaux, cellulaires/moléculaires, scintigraphiques, immunitaire de la muqueuse colique ainsi que de tests d'haleine [29]. Cependant ces travaux ont été réalisés sur des échantillons de petite taille limitant les comparaisons entre les patients avec un SII et les sujets sains ou présentant d'autres pathologies [29]. De plus, la physiopathologie multifactorielle du SII rend difficile le développement d'un unique biomarqueur pouvant nécessiter de décomposer le SII en sous-type dans le but d'améliorer la précision des biomarqueurs devant reposer sur des données mécanistiques et biologiques [29]. Il s'agit là d'un point fondamental qui pourrait amener à reconsidérer le consensus actuel selon le lequel le SII n'est pas une pathologie organique [29].

#### **1.1.4 Epidémiologie**

En l'absence d'un « Gold standard » définissant le SII, les critères diagnostiques utilisés présentent une large marge d'erreur dans leur application [30, 31]. C'est pourquoi la définition des cas caractérisés lors d'études épidémiologiques représente une difficulté qui pourrait limiter la pertinence de leurs résultats [32]. De plus, en l'absence d'une approche thérapeutique bien établie malgré les nombreux traitements proposés en vente libre et tenant compte également que certains patients ne suivent aucune médication, les données issues des prescriptions représentent un intérêt limité [32]. Une minorité des patients est admise à l'hôpital avec un SII ou diagnostiqué comme tel durant leur admission [31]. Dans la mesure où le SII n'est pas considéré comme une cause de mortalité, les données hospitalières ne sont également pas d'un grand intérêt pour définir les cas [32, 33]. Une attention particulière doit de ce fait être apportée à la méthodologie employée pour la définition et la constatation des cas qui peut impacter significativement le nombre de cas rapportés [32].

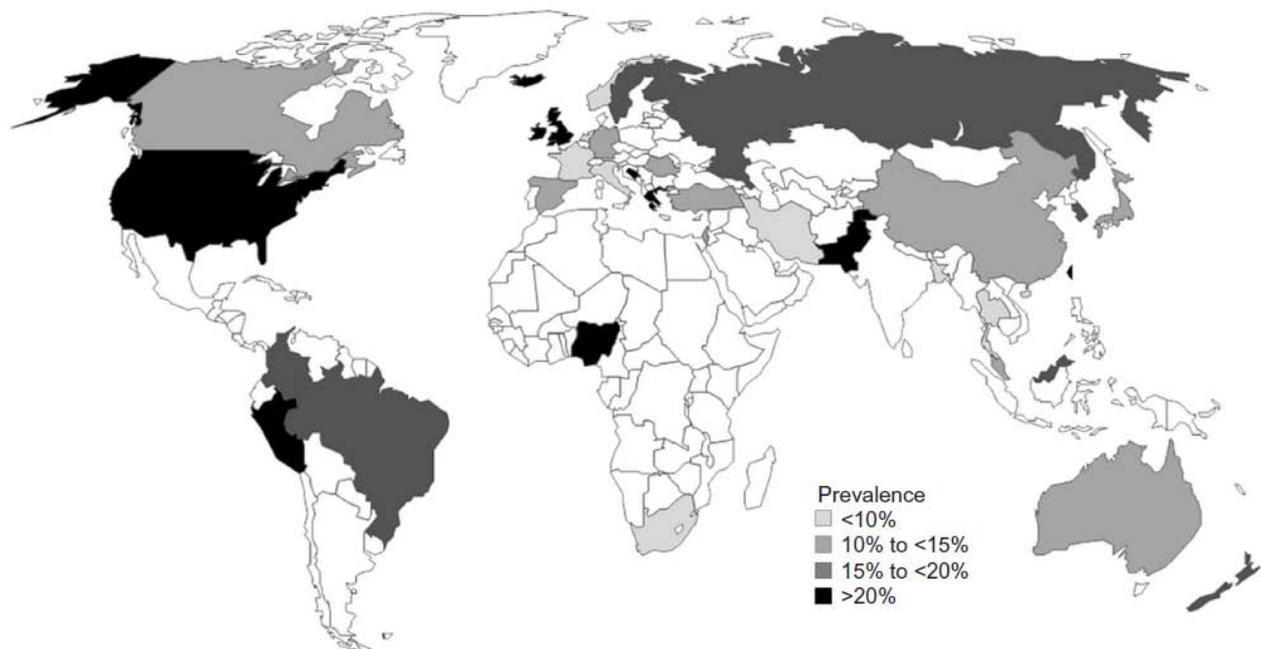
##### **1.1.4.1 Incidence**

Dans la mesure où les symptômes associés au SII sont couramment décrits au sein de la population, il est fréquent que leur survenue n'aboutisse pas à une prise en charge médicale [34, 35]. En conséquence, il existe un écart entre l'incidence de la première occurrence des symptômes et le diagnostic du SII établi par un médecin expliquant le faible nombre d'études destinées à estimer une incidence du SII [34]. Une étude américaine publiée en 1992 a estimé l'incidence du SII en mesurant la première occurrence des symptômes du SII par la réalisation de deux études de cohorte à un an d'intervalle et a conclu à un taux d'incidence de 67 pour 1000 sujets/an [36]. Néanmoins les

trois autres études d'incidence publiées à ce jour et ayant opté pour définir les cas comme le premier diagnostic du SII par un médecin ont fourni des estimations plus prudentes d'environ 2 pour 1000 sujets/an [37-39].

#### 1.1.4.2 Prévalence globale

La prévalence globale du SII au sein d'une communauté donnée se situe entre 10 % et 25 % [32]. Les estimations de prévalence pour le SII varient de façon importante au niveau international, à la fois à l'intérieur et entre les pays (Figure 1 – Tableau 5) [32]. La considérable hétérogénéité existant entre les études épidémiologiques s'explique d'une part par les différences méthodologiques et d'échantillonnage et d'autre part par l'utilisation de critères différents pour définir le SII plutôt que d'un biomarqueur de référence [32]. La majorité des études traitant la prévalence du SII sont des enquêtes communautaires réalisées essentiellement en Europe, Asie du Sud-Est et en Amérique du Nord [32]. Une méta-analyse publiée par Lovell et al. (2012) conclut à une estimation globale de la prévalence du SII de 11,2 % (IC 95 % : 9,8-12,8) avec des variations par région géographique, la plus faible en Asie du Sud (7 %) et la plus élevée en Amérique du Sud (21 %) [40]. Enfin, la prévalence ne varie pas significativement selon l'année calendaire pendant laquelle les études ont été réalisées [40].



**Figure 1. Prévalence mondiale du syndrome de l'intestin irritable (SII) par pays** (d'après Canavan et al., 2014) [32].

Pays	Prévalence estimée la plus faible	IC 95 %	Prévalence estimée la plus élevée	IC 95 %
France	1,1	NR	4,7	4,36-5,04
Thaïlande	-	-	5,7	NR
Pays-Bas	-	-	5,8	NR
Hong-Kong	3,7	2,0-5,2	6,6	NR
Italie	-	-	7,2	6,0-9,0
Iran	-	-	7,1	6,0-13,0
Afrique du Sud	-	-	8,1	NR
Norvège	-	-	8,4	7,9-9,4
Bangladesh	-	-	8,5	7,0-10,0
Turquie	6,3	NR	10,2	6,0-9,0
Singapour	2,3	0,8-3,9	11,0	9,7-12,3
Israël	2,9	NR	11,4	NR
Chine	0,8	NR	11,5	NR
Allemagne	-	-	12,5	10,7-14,5
Australie	4,4	3,6-5,1	13,0	11,0-16,0
Pakistan	-	-	13,3	4,0-62,0
Canada	-	-	13,5	10,2-14,0
Japon	6,1	5,0-7,0	14,0	NR
Espagne	3,3	2,1-4,9	14,1	10,0-18
Roumanie	-	-	14,4	11,9-19,0
Suède	12,5	9,0-18,0	15,0	NR
Corée du Sud	6,6	2,0-11,0	15,5	12,0-19,0
Malaisie	-	-	15,6	13,0-18,0
Finlande	5,1	4,4-5,8	16,4	15,0-17,2
Brésil	-	-	17,0	12,0-23,0
Nouvelle-Zélande	3,3	2,1-4,5	18,8	16,3-21,3
Russie	-	-	19,0	17,0-22,0
Colombie	-	-	19,9	16,7-23,3
Etats-Unis	3,0	NR	20,4	16,7-24,2
Taiwan	17,5	NR	22,1	NR
Angleterre	6,1	NR	21,6	NR
Grèce	-	-	21,4	NR
Pérou	15,0	NR	24,0	21,0-28,0
Croatie	-	-	28,2	24,0-32,0
Islande	17,2	14,4-19,9	30,9	28,0-33,0
Nigeria	-	-	31,6	27,0-36,0

**Tableau 5. Prévalence estimée du SII par pays : limites et analyses par pays.** IC : Intervalle de confiance, NR : Non rapporté (d'après Canavan et al., 2014) [32].

#### 1.1.4.3 Prévalence en soins primaires

Les estimations de la proportion de patients avec un SII qui consultent un médecin pour leurs symptômes varient entre 10 % à 70 % [41, 42]. En Angleterre, la prévalence est de 30 % à 50 % et varie également en Allemagne mais de façon plus importante où elle est comprise entre 10 % et 50 % [41, 43-45]. En effet, en interrogeant les sujets s'ils se rappellent avoir consulté un médecin pour leurs symptômes, la proportion de patients varie de façon importante selon le pays européen [32]. La proportion la plus importante se situe en Italie avec 50 % et la plus faible en France, Suisse et en Espagne avec 10 % [41]. Une limitation de ces études vient du fait qu'elles reposent sur le souvenir

des sujets, néanmoins les différences observées pourraient refléter des différences dans les critères diagnostiques employés, l'acceptabilité des symptômes perçus et la facilité d'accès aux soins qui peuvent varier selon le système de santé [32]. Les études américaines rapportent uniformément une proportion de 30 % de sujets consultant pour leurs symptômes et 80 % d'entre eux sont diagnostiqués avec un SII-D [41, 46]. De plus, le SII représente à lui seul aux Etats-Unis 40 % des motifs de consultation en gastro-entérologie [47]. En outre, la comorbidité psychiatrique chez les patients avec un SII (dépression majeure, trouble d'anxiété et troubles somatoformes) concerne 48 % à 60 % des patients suivis en consultation gastro-entérologique et jusqu'à 70 % des patients suivis dans les centres de soins tertiaires [48, 49]. Enfin, il n'existe pas de différences significatives dans les symptômes gastro-intestinaux entre les patients qui consultent et ceux qui ne le font pas [50]. Parmi ceux qui consultent, des scores de douleur plus élevés, des niveaux plus élevés d'anxiété ainsi qu'une réduction plus importante de la qualité de vie sont présents [51].

### **1.1.5 Marqueurs et facteurs de risque**

La prévalence du SII est tout d'abord plus importante chez les femmes que chez les hommes avec un rapport compris entre 1,5 à 3 pour 1 [3, 52, 53]. De plus, la prévalence globale mondiale du SII chez la femme est 67 % plus importante que chez les hommes (OR=1,67 ; IC 95 % : 1,53-1,82). Néanmoins cette différence relative correspond à une différence absolue de seulement 5 % entre les sexes, avec une prévalence chez la femme de 14 % (IC95 % : 11,0-16,0) en comparaison à celle des hommes de 8.9 % (IC95 % : 7,3-10,5) [54]. Le SII survient dans tous les groupes d'âge, incluant les enfants et les personnes âgées et aucune différence n'a été observée en termes de fréquence des sous-types par âge [55, 56]. Cependant, 50 % des patients avec un SII rapporte avoir perçu la première survenue des symptômes avant l'âge de 35 ans [40]. Cette prévalence est 25 % plus faible chez ceux âgés de plus de 50 ans [57]. Ces données pourraient suggérer une rémission du SII avec le temps, idée contraire à celle actuellement et généralement acceptée que le SII présente un caractère chronique, dans la mesure où sa prévalence n'est pas constante ou croissante avec l'âge [32]. Un faible statut socio-économique a également été avancé comme facteur de risques en montrant son association avec le SII par Drossman et al. (1993) [46]. Association par ailleurs soutenue par la théorie établissant qu'un faible revenu est associé avec de plus faibles résultats des soins de santé, une moindre qualité de vie et davantage de facteurs de stress [58]. De plus, l'absence d'emploi et le statut marital (non marié) ont été rapportés comme étant associés au SII [59]. Cependant, ces résultats sont en contradiction avec ceux des études menées ultérieurement et concluant qu'appartenir à un groupe socio-économique élevé durant l'enfance est associé avec une plus grande prévalence de SII [60, 61]. L'étude de Grodzinsky et al. (2012) étaye ces conclusions montrant une proportion plus importante du SII chez les sujets occupant des postes de cadres

spécialistes ou gestionnaires percevant un niveau de stress plus élevé que les fonctions manuelles [62]. Cette étude confirme également les arguments d'études précédentes concluant que le SII est un trouble de l'industrialisation et de l'urbanisation, tel que cela est observé en Asie, Amérique du Sud et Afrique [63]. De plus, ces résultats s'expliqueraient par le fait que les groupes à plus hauts revenus possèdent un accès facilité aux services de soins permettant le diagnostic ou qu'ils sont sujets à une plus grande internalisation du stress [64, 65]. Enfin, les antécédents familiaux sont considérés comme un facteur de risque de SII puisqu'avoir un parent diagnostiqué double le risque relatif d'apparition de ce syndrome [66]. Les études de jumeaux montrent qu'avoir une mère ou un père avec un SII est un facteur de risque indépendant d'apparition [67]. Néanmoins, la concordance des jumeaux monozygotes, c'est-à-dire la proportion de paires de jumeaux qui présentent tous les deux un SII, est inférieure à 20 % et l'association observée est significativement réduite en partitionnant les données ou *data-clustering* par famille après ajustement par la somatisation [67-69]. Ces résultats pourraient suggérer que le facteur de l'hérédité pourrait être plus étroitement lié au comportement acquis qu'à des facteurs génétiques [70].

### **1.1.6 Enjeux de santé publique**

Tout d'abord, le SII constitue un véritable fardeau pathologique pour les patients qui présentent une diminution significative de la qualité de vie liée à la santé mesurée par le score de qualité de vie HRQOL, en comparaison avec des sujets sains ou des patients présentant un reflux gastro-œsophagien, diabétiques ainsi que des patients atteints de pathologies rénales en phase terminale [71, 72]. De plus, une étude canadienne rétrospective et naturaliste d'une durée d'un an a confirmé cette diminution globale de la qualité de vie des patients en mesurant le score au questionnaire validé de qualité de vie pour le SII (IBS-QOL) [73, 74]. Cette étude a révélé que l'évitement alimentaire et l'inquiétude liée à leur état de santé constituaient les préoccupations majeures des patients [74]. La qualité de vie dans le SII est liée à la douleur abdominale, les symptômes extra-intestinaux et les craintes liées à leur état de santé [71,75]. Les autres symptômes gastro-intestinaux et facteurs démographiques (âge, genre, statut marital) ne prédisent en effet pas de façon significative le HRQOL dans le SII [76]. Des travaux concernant d'autres indicateurs de la recherche de soins de santé pour un SII mettent l'accent sur des variables psychologiques comme anxiété, dépression, maltraitance, troubles du comportement, somatisation et préoccupations concernant la santé [77, 78]. En outre, les marqueurs de la sévérité du SII, pouvant être estimée par le score HRQOL générique, incluent la douleur abdominale, les ballonnements, l'effort ou l'urgence à la défécation, les myalgies ainsi que les inquiétudes liées à l'état de santé [76, 79]. Le SII diminue également la qualité de vie des patients en affectant significativement leurs interactions sociales et leurs opportunités professionnelles [80]. D'autre part, le SII représente un fardeau

économique en Europe ou aux USA en raison d'une part des coûts directs des soins de santé et d'autre part des coûts indirects liés à l'absentéisme au travail et à la diminution de la productivité professionnelle [41, 81-84]. Une revue publiée en 2006 et conduite aux USA et en Angleterre a montré que les coûts directs totaux par patient étaient compris entre 348 US\$ et 8 750 US\$ et ceux indirects entre 355 US\$ et 3 344 US\$ en 2002 [85]. De plus, le nombre moyen de jours d'arrêts de travail dû au SII était compris entre 8,5 et 21,6 jours [85]. En outre, l'étude de Hungin et al. (2005) a montré que le nombre moyen d'arrêts de travail connu était de 6,4 jours chez les patients avec un SII en comparaison à 3 jours chez des sujets non diagnostiqués pour un SII [41]. Ce résultat est par ailleurs cohérent avec ceux précédemment publiés par Drossman et al. (1993) établissant un ratio de 3:1 du nombre d'arrêts de travail entre les sujets diagnostiqués ou non pour un SII [86]. Plus récemment, Sethi et al. (2013) ont montré que la prévalence élevée du SII est associée aux USA avec des coûts directs et indirects totaux de 20 milliards US\$ correspondant à 3,5 millions de consultations médicales par an devenant une des causes majeures d'absentéisme professionnel [87]. En raison des différentes symptomatologies du SII dues à l'existence des sous-types, de récents travaux ont également porté une attention particulière sur le coût des soins engendré par un SII-C [88-90]. Une étude publiée en 2011 a estimé que les coûts incrémentiels de ce sous-type du SII étaient de 5 441 US\$ supérieurs à ceux des sujets contrôles suivis dans un établissement de santé [88]. L'analyse rétrospective de Doshi et al. (2014) estime plus précisément l'ensemble de tous les coûts de santé annuels incrémentiels associés au SII-C à un montant différentiel de 3 856 US\$ en comparaison à ceux générés par un sujet contrôle après ajustement des données démographiques (8 621 US\$ versus 4 765 US\$,  $P < 0,01$ ) [89]. C'est dans ce cadre que la revue systématique publiée par Fortea et Prior (2013) sur la morbidité du SII-C en Europe (France, Espagne, Italie, Allemagne, Angleterre) conclut, au vu du coût substantiel engendré par ce sous-type du SII, et alors que sa prévalence européenne est très variable comprise entre 1 % et 44 %, la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le SII efficaces, bien tolérées, et avec un impact positif sur le HRQOL [90]. Enfin, comparés à la population générale, les patients avec un SII ont recours deux fois plus aux services de santé, même pour des symptômes extra-intestinaux [91-93]. Ils ont en effet davantage recours aux actes chirurgicaux incluant cholécystectomie, appendicectomie et hystérectomie [91-93].

## **1.2 Rôle physiopathologique du microbiote intestinal**

### **1.2.1 Méthodes d'étude du microbiote intestinal**

Le microbiote désigne la population entière de micro-organismes colonisant un environnement spécifique et inclue non seulement les bactéries, mais également les champignons, archées, virus, et protozoaires [94]. Au fil de la dernière décennie, l'étude du microbiote intestinal a connu un intérêt

grandissant au sein de la communauté scientifique dans la mesure où son altération a été associée à diverses pathologies intestinales telles que le SII ou les MICI, les pathologies métaboliques (obésité, diabète) ou encore les allergies [95-98]. L'étude du microbiote intestinal, anciennement appelé flore intestinale, a tout d'abord pu débiter dans les années 70 grâce aux méthodes basées sur l'anaérobiose et la culture *in vitro* ayant permis d'isoler, d'inventorier différentes espèces bactériennes anaérobies du microbiote fécal humain et d'estimer à environ 400 le nombre d'espèces différentes qui la composeraient d'après la méthode de calcul de « coverage » publiée par Good (1953) [99-103]. Ces travaux précurseurs ont permis d'identifier dans un premier temps les genres bactériens anaérobies dominants du microbiote fécal humain cultivable représentés par les genres principaux suivants : *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Ruminococcus* et *Clostridium* [99-102]. Ces techniques ont par la suite été délaissées au profit d'approches moléculaires indépendantes de la culture et utilisant l'analyse de séquence d'ADN ou d'ARN ribosomiale 16S (ADNr 16S ou ARNr 16S) d'origine fécale obtenus d'après les travaux pionniers d'écologie moléculaire de Wilson et al. (1996) et Zoedental et al. (1998) [104, 105]. Basée sur l'analyse de la séquence du gène codant l'ARNr 16S obtenus par réaction en chaîne par polymérase ou *polymerase chain reaction* (PCR), l'étude de Zoedental et al. (1998) avait notamment permis de montrer que la diversité des espèces dominantes du microbiote fécal est d'une part très différente d'un individu à l'autre et d'autre part stable dans le temps chez un sujet sain et que cette stabilité peut s'observer durant des mois [105]. Des travaux ultérieurs ont confirmé ces résultats en étendant cette stabilité intra-individuelle à plusieurs années [106, 107]. Les premiers inventaires moléculaires basés sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S ont pu être effectués en utilisant la méthode de séquençage de Sanger [108]. Les méthodes moléculaires utilisées pour étudier la diversité du microbiote intestinal incluent la PCR quantitative (qPCR), l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) ou à gradient de température (TGGE), le polymorphisme de longueur de fragments de restriction terminaux (T-RFLP) et l'hybridation in situ par fluorescence (FISH). Puis des avancées technologiques ont permis une analyse plus approfondie de la diversité phylogénétique complète du microbiote intestinal durant la dernière décennie par l'avènement de techniques de séquençage haut débit ou *high-throughput sequencing* (HTS), également appelé *next generation sequencing* (NGS), comme le pyroséquençage (454 Roche), et des biopuces phylogénétiques [109-112]. Ces travaux basés sur l'inventaire moléculaire des séquences d'ARNr 16S ont ainsi permis de montrer que 70 % des bactéries du microbiote intestinal humain ne sont pas cultivables et que les deux tiers des espèces dominantes observées dans le microbiote fécal sont propres à un individu [108, 109]. Avec l'arrivée des méthodes de séquençage NGS, l'étude du microbiote est réalisée actuellement en deux étapes consistant d'abord en une analyse métagénomique par séquençage des gènes bactériens codant pour l'ARNr 16S puis à réaliser une analyse bioinformatique au vu du volume important de données générées [110, 113]. La

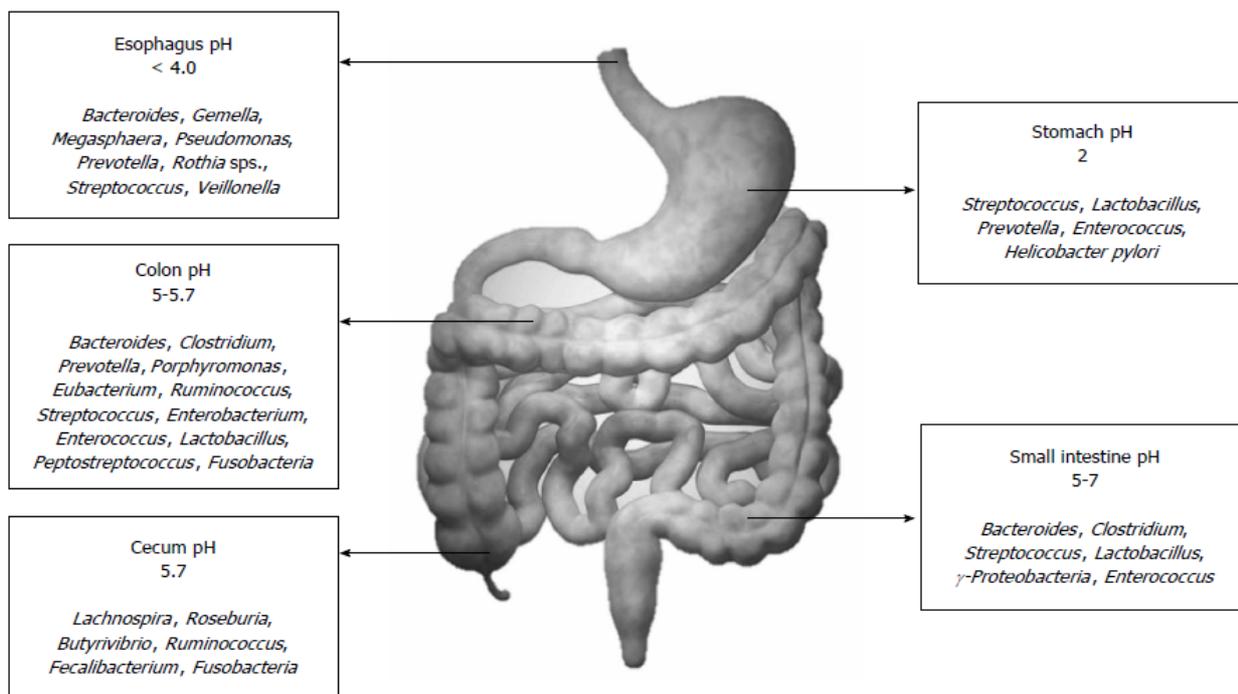
séquence d'ADNr 16S est un gène de petite taille (1,5 kb) et hautement conservé avec 9 sites hypervariables, permettant ainsi la classification phylogénétique des espèces bactériennes [114]. Les régions communes pour l'identification bactérienne dans l'ARNr 16S étant V3, V4, V6 et V8 [115]. Les études métagénomiques ayant eu recours ensuite à la méthode du séquençage en *shot-gun*, permettant de séquencer des gènes d'une taille supérieure à 1000 pb, ont permis d'aller plus loin que l'analyse phylogénétique basée sur les études de l'ARNr 16S et de fournir une vision de la capacité fonctionnelle potentielle de l'écosystème microbien intestinal [116-118]. Toutefois, bien que les techniques de séquençage NGS fournissent un volume important de données avec une précision comprise entre 98 % et 99,9 %, une récente étude a montré que le séquençage était sujet à des erreurs dues en particulier aux méthodes employées pour établir l'inventaire et au choix des amorces ou *primers* employées pour générer les amplicons [119-121]. La variabilité observée des résultats du séquençage de gènes codant pour l'ARNr 16S selon les différents centres de séquençage, que ce soit pour les taxa dominants ou mineurs, pourrait également être due aux choix différents concernant les amorces utilisées [122].

### **1.2.2 Composition du microbiote intestinal humain**

Depuis les premières estimations portant à 400 le nombre d'espèces bactériennes fécales humaines, un nombre compris entre 500 et 1000 espèces différentes composant le microbiote intestinal humain avait été proposé mais une étude publiée par Franck et al. (2007) sur une large cohorte a estimé que le microbiote intestinal humain comprendrait jusqu'à 35 000 espèces différentes [109, 123-125]. Plus récemment, et dans le but de comprendre la complexité du microbiote humain incluant celui de l'intestin, les projets MetaHIT et HMP ont collaboré, au moyen d'un séquençage à large échelle, pour tenter d'établir un niveau de base d'un microbiote chez un humain sain et comment celui-ci est altéré en situation pathologique [118, 126-128]. Le projet MetaHIT a notamment montré que 40 % des gènes étaient partagés par la majorité des individus, représentant de ce fait un noyau commun du métagénome bactérien, et que 99,1 % des gènes étaient d'origine bactérienne appartenant au règne des archées avec un nombre relativement faible de gènes eucaryotes ou viraux détectés [118]. De plus, ces projets ont permis d'avancer qu'il existerait plus de 10 millions de gènes non redondants dans le microbiome, correspondant à l'ensemble des gènes collectés d'un microbiote donné, démontrant ainsi la variabilité inter-individuelle très large des espèces bactériennes du microbiote humain [118, 126-128]. Les résultats des études destinées à décrire un microbiote intestinal humain sain et basées sur des méthodes de séquençage HTS ont également montré des résultats divergeant selon l'âge, le lieu d'habitation et le régime alimentaire. Ces résultats sont également sujets à discussion en raison de la variabilité des méthodes moléculaires et d'analyses employées [118, 129-134]. L'étude de Turnbaugh et al. (2010) soutient l'importance de la variation inter-individuelle en établissant que les microbiotes fécaux de jumeaux monozygotes

partagent moins de 50 % d'espèces bactériennes et l'existence d'une importante stabilité temporelle générale du microbiote intestinale chez un individu donné, établi par plusieurs récents travaux, semble confirmer l'existence d'un noyau métagénomique individuel de la communauté bactérienne [135-138]. Néanmoins, un consensus actuel se basant sur les séquençages HTS de l'ARNr 16S semble se dégager sur le fait qu'un microbiote intestinal humain sain est constitué de façon dominante par deux phyla *Bacteroidetes* et *Firmicutes* et par d'autres phyla incluant *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* et *Fusobacteria* présents en proportions plus faibles [109, 139, 140]. Bien qu'il existe des variations plus importantes en dessous du niveau du phyla, l'étude de Qin et al. (2010) du projet MetaHIT a identifié certaines bactéries productrices de butyrate, incluant *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* et *Bacteroides uniformis* comme étant des espèces clés d'un microbiote intestinale adulte [118]. De l'œsophage au rectum, il existe une importante variation dans la diversité et le nombre des bactéries résidentes comprises entre  $10^1$  bactéries par gramme de contenu dans l'œsophage et l'estomac pour arriver à  $10^{12}$  par gramme de contenu dans le côlon (Figure 2) [141]. *Streptococcus*, apparaît être le genre dominant dans l'œsophage distal, duodénum et jéjunum et *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) le genre dominant dans l'estomac [142-145]. Il a en effet été montré que si *H. pylori* n'appartient pas au microbiote commensal de l'estomac en tant que genre dominant, il existe une diversité et un relais de dominance exercés par d'autres genres tels que *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella* et *Rothia* qui pourrait conférer à *H. pylori* son phénotype pathogénique [144, 145]. Enfin, le côlon, qui de loin est l'organe le plus colonisé du tractus gastro-intestinal contenant à lui seul 70 % de tous les micro-organismes du corps humain, est principalement colonisé par deux phyla dominants *Bacteroidetes* et *Firmicutes* représentant au moins  $\frac{3}{4}$  du microbiome humain [109, 146, 147]. Le ratio *Firmicutes* : *Bacteroidetes* et ses variations ont été impliqués dans l'obésité et de façon plus récente dans le SII bien que ce marqueur fasse débat dans la mesure où une variabilité significative de ce ratio existe chez les sujets sains [113, 148-150]. Le côlon héberge des espèces bactériennes pathogènes avec une faible abondance, représentant moins de 0,1 % du microbiote intestinal, telles que *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Bacteroides fragilis* [127, 151]. Une faible abondance colique du phyla *Proteobacteria* associée à une abondance des genres *Bacteroides*, *Prevotella* et *Ruminococcus* pourrait caractériser un microbiote intestinal sain [152]. Le groupe de travail MetaHIT a par ailleurs proposé une autre méthode de classification du microbiote intestinal basée sur l'identification d'espèces bactériennes regroupées au sein de relations symbiotiques bactérie-hôte stables du point de vue fonctionnel indépendamment du genre et de la géographie, pouvant répondre différemment à l'alimentation et aux médicaments, et portant le nom d'entérotypes [126]. Ainsi, trois entérotypes ont pu être définis et dont les noms sont représentatifs du genre dominant qui sont *Bacteroides* (entérotipe 1), *Prevotella* (entérotipe 2) et *Ruminococcus* (entérotipe 3) qui serait l'entérotipe le plus fréquent comprenant également une

cohabitation avec le genre *Akkermansia* [126]. L'entérotype 1 présente en particulier des propriétés saccharolytiques, par la mise en évidence de gènes codant pour des enzymes tels que des protéases, hexosaminidases et galactosidases. L'entérotype 2 se caractérise par des propriétés de dégradation des mucines (glycoprotéines) et l'entérotype 3 est associé également à la dégradation des mucines ainsi qu'au transport membranaire des glucides [127]. Cependant, cette classification serait remise en question dans la mesure où la distinction de l'entérotype 3 initialement émise reste discutable [153, 154].



**Figure 2. Distribution des genres bactériens composant le microbiote intestinal du sujet sain** (d'après Jandhyala et al., 2015) [113].

Ce système de classification ne tient pas compte et ne pourrait pas expliquer la variabilité inter-individuelle de la distribution relative des différentes classes de bactéries. En effet, dans la mesure où *Bacteroides* et *Prevotella* ne sont pas présents dans des proportions équivalentes, le concept d'un entérogradient basé sur la dominance d'un genre sur l'autre pourrait constituer un autre concept de définition tenant davantage compte de la distribution inter-individuelle des différentes classes bactériennes [153, 155]. Enfin les espèces bactériennes associées à la muqueuse intestinale et colonisant le mucus diffèrent des espèces luminales détectées dans les selles et bien qu'il existe une stabilité temporelle et intra-individuelle du microbiote intestinal démontrée sur plusieurs années, la composition du microbiome des adultes sains diffère de celle des sujets âgés (> 65 ans) qui présentent généralement une diminution du ratio *Firmicutes* : *Bacteroidetes* [109, 156, 157].

### 1.2.3 Fonctions physiologiques du microbiote intestinal

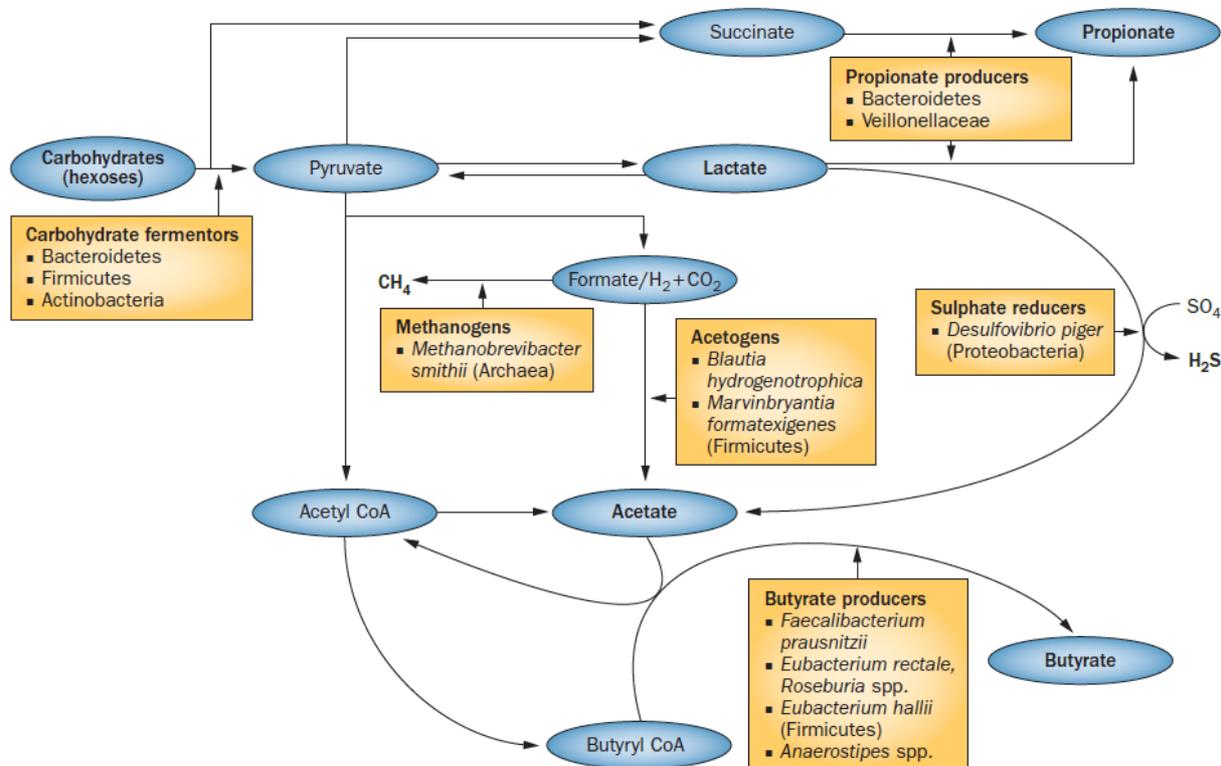
Chez un sujet sain, le microbiote intestinal maintient une relation symbiotique avec la muqueuse intestinale afin d'assurer des fonctions essentielles du métabolisme nutritionnel et de détoxification, dans la protection de l'hôte face aux agents pathogènes et l'immunomodulation ainsi que dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale [94, 113, 158]. De plus, de récents travaux ont mis en évidence un système de communication bidirectionnelle et neuro-hormonale entre le microbiote intestinal et le système nerveux central dénommé l'« axe cerveau-intestin » [159, 160].

#### 1.2.3.1 Fonctions métaboliques

##### 1.2.3.1.1 Métabolisme nutritionnel

Alors que le microbiote de l'intestin grêle, moins abondant et sujet à de plus grandes variations que le microbiote colique, est chargé de la fermentation des oses, celui du côlon, plus abondant, stable et diversifié assure la fermentation anaérobie des glucides complexes comprenant les polysaccharides (cellulose, hémicellulose, pectine), l'amidon résistant à l' $\alpha$ -amylase, des oligosaccharides ou des sucres-alcool non assimilés par l'intestin [161, 162]. Cette chaîne trophique de fermentation des glucides dans le côlon humain, considérée comme étant une activité clé du microbiote intestinal, est assurée par plusieurs groupes bactériens possédant des activités différentes et complémentaires (Figure 3) [161, 163]. Ainsi, les espèces dominantes du côlon, incluant les espèces productrices d'acides gras à courte chaîne (AGCC), jouent un rôle majeur dans l'initiation de la dégradation des polysaccharides et collaborent avec les espèces chargées de la fermentation des oligosaccharides [164]. Les AGCC tels que l'acétate, le propionate et le butyrate, retrouvés dans des proportions molaires d'échantillons fécaux humains normaux d'environ 3 : 1 : 1, exercent différents effets chez l'hôte en tant que source majeure d'anions dans le côlon et d'énergie pour l'organisme hôte [158]. Le butyrate est principalement consommé par l'épithélium colique alors que propionate rejoint le foie et l'acétate la circulation systémique [158, 165]. Le butyrate et le propionate sont impliqués dans la régulation de l'immunité, le maintien de la barrière épithéliale ainsi que la motilité intestinale alors que l'acétate sert de substrat dans la lipogenèse et la néoglucogenèse [158, 165, 166]. Les gaz, et en particulier le  $H_2$ , vont être utilisés par les espèces hydrogénotrophes méthanogènes, acétogènes ou sulfato-réductrices [109, 167]. Les principaux genres bactériens dominants du côlon qui produisent les AGCC à partir du pyruvate sont *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* et *Eubacterium* [168, 169]. Mais le pyruvate peut également être le précurseur de métabolites intermédiaires dans la synthèse des AGCC comme le lactate produit par les bactéries lactiques (LAB) du côlon et destiné aux bactéries utilisatrices de lactate telles que les espèces dominantes du côlon *Eubacterium hallii* et *Anaerostipes spp* appartenant au phylum des *Firmicutes* [158, 170]. Cette voie permet en outre de prévenir une accumulation potentiellement toxique de D-lactate [158, 170]. Les métabolites issus de la fermentation des acides aminés (AA) alimentaires ou endogènes

sont plus diversifiés que ceux issus de la fermentation des glucides et incluent des substances potentiellement toxiques ou carcinogènes telles que des nitrosamines, amines et crésol [158]. De plus, le microbiote intestinal exerce une influence positive sur le métabolisme lipidique, notamment en inhibant l'activité de la LPL dans le tissu adipeux ou en activant l'expression génique d'une colipase nécessaire au fonctionnement de la lipase pancréatique [171, 172].



**Figure 3. Groupes phylogénétiques et fonctionnels des bactéries intestinales impliquées dans le métabolisme des acides gras à courte chaîne (AGCC).** Cette figure montre un schéma du microbiote intestinal impliqué dans le métabolisme des AGCC. Acétate et lactate sont représentés en tant que métabolites intermédiaires. Les phyla et espèces représentés sont indiqués d'après les résultats des études de cultures de micro-organismes. Bien que la plupart des bactéries du côlon utilisent la voie Embden-Meyerhof du métabolisme des hexoses, le genre bactérien *Bifidobacterium* utilise la voie du « shunt bifide » (non montré ici) (d'après Macfarlane et al., 1997) [161].

En outre, d'autres espèces bactériennes, appartenant aux genres *Bacteroides* et *Bifidobacterium*, ont démontré leur capacité à stimuler la synthèse de CLA ainsi qu'à déconjuguer et déshydrogéner les acides biliaires primaires pour les convertir en acides biliaires secondaires (acides désoxycholique et lithocholique) [173, 174]. Sur le plan nutritionnel également, une autre fonction majeure du microbiote intestinal est sa capacité à synthétiser certaines vitamines du groupe B (thiamine, riboflavine, pantothenate, biotine, folate), ainsi que les vitamines C et K2 [116, 164, 175]. En exprimant l'isoforme CYP27B1 de la cytochrome P-450, le côlon fait partie des organes assurant la conversion extra-rénale du métabolite de la vitamine D (25-hydroxycholecalciferol ou [25(OH)D]) en calcitriol (1 $\alpha$ ,25(OH)2D) [176]. Les taux sanguins de vitamine D mesurés chez l'homme montrent une carence avérée soutenant le rationnel d'une supplémentation en vitamine D

récemment reconnue comme un facteur important en santé humaine [176]. Il a été démontré que l'expression du récepteur de la vitamine D par les cellules épithéliales joue un rôle dans la protection intestinale de l'inflammation et de la carcinogenèse [176, 177]. De plus, la vitamine D, qui joue un rôle essentiel dans l'intégrité des cellules épithéliales et de la réponse immunitaire innée, exercerait un rôle régulateur dans la composition du microbiote [176, 178]. Une déficience en vitamine D est ainsi associée à un risque augmenté de cancer associé à des colites, MICI et une prévalence élevée de cette déficience chez les patients avec un SII a été récemment démontrée par Kayat et al. (2015) [179, 180]. Enfin, de nombreuses études ont démontré que le microbiote intestinal était responsable de l'activation biologique des polyphénols apportés par l'alimentation en les convertissant d'une forme glycosylée à une forme aglycone [181-183].

#### 1.2.3.1.2 Métabolisme des xénobiotiques

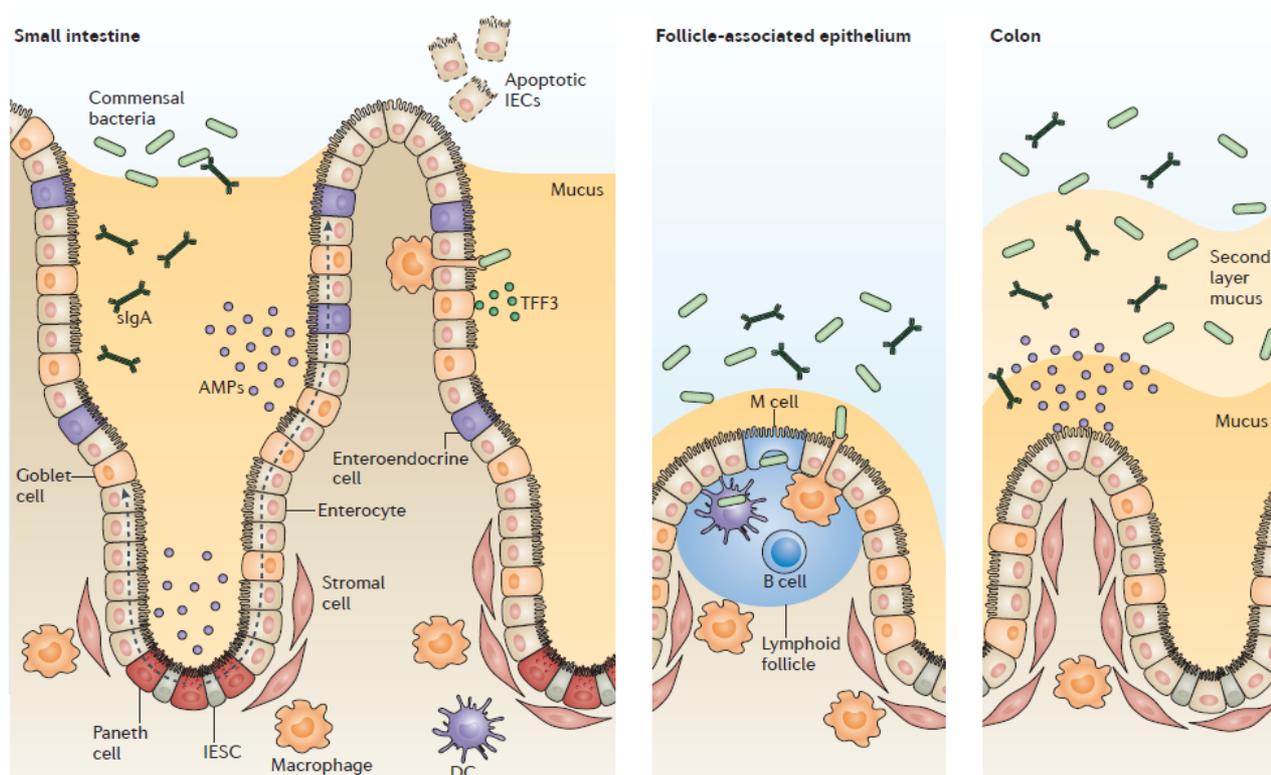
Les variations du microbiome intestinal ont été associées à la modulation des phénotypes métaboliques chez l'homme et aux différentes communautés bactériennes capables d'exercer différents degrés d'influence sur la présence de divers métabolites [184]. Ces différences inter-individuelles du microbiome intestinal donnant lieu à des différences du métabolome intestinal pourrait expliquer les variations de la tolérance relative à des traitements médicamenteux courants suivis par des patients de régions géographiques ou de cultures différentes [185]. Il a ainsi été démontré que la digoxine stimulait l'activation d'un opéron contenant un cytochrome dans une espèce bactérienne intestinale, *Eggerthella lenta* appartenant au phylum des *Actinobacteria*, résultant en une inactivation de la digoxine [186]. Plus récemment, il a également été montré que la  $\beta$ -glucuronidase bactérienne est responsable de la toxicité d'un traitement anticancéreux (irinotecan) et que le p-crésol diminue la capacité du foie à métaboliser l'acétaminophène par inhibition compétitive au niveau des sulfotransférases hépatiques [187, 188].

#### 1.2.3.2 Microbiote et homéostasie intestinale

##### 1.2.3.2.1 Interactions du microbiote avec l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est la plus large des surfaces mucosales de l'organisme couvrant une superficie d'environ 400 m<sup>2</sup> avec une seule couche de cellules organisées en crypte et en villi (Figure 4) [189]. Les cellules épithéliales intestinales (IEC), qui appartiennent au système immunitaire entérique, jouent un rôle clé dans la coexistence des micro-organismes avec l'hôte en assurant une ségrégation physique et biochimique entre les communautés microbiennes luminales et les cellules immunitaires mucosales tout en étant capable de détecter et de répondre aux stimuli bactériens afin de participer d'une part à la coordination de réponses immunitaires appropriées et d'autre part de renforcer leur fonction barrière [189]. Les IEC sécrétrices incluant les cellules entéroendocrines, caliciformes et de Paneth sont spécialisées pour le maintien des fonctions digestives et de barrière de l'intestin [189]. Les cellules entéroendocrines assurent tout d'abord le

lien entre les systèmes nerveux central (SNC) et entériques (SNE) par la sécrétion de diverses hormones régulatrices de la fonction digestive [189]. Les sécrétions luminales de mucines par les cellules caliciformes et de peptides anti-microbiens (AMP) par les cellules de Paneth principalement, constituent une barrière physique et biochimique au contact microbien avec la surface épithéliale et les cellules immunitaires sous-jacentes [190, 191]. La sécrétion luminaire de mucines hautement glycosylées constitue la première ligne de défense contre l'invasion de micro-organismes pathogènes et la plus abondante de ces mucines, MUC2, joue un rôle essentiel dans l'organisation des deux couches, interne et externe, de mucus de l'intestin à la surface épithéliale du côlon [190, 192]. La couche interne, plus dense, ne contient aucun micro-organisme alors que la couche externe, dynamique, fournit les glycanes utilisés comme substrats énergétiques par le microbiote intestinal commensal en plus des glucides faiblement absorbés par l'intestin grêle [190, 192].



**Figure 4. La barrière de cellules épithéliales intestinales (IEC).** Les IEC forment une barrière physique et biochimique qui maintient la ségrégation entre les communautés microbiennes luminales et le système immunitaire mucosale. La niche de cellules souches épithéliales intestinales (IESC), incluant les cellules épithéliales, stromales et hématopoïétiques, contrôlent le renouvellement continu de la couche de cellules épithéliales par les cellules souches de la crypte. Les IEC différenciées, à l'exception des cellules de Paneth, migrent selon l'axe crypte-villus, comme indiqué par les flèches hachurées. Les sécrétions de mucus par les cellules caliciformes ou *goblet cell* et de peptides antimicrobiens (AMP) par les cellules de Paneth assurent l'exclusion de bactéries de la surface épithéliale. La transcytose et la libération luminaire d'IgA sécrétoire (IgAs) contribuent également à cette fonction barrière. Les cellules M ou *Microfold cells* et les cellules caliciformes assurent le transport d'antigènes luminaux et de bactéries vivantes à travers la barrière épithéliale aux cellules dendritiques (DC), et les macrophages de l'intestin sondent la lumière par des dendrites transépithéliales. TFF3 : trefoil factor 3 (d'après Peterson et al., 2014) [189].

Ces glycanes permettent également l'adhésion des bactéries commensales et divers oligosaccharides de mucines ont montré leur capacité à promouvoir une relation symbiotique avec le microbiote commensal et à éluder les bactéries pathogènes [190, 193]. De plus, les cellules caliciformes sécrètent diverses protéines capables d'augmenter la stabilité du réseau des polymères de mucines MUC2, telles que les facteurs TFF3 de l'intestin (trefoil factor 3) et Fcgbp (Fc- $\gamma$  binding protein), ainsi que la cytokine (RELM)- $\beta$  (resistin-like molecule- $\beta$ ) augmentant l'expression génique de MUC2 [189, 190]. Les AMP sont actifs contre une grande variété de micro-organismes incluant les bactéries à Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>, parasites, champignons et les virus enveloppés [194]. Bien que les entérocytes de l'intestin grêle et du côlon humain soient capables de synthétiser des AMP, tels que les  $\beta$ -défensines et les isoformes REGIII $\alpha$  et  $\gamma$  de la famille des lectines de type C, les cellules de Paneth produisent de plus la majorité des autres AMP incluant les  $\alpha$ -défensines, cathelicidines et lysozymes dans les cryptes de l'intestin grêle ou cryptes dites de Lieberkhün [191, 195, 196]. Ces AMP perturbent les caractéristiques bactériennes essentielles et hautement conservées telles que la surface membranaire, rompue par des cathelicidines et défensines porogènes, et les peptidoglycanes (PGN) de l'enveloppe des bactéries à Gram<sup>+</sup> reconnus par des lectines de type C telles que REGIII $\alpha$  et  $\gamma$  [191, 196]. De façon similaire à MUC2 dans le côlon, REGIII $\gamma$  limite dans l'intestin grêle le contact direct entre les bactéries et l'épithélium intestinal assurant ainsi la tolérance au microbiote intestinal [197]. Le rôle bactéricide porogène de REGIII $\alpha$  a quant à lui été récemment mis en évidence par Mukherjee et al. (2014) démontrant également son inhibition par le lipopolysaccharide (LPS) et expliquant l'action de REGIII $\alpha$  sur les bactéries à Gram<sup>+</sup> et non Gram<sup>-</sup> [196]. Les AMP permettent ainsi une régulation des bactéries pathogènes et commensales et les variations régionales de leur production selon l'axe longitudinal du tractus GI pourraient suggérer des interactions bactéries commensales – hôte restreintes anatomiquement et qui conduiraient à une régulation différentielle des réponses des IEC ou serviraient à configurer l'hétérogénéité de la composition et localisation des communautés microbiennes [189]. De plus, les IEC assurent la transcytose vers la lumière intestinale des immunoglobulines A sécrétoires (IgAs), formées d'un dimère d'IgA produit par les plasmocytes IgA<sup>+</sup> dans la *lamina propria* (LP) et qui s'est lié au récepteur à l'immunoglobuline polymérique (pIgR) située sur la membrane basolatérale des IEC [198]. Cette collaboration entre les IEC et les plasmocytes IgA<sup>+</sup> fournit une composante immunitaire adaptative à la barrière épithéliale chargée de réguler les populations bactériennes commensales pour maintenir l'homéostasie des IEC et des cellules immunitaires [189]. En plus des IEC sécrétrices, d'autres IEC appelés cellules M (Microfold cells) captent par phagocytose des substances luminales telles que des antigènes et des macromolécules ainsi que des micro-organismes commensaux ou pathogènes intacts afin de les présenter par transcytose au système immunitaire entérique sous-jacent [199]. Ces cellules M représentent environ 10 % de l'épithélium recouvrant le GALT (gut-associated lymphoid tissue) incluant les plaques de Peyer et les follicules

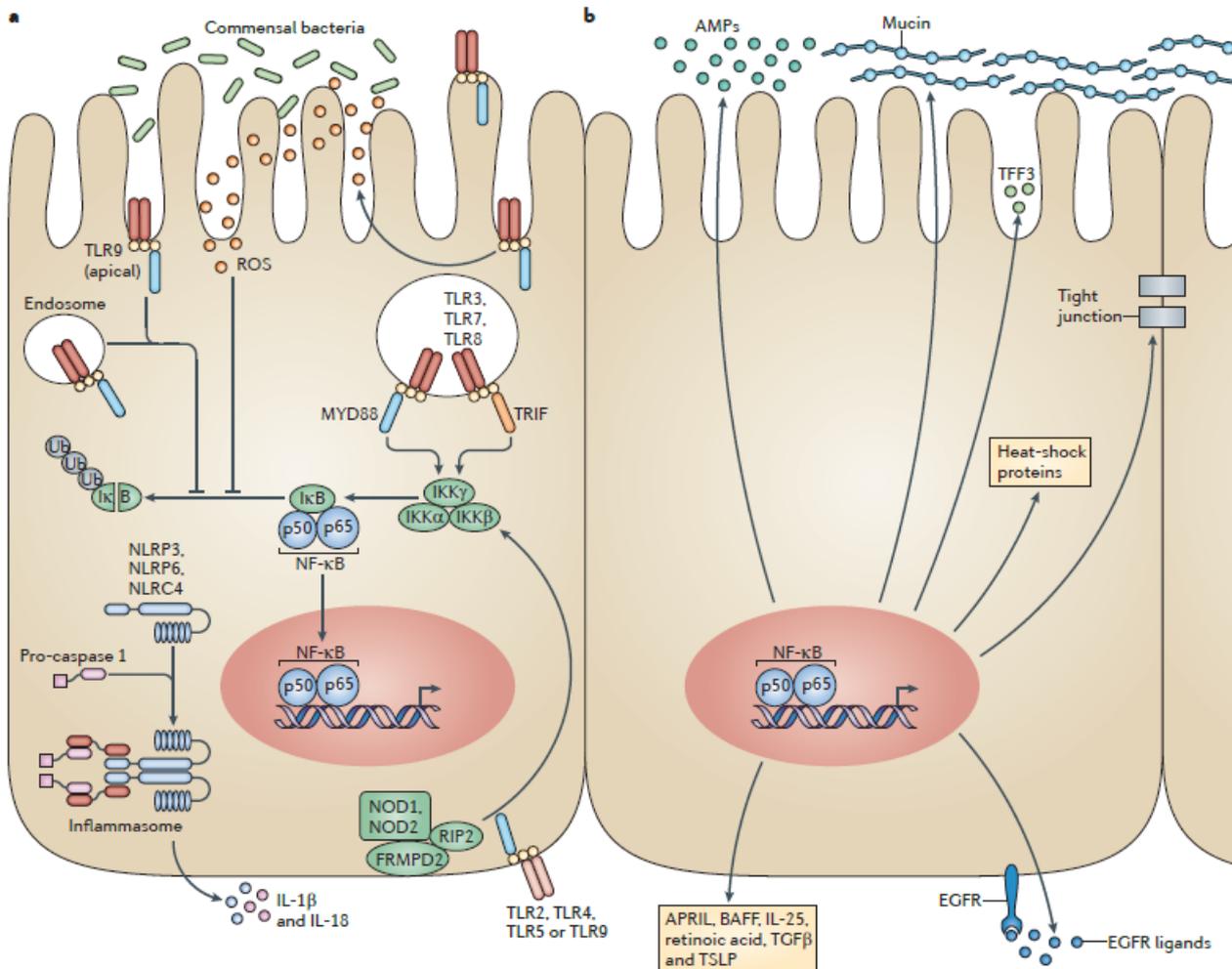
lymphoïdes isolés [189, 199]. Cette capture peut être effectuée de façon non spécifique mais également spécifique [189]. En effet, il a été démontré que la glycoprotéine GP2 apicale agit comme un récepteur à la protéine bactérienne du pilus FimH et que la transcytose de la bactérie *Salmonella enterica* est sous la dépendance de l'interaction GP2-FimH [200]. Plus récemment McDole et al. (2012) ont montré que les cellules caliciformes de l'intestin grêle sont également capables de transporter des antigènes luminaux, en particulier solubles, pour les présenter aux cellules dendritiques (DC) de la LP [201].

#### 1.2.3.2.2 Récepteurs PRR et homéostasie intestinale

La capacité du microbiote intestinal commensal à interagir avec l'hôte repose sur l'expression de récepteurs exprimés par les IEC appartenant à la famille des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires ou PRR (pattern recognition receptors) et activés par reconnaissance de motifs moléculaires hautement conservés appelés MAMP (microbe-associated molecular patterns) et PAMP dans le cas de motifs pathogènes (pathogen-associated molecular patterns) [189]. La reconnaissance des MAMP par les PRR confère un rôle de sentinelles aux IEC capables de reconnaître des ligands microbiens ou des signaux endogènes et joue un rôle central dans le maintien de leurs fonctions immunorégulatrices et de barrière [189]. Les PRR incluent d'une part les récepteurs transmembranaires TLR (Toll-like receptors) et récepteurs à la lectine de type C et d'autre part les récepteurs cytosoliques NLR ((NOD)-like receptors), ARN hélicases (RIG-I like receptor (RLR), MDA5 et LGP2) et les senseurs cytosoliques de l'ADN (DAI, AIM-2, LRRF1P1, ARN polymérase III, ARN hélicases à boîte DExD/H et IFI16) [202, 203]. Les MAMP désignent divers composants microbiens tels que PGN et acide lipotéichoïque (LTA) des bactéries à Gram<sup>+</sup> (TLR2), LPS et lipide A des bactéries à Gram<sup>-</sup> (TLR4), flagelline (TLR5), ARN double et simple brin, ADN bactérien (motifs CpG non méthylés – TLR9),  $\beta$ -glucanes de la paroi des champignons [204-206].

#### 1.2.3.2.3 Mécanismes PRR/MAMP-dépendants et homéostasie intestinale

Le « cross-talk » établi par la reconnaissance des MAMP du microbiote par les PRR de l'hôte est essentiel à l'homéostasie intestinale dans la mesure où cette relation symbiotique permet aux IEC de distinguer les bactéries commensales des pathogènes et d'enclencher des réponses immunitaires appropriées, de tolérance ou de protection face aux micro-organismes pathogènes, et au microbiote intestinal de réguler le système immunitaire entérique et de maintenir l'intégrité de la barrière intestinale (Figure 5) [189, 190, 203, 207]. Bien que l'étude des voies de signalisation des PRR ait principalement porté sur les cellules hématopoïétiques mettant en évidence leurs propriétés pro-inflammatoires, leur rôle dans la tolérance immunitaire et l'homéostasie tissulaire apparaît comme une composante majeure de leurs fonctions dans les IEC [189].



**Figure 5. La reconnaissance microbienne contribue à la santé et la fonction des IEC.** **a** | Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR), incluant les récepteurs *Toll-like* (TLR) et récepteurs *NOD-like* (NLR) exprimés par les cellules épithéliales intestinales (IEC), reconnaissent les motifs moléculaires hautement conservés et les propriétés de virulence spécifiques des pathogènes. Les TLR recrutent les adaptateurs de signalisation MyD88 et TRIF (protéine adaptatrice contenant un domaine TIR et induisant l'interféron- $\beta$ ) sur la ligature des molécules signales *via* l'activation des sous-unités NF- $\kappa$ B (facteur nucléaire  $\kappa$ B), p50 et p65, et de la voie des protéines kinases nécessaires à l'induction de la mitose (MAPK) (non représenté). Le domaine 1 de liaison des nucléotides et d'oligomérisation (NOD1) et NOD2 assurent la transduction du signal à travers le récepteur interagissant avec la protéine 2 (RIP2) pour activer la voie NF- $\kappa$ B et MAPK, alors que les autres NLR exprimés par les IEC, incluant les domaines NOD-, LRR- et pyrine- 3 (NLRP3), NLRP6, et les domaines NOD-, LRR- et CARD- 4 (NLRC4), forment des complexes d'inflammasome avec une pro-caspase 1 pour le clivage et l'activation de l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et IL-18. L'expression polarisée des PRR par les IEC soit sur la membrane apicale soit basolatérale pourrait contribuer à la discrimination entre les signaux microbiens commensaux ou pathogènes. Pour exemple, la signalisation à travers le TLR9 à la surface ou endosomal sur le pôle apicale des IEC contribue à l'inhibition de la voie du NF- $\kappa$ B, alors que la signalisation TLR par le pôle basolatéral contribue à l'activation du NF- $\kappa$ B. **b** | La reconnaissance microbienne est intégrée par les IEC. Ceci contribue à la survie et la réparation cellulaire (médiée par le facteur en trèfle 3 (TFF3), des protéines de choc thermique et l'expression de ligand pour le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR)), la fonction barrière (médiée par l'augmentation de mucines et de peptides antimicrobiens (AMP)) et les réponses immunorégulatrices (médiées par un ligand induisant la prolifération (APRIL), facteur d'activation des cellules B (BAFF), IL-25, acide rétinoïque, facteur  $\beta$  de croissance transformant (TGF $\beta$ ) et lymphopoïétine stromale thymique (TSLP), FRMPD2, FERM et protéines contenant des domaines PDZ 2) ; I $\kappa$ B : inhibiteur du NF- $\kappa$ B ; IKK : kinase I $\kappa$ B, ROS : espèces réactives de l'oxygène ; Ub : ubiquitine (d'après Peterson et al., 2014) [189].

Medzhitov et al. (2004) ont ainsi démontré sur un modèle murin de colite induite par DSS (dextran sodium sulfate), et déficient en TLR et adaptateur de signalisation MyD88 ou privé de micro-organismes commensaux majeurs après utilisation d'antibiotiques à spectre large, que les signaux provenant des bactéries commensales contribuent à l'homéostasie épithéliale et sa réparation [206].

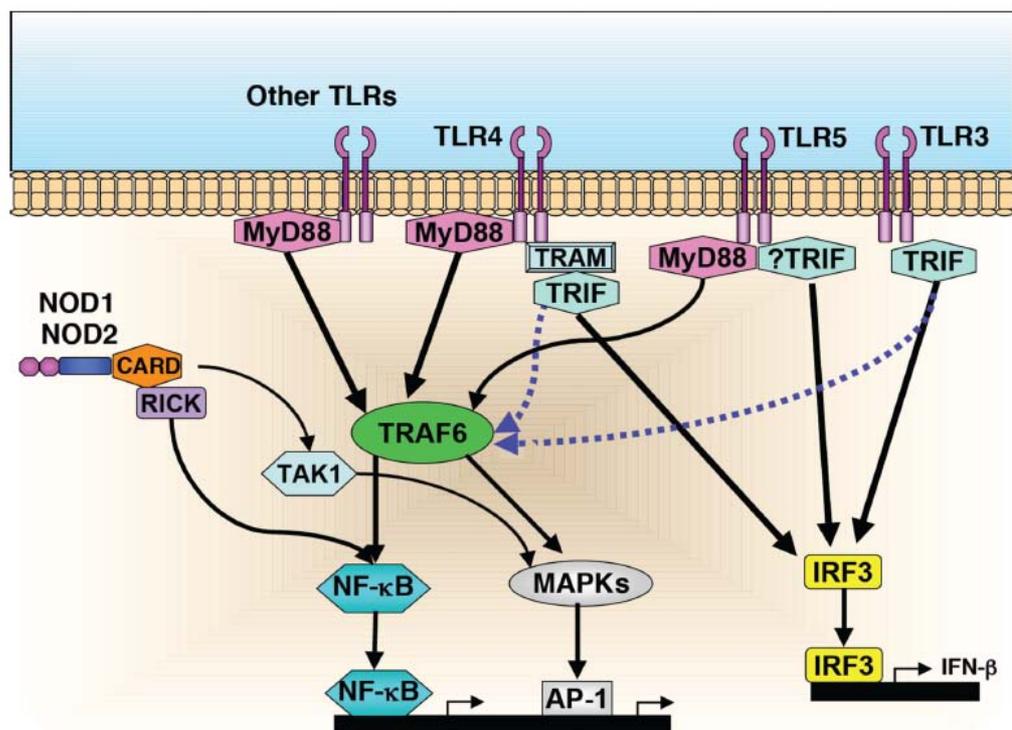
Il a également été démontré chez la souris que l'absence des éléments nécessaires à l'activation du complexe de facteur de transcription NF- $\kappa$ B en aval de la signalisation des TLR, incluant l'inhibiteur du NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), le complexe de kinase I $\kappa$ B (IKK) ou le modulateur essentiel du NF- $\kappa$ B (NEMO) augmente la sévérité d'une colite induite par DSS ou spontanée [189]. En tant que famille majeure des PRR, les TLR ont été les plus étudiés et parmi les 30 types découverts à ce jour, les récepteurs TLR1 à TLR9 ont été identifiés dans les IEC humaines [203]. Les récepteurs NLR et RLR jouent également un rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire des cellules immunitaires et de l'homéostasie intestinale dans les IEC [189]. Dans la mesure où les NLR sont exprimés par diverses populations cellulaires dans l'intestin, davantage de travaux utilisant des modèles *knock-out* conditionnels seront nécessaires pour comprendre précisément les contributions hématopoïétiques, épithéliales et stromales de ces PRR durant l'inflammation et la réparation [189].

#### 1.2.3.2.4 Microbiote et immunomodulation

La reconnaissance des MAMP par les PRR joue un rôle majeur dans les mécanismes de la réponse immunitaire innée et assure également l'initiation de la différenciation des lymphocytes T et B impliqués dans la réponse immunitaire adaptative à des antigènes spécifiques [203]. L'importance des facteurs immunologiques dans les pathologies GI est mise en évidence par le fait que la majorité des lymphocytes de l'organisme humain sont situés dans le tractus digestif où ils doivent faire face à une grande abondance de consortiums microbiens, atteignant  $10^{14}$  micro-organismes et excédant nos propres cellules d'un facteur 10, de virus et de bactériophages [208-212].

##### 1.2.3.2.4.1 Microbiote et système immunitaire inné

Les PRR partagent plusieurs voies de signalisation clés de l'immunité innée qui différencie les signaux commensaux et pathogènes pour graduer une réponse inflammatoire appropriée (Figure 6) [203]. Le système immunitaire inné fournit tout d'abord une réponse primaire de l'hôte face à une invasion microbienne induisant un nid inflammatoire permettant la localisation de l'infection et la prévention de dissémination systémique des micro-organismes pathogènes [203]. En effet, la détection des PAMP par les PRR activent les voies de signalisation intracellulaires induisant la synthèse de diverses cytokines et chemokines qui orchestrent une résistance immédiate de l'hôte à l'infection [203]. Ainsi, après reconnaissance des PAMP, l'activation des TLR, principalement TLR4, induit la transcription de pro-IL-18 et pro-IL-1 $\beta$  et active les NLR aboutissant à la formation d'un complexe protéique oligomérique (inflammasome) induisant la libération d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 mature par activation de la caspase-1 (Figure 5) [189, 203].



**Figure 6. Les PRR partagent les voies de signalisation immunitaire.** A l'exception de TLR3, les TLR induisent l'activation NF-κB à travers la voie MyD88, TLR3 induit exclusivement l'activation IRF3 à travers l'activation de la voie TRIF. La voie TRIF est partagée par le TLR4 et le TLR5. NOD1 et NOD2 activent aussi NF-κB via la voie RICK. Tous les TLR et NOD induisent aussi l'activation des MAP-kinases (d'après Fukuta et al., 2013) [203].

Les TLR des endosomes (TLR3, TLR7 à TLR9) ou de la membrane basolatérale (TLR5, TLR9) ne sont pas exposés aux micro-organismes pathogènes sauf lorsque ceux-ci envahissent la muqueuse intestinale ou pénètrent les IEC [203]. Les récepteurs NOD et NLR exprimés dans le cytoplasme ne reconnaissent pas non plus les micro-organismes pathogènes extracellulaires exceptés lorsque ces derniers injectent des protéines effectrices dans les IEC [203]. La nature polarisée des IEC permet une ségrégation anatomique des PRR participant à la distinction du microbiote commensal versus pathogène et une réponse inflammatoire appropriée (Figure 5). Cette polarisation montrant des réponses différentes des TLR selon si le ligand est exposé au niveau de leur emplacement apical ou basolatéral a été mise en évidence avec de multiples ligands aux TLR tels que le TLR9 (Figure 5) [189]. Bien que les réponses des TLR *in vivo* demeurent incertaines à la surface épithéliale, les données des études *in vitro* démontrent une hyporéponse des IEC aux ligands des TLR tels que TLR2 [203]. En effet, leur proximité avec l'abondance de signaux lumineux microbiens nécessite des mécanismes spécialisés pour maintenir une signalisation altérée des PRR ou leur hyporéponse à des stimuli du microbiote commensal [189]. Cette hyporéponse est associée à une diminution de l'expression en surface des récepteurs TLR [203]. De plus, les IEC expriment des régulateurs négatifs de la signalisation pro-inflammatoire PRR-dépendante et produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) capables d'atténuer l'activation de la voie NF-κB augmentant ainsi la tolérance

des IEC à la stimulation microbienne PRR-dépendante (Figure 5) [189]. D'autres mécanismes régulant négativement les voies de signalisation des PRR ont été mis en évidence mais pour la plupart, l'importance de leur activité dans les IEC et leurs contributions exactes dans l'homéostasie intestinale n'ont pas encore été démontrées [189]. Les cellules présentatrices d'antigène (CPA) de la LP présentent également une hyporéponse aux ligands reconnus par les TLR [213]. En effet, en ayant co-évolué avec le microbiote, une caractéristique clé des CPA, situées à proximité immédiate du microbiote intestinal, est leur capacité à protéger l'organisme contre l'infection tout en maintenant une tolérance immunitaire au microbiote commensal [214]. Il a ainsi été démontré que les signaux bactériens commensaux induisent l'expression par les IEC de facteurs solubles tels que TSLP (cytokines thymiques stromales), TGF $\beta$  et acide rétinoïque (RA) capables de promouvoir le développement de DC et de macrophages aux propriétés tolérogènes incluant la production d'IL-10 et de RA [189]. Il existe une considérable hétérogénéité des phagocytes mononucléaires intestinaux, néanmoins deux populations distinctes ont été identifiées incluant les DC CD103<sup>+</sup> et macrophages CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup> [189]. Les DC CD103<sup>+</sup> agissent comme des CPA migratrices empruntant les tissus lymphoïdes secondaires, incluant le GALT, afin de présenter le matériel antigénique aux cellules de l'immunité adaptative [189]. Ainsi, par un mécanisme RA- et TGF $\beta$ -dépendant, les DC CD103<sup>+</sup> assurent la tolérance en induisant la différenciation de cellules T régulatrices (T-reg) Foxp3<sup>+</sup> et le RA produit par les DC CD103<sup>+</sup> permet également le recrutement ciblé de cellules T matures recirculantes sur le site originel de reconnaissance antigénique au niveau de la barrière épithéliale intestinale [189]. En revanche, les macrophages CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup>, dépourvues de propriétés migratrices, expriment des protéines des jonctions serrées assurant la formation de dendrites transépithéliales qui pénètrent dans la lumière en interagissant avec les IEC afin d'y sonder des antigènes exogènes et dont l'extension est initiée par un mécanisme TLR-dépendant dans les IEC [189]. Leur rôle dans la tolérance réside dans la capacité à produire de l'IL-10 dans la LP qui supprime la production de cytokines inflammatoires par des cellules T colitogéniques et activent la fonction des cellules T-reg [189]. Cette production d'IL-10 pouvant par ailleurs être induite par un ligand de type intégrine (sémaphorine 7A) exprimé par les IEC [189]. En plus de produire une hyporéponse, les PRR de la barrière épithéliale, en reconnaissant des signaux du microbiote intestinal, permettent également de maintenir l'équilibre de la composition luminale de micro-organismes en régulant la sécrétion des AMP tels que les cathelicidines, lectines de type C ainsi que des  $\alpha$ -défensines par les cellules de Paneth et  $\beta$ -défensines par les IEC [203, 207, 215]. Les espèces commensales *Bacteroides thetaioataomicron* (*B. thetaioataomicron*) et *Lactobacillus innocua* pourraient jouer un rôle clé dans la production des AMP [216, 217]. De plus, *B. thetaioataomicron* a démontré sa capacité à induire la synthèse de la matrice de métalloprotéinases (matrilysine) par les cellules de Paneth et qui est chargée de la conversion des pro-défensines en défensines actives [218]. Il a également été démontré que la reconnaissance de MAMP du microbiote intestinal commensal et pathogénique

par les PRR des cellules caliciformes augmente la synthèse de mucines [190]. En effet, le motif LPS des bactéries à Gram<sup>-</sup> augmente l'expression génique et la sécrétion des mucines MUC5AC et MUC5CB et les études *in vitro* et *in vivo* montrent que les infections avec la bactérie pathogène à Gram<sup>+</sup> *Lysteria monocytogenes* est associée à une augmentation de la libération de mucus [219, 220]. Les polynucléaires neutrophiles (PNN) représentent également un élément crucial du système immunitaire inné et dont la régulation est sous l'influence du microbiote intestinal [214]. En effet, les rats axéniques présentent une neutropénie, une diminution de la production d'anion superoxyde et d'oxyde nitrique (NO) ainsi qu'une diminution de l'activité de phagocytose des PNN de la circulation périphérique [214]. Plus récemment, Clarke et al. (2010) ont démontré que la reconnaissance de PGN par les récepteurs NOD1 augmente l'activité microbicide et cytotoxique des PNN de la moelle osseuse démontrant le rôle du microbiote dans l'immunomodulation systémique [221]. Enfin, il a été démontré que la migration des mastocytes dans l'intestin, représentant 2-3 % de la LP dans le tractus GI et chargés notamment de réguler le péristaltisme des muscles lisses ainsi que les échanges d'électrolytes et la perméabilité des IEC, est induite par les ligands aux récepteurs CXCR2 et provenant des IEC par un mécanisme TLR-MyD88-dépendant après reconnaissance de signaux microbiens intestinaux [214]. Ces résultats mettent en évidence les caractéristiques spécifiques des récepteurs PRR des IEC pour maintenir la tolérance au microbiote commensal de la surface de la muqueuse intestinale tout en protégeant l'hôte d'une infection de bactéries pathogènes par reconnaissance des PAMP par les récepteurs PRR [203]. Néanmoins, en dépit de leur rôle important dans la régulation du microbiote commensal, les études chez des souris *knock-out* pour des gènes des PRR ont mis en évidence que seules les souris déficientes soit en TLR5, NLRP6 ou RIG-I (retinoid acid-inductible gene-I) développent une inflammation intestinale spontanée suggérant l'existence d'un mécanisme de compensation expliquant le phénotype normal de la majorité des souris déficientes en PRR [203]. Ces récepteurs partageant plusieurs voies clés du système immunitaire inné permettent également la différenciation des cellules du système immunitaire adaptatif [203].

#### 1.2.3.2.4.2 *Microbiote et système immunitaire adaptatif*

Suite à l'amorçage par les CPA intestinales, les cellules T, cellules clés du système immunitaire adaptatif, recirculent à travers l'organisme avant de rejoindre l'intestin pour y exercer leur rôle local tolérogène ou inflammatoire [189]. Les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves, majoritairement situées dans la LP, peuvent se différencier en 4 sous-types majeurs incluant les cellules T helper 1 (Th1), Th2, Th17 ou T-reg [214]. Les réponses incontrôlées des voies Th peuvent être pathologiques [214]. Ainsi celles des voies Th1 et Th17 sont associées à des pathologies auto-immunes et celle de la voie Th2 à des réactions allergiques [214]. Le microbiote intestinal exerce un rôle important dans le développement des cellules T CD4<sup>+</sup> [214]. En effet, les études menées sur des souris axéniques ont

permis de montrer une diminution des cellules T CD4<sup>+</sup> de la LP, un déséquilibre de la balance Th1/Th2 en faveur de la voie Th2 ainsi que des anomalies systématiques de la rate et des nœuds lymphatiques mésentériques [214]. De plus, l'association entre des espèces bactériennes spécifiques et le développement d'un sous-type de cellules T a été démontré [214]. Ainsi, le polysaccharide A (PSA) de *Bacteroides fragilis* induit le développement d'une réponse Th1 systémique productrice d'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et active directement le récepteur TLR2 des cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> supprimant une réponse Th17 [214]. Par contraste et chez la souris, les bactéries filamenteuses segmentées (SFB) sont un exemple de pathobiontes, désignant des micro-organismes potentiellement pathogènes vivant comme un symbionte dans les conditions normales, qui induisent le développement des cellules Th17 productrices de cytokines aux propriétés pro-inflammatoires incluant IL-17 principalement ainsi qu'IL-21 et IL-22 [214, 222]. Plus récemment, Atarashi et al. (2011) ont démontré que les bactéries du genre *Clostridium*, en particulier ceux des clusters IV et XIVa, ont la capacité de stimuler le développement des cellules T-reg coliques [223]. Leur récepteur (TCR) reconnaît majoritairement les signaux microbiens coliques et une anomalie dans la différenciation en T-reg pourrait ainsi aboutir à des cellules T effectrices capables d'induire une colite [224]. Enfin, il a été démontré que le microbiote intestinal joue un rôle dans le nombre et l'activité cytotoxique des lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) en particulier ceux possédant une activité proche des cellules T CD8<sup>+</sup> ainsi que les cellules T  $\gamma\delta$  [189, 214]. De façon identique aux AMP, la libération luminale d'IgAs, induite par l'activation des TLR3 et TLR4 des IEC, régule la composition luminale du microbiote et limite la pénétration des bactéries commensales dans la muqueuse intestinale [189]. En effet, la présentation d'antigènes par les DC dans les plaques de Peyer et les micro-organismes vivants activent la maturation des cellules B en plasmocytes IgA<sup>+</sup> par recombinaison des chaînes lourdes appelés commutation de classe ou *class-switch recombination* (CSR) [189]. De façon identique aux cellules T, les IEC, par la production de NO, IL-10 et de RA assurent le phénotype IgA<sup>+</sup> en conjonction avec les DC produisant le TGF $\beta$  et le CXCL13, et le *gut-homing* des cellules B [189, 225]. La signalisation des cellules T CD4<sup>+</sup> est nécessaire à l'activation du CRS des cellules B et en l'absence des cellules T, ce processus de maturation est assuré par des molécules de co-stimulation APRIL et BAFF [189]. Ces dernières sont produites par les IEC suite à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par le microbiote commensal et en particulier par les bactéries à Gram<sup>-</sup> telles que celles appartenant au genre *Bacteroides* par un mécanisme TLR-MyD88 dépendant [189, 226]. Par ailleurs, les souris axéniques montrent une diminution des IgA et IgG ainsi qu'une augmentation des IgE sériques leur conférant un phénotype prédisposé à une réponse humorale Th2 [214]. Enfin, il est important de noter que les mécanismes par lesquels la tolérance des IEC aux signaux du microbiote est rompue aboutissant à une infection pathogène ne sont pas précisément définis [189]. Le contrôle de l'inflammation intestinale s'appuierait davantage sur la reconnaissance de signaux de « danger » à caractère pathogène plutôt que sur la reconnaissance de

signaux microbiens seuls [189]. La reconnaissance du danger serait assurée par la détection de propriétés associées avec la viabilité microbienne ou vita-PAMP permettant la distinction des micro-organismes pathogènes vivants des débris microbiens inertes ainsi que la détection de facteurs de virulence conservés pathogéniques tels que les systèmes de sécrétion bactériens et toxines qui pénètrent dans le cytosol de la cellule hôte [189].

#### 1.2.3.2.5 *Microbiote et maintien de la fonction de barrière*

La reconnaissance des MAMP par les PRR assure le maintien de la structure des IEC et de leur fonction barrière [189]. Ainsi, en intégrant les signaux bactériens commensaux, les IEC assurent tout d'abord la fonction de barrière en exprimant les gènes impliqués dans la production du mucus et la transcytose luminale des IgAs par des mécanismes TLR-dépendant, et des AMP par les cellules de Paneth par un mécanisme NOD2-MyD88-dépendant [189]. De plus, plusieurs travaux ont démontré que cette fonction barrière est également assurée par des mécanismes TLR-dépendants induisant l'expression par les IEC des protéines cytoprotectives de choc thermique ou *heat-shock protein*, des ligands aux récepteur à l'EGF, du TFF3, des complexes protéiques constituant les jonctions serrées ou *tight junctions* apicales (Figure 5) [189]. Par reconnaissance du récepteur TLR2, le PGN de la paroi bactérienne active la voie de la protéine kinase C (PKC) induisant l'expression de ZO-1 impliquée dans le maintien des jonctions serrées [227, 228]. De plus, il a été démontré que l'espèce *B.thetaiotaomicron* induit aussi l'expression de la protéine riche en proline *sprr2A* requise pour le maintien des desmosomes des villosités intestinales [229]. Enfin, et bien que le mécanisme d'activation n'ait pas été démontré, cette même espèce commensale contribue également au développement de la muqueuse en activant le facteur de transcription de l'angiogénine-3, impliquée dans le développement de la microvascularisation intestinale, ou a montré sa capacité à stimuler l'expression d'un fragment de fucose sur les glycoconjugués de la surface épithéliale constituant des sites d'adhésion microbiens à la surface de l'épithélium [230, 231].

#### 1.2.3.2.6 *Microbiote et homéostasie intestinale par des mécanismes non PRR-dépendants*

De récents travaux démontrent que d'autres mécanismes indépendants des voies de signalisation PRR-dépendantes et induits par des métabolites issus du microbiote intestinal commensal sont impliqués dans la régulation de l'immunité intestinale et le maintien de la fonction de barrière [232-238]. Il a ainsi été démontré que l'ATP d'origine bactérienne est reconnu par les récepteurs purinergiques P2Y et P2X exprimés par les cellules myéloïdes CD70<sup>high</sup>CD11c<sup>low</sup> activant une réponse Th17 dans l'intestin [232]. Par reconnaissance des récepteurs couplés à des protéines G (GPR41, GPR43, GPR109A), les AGCC jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie intestinale [158, 233, 234]. Ainsi l'activation de GPR43 par les AGCC induit la production de cytokines anti-inflammatoires et régule les fonctions suppressives des cellules T-reg coliques [233].

De plus, l'activation de GPR109A par la niacine (vitamine B3), et spécifiquement par le butyrate, induit d'une part la production d'IL-10 par les cellules T-reg coliques et inhibe d'autre part la synthèse des cytokines pro-inflammatoires des macrophages ou d'IL-18 par les IEC [234]. Seul le butyrate a également démontré sa capacité à assurer une régulation épigénétique de l'expression du facteur de transcription majeur (Foxp3) des cellules T-reg par un mécanisme impliquant l'acétylation de l'histone H3 [235]. En plus d'être la source majeure d'énergie des colonocytes, le butyrate a également démontré sa capacité singulière à réguler leur autophagie ainsi qu'à inhiber d'une part l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et stimuler d'autre part l'expression génique de mucines soutenant ainsi son rôle important dans la régulation de l'inflammation intestinale et le maintien de la fonction barrière des IEC [158, 236-238]. De façon spécifique, le butyrate a démontré son rôle protecteur contre la carcinogenèse colique ainsi que sa capacité à augmenter la dépense énergétique et à améliorer la sensibilité à l'insuline chez la souris [158]. En outre, il a également été démontré que les acides gras polyinsaturés (AGPI), en particulier l'acide linoléique conjugué et les acides gras *trans*, en fixant les récepteurs PPAR- $\alpha$  et - $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor), induisent l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B et la production de cytokines pro-inflammatoires [239]. De plus, les acides biliaires produits par le microbiote intestinal sont chargés de contrôler l'inflammation intestinale induite par la voie NF- $\kappa$ B en fixant, d'une part, le récepteur nucléaire farnésioïde X (FXR) activant un inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B (NcoR1) et, d'autre part, à un récepteur transmembranaire couplé à une protéine G (TGR5) activant la voie de l'AMPc et permettant ainsi d'inhiber le facteur de transcription p65 [240, 241].

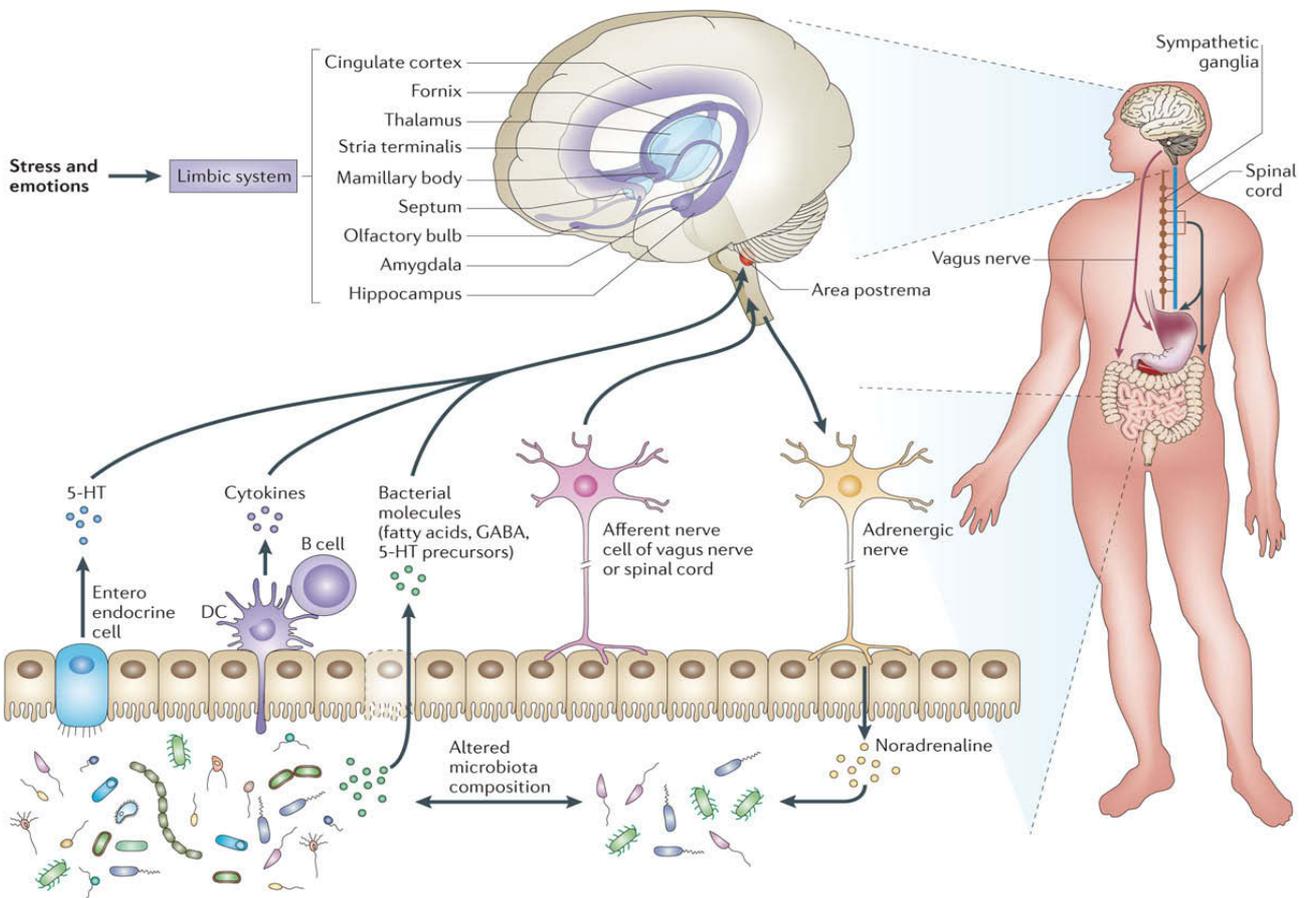
D'autres mécanismes impliquant la voie des kinases Ras/Raf/MEK/ERK et le facteur de transcription PU.1 ont été mis en évidence montrant la capacité des métabolites bactériens à induire la production de cathélicidine [242, 243]. Les AGCC et l'acide lithocholique activent l'expression du gène CAMP par les colonocytes (HT-29) codant pour la cathélicidine humaine LL-37 [243]. Un autre mécanisme d'interaction microbiote-hôte fournissant une protection contre les micro-organismes pathogènes est la capacité des espèces du genre *Lactobacillus* à produire de l'acide lactique permettant d'augmenter l'activité des lysozymes de l'hôte capable de dégrader la paroi des bactéries à Gram<sup>-</sup> [244]. Enfin, les AA métabolisés par le microbiote influencent le système immunitaire tel que cela a été démontré en particulier pour le tryptophane (Trp), AA essentiel métabolisé par les bactéries du genre *Lactobacillus* en indole-3-aldéhyde qui en se fixant à son récepteur d'hydrocarbure d'aryl (AhR) induit la synthèse d'IL-22 par une autre lignée de cellules de l'immunité innée, les cellules lymphoïdes innées (ILC), et en particulier le groupe 3, produisant le récepteur nucléaire au RA (ROR $\gamma$ t+) et identifié comme le plus étroitement associé à la régulation de l'immunité intestinale [245- 247]. De plus, le Trp traverse la barrière des IEC en fixant son transporteur TAT1 afin d'être métabolisé par l'enzymeIDO (indolamine-2,3-

dioxygénase) exprimée par les CPA intestinales en kynurénine et dont l'activité enzymatique est modulée par l'IL-27 [248, 249]. En outre, la kynurénine fixe le récepteur AhR des cellules T CD4<sup>+</sup> assurant leur conversion en T-reg et constitue le précurseur de l'acide kynurénique reconnu par le récepteur GPR35 des macrophages et qui serait impliqué dans leur chimiotactisme [245, 248]. Enfin, le système des endocannabinoïdes joue un rôle dans le maintien de la barrière intestinale régulée par le microbiote intestinal tel que cela a été démontré pour l'espèce *Akkermansia muciniphila* capable d'augmenter le niveau d'endocannabinoïdes diminuant ainsi l'endotoxémie métabolique [250].

### **1.2.3.3 Axe cerveau-intestin-microbiote**

#### *1.2.3.3.1 Description de l'axe cerveau-intestin et rôle du microbiote*

Les récentes avancées concernant la relation réciproque entre le cerveau et l'intestin ont mis en évidence un système d'interactions complexes dénommé l' « axe cerveau-intestin » (axe CI) assurant non seulement l'homéostasie gastro-intestinale mais qui aurait également de multiples effets sur l'état émotionnel, la motivation et de façon plus importante sur les fonctions cognitives [159]. Ce réseau de communication bidirectionnelle inclut le SNC, SNA, SNE ainsi que l'axe HHS (Figure 7) [251, 252]. Le SNA, sympathique et parasympathique, conduit à la fois les signaux afférents du lumen en les transmettant au SNC par les voies nerveuses entériques, vagues et spinales, ainsi qu'efférents du SNC à la paroi intestinale [251]. L'axe HHS est considéré comme l'axe efférent majeur du stress coordonnant les réponses adaptatives de l'organisme à tout type de facteurs de stress [253]. En effet, le stress environnemental ou un taux systémique élevé de cytokines pro-inflammatoires active l'axe HHS induisant une augmentation de la libération du cortisol comme hormone majeur du stress affectant la physiologie de nombreux organes [253]. Ainsi, ces deux lignes de communication neuronale et hormonale influencent l'activité des cellules épithéliales, immunitaires, interstitielles de Cajal et entérochromaffines de l'intestin [251]. Cette influence neuroendocrine s'ajoute à celle exercée par le microbiote intestinal qui a récemment démontré son rôle dans l'interaction bidirectionnelle cerveau-intestin pour former le concept émergent d' « axe cerveau-intestin-microbiote » (axe CIM) (Tableau 6) [160, 251, 252]. En effet, des travaux expérimentaux et cliniques soutiennent l'influence du microbiote dans l'anxiété, la dépression et dans l'autisme [251]. De plus, de récents travaux mettent en évidence que la dysbiose observée dans les TFI est fortement associée à des troubles psychologiques et liée à une dysrégulation de l' « axe cerveau-intestin » [254-256].



Nature Reviews | Microbiology

**Figure 7. L'axe bidirectionnel cerveau-intestin-microbiote.** Voies neuronales, immunologiques, endocrines et métaboliques par lesquelles le microbiote influence le cerveau, et la composante du cerveau au microbiote de cet axe. Les mécanismes potentiels par lesquels les bactéries accèdent au cerveau et influencent le comportement incluent les produits bactériens qui arrivent à accéder au cerveau *via* la circulation sanguine et l'area postrema, *via* la libération de cytokines par les cellules immunitaires de la muqueuse, *via* la libération d'hormones intestinales telles que la 5-hydroxytryptamine (5-HT) par les cellules entéroendocrines, ou *via* les voies neuronales afférentes incluant le nerf vague. Le stress et les émotions peuvent influencer la composition microbienne de l'intestin à travers la libération des hormones du stress ou des neurotransmetteurs du système sympathique qui influencent la physiologie intestinale et modifient l'habitat du microbiote. Les hormones du stress de l'hôte telles que la noradrénaline pourraient également influencer l'expression des gènes bactériens ou la signalisation entre les bactéries, ce qui pourrait modifier la composition microbienne et l'activité du microbiote (d'après Collins et al., 2012) [252].

#### Du microbiote intestinal au cerveau :

- Production, expression et renouvellement des neurotransmetteurs (sérotonine, GABA) et facteurs neurotrophiques (BDNF)
- Protection de la barrière intestinale et de l'intégrité des jonctions serrées
- Modulation des voies afférentes sensibles entériques
- Métabolites bactériens
- Régulation de l'immunité mucoale

#### Du cerveau au microbiote intestinal :

- Altération de la production du mucus et du biofilm
- Altération de la motilité
- Altération de la perméabilité intestinale
- Altération de la fonction immunitaire

**Tableau 6. Principaux mécanismes de l'axe bidirectionnel cerveau-intestin-microbiote** (d'après Carabotti et al., 2015) [251].

#### 1.2.3.3.2 Mécanismes d'interaction de l'axe cerveau-intestin-microbiote

La communication entre le microbiote intestinal et le cerveau est établie par des communications neuronales, métaboliques bactériennes et de l'hôte, immunologiques et endocrines [251, 252].

##### 1.2.3.3.2.1 Du microbiote intestinal vers le cerveau

Afin de comprendre le rôle du microbiote dans la régulation de l'axe cerveau-intestin, différentes stratégies ayant recours à des modèles d'animaux axéniques, des souches probiotiques et des antibiotiques ont été employées [257]. Tout d'abord, les études réalisées sur des animaux axéniques ont permis de mettre en évidence que la colonisation bactérienne de l'intestin est déterminante dans le développement et la maturation du SNE et du SNC et que cette absence de colonisation est associée avec une expression et un renouvellement altéré de neurotransmetteurs, tels que la sérotonine (5-HT), dans ces deux systèmes [251, 258, 259]. De plus, ces animaux axéniques ont montré des altérations des fonctions senso-motrices se traduisant par une vidange gastrique et un transit intestinal retardé ainsi que des anomalies neuro-musculaires résultant d'une diminution de l'expression génique d'enzymes impliqués dans la synthèse et le transport de NT et des protéines contractiles musculaires [251]. La souris axénique montre également une réponse exagérée de l'axe HHS à un stress modéré avec des niveaux augmentés de cortisol et d'ACTH [260, 261]. Il est important de noter que toutes ces anomalies observées ont pu être corrigées après colonisation d'espèces bactériennes spécifiques [251]. Dans le cas des souris axéniques présentant une réponse exagérée à un stress modéré, la réversibilité de cette réponse n'a pu être observée que chez les plus jeunes souris soutenant l'existence d'une période critique pendant laquelle la plasticité de la régulation neuronale est sensible à l'inoculation d'un microbiote [261]. En outre, il a également été mis en évidence que l'absence de colonisation du microbiote intestinal était associée à une altération de l'expression de BDNF, considéré comme un des facteurs majeurs impliqués dans la mémoire, et que l'administration du mélange de souches probiotiques VSL#3, ou une modification transitoire du microbiote induite par antibiotiques, ont permis une normalisation des niveaux de ce facteur [262-264]. L'utilisation de souches probiotiques a également pu mettre en évidence que le nerf vague constitue la voie de communication neuronale modulatrice majeure entre le microbiote et le cerveau en transmettant les informations de la lumière intestinale au SNC [265, 266]. Parmi les différents mécanismes établissant les interactions entre le microbiote et l'axe CI, la protection de la barrière intestinale pourrait être une composante clé [251, 267]. En outre, le microbiote pourrait également interagir avec l'axe CI comme cela a été démontré pour l'espèce *Lactobacillus reuteri* capable d'augmenter l'excitabilité des nerfs sensitifs afférents en inhibant l'ouverture des canaux potassiques calcium-dépendant afin de moduler la motilité intestinale et la perception de la douleur [268]. De plus, les bactéries du genre *Lactobacillus* utilisent le nitrate et les nitrites pour générer du NO et du H<sub>2</sub>S (sulfure d'hydrogène) capable de réguler la motilité intestinale en interagissant avec le récepteur vanilloïde sur les fibres nerveuses sensibles à la capsaïcine [269, 270]. Le microbiote

influence également l'activité du SNE par la production de neurotransmetteurs (NT) pouvant agir localement tels que GABA, sérotonine (5-HT), mélatonine, histamine, acétylcholine et en générant une forme biologiquement active de catécholamines libérée dans la lumière intestinale [251, 252]. Les métabolites bactériens, et en particulier les AGCC, permettent d'interagir avec le SNE de part leur capacité par exemple à stimuler le système nerveux sympathique par un mécanisme GPCR-dépendant ou l'excrétion de 5-HT mucosale par les cellules entérochromaffines [251]. Le rôle des voies immunologiques ont quant à elles été mises en évidence chez l'animal et l'homme en montrant que certains troubles psychologiques étaient associés à des niveaux altérés de cytokines pro-inflammatoires suite à une modification de la composition du microbiote [271]. Enfin, l'effet du microbiote sur l'activation immunitaire pourrait être lié aux protéases dont l'expression est augmentée dans les pathologies de l'immunité intestinale et qui sont responsables des lésions nerveuses entériques et de la muqueuse [251].

#### *1.2.3.3.2 Du cerveau au microbiote intestinal*

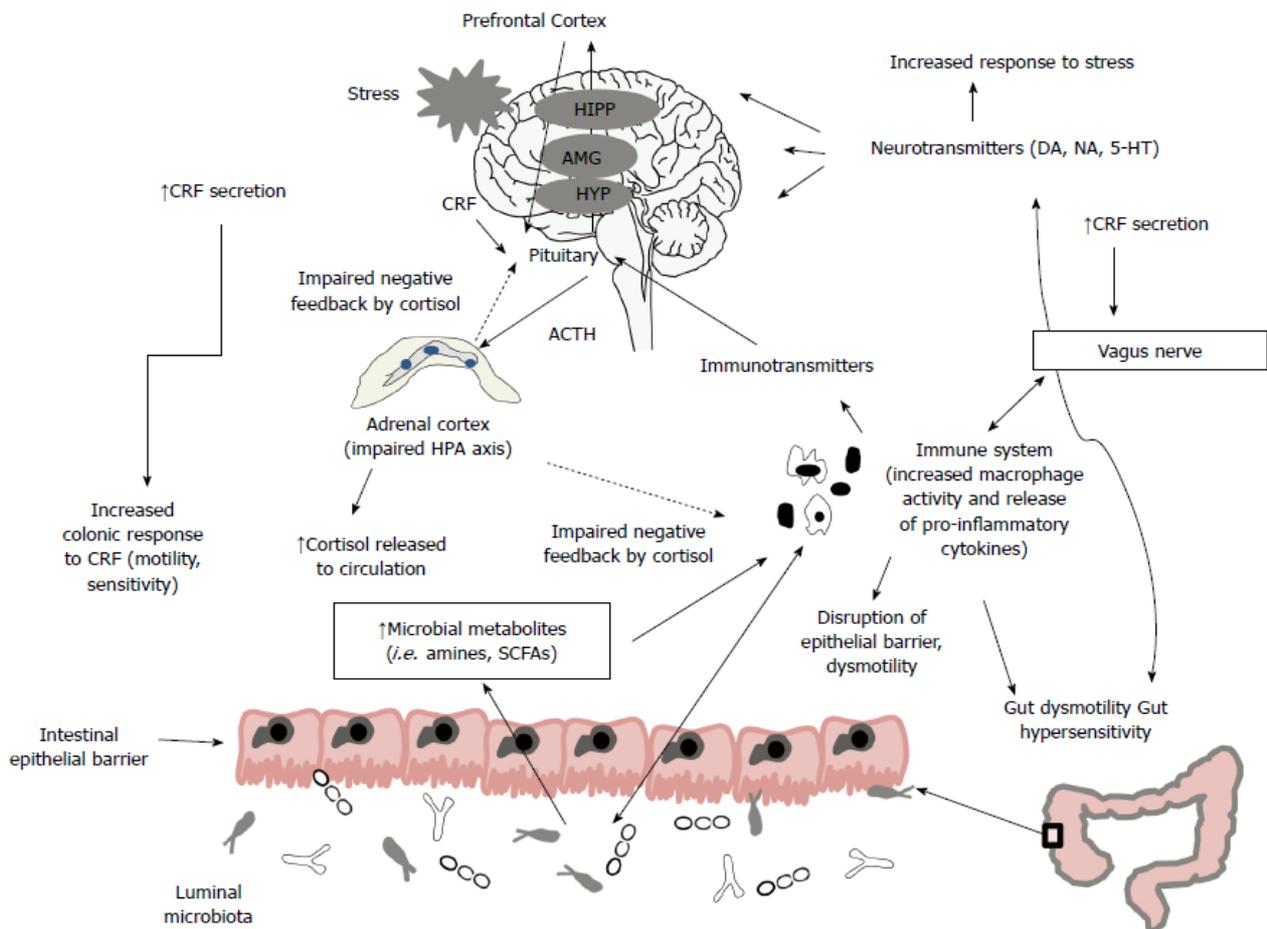
Différents types de facteurs de stress psychologiques peuvent moduler la composition et le nombre de bactéries du microbiote entérique, et ceci indépendamment de la durée du stimulus [251]. En effet, il a été démontré que l'exposition à un facteur de stress social d'une durée seulement de 2 heures modifie significativement le profil de communauté bactérienne ainsi que la proportion des phyla principaux du microbiote [272]. Les effets du SNC s'exercent par les voies efférentes neuroendocrines, SNA et l'axe HHS, à la fois directement par l'interaction microbiote-hôte et indirectement en modifiant le milieu intestinal (Tableau 6) [251]. Ainsi, Rhee et al. (2009) définit ces voies neuronales efférentes associées aux voies endogènes de régulation de la douleur comme étant le « système moteur émotionnel » [159]. L'influence directe du SNC est exercée par la synthèse des NT entériques de l'hôte capables d'affecter le microbiote [251]. En effet, plusieurs études ont montré que certaines espèces bactériennes commensales possèdent des récepteurs à ces NT, telles que *Pseudomonas fluorescens* GABA<sup>+</sup> ou *E. coli* O157:H7 ADRE/NOR<sup>+</sup>, pouvant influencer leur fonction et contribuer à augmenter la prédisposition à un stimulus inflammatoire ou infectieux [251]. De plus, le cerveau joue un rôle majeur dans la modulation des fonctions intestinales, telles que la motilité, la sécrétion d'acides, de bicarbonates et de mucus, le transport du liquide intestinal et la réponse immunitaire de la muqueuse [273]. Ces fonctions contribuent toutes au maintien de la couche de mucus et du biofilm nécessaires à la croissance et la diversité des différentes niches écologiques microbiennes et métaboliques associées à la muqueuse [273]. Une dysrégulation de l'axe CI induite par le stress peut affecter le microbiote intestinal en altérant l'écosystème associé à la muqueuse, en modifiant la taille et la qualité du mucus ou en augmentant la fréquence des contractions coliques induite par une libération augmentée de CRF dans le cas d'un stress mental [251]. Par ailleurs, les altérations du transit GI affectent l'apport de micronutriments

importants pour le microbiote, c'est-à-dire principalement les prébiotiques et fibres alimentaires [251]. En outre, le cerveau peut affecter la composition et la fonction du microbiote en altérant la perméabilité paracellulaire intestinale et facilitant ainsi l'accès d'antigènes bactériens capables de stimuler la réponse immunitaire dans la muqueuse [242]. En effet, il a été démontré qu'un stress aigu augmente la perméabilité colique impliquant une augmentation de l'IFN- $\gamma$  et une diminution de l'expression génique des protéines des jonctions serrées telles que ZO-2 et l'occludine [251, 274]. Le cerveau, par la voie sympathique du SNA, peut également moduler la fonction immunitaire intestinale en régulant le nombre et l'activité des mastocytes [251]. Il a ainsi été démontré qu'en cas de stress aigu, l'augmentation de l'activité mastocytaire, en modifiant la balance tryptase/histamine, diminue la perméabilité intestinale [251]. Enfin, le stress affecte la composition du microbiote par la libération d'une part de CRF, dont l'augmentation est associée à un dysfonctionnement de la barrière du côlon, et d' $\alpha$ -défensine sécrétée par les cellules de Paneth [251]. Il est important de noter que l'altération du microbiote induite par le stress facilite la prolifération de bactéries virulentes telle que cela a été démontré pour les espèces *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni* ou la souche pathogénique *E. coli* O157:H7:3 activées par la noradrénaline [251].

## **1.2.4 Mécanismes physiopathologiques du SII**

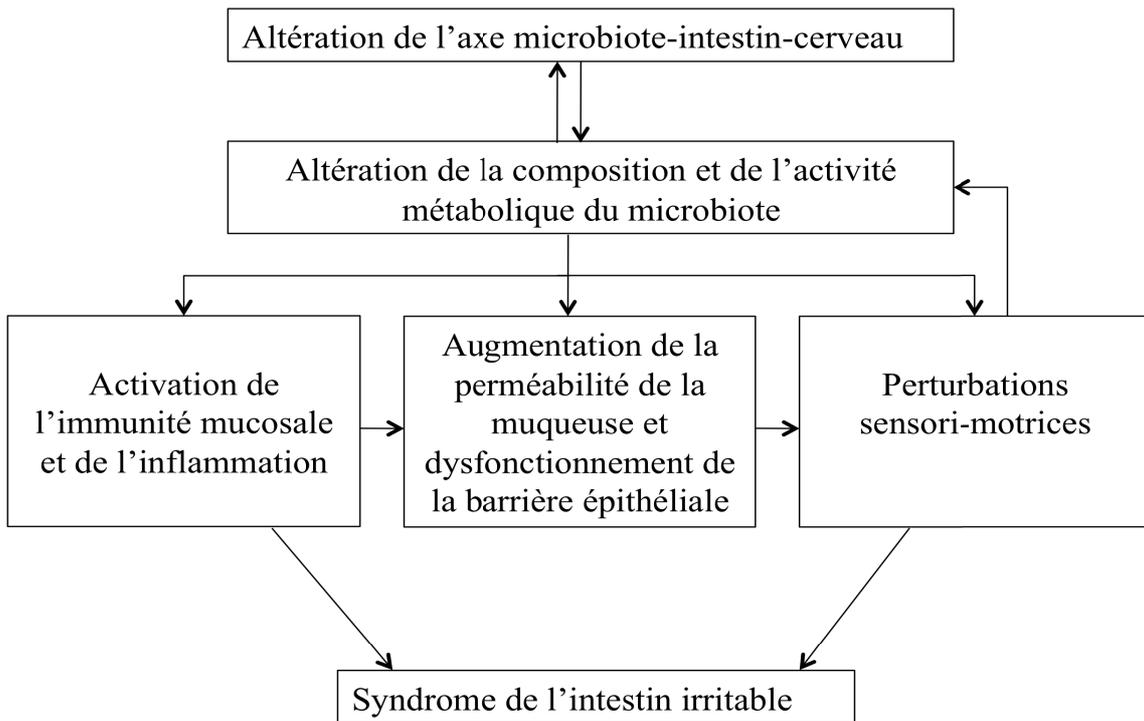
### **1.2.4.1 Dysrégulation de l'axe cerveau-intestin-microbiote**

La dysrégulation de l'axe CIM correspond à une altération du microbiote intestinale par les fonctions cérébrales et cette altération microbienne à son tour influence les fonctions du cerveau [271]. De récents travaux ont démontré que le SII est associé à une altération de l'axe CIM à l'origine des troubles psychologiques des patients tels que l'anxiété et la dépression, de l'hypersensibilité viscérale, des modifications dans la sécrétion et la motilité intestinale ainsi que des altérations cellulaires des systèmes entéro-endocrine et immunitaire (Figure 8) [275, 276]. Différents niveaux de preuve soutiennent que le microbiote intestinal pourrait interagir avec ces différentes cibles physiopathologiques du SII [277]. En effet, chez les patients avec un SII, les études récemment publiées mettent en évidence une altération de la stabilité et de la diversité de la composition du microbiote, le développement d'un SII post-infectieux (SII-PI), la possible coexistence d'un SIBO, l'efficacité de certaines souches de probiotiques et d'antibiotiques non-systémiques [278-280]. De plus, l'étude de Crouzet et al. (2013) démontre que le phénotype de l'hypersensibilité viscérale, caractéristique des TFI, peut être transféré par le microbiote de patients avec un SII à des rats axéniques [281].



**Figure 8. Influence du microbiote intestinal sur la communication bidirectionnelle entre le SNE et le SNC, modulant le développement intestinal et plusieurs fonctions physiologiques, incluant motilité, sensibilité, sécrétion et immunité intestinale.** Dans le SII, l'altération de la composition et/ou de l'activité du microbiote pourrait induire une perturbation de cette communication menant à une activation du système immunitaire et une production de cytokines pro-inflammatoires, une production de métabolites microbiens tels que les AGCC (SFCA) toxiques à hautes concentrations et les amines, une activation de l'axe HHS (HPA) avec une augmentation du cortisol exerçant un rétrocontrôle sur l'HYP, AMG, HIPP, et le cortex préfrontal pour désactiver l'axe HHS, et une augmentation du CRF. Ces effets conduisent à des altérations de la motilité et sensibilité intestinale, une déstabilisation de la barrière et une production diminuée de neurotransmetteurs associée à une augmentation de la réponse aux facteurs de stress. A son tour, le stress pourrait provoquer une production systémique de cytokines pro-inflammatoires activant l'axe HHS qui communique à la fois avec le SNE et le SNC et pourrait altérer le microbiote (d'après Distrutti et al., 2016) [276].

Ainsi, l'hypothèse actuelle de travail définit le SII comme un microbiote altéré qui active les réponses immunitaires innées de la muqueuse, augmente la perméabilité intestinale, active les voies sensibles nociceptives incluant la douleur viscérale, et entraîne une dysrégulation du SNE [282-284]. Enfin, la dysrégulation concomitante de l'axe CI et du microbiote dans la physiopathologie du SII a amené récemment à considérer ce TFI comme étant une perturbation de l'axe CIM (Figure 9) [95, 271].



**Figure 9. Rôle physiopathologique supposé du microbiote dans le syndrome de l'intestin irritable.** Le microbiote intestinal pourrait jouer un rôle substantiel dans le syndrome de l'intestin irritable (SII). Bien que le microbiote puisse contribuer directement aux symptômes du SII, la composition et l'activité métabolique altérées du microbiote dues au stress ou à d'autres perturbations psychologiques activeraient indirectement l'immunité muqueuse et l'inflammation, augmenteraient la perméabilité épithéliale et réduiraient sa fonction de barrière aboutissant ainsi à un dysfonctionnement sensori-moteur responsable d'une variété de symptômes des patients avec un SII (d'après Lee et al., 2014) [271].

#### 1.2.4.2 Dysbiose

##### 1.2.4.2.1 Altération de la composition du microbiote intestinal

Il est généralement accepté que la physiopathologie du SII est liée à une perturbation du microbiote muqueuse et luminale différant ainsi de celui des sujets sains bien que les résultats des études ayant investigué ces modifications ne soient pas univoques (Tableau 7) [271, 276]. Néanmoins, en se basant sur les études de culture et les analyses phylogénétiques les plus récentes, et utilisant l'ARNr 16S, un consensus confirmé récemment par le groupe de travail de Rome établit que le microbiote d'un patient avec un SII présente une diminution de la diversité de population microbienne, une altération des proportions de groupes bactériens spécifiques et un degré de variabilité dans la composition différent des sujets sains [271, 276]. Ces résultats montrent notamment une baisse du niveau fécal des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, une augmentation de la concentration de bactéries anaérobies facultatives, dominées par le genre *Streptococcus* et l'espèce *E. coli*, et de bactéries anaérobiques telles que celles appartenant au genre *Clostridium*, ainsi qu'une augmentation du ratio *Firmicutes* : *Bacteroidetes*, qui en particulier serait corrélée avec les troubles psychiatriques d'anxiété et de dépression [271, 276]. De plus, il a été démontré que la composition

du microbiote des patients avec un SII varie selon le sous-type diagnostiqué et que leur microbiote appartient à des entérotypes entièrement différents de ceux des sujets sains [285, 286]. Enfin, l'implication majeure du microbiote intestinal dans la physiopathologie du SII s'appuie également sur la forte association existante entre la prise d'antibiotiques et sa survenue ainsi que sur la relation établie entre la co-morbidité psychiatrique du SII et l'impact démontré du microbiote sur le comportement et les émotions [276].

Références	Sujets (n)	Critères de Rome	Méthode	Résultats des patients avec un SII comparés à des sujets sains
Si et al. (2004)	50	II	Culture	Diminution de <i>Bifidobacterium</i> Augmentation des <i>Enterobacteriaceae</i>
Malinen et al. (2005)	49	II	PCRq	Diminution de <i>Lactobacillus</i> (SII-D) Augmentation de <i>Veillonella</i> (SII-C)
Mättö et al. (2005)	51	II	Culture PCR-DGGE	Augmentation des bactéries aérobies Instabilité temporelle
Kassinen et al. (2007)	47	II	Séquençage ARNr 16S	Diminution des espèces <i>Coprococcus eutactus</i> , <i>Collinsella aerofaciens</i> , <i>Clostridium cocleatum</i>
Krogius-Kurikka et al. (2009)	33	II	Séquençage ARNr 16S	Augmentation de <i>Firmicutes</i> , <i>Proteobacteria</i> , Diminution de <i>Bacteroidetes</i> , <i>Actinobacteria</i> ,
Tana et al. (2010)	52	II	Culture PCRq	Augmentation de <i>Lactobacillus</i> et <i>Veillonella</i>
Codling et al. (2010)	74	II	PCR-DGGE	Pas de différences du microbiote fécale et mucosale ; Instabilité temporelle
Ponussamy et al. (2011)	19	II	DGGE PCRq-ARNr 16S	Diversité augmentée de <i>Bacteroidetes</i> , <i>Lactobacillus</i> et diminuée de <i>Bifidobacterium</i> , et de l'espèce <i>Clostridium coccoides</i>
Kerckhoffs et al. (2011)	67	II	DGGE PCRq-ARNr 16S	Augmentation de l'espèce <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Rajilić-Stojanović et al. (2011)	108	II	PCRq-ARNr 16S	Ratio <i>Firmicutes</i> : <i>Bacteroidetes</i> augmenté
Carroll et al. (2011)	37	III (SII-D)	ARNr 16S	Diminution de la diversité bactérienne
Parkes et al. (2012)	73	III	FISH	Augmentation de <i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium coccoides</i> , <i>Eubacterium rectale</i>
Jeffery et al. (2012)	57	II	ARNr 16S	Ratio <i>Firmicutes</i> : <i>Bacteroidetes</i> augmenté
Sundin et al. (2015)	48	III	ARNr 16S	SII global (n=19) : augmentation des <i>Firmicutes</i> ( <i>Clostridium</i> ) ; SII-PI (n=13) : augmentation des <i>Bacteroidetes</i>

SII : Syndrome de l'intestin irritable ; SII-C : SII avec constipation prédominante SII-D : SII avec diarrhée prédominante ; SII-PI : SII post-infectieux ; DGGE : Electrophorèse sur gel en gradient dénaturant ; PCR(q) : Réaction de polymérase en chaîne (quantitative) ; FISH : hybridation fluorescente in situ. Les références du tableau sont spécifiquement issues des revues de Lee et al. (2014) et Distrutti et al. (2016) [271, 276].

**Tableau 7. Synthèse non exhaustive des études du microbiote intestinal des patients avec un syndrome de l'intestin irritable diagnostiqués d'après les critères de Rome II et III (Adapté d'après Lee et al., 2014 et Distrutti et al., 2016) [271, 276].**

#### *1.2.4.2.2 Altération de l'activité métabolique du microbiote intestinal*

La forte interaction du microbiote intestinal avec des facteurs exogènes, tels que l'alimentation en particulier, pourrait être de façon directe ou indirecte à l'origine des symptômes du SII [287]. Ainsi, les glucides fermentescibles à chaîne courte faiblement absorbés par l'intestin grêle incluant les monosaccharides (fructose), disaccharides (lactose, sucrose), oligosaccharides (fructanes et galactanes) et les polyols (sorbitol, xylitol, mannitol), regroupés sous le terme de FODMAP, aboutiraient à une production excessive de gaz à l'origine des symptômes de douleur abdominale, ballonnement, flatulence et distension abdominale [288, 289]. En effet, Ong et al. (2010) ont mis en évidence qu'un régime alimentaire riche en FODMAP augmente la douleur abdominale, le ballonnement et la flatulence chez les patients avec un SII attirant l'attention sur la nécessité de veiller à une restriction des glucides fermentescibles chez ces patients [289]. De plus, cette fermentation de FODMAP pourrait accroître la production d'AGCC capable d'augmenter la libération luminale de 5-HT responsable d'une accélération du transit intestinal ainsi que de l'augmentation de la motilité GI [271]. En outre, il a également été démontré que la dysbiose observée dans le SII est associée à une altération des taux de 5-HT à la fois dans l'intestin mais également dans le cerveau soutenant l'hypothèse d'une dysrégulation de l'axe CIM à l'origine des symptômes [278]. Enfin, il a été démontré qu'une perfusion intestinale de lipide chez des patients avec un SII pourrait entraîner une augmentation de la sensibilité colique et une altération de la perception rectale [276]. Ainsi, les résultats des études disponibles à ce jour permettent de soutenir que l'altération de la composition du microbiote intestinal pourrait affecter directement ou indirectement le fonctionnement normal de l'axe CIM aboutissant à une activation de l'immunité mucosale et l'inflammation, une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale et des perturbations sensori-motrices [271, 276].

#### **1.2.4.3 Activation de l'immunité mucosale et de l'inflammation**

La dysbiose observée dans le SII serait associée à l'activation de l'immunité mucosale et de l'inflammation [271, 276]. Cette association serait soutenue par une prévalence d'environ 10 % des patients rapportant avoir perçu la survenue inédite des symptômes du SII suite à un épisode de gastroentérite infectieuse (SII-PI) ayant entraîné une altération de la composition du microbiote [276]. De plus, plusieurs études menées chez des patients avec un SII ont mis en évidence une inflammation chronique et de bas-grade de la muqueuse et qui serait provoquée par une dysrégulation du système immunitaire entérique inné et adaptatif [271]. En effet, les patients avec un SII présentent une augmentation de l'expression d'AMP tels que la  $\beta$ -défensine-2, de récepteurs TLR par la muqueuse colique et du niveau d'anticorps circulants tels que les anticorps antiflagellines induisant ainsi une reconnaissance augmentée des composants bactériens tels que les LPS et la flagelline [290-292]. En outre, le côlon des patients avec un SII présente une augmentation de l'activité (dégranulation) des mastocytes en étroite proximité avec les nerfs

entériques qui est corrélée avec les symptômes du SII. Néanmoins, ces résultats ne sont valables que pour un SII-D [293, 294]. Par ailleurs, une altération des plasmocytes IgA<sup>+</sup> et IgG<sup>+</sup> ainsi que des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6) et anti-inflammatoires (IL-10) ont été observés dans la muqueuse intestinale des patients avec un SII en comparaison à des sujets contrôle [271]. Enfin, et bien que des variations existent également selon le sous-type, les patients avec un SII présentent un niveau plus élevé de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ) dans la circulation sanguine périphérique [271].

#### **1.2.4.4 Altération de la barrière épithéliale**

L'activation de l'immunité entérique et l'inflammation résultant de l'altération du microbiote dans le SII pourrait dégrader la fonction de la barrière épithéliale [292]. Les perturbations de la barrière épithéliale observées dans le SII incluent une augmentation de la perméabilité de la muqueuse, de l'expression génique de mucine (MUC20) et *mucin-like* (PARM1) ainsi que de la concentration fécale en  $\beta$ -défensine-2 [292]. L'augmentation de la perméabilité de la muqueuse ou « *leaky-gut* » observée en particulier chez les patients avec un SII-D est associée à une diminution de l'expression des protéines des jonctions serrées ZO-1 dans l'intestin grêle et le côlon ainsi qu'une augmentation des protéases bactériennes à sérine et de leurs récepteurs sur l'épithélium intestinal en comparaison avec des sujets contrôle [295-298]. De plus, une augmentation de la perméabilité de la muqueuse accompagnée d'une infiltration colique de mastocyte a été associée à une sévérité élevée des symptômes du SII [299]. Enfin, l'augmentation de la perméabilité intestinale observée dans le SII-PI est associée à un polymorphisme d'un seul nucléotide du gène codant pour la cadhérine-E, protéine du cytosquelette impliquée dans l'adhérence cellulaire [300].

#### **1.2.4.5 Perturbations des fonctions sensori-motrices**

En plus de l'inflammation de la muqueuse qui pourrait affecter les fonctions sensori-motrices et sécrétoires, la structure neuronale et la libération de neurotransmetteurs dans l'intestin, le microbiote intestinal peut directement affecter les fonctions sensori-motrices intestinales [301, 302]. Ces affectations sensori-motrices pourraient être reliées aux symptômes du SII bien que les mécanismes exacts régissant ces interactions ne sont pas entièrement démontrés à ce jour [271].

##### *1.2.4.5.1 Hypersensibilité viscérale*

Les terminaisons nerveuses afférentes primaires du SNE localisées dans le plexus nerveux sous-muqueux du tractus gastro-intestinal (plexus de Meissner) et entre les fibres musculaires lisses du plexus nerveux myentérique (plexus d'Auerbach) transmettent les stimuli au SNC à travers les voies sympathiques et parasympathiques du SNA [303]. D'une part, la voie sympathique transmet les stimuli qui par le thalamus stimule le cortex cérébral pour être reconnu comme une douleur viscérale et d'autre part la voie parasympathique transmet les stimuli initiant une variété de réflexes [303, 304]. Ce réseau de communication complexe qui interagit avec l'axe HHS, influençant ainsi

les fonctions sensori-motrices et l'activation des voies afférentes du nerf vague, exerce un contrôle spinal de la douleur viscérale [305, 306]. L'hypersensibilité viscérale se développerait à plusieurs niveaux de l'axe CI, c'est-à-dire le SNE, la moelle épinière et les sites supra-spinaux, et cette sensibilité accrue joue un rôle majeur dans la physiopathologie et la symptomatologie du SII se manifestant par un seuil de perception diminué de douleur abdominale [307, 308]. De récents travaux démontrent les différents mécanismes établissant la relation directe entre la dysbiose intestinale et l'hypersensibilité viscérale [302, 309-311]. Ainsi, il a été démontré chez la souris qu'une altération du microbiote intestinal induite par antibiotiques modifie la perception de la douleur et de la motricité colique par une augmentation de l'expression des récepteurs TLR4 et TLR7 et une diminution des récepteurs anti-nociceptifs cannabinoïdes de type 1 (CB1) et opioïdes de type  $\mu$  (MOR) [309]. De plus, Aguilera et al. (2013) ont démontré qu'une dysbiose intestinale induite chez la souris par des facteurs de stress augmente l'expression dans le côlon des récepteurs CB2 et de l'isoforme TPH1 (tryptophane hydroxylase 1) impliqués dans la sensibilité viscérale [310]. En outre, la dysbiose observée chez les patients avec un SII, y compris le SII-PI, et entraînant l'hypersensibilité intestinale, un SIBO et une constipation chronique, est associée à une activation de l'immunité entérique et systémique ainsi qu'à une fermentation colique altérée impliquant en particulier le butyrate [276, 311]. Enfin, il est important de rapporter que la récente étude de Mao et al. (2013) a démontré qu'une espèce bactérienne du microbiote commensale, et plus précisément le polysaccharide A capsulaire de *Bacteroides fragilis*, est capable de réguler l'activation des terminaisons nerveuses sensibles [312].

#### 1.2.4.5.2 Altérations de la motilité gastro-intestinale

Bien que les altérations de la motricité intestinale et colique aient pu être considérées comme étant des composantes majeures de la physiopathologie du SII, la démonstration de leurs implications s'est heurtée aux résultats non concluants des études de manométrie intestinale tentant de mettre en évidence un diagnostic anormal chez les patients avec un SII [313-316]. Néanmoins, il a été démontré également que le microbiote entérique régule la fonction motrice de l'intestin qui en retour peut affecter la composition de l'écosystème microbien intestinal [276, 302]. En effet, l'implantation d'un microbiote intestinal sain corrige les signes d'une motilité intestinale altérée observés chez une souris axénique et cette normalisation de l'activité myoélectrique de l'intestin grêle serait espèce-dépendante [317-319]. Ainsi, l'espèce *B. thetaiotaomicron*, espèce commensale chez la souris et chez l'homme, est capable de réguler l'expression des gènes impliqués dans la fonction des fibres musculaires lisses et des neurotransmetteurs [320]. De plus, l'étude de Kashyap et al. (2013) démontre que l'implantation d'un microbiote humain sain chez une souris axénique augmente la motricité colique, diminuant ainsi la durée du transit GI, et que cet effet serait associé à la quantité et au type de glucides dans l'alimentation [321]. L'effet modulateur du microbiote sur la

motilité gastro-intestinale reposerait sur un mécanisme dépendant de la voie de signalisation du TLR4 fixant les LPS bactériens et sur les métabolites bactériens libérés dans l'intestin [271, 322]. L'absence du récepteur TLR4 chez la souris est ainsi associée à une augmentation du temps de transit et une réduction de l'abondance des neurones nitrergiques coliques [322]. De plus, les métabolites issus de la fermentation colique pourraient affecter le transit GI. Ainsi, il a été démontré que le CH<sub>4</sub> (méthane) diminue la durée du transit GI, le H<sub>2</sub>S inhibe la contraction des fibres musculaires lisses, les AGCC stimulent le transit colique en activant la libération de 5-HT et la tryptamine issue du tryptophane augmente les contractions intestinales [323-327]. Les autres métabolites bactériens qui pourraient influencer la motilité GI incluent les métabolites des acides biliaires et les ligands des récepteurs GABA qui pourraient exercer un effet inhibiteur [328, 329]. Enfin, alors que le microbiote pourrait influencer les fonctions sensori-motrices, l'inverse pourrait être vrai dans la mesure où le microbiote intestinal pourrait être affecté par une durée de transit GI accélérée ou ralentie [321]. Ces variations de la durée du transit GI, en modifiant le débit du contenu intestinal, affecteraient les gènes exprimés par le microbiote intestinal et sa structure organisationnelle [271, 321]. Il est en outre important de noter qu'en dépit de l'implication des AGCC dans les perturbations sensori-motrices des patients avec un SII, les concentrations fécales d'AGCC ne diffèrent cependant pas de façon significative en comparaison avec des sujets sains et sont faiblement corrélées avec les symptômes du SII [276].

### 1.3 Stratégies de prise en charge du SII

La prise en charge du SII est multidimensionnelle et orientée selon la sévérité de la pathologie, des symptômes prédominants et des préférences des praticiens [2]. En effet, une approche thérapeutique graduée avec une stratégie palliative a été proposée pour la prise en charge des patients diagnostiqués pour un SII [330]. Pour des symptômes légers, un suivi personnalisé basé sur l'écoute et la transmission d'informations aux patients sur le SII et sur les approches thérapeutiques, facteur important de réussite dans la prise en charge, accompagné d'ajustements du régime alimentaire peuvent suffire [2]. Pour des symptômes modérés, des approches pharmacologiques et des techniques de thérapies psychiatriques et/ou comportementales vont s'ajouter dans le but de prendre en charge le ou les symptômes prédominants [2]. Pour les symptômes sévères et persistants, la consultation à un centre antidouleur peut s'avérer utile [2]. Néanmoins, dans le cas où les médicaments opiacés seraient l'approche thérapeutique prédominante, ceux-ci devraient être évités en raison de leur inefficacité pour traiter la douleur abdominale fonctionnelle chronique [2]. De plus, le recours aux opiacés peut mener au développement des troubles intestinaux liés aux opiacés ou NBS (Narcotic Bowel Syndrom) augmentant la sévérité des douleurs abdominales et le risque d'une escalade continue des doses employées [2, 331].

### 1.3.1 Mesures générales

Tout d'abord, la qualité de la relation établie entre le médecin et le patient présentant un SII est un facteur important dans l'efficacité et la réussite de la prise en charge [332]. Il a été ainsi démontré que la sévérité des symptômes est associée à un sentiment de honte pour les patients qui se sentent faiblement compris par les médecins et qui attendent principalement écoute, soutien et des informations compréhensives sur le SII et les approches thérapeutiques existantes [333]. De plus, l'interrogation du patient accompagné d'un historique médical synthétique permet de faciliter la création d'une relation médecin-patient afin d'aboutir à un protocole thérapeutique flexible et davantage personnalisé [334].

### 1.3.2 Modifications du régime alimentaire

Environ 70 % des patients avec un SII estiment que l'alimentation joue un rôle dans la sévérité de leurs symptômes [2]. En effet, une étude de vaste cohorte ( $n=1\ 200$ ) a montré qu'une modification des habitudes alimentaires est associée à une diminution significative de leurs symptômes notamment en consommant de petites portions lors des repas (69 %), en augmentant la consommation de fibres (58 %) et en évitant les aliments gras (64 %), produits laitiers (54 %), glucides (43 %), caféine (41 %), alcool (27 %) ainsi que les aliments riches en protéines comme les produits carnés (21 %) [335]. Bien que des mécanismes d'activation de l'immunité et de l'inflammation de la muqueuse liés à une modification du microbiote intestinal et engendrés par des antigènes alimentaires aient pu être démontrés, les seules preuves soutenant l'existence d'allergies alimentaires à l'origine du SII incluent les améliorations perçues par les patients suivant les régimes d'exclusion et évitant les allergènes disodium cromoglycate et métacholine [2]. De plus, l'absence d'un « Gold standard » pour les tests de diagnostic d'allergies alimentaires et la difficulté pour les patients avec un SII de distinguer une allergie et une intolérance alimentaire dans les enquêtes, confirmée par les résultats d'une revue de Park et al. (2006) sur les allergies et les intolérances dans le SII montrant que les taux de réponses après exclusion alimentaire varient entre 15% et 71%, ne permettent pas au GT-SII-ACG de recommander l'exclusion des allergènes alimentaires pour la prise en charge du SII [11, 336, 337]. Le GT-SII-ACG recommande cependant de mener les tests sérologiques cœliaques en cas de SII-D ou SII-M et/ou d'intolérance au lactose (Tableau 4) [6]. Une étude non-contrôlée d'exclusion du gluten alimentaire menée auprès de 41 patients avec un SII-D sans confirmation sérologique de la maladie cœliaque a montré une diminution significative des anticorps IgG à la gliadine et l'observation de transglutaminase tissulaire après le régime d'exclusion [338]. Après 6 mois, la résolution des diarrhées ( $< 3$  défécations par jour) et la diminution des symptômes du SII (douleur abdominale, ballonnement, distension, gaz, borborygmes) sont retournées aux valeurs initiales chez 60 % des patients présentant une sérologie

coélique et porteur du groupe HLA-DQ2 et chez 12 % des sujets négatifs aux deux tests [338]. Plus récemment, l'essai contrôlé randomisé (ECR) de Vasquez-Roque et al. (2013) ( $n=45$ ) et l'étude prospective de Aziz et al. (2016) ( $n=41$ ) ont démontré une diminution significative des symptômes du SII chez les patients diagnostiqués avec un SII-D et en particulier ceux porteurs du groupe HLA-DQ2/8 [339, 340]. Néanmoins, ces résultats méritent d'être confirmés par des essais de plus large cohorte et de haute qualité méthodologique [339, 340]. En raison du mimétisme entre les symptômes du SII et ceux d'une intolérance au lactose, avérée ou non, et d'une prévalence plus élevée de cette intolérance dans la population de patients avec un SII en comparaison avec des sujets sains, la consommation de produits alimentaires doit être évitée ou diminuée si elle est associée à l'incidence ou une augmentation de la sévérité des symptômes [6]. De plus, l'essai pilote contrôlé publié par Shepherd et al. (2006) et mené auprès de 26 patients avec un SII avait suggéré l'efficacité d'un régime alimentaire excluant les FODMAP à améliorer les symptômes chez 80 % des patients de l'étude qui présentaient une intolérance au fructose [341]. Il est intéressant de noter par ailleurs que Parker et al. (2010) ont mis en évidence une augmentation durant les dernières décennies de la consommation de FODMAP dans le régime alimentaire occidental et de fructose en particulier [342]. Quatre études plus récentes ont démontré par la suite l'efficacité du régime pauvre en FODMAP de l'Université de Monash pouvant améliorer les symptômes du SII chez 68 à 76 % des patients [343-347]. En outre, il a été récemment démontré par Pedersen et al. (2014) que ce régime pauvre en FODMAP pouvait être plus efficace que la prise d'une souche de probiotiques telle que *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) dans la diminution du score de sévérité des symptômes du SII [348]. Néanmoins, bien que le fructose, le sorbitol et une variété d'alcools polyhydriques faiblement absorbés par l'intestin retiennent des quantités excessives d'eau à l'origine des diarrhées et que le régime alimentaire pauvre en FODMAP peut être recommandé pour réduire la sévérité des symptômes du SII, cette modification de l'alimentation peut également conduire à des modifications délétères sur le microbiote intestinal, telle qu'une diminution des bactéries du genre *Bifidobacterium*, et sur les apports nutritionnels chez les patients avec un SII [345, 349]. C'est pourquoi en raison du faible nombre et de la faible qualité méthodologique des études menées à ce jour, dont les résultats sont pourtant prometteurs, et des effets incertains des modifications qu'entraînent ce régime à long terme, davantage de travaux de haute qualité méthodologique sont nécessaires pour mieux identifier les implications pour la santé d'un tel régime nécessitant des conseils alimentaires appropriés en fonction des patients et un suivi personnalisé [349-351]. Enfin, Halmos et al. (2015) ont récemment démontré qu'un régime pauvre en FODMAP pouvait produire des effets délétères sur l'écosystème microbien et le micro-environnement luminal colique chez les sujets sains consistant en une diminution absolue et relative de l'abondance et de la diversité bactérienne [352].

### **1.3.3 Approches thérapeutiques pharmacologiques**

Les stratégies thérapeutiques pharmacologiques sont préconisées en fonction du symptôme prédominant, soit constipation (SII-C), diarrhées (SII-D) ou encore douleur et/ou ballonnement [2].

#### **1.3.3.1 Approches pharmacologiques du SII-C**

Les traitements pour le SII-C comprennent les agents de charge conventionnels, tels que psyllium, méthylcellulose, polycarbophile de calcium et les fibres utilisées en première intention dans le SII et ceci bien que leur administration nécessite un ajustement graduel des doses afin de limiter les évènements indésirables (EI) tels que ballonnement et flatulence [2, 353, 354]. De plus, et bien que leur utilisation dans le SII-C n'ait pas fait l'objet de nombreuses études, les laxatifs osmotiques (exemple : lactulose) et stimulants (exemple : bisacodyl) sont couramment prescrits mais leur utilisation est limitée par leurs EI tels que ballonnement, flatulence et diarrhées [355, 356]. Enfin, un activateur du canal chlorure (Lubiprostone) et un agoniste des récepteurs 5-HT<sub>4</sub> (Tegaserod) ont été approuvés par la FDA mais uniquement dans des indications restreintes en raison des EI de la Lubiprostone et du risque cardio-vasculaire du Tegaserod [2].

#### **1.3.3.2 Approches pharmacologiques du SII-D**

La prise en charge courante du SII-D concerne la prescription d'antidiarrhéiques tels que le Loperamide qui, en agissant sur les récepteurs opioïdes de type  $\mu$  (MOR) du plexus myentérique, diminue la fréquence et améliore la consistance des selles [6, 28]. Bien que son efficacité ait également été démontrée, l'alosetron, un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> n'est couramment prescrit que chez les femmes avec un SII-D sévère et persistant en raison des complications de constipation et de colite ischémique [6]. Enfin, la rifaximine, un antibiotique à faible absorption systémique et à large spectre d'activité contre les bactéries à Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> aérobiques et anaérobiques, pourrait être efficace à court terme dans l'amélioration globale des symptômes du SII et dans le SII-C en particulier chez les patients présentant un niveau de sévérité élevé de ballonnements [6, 357]. Cependant, l'absence de données de sécurité et d'efficacité à long terme des antibiotiques dans la prise en charge du SII limitent leur utilisation [6]. De plus, la réponse au traitement de la rifaximine n'a pas été associée à un résultat positif au test respiratoire pour un SIBO et son efficacité dans la diverticulose colique pourrait davantage suggérer une action sur le microbiote du côlon [358, 359].

### 1.3.3.3 Approches pharmacologiques de la douleur abdominale et/ou ballonnements

La douleur perçue dans le SII est liée d'une part à des mécanismes périphériques pris en charge couramment par des antispasmodiques et centraux par les antidépresseurs tricycliques (ATC) et inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine (ISRS) [2]. En ciblant le muscle lisse et les récepteurs cholinergiques, certains antispasmodiques ont montré un bénéfice significatif comparé au placebo d'après les résultats d'une méta-analyse de 12 essais ( $n = 1\ 778$ ) précisant néanmoins qu'il était difficile de conclure en raison d'une hétérogénéité trop importante parmi les études comparées et des biais de publication [353]. Ainsi, le GT-SII-ACG recommande l'utilisation des antispasmodiques sur une courte durée en l'absence de données sur l'efficacité et la sécurité à long terme [6]. De plus, bien que la SBG recommande l'utilisation de la mebeverine en cas d'échec des mesures générales, et qui est généralement bien tolérée dans le cadre d'une prise symptomatique et après les repas, une revue systématique a conclu que la mebeverine n'avait pas démontré son efficacité à diminuer la douleur abdominale ni à améliorer de façon globale les symptômes comparée au placebo [28, 360]. Enfin, les analyses *post-hoc* d'un essai mené avec les ATC suggèrent leur efficacité dans l'amélioration de la douleur et du ballonnement en particulier chez les patients avec un SII-D [361]. Bien que l'efficacité des ISRS dans la diminution de la douleur abdominale ne soit pas démontrée en raison de la faible taille des échantillons des études, ils peuvent être utilisés pour réduire l'anxiété et augmentent l'efficacité des ATC [361, 362]. Les diarrhées courantes liées aux ISRS suggèrent davantage une indication pour le SII-C mais des études de large cohorte et de haute qualité méthodologique sont nécessaires pour confirmer leur capacité à diminuer la douleur abdominale indépendamment de leurs effets sur l'humeur [2, 362]. Le Tegaserod, seulement en cas d'urgence d'après la FDA, et la rifaximine font également partie des options pharmacologiques pour diminuer la douleur et/ou le ballonnement [2].

### 1.3.4 Approches thérapeutiques non-pharmacologiques

#### 1.3.4.1 Comportementales

Les recommandations du GT-SII-ACG indiquent que la thérapie comportementale cognitive (CBT), la psychothérapie dynamique, l'hypnothérapie et la gestion du stress peuvent améliorer la qualité de vie et diminuer l'impact psychologique induit par des facteurs de stress ou traumatiques qui sont associés à la survenue des symptômes du SII ou à leur intensification [6]. Cependant, l'utilisation de ces techniques est limitée en raison d'une absence d'études de haute qualité méthodologique, d'une efficacité insuffisante chez les patients avec un niveau élevé d'anxiété et dépression, et d'une efficacité significative en particulier chez les patients réfractaires à tout traitement et souhaitant une approche comportementale [2].

#### 1.3.4.2 Acupuncture

Une revue Cochrane publiée en 2006 a examiné 6 essais cliniques, randomisés et contrôlés par placebo et a conclu que l'efficacité de l'acupuncture n'est pas démontrée en raison de la faible qualité méthodologique des études [363]. Un essai de Lembo et al. (2009) randomisé, contrôlé par placebo et mené sur 230 patients avec un SII a confirmé l'absence d'efficacité de l'acupuncture [364]. Les mêmes investigateurs dans une autre étude publiée en 2008 ont mis en évidence que l'effet placebo produit des améliorations cliniquement significatives et dont la composante la plus robuste de cet effet est assurée par une relation médecin-patient de qualité [365].

#### 1.3.4.3 Phytothérapie

Une revue Cochrane systématique publiée en 2006 et évaluant l'efficacité de la phytothérapie de 75 essais cliniques, randomisés et contrôlés par placebo auprès d'un total de 7 957 patients avec un SII a conclu que certaines préparations de plantes, telles que les médicaments à base de plantes conçus d'après les principes de la médecine chinoise (STW5 Iberogast<sup>®</sup>) ou tibétaine (Padma Lax<sup>®</sup>), pourraient présenter des effets bénéfiques dans la prise en charge de ce TFI [366]. Cependant, la faible qualité méthodologique des études ainsi que la pureté ou l'innocuité incertaine de ces préparations limitent leur utilisation [2].

#### 1.3.4.4 Prébiotiques

La FAO (Food and Agriculture Organization) définit le prébiotique comme un « composant alimentaire non vivant qui confère un effet bénéfique pour la santé de l'hôte associé avec une modulation du microbiote » [367]. Cette stratégie vise à reconfigurer le microbiote intestinal en fournissant des doses régulières d'un substrat spécifique destiné à être métabolisé par des bactéries cibles contribuant à leur croissance contrairement à celle des espèces bactériennes néfastes. Egalement reconnu en tant qu' « aliments fonctionnels », ils échappent à l'absorption de l'intestin grêle et atteignent le côlon où ils servent de nutriments pour des espèces bactériennes spécifiques appartenant principalement aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* [368]. Plusieurs prébiotiques appartiennent aux FODMAP et dont un exemple est l'inuline, fructane présent dans une variété de plantes telles que la chicorée et dont l'hydrolyse produit des oligofructoses [368]. Les prébiotiques proviennent de nombreux fruits, céréales, légumes et sont présents dans le lait maternel qui contient jusqu'à 1000 oligosaccharides [369]. Il a également été démontré que les longues chaînes polyinsaturées d'acides gras présentaient des propriétés prébiotiques [370]. Les données expérimentales et chez l'homme ont montré des effets bénéfiques d'une supplémentation en prébiotiques dans différentes conditions pathologiques telles que les infections, allergies, troubles liés à la grossesse ou du métabolisme, pathologies GI incluant MICI, CIC et cirrhoses [276]. Cependant, peu d'études ont été menées avec des prébiotiques dans le SII et les résultats fournis sont contradictoires [371-374]. Deux essais, utilisant soit un oligofructose soit des fructo-

oligosaccharides (FOS), n'ont démontré aucun effet bénéfique des prébiotiques, alors que 2 autres études utilisant des FOS ou des galacto-oligosaccharides (GOS) ont démontré une amélioration significative des symptômes [371-374]. En effet, les FOS ont permis une amélioration globale des symptômes et les GOS une diminution du ballonnement et de la flatulence ainsi qu'une amélioration du score d'anxiété [373, 374]. Ces résultats pourraient suggérer que la réponse clinique dépendrait du type et des doses de prébiotiques utilisés en tenant compte du fait que de faibles doses pourraient être inefficaces et des doses élevées induiraient une production de gaz. En effet, le lactulose ou les fibres, qui ont démontré leur efficacité dans la constipation, pourraient entraîner une production excessive de gaz induisant une douleur abdominale aggravant ainsi la sévérité des symptômes du SII [375-377]. Enfin, et en dépit de leurs effets bénéfiques modestes à augmenter le poids des selles, les mélanges de fructose et sorbitol augmentent fréquemment le ballonnement et la flatulence à la fois chez les patients avec un SII mais également dans la population des volontaires sains [378, 379].

## 1.4 Probiotiques et prise en charge du SII

### 1.4.1 Historique des probiotiques

Le concept de probiotiques, introduit par le postulat du lauréat du prix Nobel Elie Metchnikoff en 1907 au sein de la communauté scientifique, s'est basé initialement sur l'association existante entre la longévité des Bulgares et la consommation de produits laitiers fermentés contenant des LAB vivantes suggérant ainsi que l'ingestion de certains micro-organismes vivants pourraient être bénéfiques pour la santé humaine [380]. Il suggéra que des micro-organismes protéolytiques du côlon, tels que les bactéries du genre *Clostridium*, produisent des substances toxiques responsables du vieillissement et que la consommation de lait fermenté pourrait recouvrir le côlon par les bactéries lactiques apportées capables de diminuer le pH intestinal afin de supprimer les bactéries protéolytiques et ralentir ainsi le processus de vieillissement [380-382]. Il développa un régime alimentaire à base de lait fermenté par une bactérie qu'il appela *Bacillus bulgaricus* ou « Bacille bulgare » et dont les bénéfices santé furent rapportés par des travaux ultérieurs publiés en 1965 par Vaughan [383]. La même année, le terme de « probiotique » fut introduit pour la première fois par Lilly et Stillwell par opposition aux antibiotiques et ils furent définis comme des facteurs dérivés des microorganismes stimulant la croissance des autres organismes [382]. Enfin, la nécessité que les probiotiques soient des micro-organismes vivants afin d'exercer un effet bénéfique sur l'hôte fut introduite par Roy Fuller (1989) [382].

## **1.4.2 Définitions des probiotiques**

D'après la définition actuelle de la FAO/WHO (World Health Organization) établie en 2001 et grammaticalement modifiée par Hill et al. (2014), les probiotiques désignent des « micro-organismes vivants qui, administrés en quantité suffisante, sont capables d'exercer des effets bénéfiques sur l'hôte » [384, 385]. Il est important de noter que cette définition donnant lieu à la publication des recommandations émises par la FAO/WHO en 2002 et 2006 ne donne aucune indication sur l'origine des souches comme critère de sélection et de définition des probiotiques mais se base sur la spécificité de l'effet probiotique induit [386, 387]. En 2005, le ministère de la Santé italien a résumé la définition de la FAO/WHO des probiotiques comme étant des « micro-organismes qui, ingérés en quantité suffisante, confèrent des effets bénéfiques sur l'organisme » [388]. Ce transfert de définition d'un usage scientifique à une fonction réglementaire a amené à considérer le terme de « probiotique », dont la définition originelle implique un bénéfice santé, comme une allégation de santé conformément au règlement européen (EC) n. 1924/2006 [389, 390].

## **1.4.3 Aspects critiques de l'interaction probiotiques – organisme hôte**

Les principaux aspects de l'interaction entre les probiotiques et l'organisme hôte, définis pour légitimer l'utilisation des probiotiques pour améliorer les fonctions physiologiques de l'hôte, concernent la viabilité des souches administrées, leur identification, la quantité de souches administrées, leurs bénéfices pour l'hôte et leur définition, et la sécurité d'emploi [390].

### **1.4.3.1 Viabilité des souches probiotiques**

Depuis Metchnikoff, les probiotiques, apportés soit dans une matrice alimentaire fermentée avec une ou des bactérie(s) « bénéfique(s) » soit par un complément alimentaire à base de bactérie(s) sous une forme « concentrée », fournissent aux consommateurs des bactéries vivantes capables de passer les environnements gastriques et iléales et ainsi proliférer dans le côlon conformément aux lignes directrices de la FAO/WHO en 2001 [384, 390]. Ce concept, écologique par nature, soutient que l'utilisation de bactéries vivantes capables de s'implanter parmi d'autres bactéries vivantes, c'est-à-dire le microbiote, exercent des fonctions impliquant une activité métabolique [390]. Néanmoins, le rapport de l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) publié en 2005 et intitulé « Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte » a émis des lignes directrices n'exigeant pas de démontrer la capacité de prolifération des probiotiques dans le tractus GI pour apporter la démonstration de leur bénéfice [391]. La viabilité est par définition un prérequis pour la fonctionnalité des probiotiques dans la mesure où elle assure les mécanismes tels que l'adhérence, la réduction de la perméabilité, l'immunomodulation et constitue un défi industriel dans la mesure où les souches doivent pouvoir croître dans les

conditions de fabrication et commercialisation, et conserver leur viabilité dans les conditions normales de stockage [392-394]. Néanmoins, certains travaux ont pourtant démontré que la viabilité n'est pas nécessaire pour tous les effets probiotiques et que les composants de la paroi cellulaire ou l'ADN de certaines souches de bactéries probiotiques pourraient exercer des effets bénéfiques chez l'hôte ; ainsi pour certaines souches une croissance optimale lors des phases initiales de production pourrait être suffisante et ne nécessitant donc pas une viabilité optimale lors du stockage [395-397]. De nombreuses études soutiennent l'efficacité de bactéries vivantes mais les résultats des études sur les effets d'une même souche, à la fois sous des formes vivante et non-vivante, sont peu nombreux et conflictuels [390]. Par conséquent, en accord avec des définitions bien établies des probiotiques et par souci de clarté pour une meilleure information du consommateur, le terme probiotique est réservé aux produits contenant des micro-organismes vivants [390].

#### **1.4.3.2 Identification des probiotiques**

L'identification de la souche est nécessaire à la fois pour des raisons de sécurité et pour prouver son action bénéfique [390]. En effet, il a été démontré que différentes souches de la même espèce pourraient exercer des effets différents chez l'hôte [390]. Ainsi, dès 2001 la FAO/WHO a établi que « les données obtenues avec un aliment probiotique spécifique ne peuvent pas être extrapolées à d'autres aliments contenant cette souche probiotique particulière ou à d'autres micro-organismes probiotiques » [384]. De plus, le rapport de l'AFSSA (2005) mentionne que la quantité de probiotiques passant vivants à travers l'intestin dépend de la souche, de la dose ingérée et des facteurs liés à l'hôte et au vecteur alimentaire [391]. En effet, il a été mis en évidence que des souches d'une même espèce peuvent exercer des effets différents ou opposés [398,399]. Pour exemple, des différences dans la capacité de colonisation *in vivo* ont été mis en évidence entre LGG et *L. rhamnosus* 1970-2 et il a été démontré que *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) W11 diminue l'induction d'IL-10 et augmente la réponse Th1 alors que les souches *B. longum* NCIMB 8809 et *B. longum* BIF53 à l'opposé augmentent l'induction d'IL-10 et diminuent la réponse Th1 [398,399]. Les méthodes analytiques sont établies et décrites dans plusieurs rapports incluant le rapport de la FAO/WHO (2001), les recommandations du ministère de la Santé italien (2005) ainsi que l'avis scientifique émis plus récemment par l'Autorité européenne de sécurité des aliments ou *European Food Safety Authority* (EFSA) (2012) [384, 388, 400]. L'espèce doit être identifiée par hybridation ADN-ADN ou par analyse de séquence du gène codant pour l'ARNr 16S et/ou analyse d'autres marqueurs phylogénétiques alors que la souche doit être identifiée par macro-restriction d'ADN suivie d'une électrophorèse en champ pulsé ou *pulsed field electrophoresis* (PFGE), d'une amplification aléatoire d'ADN polymorphe ou *randomly amplified polymorphic DNA analysis* (RAPD) ou d'autres méthodes moléculaires d'identification génétiques internationalement acceptées [384, 388, 400]. La bactérie est considérée suffisamment caractérisée si ces deux critères

d'identification sont remplis [384, 388, 400]. L'inscription dans une collection internationale de souches est également recommandée [390].

#### **1.4.3.3 Doses**

La quantité optimale de bactéries probiotiques à administrer est mal documentée et difficilement estimable dans la mesure où celle-ci est souche-dépendante et dépendrait du bénéfice recherché [390]. Malgré l'absence d'études dose-réponse spécifiques, le rapport de l'AFSSA (2005) indique que :

- 1) La dose de probiotiques ingérée est un facteur important pour obtenir de fortes concentrations dans les divers compartiments du tractus GI.
- 2) Le rationnel scientifique appuyant l'allégation que les concentrations en probiotiques doivent être supérieures ou égales à  $10^6$  CFU/ml dans l'intestin grêle (ileum) et  $10^8$  CFU/g dans le côlon est faible.
- 3) Les concentrations dans le côlon ont été proposées car elles correspondent à moins de  $1/1000^{\text{ème}}$  du microbiote autochtone présent.

Il est également important de noter que dans le cas d'association microbienne, chaque espèce en « compétition » sur le plan fonctionnel doit être apportée dans des quantités appropriées et que le niveau de preuve d'un effet synergique, métabolique ou fonctionnel chez l'homme, de 2 souches bactériennes ou plus est faible [390]. Néanmoins, il existe pourtant un rationnel théorique soutenant que l'administration de 2 espèces bactériennes ou plus pourrait conduire à des effets fonctionnels complémentaires ou synergiques [390].

#### **1.4.3.4 Type de bénéfice et population cible**

Les probiotiques peuvent améliorer, dans les limites physiologiques, des fonctions du système digestif, telles que la fréquence des selles ou des caractéristiques subjectives et pourraient également être efficaces dans la réduction du risque de pathologies spécifiques en prévenant à la fois des symptômes objectifs et subjectifs [390]. Expérimentalement, les effets des probiotiques ont été observés principalement en étudiant des groupes de sujets diagnostiqués pour une pathologie pour des raisons méthodologiques dans la mesure où il est difficile d'enregistrer des effets positifs significatifs en l'absence d'anomalies fonctionnelles tel que c'est le cas des populations de sujets sains [390]. Cette approche a permis de démontrer divers bénéfices des probiotiques en santé humaine mais pose le problème de la transférabilité des données à une partie de la population représentant des consommateurs habituels de probiotiques et définis par la FAO/WHO comme étant des personnes en « bonne santé » [390]. Enfin, les effets observés sont souvent liés à la présence de probiotiques dans le tractus GI assurée uniquement en cas d'une administration prolongée [390].

#### 1.4.3.5 Sécurité

L'évaluation de la sécurité des espèces microbiennes proposées comme probiotiques constitue un critère clé pour les autorités réglementaires [390]. La distribution des espèces microbiennes a reposé sur une longue tradition d'une consommation sûre ou d'une évaluation au cas par cas conformément à la réglementation européenne relative aux nouveaux aliments ou *novel foods*, additifs alimentaires ou médicaments selon leurs conditions d'utilisation [390, 401]. Dans le secteur alimentaire, l'introduction de nouvelles directives a exigé l'adoption de nouveaux instruments d'évaluation des probiotiques basés sur le principe de présomption d'innocuité reconnue ou *qualified presumption of safety* (QPS) [402]. Ainsi, seules les souches microbiennes classées dans le groupe QPS sont sujettes à une vérification de l'absence de caractéristiques spécifiques basées sur l'absence de résistance aux antibiotiques, à usage clinique et vétérinaire, et de facteurs de virulence [403]. Cependant, dans la mesure où différents micro-organismes sont insensibles de façon inhérente aux antibiotiques, la résistance aux antibiotiques est problématique en particulier si celle-ci s'accompagne d'un transfert horizontal de déterminants génétiques [404]. C'est pourquoi le Comité Scientifique de Nutrition Animale de l'Union Européenne (UE) ou *Scientific Committee on Animal Nutrition of the EU* (SCAN) et le Panel EFSA sur les additifs, produits et substances utilisées dans l'alimentation animale exigent l'absence de gènes résistants aux antibiotiques transférables comme prérequis pour autoriser un micro-organisme [405-407].

#### 1.4.3.6 Propriétés souhaitables des probiotiques

Afin qu'une souche potentiellement probiotique puisse exercer des effets bénéfiques, certaines propriétés sont couramment évaluées par des tests *in vitro* et incluent [408] :

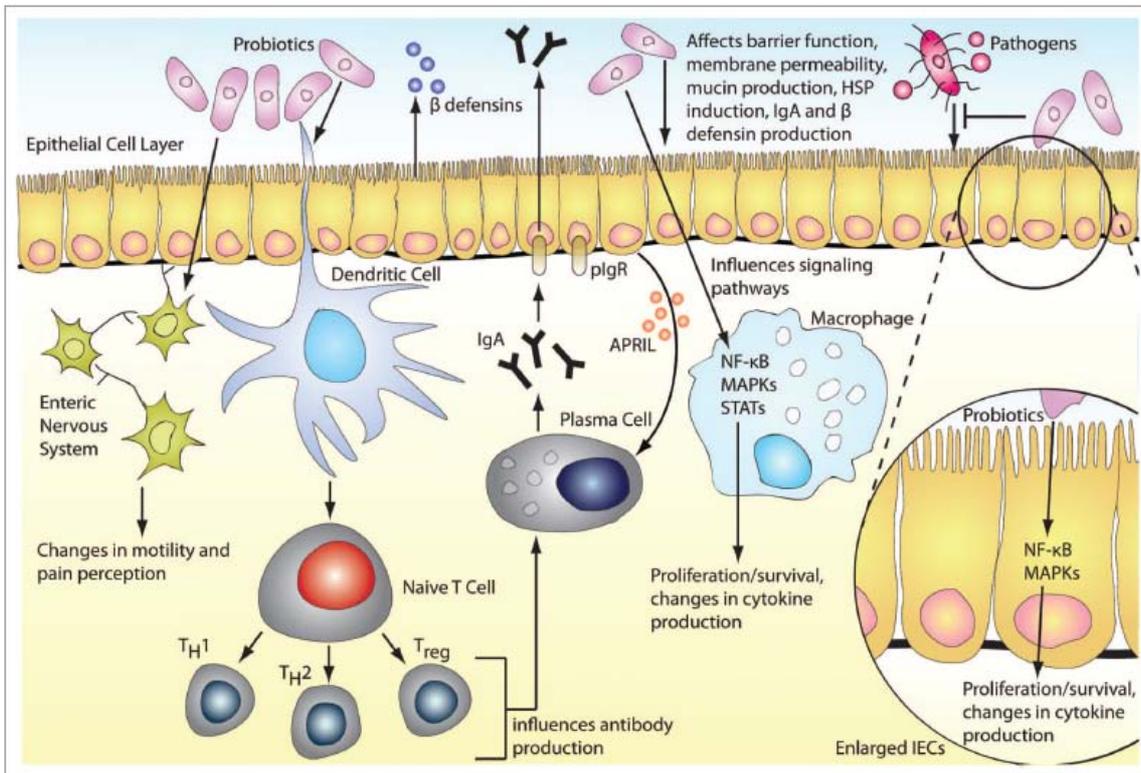
- 1) Tolérance à l'acide et la bile, propriété majeure en vue d'une administration orale,
- 2) Adhésion aux surfaces mucosales et épithéliales, propriété nécessaire aux mécanismes d'immunomodulation, d'exclusion compétitive des pathogènes pour prévenir l'adhésion des pathogènes et leur colonisation,
- 3) Activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes,
- 4) Activité hydrolytique des sels biliaires.

Néanmoins, la pertinence de ces paramètres fait débat en raison des écarts entre les résultats des tests *in vitro* et *in vivo* et d'une absence de standardisation des procédures employées pour les réaliser. Ainsi, dans la mesure où il n'existe pas de paramètres spécifiques et essentiels pour toutes les applications probiotiques, les propriétés probiotiques des souches sont fonction de la population cible et des études spécifiques d'une fonction physiologique [386, 409].

#### 1.4.4 Mécanismes de l'interaction entre les probiotiques et l'organisme hôte

Les données expérimentales tendent à démontrer que les probiotiques exercent des effets positifs impliqués dans l'homéostasie intestinale en modulant la composition du microbiote intestinal et en

soutenant l'intégrité physique et fonctionnelle de la barrière épithéliale, et en particulier en influençant l'activité des IEC et des cellules immunitaires (Figure 10) [390, 410]. Les nombreux effets bénéfiques démontrés des probiotiques pour la santé peuvent être classés en 3 niveaux [411]. En premier lieu, les probiotiques pourraient agir directement dans le tractus GI (niveau 1) en modulant la composition et la diversité du microbiote afin d'exercer leurs effets bénéfiques par interaction avec le microbiote intestinal ou en modifiant l'activité métabolique [390, 412]. Les mécanismes permettant cette modulation comprennent la synthèse d'AGCC diminuant le pH luminal et d'AMP ainsi que la compétition pour les nutriments [390, 412]. Ces mécanismes permettent de moduler le microbiote intestinal et surtout de prévenir une prolifération bactérienne pathogénique [412]. En deuxième lieu, les probiotiques peuvent interagir directement avec le mucus et les IEC (niveau 2) induisant d'une part la synthèse de  $\beta$ -défensines nécessaires à la prévention de la prolifération bactérienne et influençant d'autre part la réponse immunitaire et le maintien de la fonction barrière [410, 412]. Les probiotiques peuvent réguler l'activité du facteur NF- $\kappa$ B, qui représente la principale voie de signalisation dans les IEC impliquée dans la réponse immunitaire face à une variété de stimuli, notamment en régulant l'activité du facteur I $\kappa$ B- $\alpha$  ou l'expression du récepteur nucléaire PPAR- $\gamma$  [390, 410]. En outre, certaines souches de probiotiques sont capables de participer au maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale en induisant l'expression de mucines, de protéines HSP nécessaires au maintien des jonctions serrées et de protéines anti-apoptotiques [390, 410]. Les probiotiques augmentent l'activité des cellules NK sécrétrices d'IFN- $\gamma$  et de perforines, peuvent être capturés au niveau des plaques de Peyer par les CPA qui induisent ainsi la synthèse de cytokines et de molécules de co-stimulation orientant la réponse des cellules T (IL-10 et IL-12) [214, 390]. De façon souche dépendante, ils peuvent stimuler la réponse à médiation humorale des lymphocytes B associée à une augmentation d'IgA et l'activité de phagocytose des cellules polynucléaires mais également influencer la réponse à médiation cellulaire des lymphocytes T modifiant ainsi la balance Th1/Th2 en faveur de la voie Th1 [390, 413-415]. Enfin, les probiotiques peuvent exercer leurs effets bénéfiques en dehors du tractus GI (niveau 3), tels que le système immunitaire systémique et d'autres organes comme le foie ou le cerveau [412].



**Figure 10. Les mécanismes des probiotiques dans le tractus gastro-intestinal humain.** Les probiotiques pourraient modifier et supprimer la croissance des micro-organismes pathogènes en induisant la production par l'hôte de  $\beta$ -défensine et d'IgA. Les probiotiques seraient capables de fortifier la barrière intestinale en maintenant les jonctions serrées et induisant la production de mucines. L'immunomodulation médiée par les probiotiques est assurée par la sécrétion de cytokines au travers des voies de signalisation NF $\kappa$ B et MAPK, qui peuvent également affecter la prolifération et la différenciation des cellules immunitaires (telles que les cellules T) ou épithéliales. La motilité et la nociception intestinales seraient modulées par la régulation de l'expression de récepteurs de la douleur et la sécrétion de neurotransmetteurs. APRIL : ligand induisant la prolifération ; HSP : protéines de choc thermique ; IEC : cellules épithéliales intestinales ; Ig : Immunoglobuline ; MAPK : protéines kinases nécessaires à l'induction de la mitose ; NF $\kappa$ B : facteur nucléaire kappaB ; pIgR : récepteur à l'immunoglobuline polymérique ; STAT : signal de transduction et d'activation de la transcription ; Treg : cellule T régulatrice (d'après Thomas et Versalovic, 2010) [410].

#### 1.4.5 Principaux genres et espèces microbiens aux propriétés probiotiques

En tenant compte d'une définition générique des probiotiques, divers micro-organismes ont été étudiés pour leur utilisation potentielle en tant que probiotiques en relation avec un large spectre d'effets biologiques et cliniques [412]. La majorité des micro-organismes qui ont été étudiés sont naturellement présents dans le tractus GI humain [412]. Actuellement, la majorité des micro-organismes probiotiques utilisés appartiennent principalement aux genres bactériens *Lactobacillus*, classé en tant que bactérie lactique (LAB), et *Bifidobacterium* [412,416-418]. Ces deux genres comprennent un large nombre d'espèces et de souches bénéficiant du statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*) dû à leur longue utilisation par l'industrie alimentaire et dont sont issues de nombreuses souches utilisées en tant que probiotiques [412, 419, 420]. D'autres genres bactériens appartenant aux LAB telles que *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, ainsi que les genres *Bacillus* et *Propionibacterium* comprennent également des souches exerçant des effets probiotiques [412, 421]. Certaines bactéries à Gram<sup>-</sup>, incluant principalement *E. coli* Nissle 1917, ainsi que les

souches de levures appartenant au genre *Saccharomyces* ont également démontré leurs effets probiotiques [412, 421]. Plus récemment, des souches appartenant aux espèces bactériennes *Akkermansia muciniphila* et *Faecalibacterium prausnitzii* du cluster IV du genre *Clostridium* ont démontré des effets probiotiques bénéfiques dans les pathologies GI mais qui restent à être confirmés par des études chez l'homme démontrant leur efficacité et innocuité [421].

#### 1.4.6 Métabolisme et effets probiotiques des bactéries lactiques (LAB)

Les bactéries lactiques (LAB) désignent un groupe de bactérie à Gram<sup>+</sup>, non sporulée, cocci, coccobacillus ou en bâtonnets, généralement anaérobie et sans catalase, et qui produit l'acide lactique en tant que produit principal de la fermentation des glucides [421, 422]. Contrairement au genre *Bifidobacterium*, appartenant au phylum des *Actinobacteria*, et actif dans les parties basses du côlon, les LAB qui appartiennent au phylum des *Firmicutes*, classe des *Bacilli*, ordre des *Lactobacillales*, sont davantage actifs dans la partie supérieure du tractus GI [418, 421]. Bien que phylogénétiquement différent et utilisant une voie métabolique différente pour produire l'acide lactique en tant que produit majeur de la fermentation des glucides, le genre *Bifidobacterium* est traditionnellement classé en tant que LAB sur le plan fonctionnel mais n'est actuellement plus considéré comme appartenant à ce groupe sur le plan taxonomique [161, 417, 418]. Les LAB comprennent ainsi les genres *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, et constituent un groupe bactérien du microbiote normal commensal humain ou autochtone de la cavité orale, de l'intestin grêle, de l'épithélium vaginal où il exercerait des effets bénéfiques [418, 421]. Les LAB possèdent les gènes impliqués dans le métabolisme des glucides simples et complexes, potentiellement associés à une multiplication facilitée dans l'intestin, et produisent des bactériocines utilisées notamment dans la fermentation industrielle des aliments [423]. De plus, il a été démontré que l'acide lactique, en diminuant le pH, exerce un effet antimicrobien et potentialise l'effet du lysozyme de l'hôte mais serait également capable de rompre la membrane extérieure des bactéries à Gram<sup>-</sup> telles que *E. coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* [424, 425]. Les LAB utilisés en tant que probiotiques bénéficient d'un statut GRAS dont les espèces appartenant au genre *Lactobacillus* représentent un groupe majeur [412, 419, 426]. Les bactéries du genre *Lactobacillus* ont démontré leur capacité à améliorer la digestion, l'absorption et réguler la biodisponibilité des nutriments [421]. En outre, certaines souches appartenant à ce genre ont également démontré leur capacité à augmenter l'absorption de minéraux par les cellules Caco-2 et la production de vitamines du groupe B par l'hôte ainsi qu'à participer à l'homéostasie énergétique chez les patients obèses [421]. Des souches appartenant aux espèces *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*), *L. johnsonii*, *L. rhamnosus*, *L. casei* et *L. rhamnosus* sont capables d'interférer avec une large variété de micro-

organismes pathogènes, *E. coli* entéropathogénique, *E. coli* entérohémorragique, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* et *Shigella flexneri* [427]. Les LAB ont démontré leur capacité à inhiber la prolifération d'*H.pylori*, considérée comme une cause majeure de gastrite et d'ulcère gastro-duodéal et certaines souches appartenant au genre *Lactobacillus*, à l'instar du genre *Bifidobacterium*, permettent de diminuer les EI d'un traitement d'éradication d'*H. pylori* [421]. Enfin, les motifs microbiens tels que l'acide lipotéichoïque (LTA) de la paroi cellulaire des bactéries du genre *Lactobacillus* peuvent initier une réponse immunitaire innée et adaptative de l'hôte par reconnaissance des PRR, TLR2 et TLR6, exprimés par les cellules épithéliales et immunitaires [419].

#### **1.4.7 Rationnel d'utilisation des probiotiques en santé humaine**

Le concept de probiotiques soutient que la supplémentation du microbiote intestinale, devant être adaptée tant sur le plan qualitatif et quantitatif des souches à employer, peut améliorer les caractéristiques du microbiote et améliorer ainsi la santé [390, 418, 421, 428, 429].

##### **1.4.7.1 Pathologies intestinales**

La majorité des effets étudiés des probiotiques chez l'homme font référence à la fonction digestive et/ou à des bénéfices dans diverses pathologies GI de l'adulte et de l'enfant [390, 421, 430-432].

De façon souche-dépendante, les bénéfices des probiotiques, et en particulier des bactéries lactiques (LAB) et du genre *Bifidobacterium* ainsi que des souches de levure appartenant à l'espèce *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*), sont actuellement établis dans le traitement des diarrhées infectieuses chez l'adulte et l'enfant ainsi que dans la prévention des diarrhées associées aux antibiotiques, de l'infection à *Clostridium difficile* chez l'adulte et nosocomiale à rotavirus chez l'enfant [390, 433-440]. Le bénéfice des espèces de LAB, et en particulier celles classiquement utilisées pour leur fonction initiatrice ou *starter* dans la fabrication du yaourt (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), a également été démontré dans l'intolérance au lactose [441]. De plus, certaines souches de probiotiques ont démontré leur efficacité dans la prévention de l'entérocolite ulcéro-nécrosante du nourrisson de faible poids de naissance (prématuré) et en tant qu'adjuvant dans les traitements d'éradication d'*H. pylori* [390, 421]. Concernant les MICI, la méta-analyse de Sang et al. (2010) de 13 ECR sur les effets des probiotiques sur l'induction et le maintien en rémission dans la rectocolite hémorragique a conclu à une efficacité similaire aux anti-inflammatoires sur l'induction d'une rémission de la rectocolite hémorragique légère à modérée mais l'efficacité supérieure pour le maintien de la rémission n'a pas été confirmée par la méta-analyse de la revue Cochrane publiée par Naidoo et al. (2011) spécifique de 4 ECR menés sur le maintien en rémission en tant que critère principal [390, 421, 442, 443]. En outre, la méta-analyse de la revue Cochrane publiée par Holubar et al. (2010) sur l'efficacité des

probiotiques dans la pouchite conclut que seul le mélange de plusieurs espèces bactériennes dénommé VSL#3 (Sigma-tau, Gaithersburg, Maryland, USA) appartenant à différentes espèces du groupe des LAB et du genre *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, et *Streptococcus salivarius spp. thermophiles*) démontre une efficacité supérieure au placebo dans le maintien de la rémission et la prévention de la pouchite mais pas dans son traitement [444]. Il est cependant important de noter que la méta-analyse de Rahimi et al. (2008), menée sur les résultats de 8 ECR investiguant l'effet des probiotiques dans le traitement ou pour le maintien en rémission de la maladie de Crohn, incluant *E. coli* Nissle 1917, VSL#3, des souches du genre *Lactobacillus* (LGG et *L. johnsonii* LA1) et l'espèce de levure *S. boulardii*, conclut que les preuves fournies par ces ECR ne permettent pas de démontrer leur efficacité [445]. Plusieurs ECR comparant les effets des probiotiques versus placebo dans les TFI ont été publiés durant ces dernières années avec une majorité menée sur des patients avec un SII [432]. Une revue de ces études révèle que la plupart des travaux ont été menés sur de petits échantillons, des courtes durées et utilisant des critères primaires souvent non applicables cliniquement [432].

#### **1.4.7.2 Pathologies extra-intestinales**

Plusieurs études ont montré des résultats prometteurs sur la capacité des probiotiques à diminuer l'incidence des réactions allergiques mais l'importante hétérogénéité des études, des souches, de la durée et de la dose journalière employées et les résultats des méta-analyses les plus récentes ne permettent pas de conclure à un bénéfice établi des probiotiques dans le traitement et la prévention des maladies allergiques et de la dermatite (eczéma) atopique du nourrisson et de l'enfant [390, 446-449]. Par leur capacité à augmenter la sécrétion d'IgA dans la muqueuse bronchique, certaines souches de probiotiques ont permis de prévenir et de réduire la sévérité et/ou la durée des infections respiratoires chez l'enfant, l'adulte et les personnes âgées [390].

### **1.4.8 Rationnel d'utilisation des probiotiques dans le SII**

#### **1.4.8.1 Revues systématiques et méta-analyses**

Un grand nombre de travaux menés avec des souches de probiotiques auprès de patients diagnostiqués pour des TFI montrent une amélioration des critères d'efficacité en comparaison aux valeurs à *baseline* mais une minorité seulement d'entre elles ont démontré une amélioration significative comparée au placebo, probablement en lien avec la large contribution de l'effet placebo par l'utilisation de méthodes subjectives de prise de mesures auprès des patients diagnostiqués pour un TFI [432, 450]. Tirer des conclusions résumant l'efficacité des probiotiques dans les TFI représente une difficulté due à l'hétérogénéité des patients inclus, des espèces et souches de probiotiques utilisées, des dosées administrées et des importantes différences de méthodologie d'étude et de critères d'efficacité retenus [432]. Néanmoins, et malgré ces limitations,

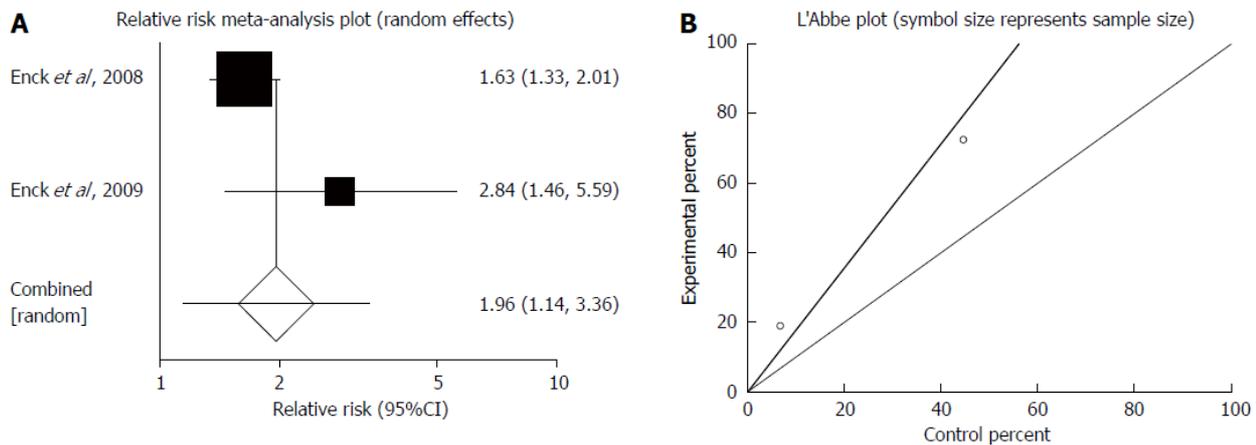
plusieurs méta-analyses et/ou revues systématiques ont été publiés concernant l'efficacité des probiotiques dans les TFI et en particulier dans le SII [451- 459]. Ainsi, sur les 5 dernières années, 5 études ont été publiées incluant 1 revue systématique, 1 méta-analyse, 2 revues systématiques et méta-analyses ainsi qu'1 revue spécifique des LAB [455-459]. La revue systématique de Hungin et al. (2013) portant sur 19 ECR ( $n=1\ 807$ ) a ainsi pu montrer que la majorité des études ont inclus tous les sous-types de SII avec seulement 2 études portant sur le SII-C et 3 sur le SII-D [2,457]. De plus, ce travail rend compte de la variabilité d'une part des souches probiotiques employées dans ces études et principalement représentées par les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* mais également par l'espèce bactérienne *Streptococcus salivaris* et l'espèce de levure *Saccharomyces boulardii* ainsi que le mélange breveté de souches probiotiques VSL#3, et d'autre part, des protocoles d'étude ainsi que des taux de réponse de 18-80 % dans le groupe diagnostiqué pour un SII et 5-50 % dans le groupe contrôle. Néanmoins, cette revue a mis en évidence plusieurs effets bénéfiques liés à l'administration de souches probiotiques pour améliorer les symptômes du SII et le HRQOL ainsi que le profil sécuritaire des 23 souches de probiotiques incluses dans l'analyse [457]. Plus récemment, Didari et al. (2015) ont mené une revue systématique de 9 ECR ( $n=514$ ) et une méta-analyse de 15 ECR ( $n=1\ 793$ ), publiés entre 2007 et 2013, dont 9 études menées sur des patients avec un SII sans distinction de sous-type et faisant l'objet d'une analyse approfondie [458]. Les 15 ECR de la méta-analyse ont inclus des patients diagnostiqués selon les critères de Rome II ( $n=7$ ), Rome III ( $n=6$ ), de l'ICHPPC (International Classification of Health Problems in Primary Care) et des critères du comité de classification de la WONCA (World Organization of Family Doctors) ( $n=2$ ) (Tableau 8) [458, 460-474]. Il est important de noter également que les 15 ECR retenus ont aussi été sélectionnés d'après leur qualité méthodologique établie par un score Jadad  $\geq 3$ , sur une échelle allant de 0 à 5, et basé sur la description de la randomisation, du double-aveugle et des abandons ou retraits [458]. Une étude de haute qualité méthodologique étant ainsi définie par un score  $\geq 3$  et une étude de qualité mineure par un score  $\leq 2$  [475]. Bien que les études diffèrent sur les souches de probiotiques utilisées, la dose administrée, la durée de la supplémentation et du suivi ainsi que des critères d'efficacité, les résultats de la méta-analyse ont montré tout d'abord que le risque-relatif (RR) combiné de 2 ECR, comparant les probiotiques au placebo, des répondeurs aux thérapies basés d'une part sur le score de douleur abdominale était de 1,96 (IC 95 % : 1,14-3,3 ;  $P=0,01$ ) et d'autre part sur le score globale des symptômes était de 2,43 (IC 95 % : 1,13-5,21 ;  $P=0,02$ ) (Figures 11A et 11B) [460, 461]. Cependant ces 2 ECR de haute qualité méthodologique, publiés par Enck et al. (2008 et 2009) et réalisés dans le cadre d'une même étude, ont été menés sur la même cohorte de patients diagnostiqués avec un SII selon d'autres critères que ceux de Rome [460, 461]. La méta-analyse met également en évidence l'efficacité des probiotiques en comparaison au placebo à diminuer la sévérité de la douleur abdominale cotée par un système d'évaluation de la sévérité du SII après 8 et 10 semaines et l'étude de Kajander et al. (2008) met

évidence une amélioration significative du score composite des 4 symptômes du SII (douleur abdominale+distension+flatulence+borborygmes) [463, 465]. De plus, le RR combiné de l'amélioration générale des symptômes chez des patients avec un SII, pour 7 ECR (6 études) comparant les probiotiques au placebo, était de 2,14 (IC 95 % : 1,08-4,26 ;  $P=0,03$ ) [464, 467, 468-471].

Références	Type de SII	Probiotiques	Sujets (n)	Dose (cfu) et durée	Résultats
<b>Patients diagnostiqués selon les critères de l'ICHPPC et WONCA</b>					
Enck et al. (2008) [460]	Global	<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	298	1,5-4,5 x 10 <sup>7</sup> 8 semaines	Diminution des symptômes caractéristiques du SII
Enck et al. (2009) [461]	Global	<i>E. coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	297	3-9 x 10 <sup>7</sup> 8 semaines	Diminution de 50% du score de douleur abdominale
<b>Patients diagnostiqués selon les critères de ROME II</b>					
Zeng et al. (2008) [462]	SII-D	Mélange AB100 Jianneng <sup>1</sup>	29	1 x 10 <sup>7-8</sup> 4 semaines	Diminution NS de la perméabilité de l'intestin
Kajander et al. (2008) [463]	Global	Mélange Valio Ltd. <sup>2</sup>	86	1 x 10 <sup>7</sup> 20 semaines	Diminution du score composite mais diminution NS de la douleur abdominale
Drouault-Holowacz et al. (2008) [464]	Global	<i>B. longum</i> LA101, <i>L. lactis</i> LA103, <i>L. acidophilus</i> LA102, <i>S. thermophilus</i> LA104	100	1 x 10 <sup>10</sup> 4 semaines	Diminution de la douleur abdominale, ballonnement et flatulence
Williams et al. (2009) [465]	Global	<i>L. acidophilus</i> CUL60 et CUL21, <i>B. lactis</i> CUL34, <i>B. bifidum</i> CUL20	56	2.5 x 10 <sup>10</sup> 8 semaines	Diminution de la sévérité des symptômes du SII
Simren et al. (2010) [466]	Global	<i>L. paracasei</i> F19, <i>L. acidophilus</i> La5, <i>B. lactis</i> Bb-12	74	5 x 10 <sup>7</sup> 8 semaines	Diminution NS de la douleur abdominale et ballonnement
Sondergaard et al. (2011) [467]	NR	<i>L. paracasei</i> F19, <i>L. acidophilus</i> La5, <i>B. lactis</i> Bb-12	52	5 x 10 <sup>7</sup> 8 semaines	Amélioration NS des symptômes du SII
Kruis et al. (2012) [468]	SII-D	<i>E. coli</i> (Nissle 1917)	120	2,5-25 x 10 <sup>9</sup> 12 semaines	Amélioration NS des symptômes du SII
<b>Patients diagnostiqués selon les critères de ROME III</b>					
Sinn et al. (2008) [469]	Global	<i>Lactobacillus acidophilus</i> SDC 2012, 2013	40	2 x 10 <sup>9</sup> 4 semaines	Diminution de la douleur abdominale
Guglielmeti et al. (2011) [470]	Global	<i>Bifidobacterium bifidum</i> MIMBb75	122	1 x 10 <sup>9</sup> 4 semaines	Diminution de la douleur abdominale et ballonnement
Ducrotté et al. (2012) [471]	SII-D	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	214	1 x 10 <sup>10</sup> 4 semaines	Diminution de la douleur abdominale et ballonnement
Ki Cha et al. (2012) [472]	SII-D	Mélange Dulac7 (7 souches de bactéries lactiques)	50	1 x 10 <sup>10</sup> 8 semaines	Amélioration du HRQOL
Dapoigny et al. (2012) [473]	Global	<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i> (LCR 35)	50	6 x 10 <sup>8</sup> 4 semaines	Diminution NS de 50% du score de sévérité du SII
Roberts et al. (2013) [474]	SII-C SII-M	<i>Bifidobacterium lactis</i> DN-173 010	179	1.25 x 10 <sup>10</sup> 12 semaines	Amélioration NS des symptômes du SII

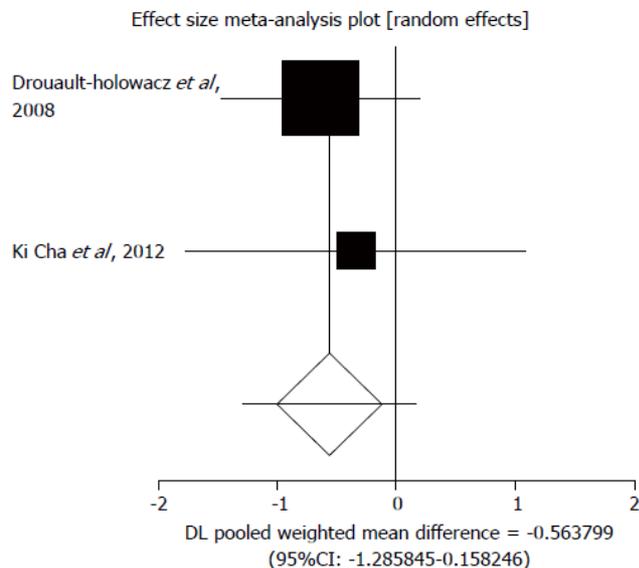
<sup>1</sup>: *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium Longum* ; <sup>2</sup>: *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* LC705, *Bifidobacterium breve* Bb99, *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermani* JS ; NS : non significative.

**Tableau 8. Synthèse des études de haute qualité méthodologique évaluant l'efficacité des probiotiques dans le syndrome de l'intestin irritable** (d'après Didari et al., 2015) [458].



**Figure 11. Répondeurs aux thérapies basés sur le score de douleur abdominale.** **A** : risque-relatif individuel et combiné des études comparant les probiotiques dans le syndrome de l'intestin irritable. **B** : Indicateurs de l'hétérogénéité des études. Le résultat non significatif du test  $Q$  de Cochrane ( $P=0,11$ ) indique une absence d'hétérogénéité mais due au faible nombre d'études incluses ( $n=2$ ), le modèle intégrant les effets dus au hasard ou *random* a été appliqué au RR individuel et combiné (d'après Didari et al., 2015) [458].

Néanmoins, le RR individuel pour la diminution de la douleur abdominale (IC 95 % : 0,77-1,60) et la taille de l'effet combiné des différences de moyennes standardisées du score de douleur abdominale évaluée par échelle visuelle analogique (EVA) de 0 à 10 pour 2 ECR comparant les probiotiques au placebo (IC 95 % : 1,08-4,26 ;  $P=0,13$ ) n'étaient statistiquement pas significatifs (Figure 12) [464, 472].



**Figure 12. Taille d'effet individuelle et combinée de la moyenne standardisée pour la douleur abdominale dans les études comparant les probiotiques au placebo chez des patients avec un syndrome de l'intestin irritable.** Le résultat non significatif du test  $Q$  de Cochrane ( $P=0,73$ ) indique une absence d'hétérogénéité mais due au faible nombre d'études incluses ( $n=2$ ), le modèle intégrant les effets *random* a été appliqué à la taille de l'effet individuel et combiné des moyennes standardisées (d'après Didari et al., 2015) [458].

De plus, 1 ECR, utilisant une EVA de 0 à 100 pour évaluer l'efficacité des probiotiques chez des patients avec un SII-D, a montré une réduction moyenne des scores de douleur abdominale et du ballonnement de  $-7,65 \pm 9,69$  et  $0,34 \pm 6,49$  dans le groupe des probiotiques et de  $-0,98 \pm 7,67$  et  $0,44 \pm 5,25$  dans le groupe placebo mais n'a pas démontré une amélioration statistiquement significative des probiotiques comparée au placebo [462]. Les probiotiques ont permis une diminution de la sévérité des symptômes mais leur efficacité comparée au placebo n'a pas été démontrée pour la diminution de la sévérité des symptômes de distension, ballonnement et flatulence ni pour le score d'amélioration de la sévérité du SII [462, 463, 465, 466, 468, 473]. Les probiotiques n'ont également pas montré une amélioration significative du score global des symptômes du SII, consistant en une évaluation subjective globale, en comparaison au placebo [474]. En outre, le faible nombre de retraits de patients des 15 ECR de la méta-analyse sont dus à des EI liés à la prise de probiotiques ( $n=7$ ) ou l'absence d'efficacité dans les groupes placebo ( $n=4$ ) [458]. Enfin, il est important de noter que les résultats de la revue systématique, incluant 9 ERC ne remplissant pas les critères de la méta-analyse (échelle de Likert  $n=1$ ; patients pédiatriques  $n=1$ ; études en *cross-over*  $n=2$ , rapport incomplet  $n=5$ ) et 324 patients diagnostiqués avec un SII-D, SII-C et SII-M selon les critères de Rome II ou Rome III, ont montré des effets bénéfiques sur la douleur abdominale, la qualité de vie mais également sur la sévérité des symptômes de distension, ballonnement et flatulence, sur les symptômes globaux du SII ainsi que sur les scores de diagnostic du SII [458]. Cependant, aucune conclusion n'a été fournie par cette étude concernant l'efficacité des probiotiques dans les sous-types du SII [458]. La méta-analyse de Ford et al. (2015) fournit quant à elle des éclaircissements sur l'hétérogénéité des critères d'évaluation des études portant sur l'efficacité des probiotiques dans les TFI incluant le SII et la CCI [459]. En effet, cette étude met en évidence que les ECR menés sur le SII montrent une hétérogénéité significative de l'effet des probiotiques sur la persistance des symptômes ( $I^2=72\%$ ;  $> 25\%$  indiquant des niveaux élevés d'hétérogénéité;  $P < 0,00001$ ) mais un niveau d'hétérogénéité faible et non-significatif de l'effet des probiotiques sur les symptômes de douleur abdominale ou globaux du SII ( $I^2=27\%$ ;  $P=0,11$ ), ballonnement ( $I^2=16\%$ ;  $P=0,26$ ) et flatulence ( $I^2=0\%$ ;  $P=0,63$ ) [459]. De plus, la magnitude de l'effet des probiotiques pourrait dépendre de la qualité méthodologique des études [459]. En effet, cette méta-analyse de 19 ECR ( $n=1\ 650$ ) a également montré que les études de plus haute qualité mettent en évidence des effets bénéfiques plus modestes (RR=0,86; IC 95% : 0,72-1,03) que les études de plus faible qualité (RR=0,52; IC 95% : 0,35-0,77) suggérant un biais de publication en raison de la surestimation d'études positives de qualité mineure dans la littérature [459]. Néanmoins, cette méta-analyse a montré des effets bénéfiques des probiotiques en comparaison au placebo dans l'amélioration du score des symptômes globaux du SII, de la douleur abdominale, du ballonnement et de la flatulence ainsi que dans la réduction du risque de persistance des symptômes

du SII avec un RR de 0,79 (IC 95 % : 0,70-0,89 ;  $P < 0,001$ ) et un nombre de sujets à traiter (NST) de 7 [459].

#### 1.4.8.2 Les études cliniques individuelles de haute qualité méthodologique

Dans la mesure où les revues systématiques et méta-analyses pourraient diluer l'effet d'une intervention spécifique, l'évaluation de l'efficacité des probiotiques peut également être réalisée selon le nombre d'études par souche ou formulation de probiotiques, la qualité méthodologique des études, la reproductibilité des résultats au travers des études et la pertinence clinique des critères d'évaluation [432]. Tenant compte de ces critères, 5 souches ou formulations de probiotiques ont fait l'objet d'études cliniques publiées à ce jour et prouvant leur efficacité dans la prise en charge du SII avec un haut niveau de qualité méthodologique [432, 463, 471, 472, 476- 482]. Tout d'abord, et d'après les résultats de la revue systématique de Brenner et al. (2009) incluant 16 ECR, la souche probiotique bénéficiant du plus haut niveau de preuve est *Bifidobacterium infantis* 35624 (*B. infantis* 35624) ayant montré une efficacité répétée d'après les résultats de 2 essais de haute qualité méthodologique [453, 476, 477]. La 1<sup>ère</sup> étude, comparant *B. infantis* 35624 à la souche *Lactobacillus salivarius* UCC4331 versus placebo chez 77 patients avec un SII durant 8 semaines, a montré une diminution significative du score de douleur abdominale et/ou inconfort abdominal, de ballonnement et/ou distension, des troubles de la défécation et du score composite en comparaison au placebo pour *B. infantis* 35624 mais pas pour *Lactobacillus salivarius* UCC4331. De plus, seul *B. infantis* 35624 a montré une normalisation des niveaux d'interleukine en comparaison avec le placebo ( $P < 0,05$ ) mais en revanche aucune efficacité sur la fréquence des selles ni la consistance n'a été démontrée [476]. Une 2<sup>ème</sup> étude de plus large cohorte, multicentrique et incluant un suivi, a mis en évidence que le groupe recevant la dose journalière de  $1.10^8$  d'unités formant colonies (UFC) de la souche *B. infantis* 35624 pendant 4 semaines a montré une amélioration significative du critère principal de douleur abdominale en comparaison au groupe placebo (1,73 vs. 1,48,  $P < 0,03$ ) et des critères secondaires incluant le score de ballonnement, composite ainsi que celui des symptômes globaux du SII [477]. Il est intéressant de noter que les effets observés chez les groupes recevant des doses journalières de  $1.10^6$  ou  $1.10^{10}$  UFC n'ont pas montré de différences statistiquement significatives avec le groupe placebo et aucun EI n'a été enregistré bien que ni la sécurité ni la tolérance n'ont été évaluées rigoureusement [2, 477]. Le mélange de 4 souches probiotiques multi-espèces concentrées de façon équivalente (LGG, *Lactobacillus rhamnosus* LC705, *Bifidobacterium breve* Bb99, *Propionibacterium freudenreichii* spp *shermani* JS ; Valio Ltd, Helsinki, Finlande) a également fait l'objet de 2 ECR réalisés par la même équipe (Kajander et al. 2005 et 2008) bien que dans la 2<sup>ème</sup> étude, la souche *Bifidobacterium breve* Bb99 a été remplacée par *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 (*B. lactis* Bb12) et la dose journalière a été abaissée passant de  $8-9.10^9$  à  $1.10^7$  UFC [463, 478]. En dépit de ces différences, les 2 études mettent en

évidence une réduction significative du score des symptômes du SII (douleur abdominale, distension, flatulence, borborygmes) comparée au placebo après 5 mois dans la 1<sup>ère</sup> étude (42 % vs. 6 %,  $P=0,015$ ) et 20 semaines dans la 2<sup>ème</sup> (37 % vs. 9 %,  $P=0,012$ ) [463, 478]. Le mélange de souches probiotiques dénommé VSL#3 a fait également l'objet de 4 ERC chez des patients avec un SII dont 2 récentes publiées pour l'une par Guandalini et al. (2010) utilisant les critères de Rome II et pour l'autre par Michail et al. (2011) ceux de Rome III, bien que ces 2 études présentent un score Jadad  $\leq 2$  [458, 479-482]. L'étude de Guandalini et al. (2010) réalisée pendant 6 semaines chez 59 patients avec un SII et âgés entre 4 et 18 ans a permis de montrer que le mélange VSL#3 a amélioré de façon significative les symptômes de douleur abdominale et ballonnement ( $P<0,05$ ) en comparaison au placebo [481]. L'étude de Michail et al. (2011) montre quant à elle une amélioration du HRQOL et du score GSRS-IBS mais chez des patients adultes avec un SII-D et après 8 semaines d'administration du mélange VSL#3 en comparaison au placebo [482]. Plus récemment, un 3<sup>ème</sup> mélange de souches probiotiques issues de 7 espèces différentes (Dulac7, Cell Biotech, Co., Ltd, Seoul, Corée ; *Lactobacillus acidophilus* LH5, *Lactobacillus plantarum* LP1, *Lactobacillus rhamnosus* LR3, *Bifidobacterium breve* BR2, *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* BL2, *Bifidobacterium longum* spp. *longum* BG3, and *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus* ST3) a aussi fait l'objet d'un ECR de haute qualité méthodologique (score Jadad  $\geq 3$ ) publié par Ki Cha et al. (2012) et mené sur 50 patients diagnostiqués pour un SII-D d'après les critères de Rome III. L'administration de ce mélange pour une dose journalière de  $1.10^{10}$  CFU durant 8 semaines a démontré son efficacité dans l'amélioration générale des symptômes du SII comparée au placebo (48 % vs. 12 %,  $P=0,01$ ) [472]. Enfin, la souche *Lactobacillus plantarum* 299v ou DSM 9843 (*L. plantarum* 299v), qui avait fait l'objet de 5 ECR, dont 3 en groupe parallèle aux résultats contrastés et précédemment publiés entre 2000 et 2006, a récemment montré son efficacité dans un ECR de haute qualité méthodologique (score Jadad  $\geq 3$ ) publié par Ducrotté et al. (2012) et mené chez 214 patients diagnostiqués avec un SII selon les critères de Rome III, dont 63,89 % avec un SII-D. En effet, l'administration durant 4 semaines de  $1.10^{10}$  CFU/jour de *L. plantarum* 299v a permis de diminuer de façon significative la fréquence, et non la sévérité, de la douleur abdominale (51,9 % vs. 13,6 %,  $P<0,05$ ) et du ballonnement ( $P<0,05$ ) [471, 483-487].

### **1.4.8.3 Rationnel d'utilisation des souches probiotiques dans les sous-types du SII**

#### **1.4.8.3.1 Probiotiques et SII-D**

Le mélange de souches probiotiques VSL#3 a fait l'objet de 2 ECR auprès de patients avec un SII-D démontrant ses effets bénéfiques dans l'amélioration du score globale du SII et des fonctions intestinales incluant la consistance des selles en comparaison au placebo [479, 482]. En outre, la souche *Bacillus coagulans* GBI-306086, et d'après les résultats de 2 ECR de 8 semaines de qualité méthodologique mineure (score Jadad  $\leq 2$ ) chez des patients avec un SII-D, a montré une

diminution significative de la fréquence des selles et des scores de douleur abdominale et ballonnement en comparaison au placebo [458, 488, 489]. Enfin le mélange multi-espèces de 4 souches probiotiques AB100 Jianneng (*Streptococcus salivarius spp. thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium Longum*; Bright Dairy, Shanghai, Chine), ayant fait l'objet d'une l'étude pilote ( $n=29$ ) publiée par Zeng et al. (2008) chez les patients avec un SII-D durant 4 semaines, a montré une tendance statistiquement non significative à améliorer la fonction de la barrière intestinale comparée au placebo [462].

#### **1.4.8.3.2 Probiotiques et SII-C**

Un produit laitier fermenté, associant la souche probiotique *Bifidobacterium lactis* DN-173010 et les LAB starter du yaourt *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, a fait l'objet de 3 ECR chez les patients avec un SII-C [474, 490, 491]. Ce produit laitier fermenté probiotique a ainsi montré son efficacité à accélérer le transit GI et à améliorer la distension ainsi que la sévérité des symptômes globaux du SII après 4 ou 6 semaines [490, 491]. Plus récemment, Roberts et al. (2013) ont mené une étude multicentrique auprès de 179 patients diagnostiqués pour un SII-C ou SII-M montrant que la consommation pendant 12 semaines de ce même lait fermenté probiotique avait amélioré les scores des symptômes globaux et individuels du SII ainsi que la fréquence et la consistance des selles ainsi que la défécation mais ces améliorations n'étaient pas statistiquement significatives en comparaison au placebo [474]. De plus, la puissance de l'étude a été réduite par le nombre important de retraits avec un taux d'abandon de 55 % à la semaine 12 c'est pourquoi les résultats de cette étude doivent être considérés avec précaution car l'effet du produit pourrait avoir été masqué par le manque de puissance [432].

#### **1.4.8.3.3 Probiotiques chez les enfants diagnostiqués pour un SII associé ou non à une DAF**

Les effets bénéfiques des probiotiques chez les enfants ou adolescents diagnostiqués pour un SII n'a été démontré que par 1 ECR réalisé avec le mélange probiotique VSL#3 et a fait l'objet de 3 ECR investiguant les effets probiotiques de la souche LGG en comparaison au placebo [492-495]. La 1<sup>ère</sup> étude, d'une durée de 4 semaines et menée auprès de 104 enfants âgés de 6 à 16 ans et diagnostiqués pour des troubles fonctionnels de douleur abdominale (SII ou DAF et une dyspepsie fonctionnelle), a montré que la prise de LGG a diminué de façon significative la fréquence de douleur ( $3,3\pm 1,3$  à *baseline* vs.  $2,2\pm 1,7$  à la semaine 4) en comparaison au placebo ( $3,7\pm 1,0$  à *baseline* vs.  $2,6\pm 1,4$  à la semaine 4) ( $P=0,02$ ) avec un NST de 4 (IC 95 % : 2-36) [493]. La 2<sup>ème</sup> étude menée sur 50 enfants âgés de 5 à 15 ans durant 12 semaines et diagnostiqués pour un SII et une DAF confirme ces résultats en démontrant une diminution significative de la fréquence de douleur abdominale (1,6 vs. 3,2,  $P<0,05$ ) et de sa sévérité évaluée sur une échelle de Likert allant de 0-10 (2,5 vs. 3,6,  $P<0,01$ ) comparée au placebo [494]. Néanmoins, les résultats d'une 3<sup>ème</sup> étude menée chez 50 enfants diagnostiqués pour un SII, présentant un âge moyen de 12 ans, et recevant

1.10<sup>10</sup> UFC/jour de LGG pendant 6 semaines ne montrent pas une amélioration significative de la douleur abdominale en comparaison au placebo (44 % vs. 40 %,  $P=0,02$ ) mais suggèrent une efficacité dans la diminution de la distension abdominale perçue ( $P=0,02$ ) [495].

Une revue détaillée et individuelle des études cliniques suggère l'efficacité de plusieurs souches ou mélanges spécifiques de probiotiques tels que *Bifidobacterium infantis* 35624 et VSL#3 dans la prise en charge de la population globale des patients avec un SII. L'efficacité, moins étudiée, des probiotiques chez des patients diagnostiqués pour un sous-type du SII a également été montrée pour certains produits ou mélanges probiotiques tel que le produit laitier fermenté apportant la souche *Bifidobacterium lactis* DN-173010 dans la prise en charge du SII-C ou le mélange VSL#3 dans celle du SII-D. En outre, la souche probiotique LGG a montré des effets bénéfiques chez des enfants et adolescents diagnostiqués pour un SII associé ou non à une DAF [432]. Ainsi, les données sur l'efficacité des probiotiques dans la DAF sont limitées aux données disponibles chez les enfants et adolescents d'après les travaux menés avec la souche LGG et celles sur le BF et les DF à des essais menés chez des patients avec un SII [454, 479, 493-495]. Enfin, dans la mesure où les symptômes perçus par les patients diagnostiqués pour un SII peuvent être également exprimés avec une sévérité moins importante par les sujets sains non diagnostiqués pour un SII, les bénéfices observés dans la prise en charge du SII peuvent représenter un intérêt pour la population générale soumise à des TFI occasionnels [432].

#### **1.4.8.4 Symbiotiques et prise en charge du SII**

Une caractéristique importante liée à la sécurité des probiotiques réside dans leur faible résilience dans l'intestin nécessitant une administration sous forme de doses répétées pour assurer leur maintien à un niveau constant [276]. Ainsi, une stratégie possible pour assurer ce maintien des niveaux constants de bactéries probiotiques dans l'intestin consiste à administrer des symbiotiques se définissant par la prise concomitante de souches probiotiques et de prébiotiques [276]. Cependant, l'efficacité des symbiotiques dans la prise en charge du SII n'est pas démontrée en raison du faible niveau méthodologique de la majorité des essais menés [496]. En effet, parmi 7 essais investiguant l'effet des symbiotiques dans le SII et publiés à ce jour, seuls 3 ECR ont été menés [497-503]. Ces 3 ECR, dont le plus récent publié par Rogha et al. (2014) qui a évalué l'effet de l'association de la souche *Bacillus coagulans* et des FOS, ont montré des effets bénéfiques dans la prise en charge du SII en comparaison au placebo [498, 502, 503]. Plus récemment encore, l'ECR publié par Saneian et al. (2015) a étudié l'effet de ce même symbiotique combinant *Bacillus coagulans* et des FOS dans un autre TFI et a ainsi démontré une efficacité statistiquement significative comparée au placebo dans la réduction de la douleur abdominale chez des enfants diagnostiqués avec une DAF [504]. Malgré ces récentes études et la pertinence théorique à utiliser

des symbiotiques, davantage d'études de haute qualité méthodologique sont nécessaires pour pouvoir conclure sur leurs effets bénéfiques dans les TFI et en particulier dans le SII [496].

#### **1.4.8.5 Mécanismes d'action des probiotiques et cibles physiopathologiques du SII**

En l'absence d'une approche thérapeutique établie et consensuelle du SII en raison de sa nature multifactorielle, les probiotiques pourraient agir sur diverses cibles physiopathologiques du SII en exerçant des effets bénéfiques sur la composition du microbiote intestinal et du métabolisme luminal, les perturbations sensori-motrices, l'altération de la fonction immunitaire et barrière de l'intestin ainsi que sur le dysfonctionnement de l'axe CIM associé à des troubles psychologiques [276, 505, 506].

##### *1.4.8.5.1 Modifications du microbiote intestinal et du métabolisme luminal*

Les données disponibles à ce jour concernant l'impact des probiotiques sur le microbiote intestinal des patients diagnostiqués avec un SII sont peu nombreuses rendant incomplète la compréhension de l'effet des probiotiques sur sa composition [276, 412]. Il a néanmoins été montré que certaines souches de probiotiques, ayant démontré par ailleurs des effets positifs significatifs sur les symptômes du SII, pourraient modifier de façon significative les proportions de différents phylotypes bactériens et configurer un écosystème microbien intestinal générant un milieu écologique défavorable à des espèces néfastes en augmentant notamment le nombre de bactéries du genre *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* capables de stabiliser le microbiote intestinal [276, 463, 472, 487, 507, 508]. Les probiotiques peuvent affecter la croissance d'une large variété de bactéries pathogènes, appartenant notamment à l'espèce *E. coli* ou aux genres *Clostridium*, *Salmonella*, *Shigella* et *Pseudomonas* à la fois indirectement par compétition pour les nutriments et directement par leur capacité à produire des métabolites (acide lactique, AGCC, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et facteurs solubles tels que des bactériocines (sakacine, lactocine, amylovorine, acidophiline, bifidine, bifidocine) [276]. De plus, les probiotiques par leur capacité à induire l'expression génique de mucines par les IEC peuvent réduire l'adhérence des bactéries pathogènes [276, 410]. Une augmentation significative de bactéries productrices d'acétate et de propionate, appartenant aux genres *Veionella* et *Lactobacillus*, a été démontrée chez des patients avec un SII en comparason à des sujets sains et l'augmentation de la production d'AGCC stimule la synthèse de 5-HT capable d'augmenter la motilité GI [271, 276]. Néanmoins, et en dépit du bénéfice potentiel du butyrate à améliorer la perception viscérale, la faible corrélation entre les symptômes du SII et les concentrations fécales en AGCC ainsi que les résultats conflictuels des études menées chez l'homme avec des probiotiques investiguant leurs effets sur les concentrations fécales en AGCC ne permettent pas de démontrer une forte corrélation entre l'administration de probiotiques et les niveaux fécaux en AGCC [276].

#### 1.4.8.5.2 Hypersensibilité viscérale

Les études chez l'animal ont permis de mettre en évidence que les probiotiques, de façon souche dépendante, sont capables d'exercer un effet anti-nociceptif en modulant la production de métabolites bactériens, incluant catécholamines, GABA et 5-HT, au niveau des terminaisons nerveuses sensibles afférentes de la muqueuse intestinale ou en ciblant des voies neurosensitives centrales spécifiques [160, 276]. L'étude de Verdù et al. (2006) démontre que l'activation de l'immunité mucoale chez la souris, induite par antibiotique et augmentant la substance P dans le SNE, est normalisée par l'administration d'une souche de l'espèce *Lactobacillus paracasei* qui a également atténué l'hypersensibilité viscérale [509]. Cet effet positif sur la sensibilité viscérale a également été démontré pour les souches *Lactobacillus reuteri* ATCC 23272 (American Tissue Type Culture Collection #23272) et *B. infantis* 35624 sur des modèles de rats soumis à une distension colorectale [510, 511]. Plus récemment, Distrutti et al. (2013) ont démontré que l'administration précoce du mélange VSL#3 sur un modèle de rat SII présentant une hypersensibilité viscérale, induite par une séparation maternelle néonatale, normalise l'expression des gènes impliqués dans les voies nociceptives centrales [512]. Des souches du genre *Lactobacillus*, incluant *L. rhamnosus* JB-1 et *L. acidophilus* NCFM, ont également démontré sur des modèles murins leur capacité à moduler directement les voies anti- et pro-nociceptives centrales mais peu de travaux ont été menés pour étudier leurs effets sur la sensibilité viscérale chez l'homme [263, 266, 276, 512, 513]. En effet, un produit laitier fermenté associant les souches probiotiques *B. lactis* DN-173 010 ou CNCM I-2494, correspondant au numéro de souche I-2494 de la Collection Nationale Française des Cultures de Micro-organismes (CNCM, Paris, France), *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNCM I-1631, *Streptococcus thermophilus* CNCM I-1630 et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNCM I-1632 et I-1519, a démontré chez des sujets sains une activation des régions cérébrales du traitement de la sensibilité et des émotions [514]. En revanche, un mélange de 6 espèces différentes de souches probiotiques dénommé Winlove 801 (*Bifidobacterium lactis* W52, *L. casei* W56, *L. salivarius* W57, *Lactococcus lactis* W58, *L. rhamnosus* W71 et *L. acidophilus* NCFM) n'a pas démontré une amélioration significative de l'hypersensibilité viscérale en comparaison au groupe placebo [515].

#### 1.4.8.5.3 Motilité intestinale

Durant les quatre dernières décennies, le rôle supposé majeur de l'altération de la motilité GI et de la rétention de gaz dans la physiopathologie du SII a légitimé l'utilisation de probiotiques pouvant exercer des effets bénéfiques sur la dysrégulation de la motilité de l'intestin grêle et du côlon [276]. Plusieurs souches de l'espèce *Bifidobacterium lactis* (*B. lactis*), incluant *B. lactis* DN-173 010 et *B. lactis* HN019, ont ainsi démontré leur capacité à diminuer la durée du transit GI chez des adultes constipés diagnostiqués pour un SII ou une CCI [490, 516]. Plus récemment, Eskesen et al. (2015) ont démontré la capacité de *B. lactis* Bb-12 à diminuer les symptômes GI fonctionnels de façon

dose-dépendante chez des sujets sains mais souffrant de défécation irrégulière et de flatulence [517]. Les probiotiques ont également été étudiés chez les patients avec un SII-D [472, 479]. Bien que le mélange de souches probiotiques Dulac 7 ait montré son efficacité à contrôler les symptômes, l'efficacité du mélange VSL#3 pour ce sous-groupe du SII n'est pas démontrée [276, 472, 479]. Néanmoins, Massi et al. (2006) ont démontré que toutes les souches du mélange VSL#3 induisent une relaxation de l'activité du côlon proximal qui serait un mécanisme par lequel les probiotiques exerceraient leurs effets positifs sur la motilité intestinale [518]. Enfin, l'utilisation de souches probiotiques appartenant aux espèces *Lactobacillus reuteri* et *Lactobacillus rhamnosus* a permis de démontrer que les effets bénéfiques du microbiote sur la motilité étaient région-dépendants dans la mesure où la vitesse du complexe moteur migrant augmente dans l'intestin grêle (jéjunum) et diminue dans le côlon [519].

#### **1.4.8.5.4** *Immunité mucosale et barrière intestinale*

Il a été démontré que des souches de probiotiques, seules ou combinées, permettent de moduler le système immunitaire inné ou adaptatif et contribuent au maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale dans des modèles expérimentaux inflammatoires ou chez l'homme [276, 462, 476, 494, 520-522]. Des souches de probiotiques, en particulier du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, ont montré leur capacité à diminuer les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  et la souche *B. infantis* 35624 a démontré en particulier chez des patients avec un SII sa capacité à rééquilibrer le ratio entre les cytokines IL-10 (anti-inflammatoire) et IL-12 (pro-inflammatoires), soit IL-10 : IL-12, associé à l'amélioration des symptômes du SII [276, 476]. Plus récemment, Abbas et al. (2014) ont démontré l'efficacité d'une souche de levure de l'espèce *S. boulardii* à diminuer de façon significative les niveaux tissulaires et sanguin de cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-8, à augmenter le ratio IL-10 : IL-12 et à améliorer le HRQOL des patients avec un SII-D [522]. En outre, le bénéfice de l'espèce *S. boulardii* à améliorer les symptômes dans la population globale des patients avec un SII a récemment été démontré par un ECR publié par Pineton de Chambrun et al. (2015) [523]. Un autre mécanisme permettant le maintien de la fonction barrière de l'intestin par les probiotiques a été mis en évidence avec la souche LGG capable de synthétiser des facteurs solubles p40 et p75 prévenant l'apoptose induite par les cytokines et ceci par l'intermédiaire des voies de signalisation impliquant l'EGFR et la PKC [524].

#### **1.4.8.5.5** *Dysrégulation de l'axe cerveau-intestin*

Il a été démontré que plusieurs souches probiotiques sont capables d'influencer directement une réponse exagérée de l'axe CIM dans plusieurs modèles expérimentaux murins du SII soumis au stress [265-267, 276, 525-527]. Sur un modèle expérimental du SII chez le rat soumis au stress induit par une séparation maternelle néonatale, le bénéfice d'une combinaison de deux souches du

genre *Lactobacillus*, *L. rhamnosus* R0052 et *L. helveticus* R0052, à améliorer la fonction intestinale associée à la normalisation de l'activité de l'axe HHS a été mis en évidence par Gareau et al. (2007) [525]. Sur ce même modèle expérimental du SII, l'administration précoce d'une autre combinaison de deux souches, *B. lactis* Bb-12 et *Propionobacterium jensenii* 702, a permis de normaliser l'activité de l'axe HHS, la fonction immunitaire ainsi qu'à protéger les perturbations du microbiote induites par le stress à l'âge adulte [526]. En outre, sur des modèles murins soumis au stress, il a été démontré que l'administration des souches *Lactobacillus rhamnosus* JB-1, capable de réguler l'expression des récepteurs de GABA dans le cerveau, ou de *Bifidobacterium longum* NCC3001 maintient l'intégrité du nerf vague et diminue la libération de cortisol induite par le stress ainsi que le comportement lié à l'anxiété et la dépression [265,266]. La protection de la barrière intestinale pourrait être une composante clé des interactions entre le microbiote et l'axe CI et c'est dans ce cadre que l'étude d'Ait Belgnaoui et al. (2014) démontre que l'administration d'un mélange de souches probiotiques, combinant *Lactobacillus helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175, sur un modèle de souris soumis à un stress restaure l'intégrité des jonctions serrées et atténue l'activité de l'axe HHS et du SNA [252, 267]. Enfin, les travaux de Distrutti et al. (2014) et Savignac et al. (2015) ont permis de montrer sur des modèles expérimentaux murins les effets positifs sur la fonction cognitive du mélange VSL#3, capable d'augmenter l'expression génique du facteur BDNF, et de la souche *Bifidobacterium longum* 1714 [264, 527].

## 1.5 Complément alimentaire et justification scientifique de l'effet probiotique

### 1.5.1 Définition et cadre réglementaire des compléments alimentaires en Europe et en France

La définition réglementaire des compléments alimentaires (CA) est établie pour l'Union Européenne (UE) par la directive 2002/46/CE, transposée en France par le décret du 20 mars 2006, 2006/3524, comme étant «les denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisés sous forme de doses, à savoir les formes de présentation telles que les gélules, les pastilles, les comprimés, les pilules et autres formes similaires, ainsi que les sachets de poudre, les ampoules de liquide, les flacons munis d'un compte-gouttes et les autres formes analogues de préparations liquides ou en poudre destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité ». Le décret 2006/3524 prévoit que les CA dépendent du code de la consommation et que leur mise sur le marché nécessite une déclaration préalable auprès de la DGCCRF (Direction de la Concurrence et de la Répression des Fraudes) chargé également des contrôles une fois mis sur le marché. Cependant, avec l'évolution rapide de l'offre alimentaire et l'émergence de produits « nouveaux » en raison de leur technologie

ou de leurs ingrédients, des aliments et des boissons enrichis, le consommateur pourrait être exposé à de nouveaux dangers qu'il faut être en mesure d'identifier sans délais. C'est dans ce cadre qu'un dispositif national de sécurité sanitaire dit de « nutrivigilance » a été mis en place par la loi Hôpital, Patients, Santé et Territoires (HPST) de juillet 2009 et confié à l'agence nationale de sécurité de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). Les professionnels de santé sont ainsi chargés de diagnostiquer chez leurs patients les potentiels EI liés à la consommation de ces nouveaux types d'aliments ou boissons fonctionnels incluant les CA, et de remplir le formulaire disponible sur le site internet de l'ANSES [528].

### **1.5.2 Les allégations nutritionnelles et de santé en Europe**

Le règlement européen (EC) n. 1924/2006 du Parlement européen et du Conseil du 20 septembre 2006 définit l'allégation comme étant un message ou toute représentation, non obligatoire en vertu de la législation communautaire et nationale, y compris sous forme d'images, d'éléments graphiques ou de symboles, quelle qu'en soit la forme, qui affirment, suggèrent ou impliquent qu'une denrée alimentaire possède des caractéristiques particulières. Ce règlement distingue trois types d'allégation c'est-à-dire nutritionnelle, de santé et relative à la réduction d'un risque de maladie. L'allégation de santé affirme, suggère, ou implique l'existence d'une relation entre, d'une part, une catégorie de denrées alimentaires, une denrée alimentaire ou l'un de ses composants et, d'autre part, la santé alors que l'allégation relative à la réduction d'un risque de maladie affirme, suggère ou implique que la consommation d'une catégorie de denrées alimentaires, d'une denrée alimentaire ou de l'un de ses composants réduit sensiblement un facteur de risque de développement d'une maladie humaine [389].

### **1.5.3 La justification scientifique des allégations des aliments et ingrédients santé**

La directive européenne 2002/46/CE qui introduit la notion d'effet physiologique, définit l'aliment santé comme un aliment dont il a été démontré, au-delà des fonctions nutritionnelles de base, des bénéfices physiologiques précisés par des travaux scientifiques.

Le règlement distingue trois catégories d'aliments comprenant :

- 1) Les aliments fonctionnels tels que les yaourts enrichis en probiotiques et céréales enrichies en vitamines
- 2) Denrées alimentaires destinées à une alimentation particulière (DADAP) telles que les préparations alimentaires destinées à des catégories de population ou de patients (nourissons, diabétiques)
- 3) Compléments alimentaires

### **1.5.4 La démarche PASSCLAIM**

Le concept PASSCLAIM, initié par le projet FUFOSÉ (Functionnal Foods Sciences in Europe) en 1999, désigne le « processus d'évaluation de l'appui scientifique des allégations sur les denrées

alimentaires » correspondant à une réflexion scientifique globale destinée à présenter une vision consensuelle des critères à fournir pour soutenir que les données scientifiques qui sous-tendent les allégations santé des aliments sont suffisantes et que les revendications peuvent être considérées comme valides [529-531].

Celles-ci doivent être systématiquement évaluées selon les critères suivants :

- 1) Une caractérisation de l'aliment ou ingrédient alimentaire à laquelle l'effet allégué est attribué,
- 2) Des données chez l'homme, principalement des études d'intervention qui représentent la ou les populations cible(s) pour l'allégation,
- 3) Une relation dose-effet,
- 4) Des éléments de preuve permettant de définir les facteurs confusionnels, comme le mode de vie, les modes de consommation, l'alimentation de base et la matrice alimentaire,
- 5) Une durée appropriée pour l'étude,
- 6) Une mesure de la conformité,
- 7) Une puissance statistique suffisante pour tester l'hypothèse.

Le niveau de preuve le plus élevé consiste à réaliser un essai clinique randomisé, en double insu (aveugle) contrôlé par placebo et dans le cas des allégations de santé génériques, celle relevant de l'article 13.1 du règlement (EC) n. 1924/2006, Asp et Bryngelsson (2008) soulignent que des études observationnelles peuvent constituer une méthodologie recevable [529-531].

### **1.5.5 Législation communautaire et rôle de l'EFSA**

A l'initiative des responsables politiques de l'UE, le règlement (EC) n. 1924/2006 établit des règles harmonisées au niveau de l'Union pour l'utilisation des allégations nutritionnelles et de santé, basées sur des profils nutritionnels. Les profils nutritionnels définissent les exigences nutritionnelles globales auxquelles doivent satisfaire les aliments afin de pouvoir faire l'objet d'allégations nutritionnelles et de santé spécifiques. Un des objectifs clés de ce règlement est de garantir que toute allégation figurant sur l'étiquette d'un aliment vendu au sein de l'UE soit claire et justifiée par des preuves scientifiques. Le rôle de l'EFSA, et en particulier du groupe scientifique sur les produits diététiques, la nutrition et les allergies (groupe NDA), est de vérifier le niveau de preuve scientifique des demandes d'allégations introduites par les entreprises qui souhaitent soumettre des allégations au processus d'autorisation de l'UE. Ces informations sont ensuite utilisées comme fondement scientifique par la Commission européenne et les États membres pour décider s'ils autorisent ou non l'utilisation de ces allégations. À la suite d'une consultation approfondie auprès du secteur de l'industrie et d'autres parties intéressées, l'EFSA a élaboré des recommandations à respecter pour établir les demandes d'autorisation d'allégations. De plus, en se basant sur l'expérience des évaluations des demandes d'allégation, incluant celle des effets probiotiques et

prébiotiques, l'EFSA a notamment publié les recommandations concernant les demandes d'allégations relatives au système immunitaire, au tractus GI et à la défense contre les micro-organismes pathogènes [400, 532, 533].

### **1.5.6 La justification scientifique d'un effet probiotique**

Conformément aux recommandations de la FAO/WHO (2002 et 2006) et en particulier celle de l'EFSA, les preuves requises pour alléguer un effet probiotique, à l'instar de l'effet prébiotique ou symbiotique, reposent principalement sur [386, 387, 532, 533] :

- 1) La caractérisation de la ou des souche(s) et/ou de la ou des substances prébiotique(s)
- 2) L'identification de la relation santé qui est considérée comme un effet physiologique bénéfique pour la population cible (population générale ou une catégorie définie qui en fait partie)
- 3) La démonstration de l'effet santé chez l'homme et dans une population cible de sujets sains

Comme le mentionnait le rapport de l'AFSSA dès 2005, le groupe NDA de l'EFSA n'a pas retenu la prolifération des souches probiotiques comme un effet physiologique bénéfique [391, 532, 533]. De plus, les demandes d'allégation revendiquant le traitement de situations pathologiques plutôt que le maintien d'une fonction physiologique ou la réduction du risque de maladie, ne sont pas éligibles dans la mesure où elles ne respectent pas le cadre du règlement (EC) n. 1924/2006 [389, 532, 533]. L'EFSA indique que les effets démontrés dans certaines conditions de santé spécifiques (personnes âgées, femmes enceintes, ...) peuvent être acceptées et transposables pour la population générale [400, 532, 533]. Or la majorité des études évaluant l'effet des probiotiques chez l'homme ont été réalisées dans des populations de patients [533]. Tenant compte de la similarité des perturbations GI similaires observées dans la population des sujets sains à celle exprimées par les patients diagnostiqués pour des TFI, il est enfin important de noter que le groupe NDA indique que les données recueillies dans les populations de patients avec des TFI pourront être recevables pour revendiquer une allégation de santé, telle qu'un effet probiotique, dans la population générale [532].

### **1.5.7 Contexte scientifique de l'étude**

En dépit du profil sécuritaire des bactéries lactiques (LAB), et en particulier du genre *Lactobacillus* pour sa traditionnelle utilisation dans la fermentation alimentaire, et de leurs mécanismes d'action mis en évidence d'après les études *in vitro* et *in vivo* suggérant leurs bénéfices sur différentes cibles physiopathologiques du SII, le rationnel de leur utilisation est limité par le faible nombre d'ECR de haute qualité méthodologique et en particulier dans la population de patients caucasiens diagnostiqués avec un SII [463, 469-474, 476, 477, 485-487, 534]. Ainsi, en raison du rationnel d'utilisation des probiotiques sur différentes cibles physiopathologiques du SII, un ECR a été mené d'après un protocole d'étude de haute qualité méthodologique intitulé LAPIBSS (*Lactobacillus*

*acidophilus* versus placebo in the symptomatic treatment of irritable bowel syndrome) afin de démontrer l'efficacité et l'innocuité d'un mélange de deux souches probiotiques du genre *Lactobacillus*, apportées sous forme d'un complément alimentaire, dans la prise en charge des symptômes du SII. Les deux souches appartenant à la même espèce *L. acidophilus*, sans effets opposés connus et dont l'association n'a pas fait à notre connaissance l'objet d'un ECR de haute qualité méthodologique dans le SII, ont été sélectionnées d'après des travaux précliniques et pilotes suggérant leur innocuité et leur bénéfice souche-dépendant à améliorer les symptômes du SII [513, 520, 521, 535-537].

## **2 MATERIEL ET METHODES**

### ***Article 1***

## **3 DISCUSSION / LIMITATIONS DU PROTOCOLE**

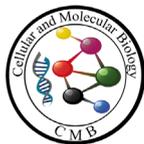
### ***Article 1***

## **4 RESULTATS ET DISCUSSION**

### ***Article 2***

# Article 1

---



Effect of Probiotic on the Gut Microbiota in Irritable Bowel Syndrome

Abstract: Irritable bowel syndrome (IBS) is a common gastrointestinal disorder... The current clinical trial protocol aims to determine the effects of a mixture of probiotics during irritable bowel syndrome...

Fig 1. Gut Microbiota in IBS

Figure 1 shows the composition of the gut microbiota in IBS patients compared to healthy controls. The x-axis represents the number of bacterial species, and the y-axis represents the relative abundance of each species.

Introduction: Irritable bowel syndrome (IBS) is a common gastrointestinal disorder... The current clinical trial protocol aims to determine the effects of a mixture of probiotics during irritable bowel syndrome...

Conclusion: The results of this study suggest that the use of probiotics may be beneficial in the treatment of IBS.

References

1. Ford AC, Quigley KS. Irritable bowel syndrome. N Engl J Med. 2017;376(16):1710-1719. doi:10.1056/NEJMra1616015

2. Mearin ML, Garcia-Roma B, Garcia-Roma B, et al. Probiotics in irritable bowel syndrome: a systematic review. J Clin Gastroenterol. 2014;48(10):1000-1008. doi:10.1097/MCG.0b013e3182910000



















## Article 2

---

# ***Lactobacillus acidophilus* versus placebo in the symptomatic treatment of irritable bowel syndrome: LAPIBSS randomized trial results.**

Sadrin S.<sup>1</sup>, Sennoune S.R.<sup>2</sup>, Gout B.<sup>3</sup>, Marque S.<sup>4</sup>, Moreau J.<sup>5</sup>, Zinoune K.<sup>6</sup>, Grillasca J.<sup>1</sup>, Pons O.<sup>7£</sup>, Maixent J.M.<sup>1£\*</sup>

1. Laboratoire PROTEE - EA 3819-EBMM-Bâtiment R, Université du Sud Toulon-Var, BP 20132, 83957 La Garde Cedex, France.
2. Department of Cellular Physiology and Molecular Biophysics - Health Sciences Center, Texas Tech University, 3601 4th Street, Lubbock, TX 79430-6551, USA.
3. Biomedical and Global Clinical Solutions - 26 Rue Hermès, 31520 Ramonville-Saint-Agne, France.
4. Capionis - 183 Avenue de Choisy, 75013 Paris, France.
5. Rangueil University Hospital - 1, Avenue du Professeur Jean Poulhès - TSA 50032 - 31059 Toulouse cedex 9, France.
6. Qualilab - 1121 Rue de la Bergeresse, 45160 Olivet, France.
7. Primary care physician - 5 Impasse de la maison du peuple, 34310 Montady, France.

£ Senior coauthor

\* **Corresponding author:** Pr. J.M. Maixent Laboratoire PROTEE - EA 3819-EBMM-Bâtiment R, Université du Sud Toulon-Var, BP 20132, 83957 La Garde Cedex, France.

Tel: +33 6 63 95 28 44

Fax: +33 9 81 40 78 16

E-mail: [jmmaixent@gmail.com](mailto:jmmaixent@gmail.com)

**Running title: Irritable bowel syndrome and probiotics**

**Keywords:** Irritable bowel syndrome, Microbiota, Probiotics, *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*), Randomized clinical trial

## Abstract

**Background:** Irritable bowel syndrome is a chronic functional gastrointestinal disorder characterized by abdominal pain/discomfort and altered bowel habits. The use of *Lactobacilli* probiotics species is limited by the small number of adequately designed clinical trials. Following a high-quality methodology protocol (LAPIBSS), the current trial aimed to demonstrate the efficacy of a 2-strain mixture of *Lactobacillus acidophilus* to improve irritable bowel syndrome symptoms.

**Methods / Design:** Eighty patients with a positive diagnosis of irritable bowel syndrome according to Rome III criteria were recruited to a multicentre, double-blinded, in parallel groups, placebo-controlled, randomized trial. Patients were provided with a daily dose of two capsules with two probiotics strains ( $5 \times 10^9$  cfu/capsule) or placebo for 8 weeks on a 1:1 ratio. The primary outcome is to obtain scores of abdominal pain/discomfort assessed with a 100-mm visual analogue scale. The secondary outcome is to obtain scores of bloating, flatus and rumbling tested with a 100-mm visual analogue scale, composite score, stool frequency and stool consistency/appearance assessed with the Bristol Stool Form scale.

**Results:** The primary outcome with abdominal pain/discomfort scores was significantly improved in both groups at weeks 4 and 8 ( $P < 0.0001$ ) while no significant differences were found between probiotics and placebo ( $-30.6 \pm 4.1$  vs  $-22.0 \pm 4.1$ , respectively;  $P = 0.33$ ). The overall treatment effect was significant on flatus score ( $P = 0.04$ ) and marginally significant on composite score ( $P = 0.07$ ). No treatment effect was found for stool characteristics. Probiotics were well tolerated and use of medication was maintained low in both groups.

**Conclusions:** The consumption of the 2-strain mixture of *Lactobacillus acidophilus* over 8 weeks is safe, significantly decreases the flatus score and shows a marginally significant trend in the improvement of irritable bowel syndrome composite symptom score. A significant placebo effect and the heterogeneity of the patient population may contribute to the lack of significance on the primary outcome.

**Trial registration:** EudraCT N°2008-A00844-51

## Background

Irritable bowel syndrome (IBS) is the most common chronic functional gastrointestinal disorder with a worldwide global prevalence of approximately 11% in general adult population [1, 2]. IBS is currently defined by the Rome III criteria, including abdominal pain or discomfort and altered bowel habits, especially constipation and/or diarrhea, which are not explained by structural or biochemical abnormalities [3]. According to the current point of view gaining evidence, pathophysiology of IBS is multifactorial and involves a dysfunction of the gut-brain axis linked to gut microbiota or “microbiome”, visceral hypersensitivity, abnormal gastrointestinal motility and secretion as well as a low-grade intestinal inflammation [4-7]. Microbiota may interplay with these different pathophysiological targets taking into account that dysbiosis observed in IBS patients is highly associated with the disruption of gut-brain axis [8, 9]. Even if a wide range of pharmacological and non-pharmacological therapies have been investigated, there is not a well-established and consensual therapeutic approach due to the multifactorial nature of IBS [10, 11]. Approximately 15% of IBS patients consult a physician and usually seek alternative strategies such as probiotics [12-14]. Among randomized clinical trials (RCT) using probiotics in IBS, 17 trials have been conducted with a high quality methodology (Jadad score  $\geq 3$ ) and only 5 of them have been performed among IBS patients diagnosed with Rome III criteria [15-19]. Several food-associated species of *Lactobacilli* have an excellent safety profile and a “generally-regarded-as-safe” (GRAS) status, such as *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) [20, 21]. While *L. acidophilus* is the most commonly dietary used bacteria, only 2 RCT performed with *L. acidophilus* strains have been reported in the symptomatic treatment of IBS [18, 19, 21]. After 4 weeks of treatment, *L. acidophilus*-SDC 2012, 2013 strains reduced significantly abdominal pain compared with placebo in a pilot RCT including 40 patients [18]. Recently, a 12-week RCT performed with *L. acidophilus* NCFM showed significant improvement of abdominal pain in the subgroup of patients suffering from moderate to severe pain [19]. Although modest, this latter result is consistent with preclinical data demonstrating the strain-specific property of *L. acidophilus* NCFM to modulate and restore a normal perception of visceral pain [22]. By considering the higher magnitude of positive results observed with *L. acidophilus*-SDC 2012, 2013 strains, the published protocol entitled LAPIBSS of the current RCT had suggested an additional effect of two strains of the same species without antagonist effects known [18, 23]. Thus, the use of a second available *L. acidophilus* strain, i.e. *L. acidophilus* LAFTI L10, was based on its strain-specific gut immunoregulatory properties according to preclinical data and a cross-over pilot study in 60 healthy subjects with gastrointestinal disturbances similar to IBS symptoms [18, 24-26]. Both strains are also probiotics with approved safety and fermentative properties [19, 26-28]. According to the published protocol, the aim of the current study was to test with the highest methodology the hypothesis that a consumption of a 2-strain mixture of probiotic species *L. acidophilus* for 8 weeks could improve abdominal pain / discomfort as primary endpoint as well as others IBS symptoms such as bloating, flatus, rumbling and bowel habits, including stool frequency and consistency/appearance [23].

## Materials and methods

### Participants

Patients who fulfilled the screening criteria were recruited by 6 general practitioners located in medical offices based in Toulouse, Montpellier and Poitiers, and by a gastroenterologist (Dr Jacques Moreau) of Rangueil University Hospital of Toulouse, France. Eligible participants were screened among patients already diagnosed with IBS and a total of 80 patients male or female were enrolled between January 2009 and April 2012. The trial was completed on May 19, 2012. Patients were eligible for the trial if they provided written informed consent and if they met all of the following criteria: aged between 30 and 60 years old; diagnosed for IBS according to Rome III criteria; presented with a negative coprological and inflammatory balance (negative CRP blood test) for over 6 months. Subjects were excluded from the trial if they presented with an organic intestinal disease, a severe or active disease with multiple treatments (psychiatric, cardio-pulmonary, kidney, haematological, neoplastic, antimicrobial or metabolic), intestinal parasitic infection in the last 6 months, inflammatory bowel disease (Crohn's disease, ulcerative colitis) or a history of previous abdominal surgery (except appendectomy, caesarean birth, tubal ligation, hernia). In addition, subjects were excluded if they changed in medication in the last 2 months, took probiotics in the last 2 months or antibiotic therapy in the last 30 days, received current antidepressant or antipsychotic treatment, and received antimycotic and antiseptic treatment or treatment affecting gastrointestinal transit as well as chronic use of analgic and antispasmodic medication. Participants were not eligible if they had a known allergy to tested products or to one of its constituents, regular alcohol consumption > 14 units per week, regular use of narcotic and psychotropic substances, changed in diet, started a weight-loss program or diet in progress. Non-menopausal women who have not used an effective contraceptive method, or who were pregnant or breast-feeding were also excluded.

### Study design

The study protocol refers to a multicentre, double-blind, placebo-controlled, two-armed, parallel design, individually randomized trial, comparing probiotics with placebo in patients with IBS. The current trial was performed for a maximum of 9 weeks with 4 visits planned (at points corresponding to screening, baseline, 2 control visits after 4 and 8 weeks of treatment). During the screening visit, investigators checked the eligibility of participants and obtained their informed consent. If the eligibility was confirmed within a maximum of 7 days from the date of the first visit, they were randomized to receive probiotics or placebo for 8 weeks, stratified by care centre. The study design was also adaptive, into two periods, with an interim analysis after the first sixty patients were included (75% of the overall participants) [23]. Regulatory approval was obtained September 11, 2008 from the ANSM (French National Agency for Medicines and Health Products Safety – Number B80623-40) and ethics approval of all procedures of the present study was obtained September 15, 2008 from the French Consultative Committee for the Protection of Individuals in Biomedical Research of the South West (Number CPP08-014a). Written informed consent was obtained from each participant. The present trial was registered in July 2008 under EudraCT number 2008-A00844-51 (European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trial) in accordance with Directive 2001/20/EC.

## Randomization and interventions

The type of randomization was the block randomization method and it was stratified by care center with participants randomly allocated (1:1 basis) to either probiotics or placebo. An 88-case randomisation arrangement was performed by an independent statistician according to the sequence generated with SAS<sup>®</sup> software (SAS<sup>®</sup> 8.2 software (SAS<sup>®</sup>, Cary, NC, USA)). The study product was provided in the form of vegetable capsule containing a blend of two viable lyophilized *L. acidophilus* strains: NCFM (FDA GRAS Notice 000357, strain number ATCC SD5221, Danisco Inc. Madison, Wisconsin, United States) and LAFTI L10 (strain number CBS 116.411, DSM Food Specialties, Moorebank, Australia). This mixture of two probiotic strains provides for each  $2.5 \times 10^9$  colony-forming unit (cfu) for a total of  $5 \times 10^9$  cfu per capsule. The control product consisted of a vegetable capsule indistinguishable in colour, shape, size, smell and weight from the test product but contained no bacteria. Both products used the same excipient namely maltodextrin, magnesium stearate and colloidal silicon dioxide. Test products were specially manufactured for the study and provided by Laboratoire Denel-Codifra (Le Chesnay, France). The trial dose was 2 capsules/day taken orally; one in the morning and the other one in the evening with a full glass of water half an hour before eating. At the baseline visit, investigators provided for each included participant a capsule box containing 120 capsules to ensure 8 weeks of consecutive supplementation ( $56 \pm 2$  days). Eligible participants received also a diary to report their bowel habits daily and their IBS symptoms weekly for 8 weeks.

## Outcomes and safety assessment

### *IBS symptoms and stool characteristics*

IBS symptoms of abdominal pain / discomfort, bloating, flatus and rumbling were recorded with the presence of the clinical investigator on the case report forms (CRF) for each patient at the baseline visit and at both control visits at weeks 4 and 8. Each IBS symptom score was assessed with a 100-mm visual analogue scale (VAS; 0: none; 100: very severe) [30]. The composite score comprised of the sums of the 4 cardinal symptoms VAS scores calculated for each patient. Stool frequency and consistency were recorded by each patient on the daily diary delivered at baseline visit and their scores were averaged over consecutive 7 day periods. Baseline scores were calculated over the 7 days before product consumption. Consistency/appearance of any bowel movement was assessed in accordance with the 7-point Bristol Stool Form scale (1 = very hard stool, 2 = hard stool, 3 somewhat hard stool, 4 = neither loose nor hard stool, 5 = somewhat loose stool, 6 = loose stool, and 7 = watery stool) using the absolute difference from normal, i.e. score 4 [31]. The change in score of abdominal pain/discomfort from baseline after 8 weeks of products consumption was defined as primary endpoint and changes in scores of bloating, flatus, rumbling, as well as composite score and stool characteristics as secondary endpoints.

### *Clinical and safety outcomes*

A medical history, including the presence of chronic diseases and regular medication were recorded before inclusion. Physical examination were performed at each visit and vital signs (blood pressure, heart rate, body weight) were also monitored both at screening and final visits.

## **Data-management**

Case report forms (CRF) were used by investigators to record data for all participants. CRF were completed by the clinical research associate of the study who sent them to the data administrator to enter the data into the electronic data base using Capture System software (Clinsight<sup>®</sup>, Cenon, France) according to the specifications for the present study [32].

## **Sample size calculation**

According to the data from a previous trial using probiotics to improve IBS symptoms, a difference of 10 points for the primary endpoint of abdominal pain between the two groups of the trial was expected [29]. Assuming a standard deviation (s.d.) of 10 points, the sample size needed to be 23 patients in each group to see these differences with  $\alpha$  error =0.05% and at a statistical power of 90%. By considering the risk that 40% of the patients included could not be assessed at the end of the study, it was necessary to include 40 patients per group [33]. Given the risk of failure at the selection, it was planned to include 10% of subjects more than necessary, hence a maximum of 88 subjects to obtain 80 assessable subjects was recruited. This statistical sample size calculation was consistent with the EMA (European Medicines Agency) guidelines [34].

## **Statistical analysis**

Statistical analysis was conducted based on the intention to-treat (ITT) population which includes every subject who is randomized according to randomized treatment assignment. All treated subjects without any major protocol deviations comprised the per-protocol set (PPS). Statistical analysis was performed using the SAS<sup>®</sup> 8.2 software (SAS<sup>®</sup>, Cary, NC, USA) and the statistical significance was defined as a two-sided P-value < 0.05. The Shapiro-Wilk test as well as measures of Skewness and Kurtosis indicators were performed in order to check the normal distribution of quantitative data. Demographics and baseline clinical endpoints data were compared between groups using  $\chi^2$  test or Fisher's exact and Student's *t*-test or Mann-Whitney-Wilcoxon test, when appropriate. After adjusting by baseline and in order to take into account different sources of variability, primary and secondary outcomes were analysed using a mixed linear model so that symptom scores and changes in symptom scores are presented as adjusted (least-squares [LS]) means  $\pm$  standard error of mean (SEM). In the mixed model used, GROUP, VISIT and BASELINE were defined as fixed factors and CENTER, RESIDUAL as random factors. Multiple comparisons at each time were conducted using a Tukey's multiple comparison adjustment method. The primary analysis was also performed on PPS. As required by the protocol, analysis of tolerability was conducted on the ITT population and missing data were not replaced. The interim analysis was performed with the first 60 subjects to assess the evolution of the primary outcomes and of the stool frequency and consistency over the time using a mixed linear model as described above.

## Results

### Subjects

The flowchart of patients through the protocol study is described in Figure 1. Of the 127 participants screened by investigators to check their eligibility, 80 patients were randomized, 1 discontinued and 79 completed the study leading to an ITT population of 80 patients and a PPS of 79.

### Demographics and baseline characteristics

The demographic and clinical characteristics at baseline are shown in Table 1. No significant differences between probiotics and placebo groups were seen in terms of age, weight, gender, severity scores of abdominal pain, bloating, flatus, rumbling and composite as well as stool frequency and consistency/appearance.

### Primary outcomes

Abdominal pain/discomfort scores improved significantly in both probiotics and placebo groups ( $P < 0.0001$ ) after 4 and 8 weeks of treatment compared with baseline, while no significant differences were found between groups at the end of the study ( $-30.6 \pm 4.1$  vs  $-22.0 \pm 4.1$ , respectively;  $P=0.33$ ) (Table 2). As shown in Figure 2, the evolution of scores from baseline until the end of the intervention showed a greater reduction in abdominal pain/discomfort severity for probiotics group compared with placebo group. Compared with the ITT population, the analysis on PPS did not show any significant differences.

### Secondary outcomes

Bloating scores improved significantly in both groups ( $P < 0.0001$ ) after 4 and 8 weeks of treatment compared with baseline but no significant differences were found between groups at week 8 ( $-33.6 \pm 4.6$  vs  $-24.4 \pm 4.6$ , respectively;  $P=0.41$ ) (Table 2). A greater reduction of bloating score was observed in probiotics group in comparison with placebo group throughout the intervention period as shown in Figure 3. Compared with baseline, flatus scores were reduced significantly both in probiotics ( $P < 0.0001$ ) and placebo groups ( $P=0.001$ ) at week 8 (Table 2). Changes from baseline until the end of trial of rumbling and composite scores were significantly improved in both groups ( $P < 0.0001$ ) (Table 2). Figures 4A and 4B show respectively the evolution of flatus and composite scores throughout the trial. Although the reduction of symptoms severity did not show significant differences between groups at week 4 and week 8, the overall treatment effect was significant on flatus score ( $P=0.04$ ) and marginally significant on composite score ( $P=0.07$ ) (Table 3). No significant differences were observed in each group and between groups in changes of stool frequency and consistency with the exception of stool frequency significantly reduced from baseline until the end of the trial in the placebo group ( $P=0.02$ ) (Table 4).

### Compliance

With the exception of one patient from the placebo group who discontinued the trial due to a voluntary withdrawal after the 4<sup>th</sup> week, all patients complied with the protocol.

## Adverse events

One subject from the probiotics group reported transient adverse events (AE) including abdominal pain, bloating and diarrhea occurring at the first week of the trial but he did not withdraw the trial and he complied with the protocol until the end of the study without any other adverse events.

## Discussion

In this multicentre, double-blind, placebo-controlled, two-armed, parallel design, individually randomized trial entitled LAPIBSS study, comparing a 2-strain mixture of probiotic species *L. acidophilus* with placebo in patients with IBS, both the probiotics and placebo groups showed a significant improvement of abdominal pain/discomfort and others IBS symptoms after 4 and 8 weeks of products consumption. Although the reduction of IBS symptoms severity from baseline until the end of the intervention period was greater for probiotics group compared with placebo group, no significant differences were found between groups at weeks 4 and 8. Moreover, no treatment effect was detected on stool characteristics changes. Although modest, the overall treatment effect, nevertheless, was significant for flatus score and marginally significant on IBS composite score. Probiotics were well tolerated and free from significant or serious adverse events confirming their excellent safety profile observed in previous trials [19, 26, 27]. The trial completion rate and investigational product compliance were high in both groups.

According to the Food and Drug Administration (FDA) IBS clinical guidelines, responders were defined as patients reporting a decrease  $\geq 50\%$  of abdominal pain [35]. The placebo response rate (PRR) found in our study was 53.8%. Using the same response threshold, the overall PRR was 36% which is consistent with results of a meta-analysis performed by Ford et al. (2010) reporting a PRR in IBS of 37.2% [36]. Several factors are able to contribute towards the substantial and largely unavoidable placebo effect in patients with functional gastrointestinal disorders, such as Pavlovian conditioning and the expectation of a significant symptoms improvement [30, 37]. The significant placebo effect observed in IBS could also result from the subjective nature of outcome measures used [38]. Concomitant medications that might have affected outcomes were excluded when selecting participants and monitored through the trial with a limited use observed in both groups. Moreover, participants were excluded if they had taken probiotics in the last 2 months viewed as an adequate length run-in period to reduce any potential carryover effects [19, 26, 27]. Modes of action i.e. strain specific antinociceptive and immunoregulatory properties have been demonstrated for each of both strains of *L. acidophilus* used in our study [22, 24, 25]. We expected an additional effect of 2 strains of the same species without antagonist effects known regarding to positive results observed with the 2-strain mixture of *L. acidophilus* SDC-2012, 2013 [18, 23]. Our results did not support this assumption and the daily dosage of  $5 \cdot 10^9$  cfu for each strain over 8 weeks could be an inadequate dosing, in particular for *L. acidophilus* NCFM, to improve significantly abdominal pain. The consumption over 3 weeks of *L. acidophilus* NCFM alone at a daily dosage of  $2 \cdot 10^{10}$  cfu is able to induce the  $\mu$  opioid receptor (MOR) that has a well-established physiologic role in gut nociception, motility, and secretion [39, 40]. However, this physiological effect, consisting also in the unexpected reduction of CB2 expression, was not observed with

half of this dosage when combined at a ratio of 1:1 with *B. lactis* Bi-07 whereas clinical outcomes did not differ significantly between groups [39]. A more relevant comparison could be made with recent results of the dose-response, high-quality RCT ( $n=391$ ) estimated from a Jadad score of 5 and performed by Lyra et al. (2016) with *L. acidophilus* NCFM alone on patients with IBS [19]. At the daily dosage of  $10^9$  and  $10^{10}$  cfu over 12 weeks, a significant improvement of abdominal pain severity at the end of intervention in active groups combined compared with placebo has been demonstrated according to a *post-hoc* analysis performed among the subgroup of patients suffering from moderate to severe pain ( $n=99$ ;  $P=0.046$ ) [19]. Taking into account these latter findings, our results suggest that a longer study period of 12 weeks would have been more appropriate with the daily dosage used, apart from any possible competitive inhibiting effect between strains [19, 39]. Moreover, it could be speculated that a study period of 12 weeks would result in a plateau effect for placebo response and an emphasis of probiotic response. Nevertheless, a longer study period above of 12 weeks, i.e. 6 months, corresponding to a long-term efficacy assessment would increase significantly the patient withdrawal rate according to results of the unique 6-month RCT using a probiotic strain of *Lactobacillus* in symptomatic treatment of IBS [30, 33].

Abdominal pain/discomfort is an essential component of diagnostic criteria according to Rome III and would be the consequence of visceral hypersensitivity regardless to IBS subtypes [3, 41-43]. Bloating without distension seems to be also associated with visceral hypersensitivity whereas other mechanisms such impaired gas handling or abnormal abdominal-phrenic reflexes would be involved in bloating with distension [44, 45]. Thus, although recent research suggests that bloating is the predominant complaint of patients with IBS, the assessment of abdominal pain as primary endpoint was consistent with preclinical data supporting the rationale of strains used in our study [22-25, 46]. According to the European Food Safety Authority (EFSA) guidance, abdominal pain or discomfort could occur both in general healthy population and patients with IBS [47]. Thus, this RCT was designed to enroll participants without distinction of IBS subtypes, symptom subgroup or threshold for baseline symptom severity. Furthermore, taking into account clinical profiles of patients included with moderate to severe IBS symptoms at baseline, assessment of severity instead of frequency was justified [48]. However, the heterogeneity of participants included would have contributed to the large variability of symptoms severity at baseline and of treatment responses observed in our trial. The significant overall treatment effect on flatus could result from the species specific homofermentive properties of *L. acidophilus* strains able to produce lactic acid without gas-producing [49]. Yet, dietary intake is involved in excess gas production, which would contribute to IBS symptoms severity, as well as in the high variability of *L. acidophilus* strains gut carriage [49-51]. Moreover, pathogenesis of IBS would involve a dysregulation of gut-brain axis linked to the dysbiosis observed in patients [4-9]. Regarding the etiological role of diet or psychical in the pathogenesis of IBS, patients with change in their diet or undergoing antidepressant and antipsychotic treatments were ineligible [23]. The lack of significant effect of probiotics on stool characteristics changes is consistent with results of previous RCT performed with probiotics among general patient population and would confirm that bowel-related symptoms should be studied in separate RCT [15, 16, 52, 53]. Selecting participants or performing subgroup analysis based on IBS subtypes should consider the short-term stability of subtypes according to Rome III classification

justifying the enrolment of the general population of patients with IBS in our trial [54]. In view of the large number of missing data in diary aimed to report daily stool frequency and consistency, results observed on bowel habit are limited in scope. This absence of compliance with a former method is not unexpected and would be due to the laboriousness of a daily self-reporting of bowel-related symptoms performed over 8 weeks in our trial [30]. Yet, a retrospective assessment of patient reported measures for IBS symptoms are vulnerable to forgetting and various cognitive biases [55]. One AE in probiotics group has been recorded. Nevertheless, transient gastro-intestinal symptoms reported are equivalent to IBS symptoms and not unexpected so it would be difficult to attribute them to a treatment-related AE. Thus, this trial confirmed the GRAS status of *Lactobacilli*, especially probiotic species *L. acidophilus* [20, 21].

A significant degree of auxotrophy has been highlighted by the complete genome sequence of *L. acidophilus* NCFM that could explain its low resilience observed in healthy subjects [27, 56]. Future trials in this area could be taken to investigate whether lactitol which ensures a prebiotic effect on *L. acidophilus* strains, especially *L. acidophilus* NCFM, and / or whether microencapsulation using polymerized whey proteins as wall material would increase the efficacy of the probiotic response [57-59]. The pathogenesis of IBS is multifactorial making it difficult to develop a single and well-established biomarker for its diagnosis; however the recently revised Rome IV criteria could improve the accuracy of diagnosis criteria [38, 60, 61]. Taking into account the significant placebo effect of IBS, future trials could also identify potential placebo responders by using a biomarker of placebo response, such as the COMT val<sup>158</sup>met polymorphism, so avoiding any possible appeal for a placebo run-in period [30, 62]. The use of smartphone application specifically and recently designed for patients with IBS could improve the compliance for self-reporting of bowel-related symptoms [63]. Finally, a concomitant assessment of self-reported food-related gastrointestinal symptoms and depression and general anxiety levels could permit to investigate with more accuracy the potential benefits of probiotics in IBS and to provide more clinical data between symptoms severity and dietary intake as well as level of psychological disorders [19, 64]. In conclusion, the 2-strain mixture of *L. acidophilus* used in the current high-quality RCT can be consumed safely over 8 weeks but did not show a significant improvement of IBS symptoms compared with placebo at the end of intervention. Nevertheless, the overall treatment effect was significant on flatus score and marginally significant on composite score, with an excellent completion rate. The strong placebo effect and the substantial heterogeneity of global population of patients with IBS may contribute to our modest results. A better understanding of the physiological effect of probiotics in humans would be needed to upgrade the rationale for their use prior to future trials in this area.

## References

1. Lovell RM, Ford AC. Global prevalence of and risk factors for irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(7):712–721. e4.
2. Canavan C, West J, Card T. The epidemiology of irritable bowel syndrome. *Clinical Epidemiology*. 2014;6:71-80. doi:10.2147/CLEP.S40245.
3. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology*. 2006 Apr;130(5):1480-91.
4. Simrén M, Barbara G, Flint HJ, et al. Rome Foundation Committee. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut* 2013;62:159-176.
5. Mayer EA, Savidge T, Shulman RJ. Brain-gut microbiome interactions and functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2014;146:1500-1512.
6. Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G. Irritable bowel syndrome: a microbiome-gut-brain axis disorder? *World J Gastroenterol* 2014; 20: 14105-14125 [PMID: 25339800.
7. Lee KN, Lee OY. Intestinal microbiota in pathophysiology and management of irritable bowel syndrome. *World Journal of Gastroenterology* 2014;20: 8886–97.
8. Koloski NA, Jones M, Kalantar J, Weltman M, Zaguire J, Talley NJ. The brain-gut pathway in functional gastrointestinal disorders is bidirectional: a 12-year prospective population-based study. *Gut* 2012;61:1284-1290.
9. Dupont HL. Review article: evidence for the role of gut microbiota in irritable bowel syndrome and its potential influence on therapeutic targets. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;39:1033-1042.
10. Drossman, D. A. & Thompson, W. G. The irritable bowel syndrome: review and a graduated multicomponent treatment approach. *Ann. Intern. Med.* 1992;116, 1009–1016.
11. Mertz HR. Irritable bowel syndrome. *N Engl J Med* 2003; 349(22):2136–46.
12. Drossman FA., Camilleri M., Mayer EA. Whitehead WE. AGA technical review on irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002; 123: 2108-31.
13. Hungin AP, Whorwell PJ, Tack J, Mearin F. The prevalence, patterns and impact of irritable bowel syndrome: an international survey of 40,000 subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17(5):643-50.
14. Khan, S. & Chang, L. Diagnosis and management of IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010; 7: 565–581. doi:10.1038/nrgastro.2010.137
15. Didari T, Mozaffari S, Nikfar S, Abdollahi M. Effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome: Updated systematic review with meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2015 Mar 14;21(10):3072-84.
16. Pineton de Chambrun G, Neut C, Chau A, Cazaubiel M, Pelerin F, Justen P, Desreumaux P. A randomized clinical trial of *Saccharomyces cerevisiae* versus placebo in the irritable bowel syndrome. *Dig Liver Dis*. 2015 Feb;47(2):119-24. doi: 10.1016/j.dld.2014.11.007. Epub 2014 Nov 13.
17. Ducrotté P, Sawant P, Jayanthi V. Clinical trial: *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*. 2012;18:4012–4018.

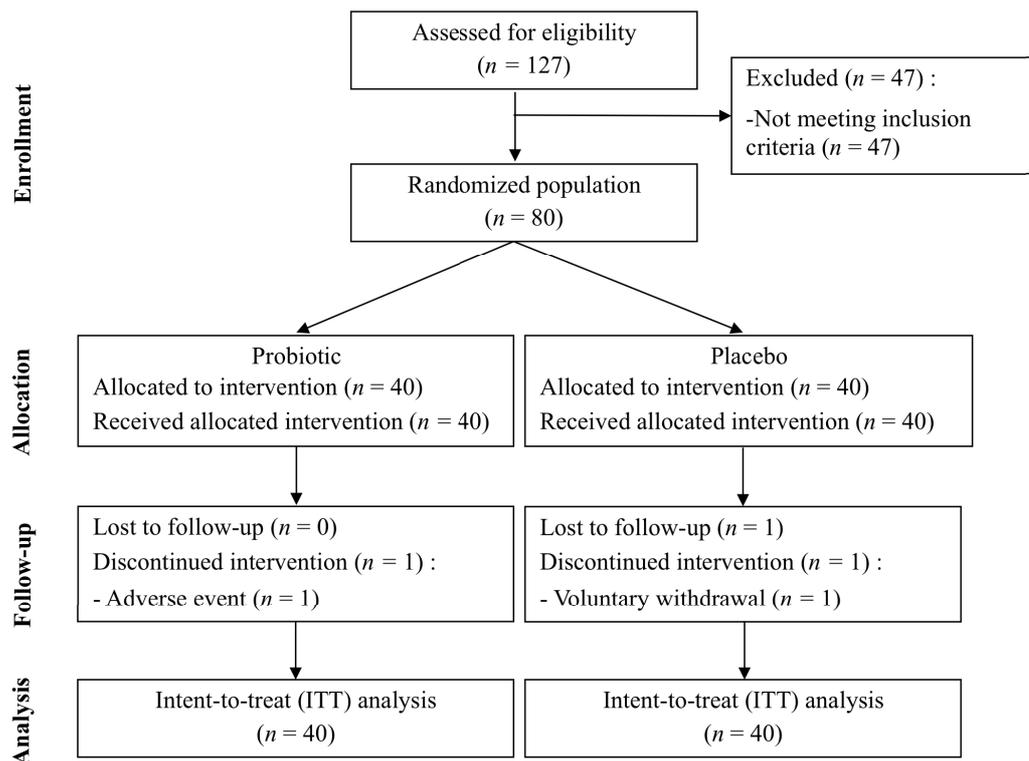
18. Sinn DH, Song JH, Kim HJ, Lee JH, Son HJ, Chang DK, Kim YH, Kim JJ, Rhee JC, Rhee PL. Therapeutic effect of *Lactobacillus acidophilus*-SDC 2012, 2013 in patients with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci*. 2008 Oct;53(10):2714-8. doi: 10.1007/s10620-007-0196-4. Epub 2008 Feb 15.
19. Lyra A, Hillilä M, Huttunen T, et al. Irritable bowel syndrome symptom severity improves equally with probiotic and placebo. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(48):10631-10642. doi:10.3748/wjg.v22.i48.10631.
20. Wells JM. Immunomodulatory mechanisms of *Lactobacilli*. *Microb Cell Fact* 2011; 10 Suppl 1:S17.
21. Bull MJ, Jolley KA, Bray JE, Aerts M, Vandamme P, Maiden MC, Marchesi JR, Mahenthiralingam E. 2014. The domestication of the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus*. *Sci Rep* 4:7202. <http://dx.doi.org/10.1038/srep07202>.
22. Rousseaux C, Thuru X, Gelot A, Barnich N, Neut C, Dubuquoy L, Dubuquoy C, Merour E, Geboes K, Chamaillard M, Ouwehand A, Leyer G, Carcano D, Colombel JF, Ardid D, Desreumaux P. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat Med*. 2007 Jan;13(1):35-7.
23. Sadrin S, Sennoune SR, Gout B, Marque S, Moreau J, Grillasca J, Pons O, Maixent JM. *Lactobacillus acidophilus* versus placebo in the symptomatic treatment of irritable bowel syndrome: the LAPIBSS randomized trial. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. doi: 10.14715/cmb/2017.63.9.21. Epub 2017 Sep 30.
24. Paturi G, Phillips M, Jones M, Kailasapathy K. Immune enhancing effects of *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 and *Lactobacillus paracasei* LAFTI L26 in mice. *Int J Food Microbiol*. 2007 Apr 1;115(1):115-8.
25. Paturi G, Phillips M, Kailasapathy K. Effect of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 and *Lactobacillus paracasei* LAFTI L26 on systemic immune functions and bacterial translocation in mice. *J Food Prot*. 2008 Apr;71(4):796-801.
26. Welin A and Henriksson A. Survival of *Lactobacillus acidophilus* LAFTI<sup>®</sup> L10 and *Lactobacillus casei* LAFTI<sup>®</sup> L26 in the human gastrointestinal tract and perceived effects on health, conducted at University of New South Wales (UNSW), Australia, January-September 2003 and approved by the UNSW Human Ethics Committee. Internal DSM report (2004).
27. Sanders ME, Klaenhammer TR. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J Dairy Sci*. 2001 Feb;84(2):319-31.
28. Mahoney M, Henriksson A. The effect of processed meat and meat starter cultures on gastrointestinal colonization and virulence of *Listeria monocytogenes* in mice. *Int J Food Microbiol*. 2003 Aug 1;84(3):255-61.
29. Nobaek S, Johansson ML, et al. Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:1231-8.
30. Irvine EJ, Whitehead WE, Chey WD, et al. Design of treatment trials for functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology* 2006;130:1538–51.
31. Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol*. 1997 Sep;32(9):920-4.

32. Kuchinke W, Ohmann C, Yang Q, Salas N, Lauritsen J, Gueyffier F, Leizorovicz A, Schade-Brittinger C, Wittenberg M, Voko Z, Gaynor S, Cooney M, Doran P, Maggioni A, Lorimer A, Torres F, McPherson G, Charwill J, Hellström M, Lejeune S. Heterogeneity prevails: the state of clinical trial data management in Europe - results of a survey of ECRIN centres. *Trials* 2010; 11:79.
33. Niv E, Naftali T, Hallak R, Vaisman N. The efficacy of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the treatment of patients with irritable bowel syndrome – a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *Clin Nutr* 2005;24:925-31.
34. ICH (1998b) ICH Topic E9: Statistical Principles for Clinical Trials. September 1998. EMEA, London.
35. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Irritable Bowel Syndrome - Clinical Evaluation of Products for Treatment. May 2012.  
<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.
36. Ford AC, Moayyedi P. Meta-analysis: factors affecting placebo response rate in the irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;32:144-158.
37. Musial F, Klosterhalfen S, Enck P. Placebo responses in patients with gastrointestinal disorders. *World J Gastroenterol* 2007;13: 3425–9.
38. Shah E, Pimentel M. Placebo Effect in Clinical Trial Design for Irritable Bowel Syndrome. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. 2014;20(2):163-170. doi:10.5056/jnm.2014.20.2.163.
39. Ringel-Kulka T, Goldsmith JR, Carroll IM, Barros SP, Palsson O, Jobin C, Ringel Y. *Lactobacillus acidophilus* NCFM affects colonic mucosal opioid receptor expression in patients with functional abdominal pain - a randomised clinical study. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 40: 200-207 [PMID: 24853043 DOI: 10.1111/apt.12800]
40. Philippe D, Dubuquoy L, Groux H, Brun V, Chuoï-Mariot MT, Gaveriaux-Ruff C, Colombel JF, Kieffer BL, Desreumaux P. Anti-inflammatory properties of the mu opioid receptor support its use in the treatment of colon inflammation. *J Clin Invest*. 2003 May;111(9):1329-38.
41. Bueno L, Fioramonti J. Visceral perception: inflammatory and non-inflammatory mediators. *Gut* 2002, 51(Suppl 1):i19-23.
42. Azpiroz F, Bouin M, Camilleri M, Mayer EA, Poitras P, Serra J et al. (2007). Mechanisms of hypersensitivity in IBS and functional disorders. *Neurogastroenterol Motil* 19 (Suppl 1): 62–88.
43. Theodorou V, Ait Belgnaoui A, Agostini S, Eutamene H. Effect of commensals and probiotics on visceral sensitivity and pain in irritable bowel syndrome. *Gut Microbes* 2014;5:430-436.
44. Agrawal A, Whorwell PJ. Review article: abdominal bloating and distension in functional gastrointestinal disorders: epidemiology and exploration of possible mechanisms. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008 Jan 1;27(1):2-10. Epub 2007 Oct 11.
45. Villoria A, Azpiroz F, Burri E, Cisternas D, Soldevilla A, Malagelada JR. Abdomino-phrenic dyssynergia in patients with abdominal bloating and distension. *Am J Gastroenterol*. 2011 May;106(5):815-9. doi: 10.1038/ajg.2010.408.

46. Pimentel M, Talley NJ, Quigley EM, Hani A, Sharara A, Mahachai V. Report from the multinational irritable bowel syndrome initiative 2012. *Gastroenterology* 2013;144:e1-e5.
47. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Guidance on the scientific requirements for health claims related to the immune system, the gastrointestinal tract and defence against pathogenic microorganisms. *EFSA Journal*. 2016; 14(1):4369.
48. Azpiroz F, Guyonnet D, Donazzolo Y, Gendre D, Tanguy J, Guarner F. Digestive Symptoms in Healthy People and Subjects With Irritable Bowel Syndrome: Validation of Symptom Frequency Questionnaire. *J Clin Gastroenterol* 2015; 49: e64-e70 [PMID:25014236 DOI: 10.1097/MCG.000000000000178]
49. Bull M, Plummer S, Marchesi J, Mahenthiralingam E. The life history of *Lactobacillus acidophilus* as a probiotic: a tale of revisionary taxonomy, misidentification and commercial success. *FEMS Microbiol Lett*. 2013 Dec;349(2):77-87. doi: 10.1111/1574-6968.12293. Epub 2013 Oct 24.
50. Gibson, P. R. & Shepherd, S. J. Evidence-based dietary management of functional gastrointestinal symptoms: The FODMAP approach. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25, 252–258 (2010).
51. Ong DK, Mitchell SB, Barrett JS, et al. Manipulation of dietary short chain carbohydrates alters the pattern of gas production and genesis of symptoms in irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25(8):1366–1373.
52. Hungin AP, Mulligan C, Pot B, Whorwell P, Agréus L, Fracasso P, Lionis C, Mendive J, Philippart de Foy JM, Rubin G, Winchester C, de Wit N; European Society for Primary Care Gastroenterology. Systematic review: probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms in clinical practice -- an evidence-based international guide. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013 Oct;38(8):864-86. doi: 10.1111/apt.12460. Epub 2013 Aug 27.
53. Trentacosti AM, He R, Burke LB, Griebel D, Kennedy DL. Evolution of clinical trials for irritable bowel syndrome: issues in end points and study design. *Am J Gastroenterol* 2010;105:731-735.
54. Engsbro AL, Simrén M, Bytzer P. Short-term stability of subtypes in the irritable bowel syndrome: prospective evaluation using the Rome III classification. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 35:350-359 [PMID: 22176384 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2011.04948.x]
55. Lackner JM, Jaccard J, Keefer L, Firth R, Carosella AM, Sitrin M, Brenner D. The accuracy of patient-reported measures for GI symptoms: a comparison of real time and retrospective reports. *Neurogastroenterol Motil* 2014; 26: 1802-1811 [PMID: 25424582 DOI: 10.1111/nmo.12466]
56. Altermann E, Russell WM, Azcarate-Peril MA, Barrangou R, Buck BL, McAuliffe O, Souther N, Dobson A, Duong T, Callanan M, Lick S, Hamrick A, Cano R, Klaenhammer TR. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3906-3912 [PMID: 15671160 DOI: 10.1073/pnas.0409188102]
57. Kontula P, Suihko ML, Von Wright A, Mattila-Sandholm T. The effect of lactose derivatives on intestinal lactic acid bacteria. *J Dairy Sci*. 1999 Feb;82(2):249-56.
58. Ouwehand AC, Tiihonen K, Saarinen M, Putaala H, Rautonen N. Influence of a combination of *Lactobacillus acidophilus* NCFM and lactitol on healthy elderly: intestinal and immune parameters. *Br J Nutr*. 2009 Feb;101(3):367-75. doi: 10.1017/S0007114508003097. Epub 2008 Jul 18.

59. Jiang Y, Zheng Z, Zhang T, Hendricks G, Guo M. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCFM using polymerized whey proteins as wall material. *Int J Food Sci Nutr*. 2016 Sep;67(6):670-7. doi: 10.1080/09637486.2016.1194810. Epub 2016 Jun 16.
60. Kim JH, Lin E, Pimentel M. Biomarkers of Irritable Bowel Syndrome. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. 2017;23(1):20-26. doi:10.5056/jnm16135.
61. Mearin F, Lacy BE, Chang L, Chey WD, Lembo AJ, Simrén M, Spiller R. Bowel Disorders. *Gastroenterology*. 2016 Feb 18. pii: S0016-5085(16)00222-5. doi: 10.1053/j.gastro.2016.02.031. [Epub ahead of print]
62. Hall KT, Lembo AJ, Kirsch I, Ziogas DC, Douaiher J, Jensen KB, Conboy LA, Kelley JM, Kokkotou E, Kaptchuk TJ. Catechol-O-methyltransferase val158met polymorphism predicts placebo effect in irritable bowel syndrome. *PLoS One*. 2012;7(10):e48135. doi: 10.1371/journal.pone.0048135. Epub 2012 Oct 23.
63. Zia J, Schroeder J, Munson S, et al. Feasibility and Usability Pilot Study of a Novel Irritable Bowel Syndrome Food and Gastrointestinal Symptom Journal Smartphone App. *Clinical and Translational Gastroenterology*. 2016;7(3):e147-. doi:10.1038/ctg.2016.9.
64. Böhn L, Störsrud S, Törnblom H, Bengtsson U, Simrén M. Self-reported food-related gastrointestinal symptoms in IBS are common and associated with more severe symptoms and reduced quality of life. *Am J Gastroenterol*. 2013 May;108(5):634-41. doi: 10.1038/ajg.2013.105.

**Figure 1. Flowchart of the patients through the study protocol**



**Table 1. Patient demographic and clinical characteristics at baseline (n = 80)**

	Probiotic (n = 40)	Placebo (n = 40)	P-value
Age (years)	48.9 ± 8.4	48.9 ± 8.0	0.77
Range (years)	26– 64	34 - 66	
Weight (kg)	64.8 ± 12.3	65.2 ± 13.9	0.98
	47 - 92	42 - 100.4	
Sex ratio (female/male)	29/11	28/12	0.80
Abdominal pain score †	52.0 ± 23.5	48.4 ± 27.0	0.49
Bloating score †	58.45 ± 21.8	54.3 ± 25.1	0.63
Flatus score †	50.4 ± 24.6	53.5 ± 21.7	0.50
Rumbling score †	45.6 ± 24.9	48.0 ± 22.9	0.60
Composite score §	206.5 ± 76.5	204.2 ± 71.5	0.71
Stool frequency	7.6 ± 4.4	8.05 ± 4.5	0.78
Stool consistency ‡	1.8 ± 0.8	1.9 ± 0.8	0.93

Datas are expressed as means ± s.d.

† : Assessed with a 100-mm visual analogue scale (VAS).

§ : Comprised of the sums of the 4 cardinal symptoms VAS scores calculated for each patient.

‡ : Assessed with Bristol Stool Form scale.

**Table 2. Symptoms scores of irritable bowel syndrome and composite score at baseline, week 4 and week 8 of the study period (n = 80)**

	Baseline	Week 4	Change at week 4	P-value	Week 8	Change at week 8	P-value
<b>Placebo group</b>							
Abdominal pain †	48.72± 2.8	31.20± 2.8	-17.52± 3.2	< 0.0001	26.6 ± 2.8	-22.0 ± 4.1	< 0.0001
Bloating †	54.1 ± 2.8	35.7 ± 2.8	-18.3 ± 3.3	< 0.0001	29.8 ± 2.8	-24.4 ± 4.6	< 0.0001
Flatus †	50.1 ± 3.5	36.7 ± 3.5	-13.4 ± 3.5	0.002	30.0 ± 3.5	-20.1 ± 4.9	0.001
Rumbling †	45.5 ± 3.2	29.89 ± 3.2	- 12.6 ± 3.3	0.003	21.9 ± 3.2	-21.7 ± 5.1	0.0005
Composite score §	197.8 ± 10.8	135.8 ± 10.8	-62.0 ± 11.7	< 0.0001	109.8 ± 10.8	-88.5 ± 11.8	< 0.0001
<b>Probiotic group</b>							
Abdominal pain †	50.1 ± 2.7	28.3 ± 2.7	-21.8 ± 3.2	< 0.0001	19.4 ± 2.7	-30.6 ± 4.1	< 0.0001
Bloating †	56.0 ± 2.8	31.4 ± 2.8	-24.5 ± 3.3	< 0.0001	22.4 ± 2.8	-33.6 ± 4.6	< 0.0001
Flatus †	49.8 ± 3.4	29.2 ± 3.4	-20.5 ± 3.7	< 0.0001	22.6 ± 3.4	-27.1 ± 3.7	< 0.0001
Rumbling †	45.3 ± 3.2	26.6 ± 3.2	-18.6 ± 3.3	< 0.0001	19.9 ± 3.2	-25.4 ± 5.0	< 0.0001
Composite score §	200.3 ± 10.6	114.8 ± 10.6	-85.5 ± 11.3	< 0.0001	83.5 ± 10.6	-116.8 ± 11.7	< 0.0001

Symptoms scores, composite score and changes from baseline at week 4 and week 8 in each group are expressed as least-square means (LSmeans) ± SEM using a mixed linear model. † : Assessed with a 100-mm visual analogue scale (VAS; 0: none; 100: very severe); § : Comprised of the sums of the 4 cardinal symptoms VAS scores calculated for each patient.

**Table 3. Overall treatment effects on symptoms scores of irritable bowel syndrome and stool characteristics (n=80)**

	LSmeans differences	SEM	P-value
Abdominal pain †	2.9	2.0	0.16
Bloating †	3.2	2.4	0.18
Flatus †	5.0	2.4	0.04*
Rumbling †	3.6	2.5	0.15
Composite score §	14.9	8.1	0.07
Stool frequency	0.01	0.2	0.94
Stool consistency ‡	0.004	0.1	0.96

Overall treatment effect expressed as least-square means (LSmeans) differences ± SEM between probiotic and placebo groups using a mixed linear model (\*P < 0.05).

† : Assessed with a 100-mm visual analogue scale (VAS).

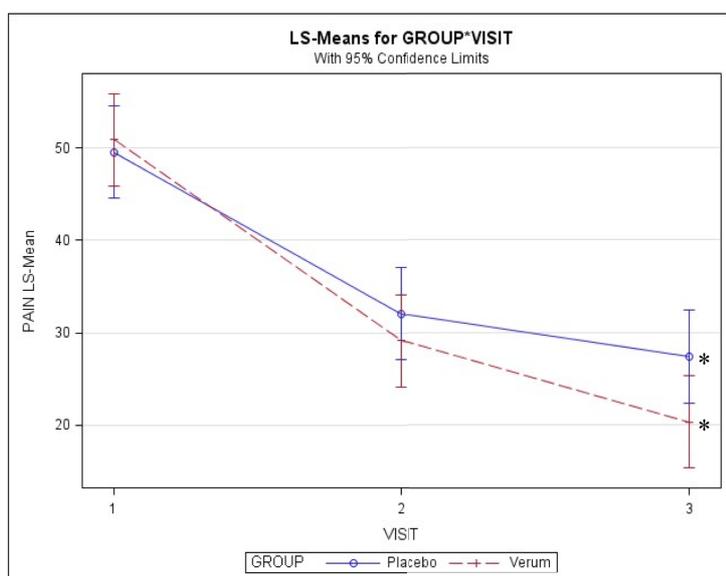
§ : Comprised of the sums of the 4 cardinal symptoms VAS scores calculated for each patient.

‡ : Assessed with Bristol Stool Form scale.

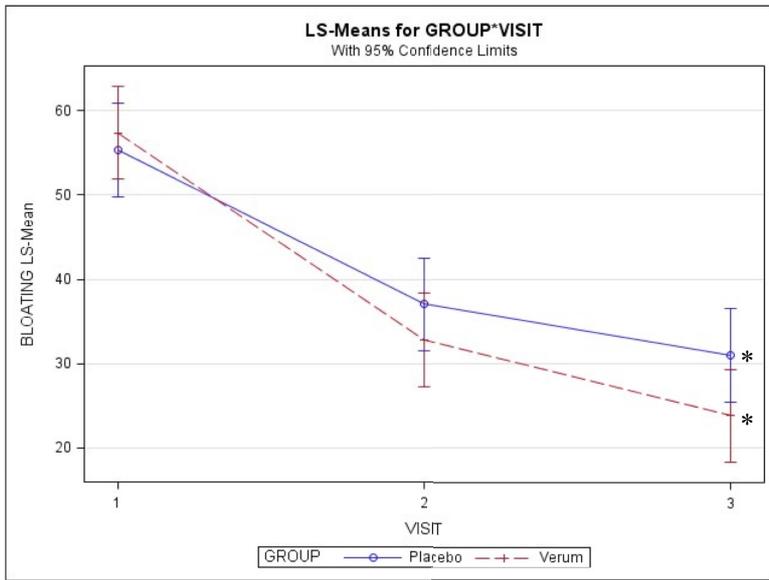
**Table 4. Stool characteristics at baseline, week 4 and week 8 of the study period (n = 80)**

	Baseline	Week 4	Change at week 4	P-value	Week 8	Change at week 8	P-value
<b>Placebo group</b>							
Stool frequency	7.9 ± 0.3	7.7 ± 0.3	-0.2 ± 0.3	0.99	6.2 ± 0.31	-1.6 ± 0.5	0.02*
Stool consistency‡	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1	- 0.1 ± 0.1	0.93	1.6 ± 0.14	-0.3 ± 0.20	0.71
<b>Probiotic group</b>							
Stool frequency	7.8 ± 0.3	7.5 ± 0.3	-0.2 ± 0.4	0.98	6.5 ± 0.3	-1.3 ± 0.5	0.15
Stool consistency‡	1.8 ± 0.1	1.6 ± 0.1	-0.2 ± 0.1	0.80	1.6 ± 0.1	-0.3 ± 0.2	0.71

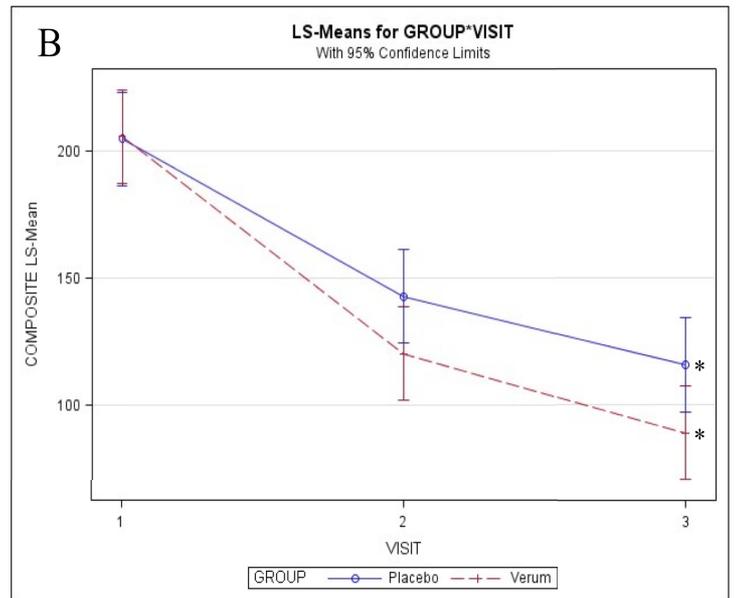
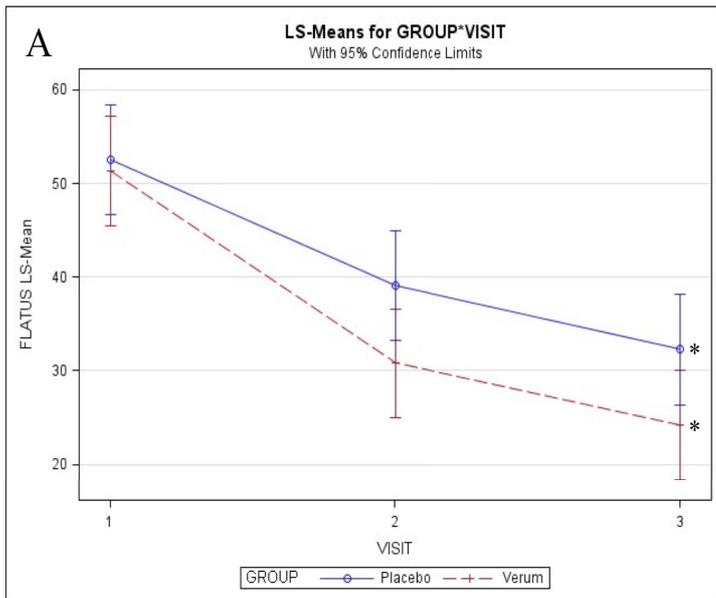
Stool characteristics and changes from baseline at week 4 and week 8 in each group are expressed as least-square means (LSmeans) ± SEM using a linear mixed model (\**P* < 0.05).. ‡ : Assessed with Bristol Stool Form scale.



**Figure 2. Evolution of abdominal pain scores in placebo and probiotic groups through the trial.** Changes of scores assessed with a 100-mm visual analogue scale (VAS; 0: none; 100: very severe) from baseline at week 4 (visit 2) and week 8 (visit 3) are expressed in each group as least-square means (LSmeans) ± 95% Confidence Limits (\**P* < 0.0001).



**Figure 3. Evolution of bloating scores in placebo and probiotic groups through the trial.** Changes of scores assessed with a 100-mm visual analogue scale (VAS; 0: none; 100: very severe) from baseline at week 4 (visit 2) and week 8 (visit 3) are expressed in each group as least-square means (LSmeans)  $\pm$  95% Confidence Limits (\* $P < 0.0001$ ).



**Figure 4. Evolution of flatus (A) and composite (B) scores in placebo and probiotic groups through the trial.** Changes of flatus scores assessed with a 100-mm visual analogue scale (VAS; 0: none; 100: very severe) and of composite score comprised of sums of the 4 cardinal symptoms VAS scores from baseline at week 4 (visit 2) and week 8 (visit 3) are expressed in each group as least-square means (LSmeans)  $\pm$  95% Confidence Limits (\* $P < 0.0001$ ).

## 5 DISCUSSION GENERALE

La légitimité de revendiquer une allégation santé en tant que probiotique pour une population cible donnée, tant au niveau scientifique que réglementaire, nécessite la réalisation d'essai clinique de haute qualité méthodologique selon un protocole adapté à la population étudiée pour apporter un niveau de preuve suffisant démontrant l'effet physiologique bénéfique souche-dépendant [386, 387, 400, 528-531, 533]. De nombreuses études chez l'homme ont démontré les bénéfices pour la santé des bactéries lactiques et du genre *Bifidobacterium*, de façon souche-dépendante, et en particulier dans les diarrhées infectieuses et celles dues aux traitements par des antibiotiques [390, 421]. Sur un plan davantage fonctionnel que thérapeutique, correspondant à l'effet physiologique introduit par la Directive 2002/46/CE, le bénéfice des bactéries lactiques sur l'intolérance au lactose a également été démontré [390, 421]. Or la nature de la population cible, en bonne santé générale ou atteinte d'une pathologie, est désormais un critère clé pour étudier les effets des probiotiques car la majorité des études publiées concernent des situations physiopathologiques ne rentrant pas dans le cadre réglementaire des aliments santé, dont font partie les compléments alimentaires soumis à une réglementation européenne désormais harmonisée [389]. En effet, au-delà des problématiques liées à la caractérisation des souches jugées insuffisantes par l'EFSA suite à la publication des avis négatifs systématiques relatifs aux demandes d'allégations concernant les souches probiotiques, la démonstration d'effets physiologiques sur des populations de sujets sains pourrait représenter un défi scientifique plus complexe à relever que la démonstration de leurs effets bénéfiques chez des patients, et en particulier ceux diagnostiqués pour des pathologies GI [390, 533, 538]. Pourtant, en raison de la similarité des perturbations GI des populations de patients avec des TFI avec celles pouvant être ressenties par la population dite « en bonne santé », l'EFSA indique dans les recommandations concernant les demandes d'allégations sur la santé intestinale et immunitaire que les données collectées auprès de patients diagnostiqués pour des TFI, dont la forme prédominante est le SII, pourraient être considérées comme étant recevables et transposables pour apporter la preuve d'un effet physiologique bénéfique au sein de la population générale [532]. En dépit d'un niveau de sévérité et une fréquence plus faible de ces perturbations rapportées dans cette population de sujets à priori sains, ceux-ci représentent en outre une part importante et croissante de consommateurs soucieux de leur santé par le biais de l'alimentation et en particulier des aliments santé tels que les compléments alimentaires. La possible coexistence ou confusion du diagnostic du SII avec une éventuelle intolérance au lactose incite donc à étudier l'effet des probiotiques présentant une balance bénéfice/risque très favorable auprès de cette population de patients diagnostiqués pour un syndrome fonctionnelle, certes non létale, mais chronique et associé à une importante comorbidité notamment psychiatrique. Le SII représente un enjeu de santé publique

affectant entre 10 et 15 % de la population générale mondiale, chiffres par ailleurs en cohérence avec les estimations restreintes aux pays membres de l'UE [32, 40, 41]. Due à la nature multifactorielle nécessitant une prise en charge multidimensionnelle du SII et des travaux précliniques et chez l'homme prouvant par ailleurs pour une très grande majorité d'entre eux leur totale innocuité, les probiotiques ont fait l'objet de nombreux travaux dans la prise en charge du SII avec une hétérogénéité importante tant sur les souches utilisées que dans la méthodologie employée limitant la pertinence des conclusions émises par les méta-analyses publiées à ce jour [432, 458, 459]. Un faible nombre d'ECR de haute qualité méthodologique a été mené pour démontrer l'efficacité des probiotiques dans la prise en charge des symptômes du SII et plus particulièrement au sein d'une population de patients caucasiens diagnostiqués pour ce TFI d'après les critères de Rome III [458, 459, 523, 541]. Ainsi, malgré le statut GRAS (*generally recognized as safe*) des bactéries lactiques délivré par la FDA, et en particulier celui des bactéries du genre *Lactobacillus* qui se base notamment sur un usage traditionnel dans la fermentation alimentaire, seulement 9 ECR ont été menés avec des souches de ce genre bactérien [419, 469, 471, 473, 476, 485-487, 534, 541]. Bien que ces essais cliniques précédents présentent un score Jadad  $\geq 3$  correspondant à une haute qualité méthodologique, seulement 4 d'entre eux ont inclus des patients avec un SII diagnostiqué selon les critères de Rome III et seulement 2 d'entre eux, utilisant pour l'un la souche *L. plantarum* 299v et pour l'autre l'association de deux souches *L. acidophilus* SDC-2012, 2013, ont démontré une amélioration significative de la douleur abdominale en tant que critère primaire [469, 471]. Ces travaux ont ainsi démontré une diminution significative de la sévérité ou de la fréquence de la douleur abdominale mais uniquement sur des patients asiatiques résidant en Asie [469, 471]. Or de récentes revues indiquent les implications génétiques et de l'environnement psychosocial dans le déclenchement du SII, en plus des facteurs alimentaires, soutenant la légitimité de travaux sur d'autres catégories de population tels que les patients caucasiens européens [539, 540]. De plus, alors que *L. acidophilus* est une des espèces prédominantes au sein de l'industrie alimentaire et de l'aliment santé, seuls 2 essais ont été menés avec des souches probiotiques de cette espèce chez des patients avec un SII [428, 469, 541]. Tout d'abord, et bien que davantage de travaux seraient nécessaires pour confirmer ces résultats, l'étude pilote ( $n=40$ ) et monocentrique publiée par Sinn et al. (2008) montre qu'une supplémentation à la dose de  $2.10^9$  UFC/jour de *L. acidophilus* SDC-2012, 2013 pendant 4 semaine réduit de façon significative la sévérité de la douleur abdominale comparée au placebo ( $P=0,003$ ) [469]. Récemment, une étude multicentrique de haute qualité méthodologique ( $n=391$ ) publiée par Lyra et al. (2016) évaluant la relation dose-effet de la souche *L. acidophilus* NCFM ( $1.10^9$  ou  $1.10^{10}$  UFC/jour) pendant 12 semaines n'a cependant pas montré d'amélioration significative du score de sévérité des symptômes du SII comparée au groupe placebo [541]. Néanmoins, une analyse *post-hoc* menée sur le sous-groupe ( $n=99$ ) des patients de l'étude présentant une intensité modérée à sévère de la douleur à l'inclusion (EVA $>35$ ) a montré un résultat

significatif dans la diminution de la sévérité de la douleur abdominale entre les groupes verum combinés et le groupe placebo ( $P=0,046$ ) [541]. Ces résultats modestes en comparaison aux résultats obtenus par l'utilisation des souches *L. acidophilus* SDC-2012, 2013 montrant une réduction de la douleur abdominale excédant de 20% celle du placebo, suggèrent l'effet additionnel de deux souches de la même espèce *L. acidophilus* sans effets opposés connus [469]. De plus, sur les 9 ECR précédemment menés avec le genre *Lactobacillus*, 2 d'entre eux n'ont pas évalué la prise de traitements médicamenteux administrés de façon concomitante durant la phase de supplémentation en probiotiques, et seuls 4 ont fait l'objet d'une étude multicentrique [454, 471, 473, 534, 541]. L'évaluation de la qualité des essais par le score Jadad ne mentionne pas l'utilisation de critères concernant le respect des Bonnes Pratiques Cliniques, telles que les procédures liées à la randomisation et l'allocation des produits testés. En conséquence, des biais méthodologiques restent potentiels conformément aux conclusions émises par la revue Cochrane publiée par Higgins et al. (2011) [475, 542].

Notre protocole de l'ECR LAPIBSS est multicentrique, en groupe parallèle, contrôlé par placebo, incluant des patients diagnostiqués pour un SII selon les critères de Rome III et destiné à fournir le score Jadad maximal de 5, excluant notamment à la sélection tout sujet ayant recours à une médication en lien avec la sévérité des symptômes du SII, en particulier les antalgiques et antispasmodiques. En effet, la douleur ou l'inconfort abdominal, est considéré comme le symptôme clé du SII quelque soit le sous-type de SII diagnostiqué et aurait pour origine une dysrégulation de la sensibilité viscérale entraînant une hypersensibilité intestinale [1, 283, 303, 543]. Cette dysrégulation de la sensibilité viscérale pourrait résulter d'une perturbation de l'axe CIM associée à une altération de la fonction neuro-immunitaire intestinale [271, 276]. Le rationnel d'utilisation des souches employées dans le protocole LAPIBSS s'appuie ainsi sur des données précliniques publiées démontrant un potentiel bénéfique souche-dépendant sur ces cibles physiopathologiques du SII [513, 520, 521]. Une des principales limitations du protocole pourrait consister en sa faible durée, de 8 semaines, qui au regard des critères de Rome III pourrait être de 3 mois ou de 6 mois [1]. Néanmoins, cette durée est double en comparaison à une majorité de travaux réalisés sur 4 semaines et la méta-analyse et revue systématique récente de Didari et al. (2015) conclut à une durée de 8 à 10 semaines pour montrer un effet bénéfique des probiotiques sur la sévérité du symptôme de douleur abdominale [458]. De plus, les essais d'une durée de 3 et 6 mois, et utilisant respectivement *L. acidophilus* NCFM et *L. reuteri* ATCC 55730, n'ont pas montré d'amélioration significative des symptômes du SII [534, 541]. L'ECR publié par Niv et al. (2005) investiguant les effets de la souche *L. reuteri* ATCC 55730 n'a pas montré de différence significative comparée au placebo notamment en raison d'un nombre importants de sorties prématurées et potentiellement d'une mauvaise observance sur une telle période [534]. En plus de l'effet souche-dépendant, une attention

particulière a également été apportée à la dose journalière de souches apportées conformément à de précédents travaux ayant montré leur bénéfice dans l'intolérance au lactose ou suggéré un effet bénéfique d'après des travaux pilotes chez l'homme [535, 536]. Ces travaux sont des éléments supplémentaires garantissant a priori leur innocuité et légitimant leur emploi en recherche clinique. Enfin, dans la mesure où les facteurs alimentaires et psychologiques sont impliqués dans la physiopathologie du SII, le protocole LAPIBSS stipule notamment que tout patient suivant un régime alimentaire spécifique ou sous traitement par antidépresseurs ou antipsychotiques ne doit pas être inclus dans l'étude [6, 287, 350]. Tenant compte des facteurs alimentaires, une durée longue d'étude pourrait également constituer un biais dû au changement de saison s'accompagnant d'un changement d'alimentation en dehors de tout régime alimentaire spécifique.

Les résultats de l'ECR LAPIBSS réalisé en France montrent une diminution statistiquement et cliniquement significative de la sévérité de la douleur abdominale, retenue comme critère primaire d'évaluation, ainsi que sur les autres symptômes du SII incluant ballonnement, flatulence, borborygmes dans le groupe verum et placebo. Bien que la diminution a été plus importante dans le groupe verum, l'analyse inter-groupe et temps par temps, à 4 et 8 semaines, n'a cependant pas permis de montrer une différence significative dans l'évolution du score de sévérité de ces symptômes. Néanmoins, et bien que modeste, l'effet global du traitement était significatif ( $P=0,04$ ) sur le score de flatulence et a montré une tendance positive marginalement significative ( $P=0,07$ ) sur le score composite du SII. Par ailleurs, aucun effet du traitement n'a été observé sur l'évolution du transit intestinal évaluée par la fréquence et la consistance des selles. Il est important de noter que l'étude, bénéficiant d'une excellente observance des patients au protocole et aux produits administrés, a également confirmé l'innocuité des souches probiotiques de l'espèce *L. acidophilus*, et de façon plus générale le statut GRAS dont bénéficient les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* [419]. En accord avec les dernières recommandations cliniques SII de la FDA (2006) définissant les répondeurs sur le critère de douleur abdominale comme étant ceux présentant une diminution d'au moins 50 % de la sévérité, le taux de réponse placebo dans la présente étude était de 53,8 % [544]. En utilisant ce même seuil de réponse, le taux de réponse placebo pour le score composite était de 36%, résultat cohérent avec celui de la méta-analyse publiée par Ford et al. (2010) estimant ce taux à 37,2 % [545]. Plusieurs facteurs contribuent à l'effet placebo substantiel et inévitable associé aux TFI, tels que le conditionnement Pavlovien ou la perspective d'une amélioration des symptômes [546, 547]. En particulier pour le SII, l'effet significatif du placebo résulterait de la nature subjective des critères d'évaluation utilisés en l'absence d'un biomarqueur établi permettant la corrélation entre la sévérité des symptômes dans la population générale de patients, correspondant à la population incluse dans l'étude LAPIBSS [548]. Par ailleurs, l'hypothèse d'un effet additionnel des souches n'a pas été mise en évidence dans cet essai posant la

question d'une dose potentiellement insuffisante, en particulier pour la souche *L. acidophilus* NCFM, ou d'une éventuelle compétition négative nuisible à leur activité métabolique respective. Des travaux précliniques ont démontré la capacité souche-dépendante de *L. acidophilus* NCFM à induire l'expression du récepteur opioïde  $\mu$  (MOR), dont le rôle physiologique dans la nociception, la motilité et la sécrétion intestinale est bien établie, ainsi que du récepteur cannabinoïde de type 2 (CB2) [513, 549]. De plus, il a précédemment été démontré que la douleur viscérale résulterait de l'activation périphérique de fibres afférentes par des substances algésiques libérées dans l'intestin et que l'activation de CB2 serait impliquée dans la régulation à la baisse de la libération de bradykinine [550]. De récents travaux cliniques ont montré que le mélange en proportion équivalente des souches *L. acidophilus* NCFM et *Bifidobacterium lactis* Bi-07 (*B. lactis* Bi-07) à la dose de  $2.10^{11}$  UFC/jour a diminué de façon significative la fréquence de ballonnement et de douleur abdominale respectivement chez des patients diagnostiqués pour des TFI ou des douleurs abdominales après coloscopie [551, 552]. De plus, l'étude de Ringel-Kulka et al. (2014) a montré que la consommation de la souche *L. acidophilus* NCFM seule à la dose journalière de  $2.10^{10}$  UFC durant 3 semaines est capable d'induire l'expression de MOR chez des patients diagnostiqués pour des douleurs abdominales fonctionnelles [553]. Cependant cet effet physiologique, s'accompagnant également d'une diminution inattendue de l'expression de CB2, n'est pas observé lorsque la souche *L. acidophilus* NCFM est combinée avec *B. lactis* Bi-07 selon un ratio de 1:1 à une dose journalière de  $1.10^{10}$  UFC alors que les observations cliniques n'ont pas montré de différence inter-groupe significative [553]. Cette étude physiologique démontre en outre que le bénéfice des probiotiques à diminuer l'hypersensibilité viscérale ne se limiterait pas à l'induction de MOR et que les mécanismes régulant l'expression de CB2 restent mal compris [553]. Néanmoins, une comparaison plus appropriée des résultats de l'étude LAPIBSS avec ceux de l'étude dose-réponse de Lyra et al. (2016) menée sur des patients avec un SII pourrait amener à spéculer qu'une durée d'étude de 12 semaines aurait permis une atténuation de l'effet placebo et une accentuation de l'effet des probiotiques sur la douleur abdominale à la dose de  $5.10^9$  UFC/jour pour chacune des deux souches employées dans la présente étude [541]. L'hypersensibilité viscérale serait également impliquée dans la physiopathologie du ballonnement décrit récemment comme le motif de plainte prédominant pour les patients diagnostiqués pour un SII [554, 555]. Cependant, chez 50 % d'entre eux, le ballonnement est associé à une distension abdominale impliquant d'autres mécanismes comme une réutilisation *in situ* altérée des gaz intestinaux ou une coordination abdomino-phrénique anormale [554, 556]. De ce fait, l'évaluation de la douleur ou inconfort abdominal comme critère primaire est d'une part cohérent avec le rationnel préclinique des souches employées et n'a pas nécessité d'autre part de distinguer à l'inclusion les sous-types du SII, un sous-groupe symptomatique ou un seuil minimal de sévérité des symptômes à l'inclusion. Ainsi, l'étude LAPIBSS a été menée sur la population générale du SII permettant de transposer les données à la population de sujets sains

pouvant présenter ce même signe de douleur ou d'inconfort abdominal avec une intensité plus modérée [532]. Cependant, l'hétérogénéité de la population de patients incluse pourrait contribuer à la variabilité importante de la sévérité des symptômes et de la réponse aux traitements observée dans la présente étude. Néanmoins, l'effet global du traitement sur le score de flatulence était statistiquement significatif entre les groupes et pourrait résulter de la capacité homofermentive et espèce-dépendante des bactéries de l'espèce *L. acidophilus* capable de synthétiser de façon majoritaire de l'acide lactique sans production de gaz et capable de s'opposer à l'augmentation des bactéries à Gram<sup>-</sup>, notamment celles productrices de gaz telles que les bactéries du genre *Enterobacteriaceae* dont la proportion pourrait être augmentée dans le microbiote des patients diagnostiqués pour un SII [244, 271, 557, 558]. Cependant, le régime alimentaire, et en particulier la consommation de FODMAP, est impliqué dans la production excessive de gaz contribuant à la sévérité des symptômes du SII ainsi que dans la variabilité importante de la résilience intestinale des souches de l'espèce *L. acidophilus* [228, 289, 557]. La modification potentielle du microbiote autochtone par l'administration de souches probiotiques allochtones n'est pas retenue par l'EFSA comme un critère établissant la preuve de leur efficacité à exercer un bénéfice physiologique [400]. De plus, les études sur le microbiote humain reste un champ d'investigation difficile avec des résultats conflictuels dûs à la complexité du microbiote ou «microbiome» lui-même et potentiellement à l'hétérogénéité des méthodes d'analyse utilisées durant la dernière décennie [559-561]. Enfin, l'absence d'effet significatif des probiotiques sur les caractéristiques des selles est cohérent avec les résultats des essais précédemment menés avec des souches probiotiques sur une population générale de patients avec un SII et confirme que les symptômes liés au transit intestinal devraient faire l'objet de travaux dédiés à un sous-type de patients en tenant compte de la stabilité à court terme observée pour chaque sous-type [457, 458, 523, 562, 563]. Néanmoins, la portée de ces résultats est limitée par le nombre important de données manquantes du carnet patient destiné à collecter la fréquence et la consistance quotidienne des selles. Ce manque d'observance prévisible pour ce type d'auto-questionnaire peut s'expliquer par la pénibilité pour les patients de noter ces informations quotidiennement sur une durée de 8 semaines mais une évaluation rétrospective peut également être vulnérable à l'oubli et à des biais cognitifs [564]. L'utilisation d'une application mobile récemment développée et spécifique du SII pourrait permettre d'améliorer l'observance quotidienne des patients à ce type d'auto-questionnaire [565].

## 6 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, l'essai LAPIBSS de haute qualité méthodologique investiguant l'efficacité d'un mélange mono-espèce *Lactobacillus acidophilus* durant 8 semaines et à la dose de  $1.10^{10}$  de UFC/jour a permis de mettre en évidence un effet significatif sur la sévérité des flatulences et une tendance positive à améliorer la sévérité globale des symptômes du SII, et ceci avec une excellente sécurité d'emploi. Un effet placebo significatif inhérent au SII associé à une hétérogénéité importante de la sévérité des symptômes et de la réponse aux traitements pourrait expliquer l'absence de significativité observée en particulier sur les symptômes de douleur abdominale et ballonnement qui résulteraient d'une hypersensibilité viscérale [303, 543, 554]. Les bactéries de l'espèce *Lactobacillus acidophilus* présente un degré significatif d'auxotrophie comme le démontre notamment le séquençage complet de la souche *Lactobacillus acidophilus* NCFM [566, 567]. Dans le but d'améliorer leur efficacité clinique, cette faible résilience pourrait être compensée par l'utilisation de prébiotiques appropriés pour cette espèce bactérienne, tels que le lactitol qui est particulièrement adapté à la souche *Lactobacillus acidophilus* NCFM et dont la microencapsulation par des protéines de lactosérum a récemment démontré une amélioration de sa survie dans le tractus intestinal [568-570]. En tenant compte de la nature multifactorielle de la physiopathologie du SII qui résulterait d'une perturbation de l'axe cerveau-intestin-microbiote et en l'absence d'une approche thérapeutique établie, d'autres cibles d'actions des probiotiques pourraient compléter le rationnel de leur utilisation afin de diminuer l'hypersensibilité viscérale incluant notamment la régulation de la libération de substances algésiques entériques ou celle de l'expression de récepteurs cérébraux aux neurotransmetteurs [252, 303, 571, 572]. La sensibilité viscérale pourrait en effet être régulée au niveau périphérique, spinal et central légitimant de part la nature bidirectionnelle de l'axe cerveau-intestin une évaluation concomitante de la sévérité de la douleur abdominale et du niveau d'anxiété et de dépression [252, 573-575]. En outre, l'utilisation conjointe d'un auto-questionnaire des symptômes gastro-intestinaux liés à la prise alimentaire et spécifique du SII permettrait d'étudier avec davantage de précision l'effet potentiel des probiotiques sur la diminution de la sévérité des symptômes [576]. L'implication majeure de l'axe cerveau-intestin dans la physiopathologie du SII pourrait expliquer l'effet placebo significatif couramment observé et l'influence du polymorphisme COMT val<sup>158</sup>met pourrait constituer un biomarqueur identifiant les répondeurs potentiels au placebo pour ce TFI [577]. En l'absence d'un biomarqueur de référence pour le diagnostic du SII, les critères de Rome ont été révisés récemment avec Rome IV dans le but d'améliorer la sensibilité et la spécificité de son diagnostic [29, 578]. Enfin, une meilleure compréhension des effets physiologiques des probiotiques chez l'homme permettrait d'améliorer le rationnel préalable à leur utilisation en recherche clinique.

## 7 REFERENCES

1. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology*. 2006 Apr;130(5):1480-91.
2. Khan S, Chang L. Diagnosis and management of IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010 Oct;7(10):565-81. doi: 10.1038/nrgastro.2010.137.
3. Manning, A. P., Thompson, W. G., Heaton, K. W. & Morris, A. F. Towards positive diagnosis of the irritable bowel. *Br. Med. J.* 2, 653–654 (1978).
4. Kruis, W. et al. A diagnostic score for the irritable bowel syndrome. Its value in the exclusion of organic disease. *Gastroenterology* 87, 1–7 (1984).
5. Brandt, L.J., Bjorkman, D., Fennerty, M.B., Locke, G.R., Olden, K., Peterson, W. et al. (2002) Systematic review on the management of irritable bowel syndrome in North America. *Am J Gastroenterol* 97: S7–S26.
6. Brandt LJ, Chey WD, Foxx-Orenstein AE, et al; American College of Gastroenterology Task Force on Irritable Bowel Syndrome. An evidence-based position statement on the management of irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2009;104(Suppl 1):S1–S35
7. Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol*. 1997 Sep;32(9):920-4.
8. Spiegel, B. M. et al. Clinical determinants of health-related quality of life in patients with irritable bowel syndrome. *Arch. Intern. Med.* 164, 1773–1780 (2004).
9. Spiegel, B. et al. Developing valid and reliable health utilities in irritable bowel syndrome: results from the IBS PROOF Cohort. *Am. J. Gastroenterol.* 104, 1984–1991 (2009).
10. Drossman, D. A. et al. Further validation of the IBS-QOL: a disease-specific quality-of-life questionnaire. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 999–1007 (2000).
11. Park, M. I. & Camilleri, M. Is there a role of food allergy in irritable bowel syndrome and functional dyspepsia? A systematic review. *Neurogastroenterol. Motil.* 18, 595–607 (2006).
12. Simren, M. et al. Food-related gastrointestinal symptoms in the irritable bowel syndrome. *Digestion* 63, 108–115 (2001).
13. Clouse, R. E. et al. Functional abdominal pain syndrome. *Gastroenterology* 130, 1492–1497 (2006).
14. Whitehead, W. E., Palsson, O. & Jones, K. R. Systematic review of the comorbidity of irritable bowel syndrome with other disorders: what are the causes and implications? *Gastroenterology* 122, 1140–1156 (2002).

15. Lydiard, R. B. Irritable bowel syndrome, anxiety, and depression: what are the links? *J. Clin. Psychiatry* 62 (Suppl. 8), 38–45 (2001).
16. Sperber, A. D. et al. Fibromyalgia in the irritable bowel syndrome: studies of prevalence and clinical implications. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 3541–3546 (1999).
17. Longstreth, G. F. & Yao, J. F. Irritable bowel syndrome and surgery: a multivariable analysis. *Gastroenterology* 126, 1665–1673 (2004).
18. Heitkemper, M. M. et al. Symptoms across the menstrual cycle in women with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 98, 420–430 (2003).
19. Lacy BE, Weiser K, De Lee R. The Treatment of Irritable Bowel Syndrome. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 2009;2(4):221-238. doi:10.1177/1756283X09104794.
20. Hammer, J., Eslick, G. D., Howell, S. C., Altiparmak, E. & Talley, N. J. Diagnostic yield of alarm features in irritable bowel syndrome and functional dyspepsia. *Gut* 53, 666–672 (2004).
21. Ford, A. C. et al. Diagnostic utility of alarm features for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Gut* 57, 1545–1553 (2008).
22. Fasano, A. et al. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch. Intern. Med.* 163, 286–292 (2003).
23. Podolsky, D. K. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 347, 417–429 (2002).
24. Winawer, S. et al. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale—Update based on new evidence. *Gastroenterology* 124, 544–560 (2003).
25. Whitehead WE, Drossman DA. Validation of symptom-based diagnostic criteria for irritable bowel syndrome: a critical review. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(4):814–820; quiz 813, 821.
26. Spiegel, B. M., Farid, M., Esrailian, E., Talley, J. & Chang, L. Is irritable bowel syndrome a diagnosis of exclusion?: a survey of primary care providers, gastroenterologists, and IBS experts. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 848–858 (2010).
27. Ford, A. C. et al. Yield of diagnostic tests for celiac disease in individuals with symptoms suggestive of irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Arch. Intern. Med.* 169, 651–658 (2009).
28. Spiller, R. et al. Guidelines on the irritable bowel syndrome: mechanisms and practical management. *Gut* 56, 1770–1798 (2007).
29. Kim JH, Lin E, Pimentel M. Biomarkers of Irritable Bowel Syndrome. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. 2017;23(1):20-26. doi:10.5056/jnm16135.

30. Spiegel BM, Farid M, Esrailian E, Talley J, Chang L. Is irritable bowel syndrome a diagnosis of exclusion? A survey of primary care providers, gastroenterologists, and IBS experts. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(4): 848–858.
31. Ford AC, Talley NJ. Irritable bowel syndrome. *BMJ*. 2012;345: e5836.
32. Canavan C, West J, Card T. The epidemiology of irritable bowel syndrome. *Clinical Epidemiology*. 2014;6:71-80. doi:10.2147/CLEP.S40245.
33. Thompson WG, Heaton KW, Smyth GT, Smyth C. Irritable bowel syndrome in general practice: prevalence, characteristics, and referral. *Gut*. 2000;46(1):78–82.
34. Hungin AP, Chang L, Locke GR, Dennis EH, Barghout V. Irritable bowel syndrome in the United States: prevalence, symptom patterns and impact. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;21(11):1365–1375.
35. Chang SY, Jones MP. Consulters and nonconsulters in irritable bowel syndrome: what makes an IBS patient? *Pract Gastroenterol*. 2003;6:15–26.
36. Talley NJ, Weaver A, Zinsmeister AR, Melton LJ 3rd. Onset and disappearance of gastrointestinal symptoms and functional gastrointestinal disorders. *Am J Epidemiol*. 1992;136(2):165–177.
37. Agreus L, Svärdsudd K, Nyrén O, Tibblin G. Irritable bowel syndrome and dyspepsia in the general population: overlap and lack of stability over time. *Gastroenterology*. 1995;109(3):671–680.
38. García Rodríguez LA, Ruigómez A, Wallander MA, Johansson S, Olbe L. Detection of colorectal tumor and inflammatory bowel disease during follow-up of patients with initial diagnosis of irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol*. 2000;35(3):306–311.
39. Locke GR 3rd, Yawn BP, Wollan PC, Melton LJ 3rd, Lydick E, Talley NJ. Incidence of a clinical diagnosis of the irritable bowel syndrome in a United States population. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004; 19(9):1025–1031.
40. Lovell RM, Ford AC. Global prevalence of and risk factors for irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(7):712–721. e4.
41. Hungin AP, Whorwell PJ, Tack J, Mearin F. The prevalence, patterns and impact of irritable bowel syndrome: an international survey of 40,000 subjects. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;17(5):643–650.
42. Koloski NA, Talley NJ, Huskic SS, Boyce PM. Predictors of conventional and alternative health care seeking for irritable bowel syndrome and functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;17(6): 841–851.
43. Heaton KW, O'Donnell LJ, Braddon FE, Mountford RA, Hughes AO, Cripps PJ. Symptoms of irritable bowel syndrome in a British urban community: consulters and nonconsulters. *Gastroenterology*. 1992; 102(6):1962–1967.

44. Icks A, Haastert B, Enck P, Rathmann W, Giani G. Prevalence of functional bowel disorders and related health care seeking: a population-based study. *Z Gastroenterol.* 2002;40(3):177–183.
45. Wilson S, Roberts L, Roalfe A, Bridge P, Singh S. Prevalence of irritable bowel syndrome: a community survey. *Br J Gen Pract.* 2004;54(504): 495–502.
46. Drossman DA, Li Z, Andruzzi E, et al. US householder survey of functional gastrointestinal disorders. Prevalence, sociodemography, and health impact. *Dig Dis Sci.* 1993;38(9):1569–1580.
47. Camilleri M, Choi MG. Review article: irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:3–15.
48. Creed F. Functional Disorders of the Gut: A Handbook for Clinicians. Phillips SF, Wingate DL, editors. WB Saunders: London; 1998, pp. 71-97. 2.
49. Lydiard, R. B. Irritable bowel syndrome, anxiety, and depression: what are the links? *J. Clin. Psychiatry* 2001;62(suppl 8);38-45. 3.
50. Creed F. Who needs a doctor for IBS? *Gut.* 1997;41(3):415–416.
51. Lee V, Guthrie E, Robinson A, et al. Functional bowel disorders in primary care: factors associated with health-related quality of life and doctor consultation. *J Psychosom Res.* 2008;64(2):129–138.
52. Kennedy TM, Jones RH, Hungin AP, O’flanagan H, Kelly P. Irritable bowel syndrome, gastro-oesophageal reflux, and bronchial hyper-responsiveness in the general population. *Gut.* 1998;43(6):770–774.
53. Drossman DA, Funch-Jensen P, Janssens J. Identification of subgroups of functional bowel disorders. *Gastroenterol Int.* 1990;(3):159–172.
54. Lovell RM, Ford AC. Effect of gender on prevalence of irritable bowel syndrome in the community: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(7):991–1000.
55. Rasquin A, Di Lorenzo C, Forbes D, et al. Childhood functional gastrointestinal disorders: child/adolescent. *Gastroenterology.* 2006;130(5):1527–1537.
56. Tang YR, Yang WW, Liang ML, Xu XY, Wang MF, Lin L. Age-related symptom and life quality changes in women with irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol.* 2012;18(48):7175–7183.
57. Maxwell PR, Mendall MA, Kumar D. Irritable bowel syndrome. *Lancet.* 1997;350(9092):1691–1695.
58. Marmot M, Allen J, Bell R, Bloomer E, Goldblatt P; Consortium for the European Review of Social Determinants of Health and the Health Divide. WHO European review of social determinants of health and the health divide. *Lancet.* 2012;380(9846):1011–1029.

59. Andrews, E. B. et al. Prevalence and demographics of irritable bowel syndrome: results from a large web-based survey. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22, 935–942 (2005).
60. Mendall MA, Kumar D. Antibiotic use, childhood affluence and irritable bowel syndrome (IBS). *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1998;10(1): 59–62.
61. Howell S, Talley NJ, Quine S, Poulton R. The irritable bowel syndrome has origins in the childhood socioeconomic environment. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(8):1572–1578.
62. Grodzinsky E, Hallert C, Faresjö T, Bergfors E, Faresjö AO. Could gastrointestinal disorders differ in two close but divergent social environments? *Int J Health Geogr.* 2012;11:5.
63. Gwee KA. Irritable bowel syndrome in developing countries: a disorder of civilization or colonization? *Neurogastroenterol Motil.* 2005;17(3):317–324.
64. Cremonini F, Talley NJ. Irritable bowel syndrome: epidemiology, natural history, health care seeking and emerging risk factors. *Gastroenterol Clin North Am.* 2005;34(2):189–204.
65. Talley NJ, Phillips SF, Bruce B, Twomey CK, Zinsmeister AR, Melton LJ. Relation among personality and symptoms in nonulcer dyspepsia and the irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 1990;99(2):327–333.
66. Locke GR 3rd, Zinsmeister AR, Talley NJ, Fett SL, Melton LJ 3rd. Familial association in adults with functional gastrointestinal disorders. *Mayo Clin Proc.* 2000;75(9):907–912.
67. Levy RL, Jones KR, Whitehead WE, Feld SI, Talley NJ, Corey LA. Irritable bowel syndrome in twins: heredity and social learning both contribute to etiology. *Gastroenterology.* 2001;121(4):799–804.
68. Morris-Yates A, Talley NJ, Boyce PM, Nandurkar S, Andrews G. Evidence of a genetic contribution to functional bowel disorder. *Am J Gastroenterol.* 1998;93(8):1311–1317.
69. Mohammed I, Cherkas LF, Riley SA, Spector TD, Trudgill NJ. Genetic influences in irritable bowel syndrome: a twin study. *Am J Gastroenterol.* 2005;100(6):1340–1344.
70. Hopper JL, Bishop DT, Easton DF. Population-based family studies in genetic epidemiology. *Lancet.* 2005;366(9494):1397–1406.
71. El-Serag, H. B., Olden, K. & Bjorkman, D. Healthrelated quality of life among persons with irritable bowel syndrome: a systematic review. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16, 1171–1185 (2002).
72. Gralnek, I. M., Hays, R. D., Kilbourne, A., Naliboff, B. & Mayer, E. A. The impact of irritable bowel syndrome on health-related quality of life. *Gastroenterology* 119, 654–660 (2000).

73. Patrick, D. L., Drossman, D. A., Frederick, I. O., DiCesare, J. & Puder, K. L. Quality of life in persons with irritable bowel syndrome: development and validation of a new measure. *Dig. Dis. Sci.* 43, 400–411 (1998).
74. Pare, P. et al. Health-related quality of life, work productivity, and health care resource utilization of subjects with irritable bowel syndrome: baseline results from LOGIC (Longitudinal Outcomes Study of Gastrointestinal Symptoms in Canada), a naturalistic study. *Clin. Ther.* 28, 1726–1735 (2006).
75. Spiegel, B. M. et al. Clinical determinants of health-related quality of life in patients with irritable bowel syndrome. *Arch. Intern. Med.* 164, 1773–1780 (2004).
76. Naliboff, B. D., Balice, G. & Mayer, E. A. Psychosocial moderators of quality of life in irritable bowel syndrome. *Eur. J. Surg. Suppl.* 57–59 (1998).
77. Koloski, N. A., Talley, N. J. & Boyce, P. M. Predictors of health care seeking for irritable bowel syndrome and nonulcer dyspepsia: a critical review of the literature on symptom and psychosocial factors. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 1340–1349 (2001).
78. Creed, F. The relationship between psychosocial parameters and outcome in irritable bowel syndrome. *Am. J. Med.* 107, 74S–80S (1999).
79. Spiegel, B., Strickland, A., Naliboff, B. D., Mayer, E. A. & Chang, L. Predictors of patient-assessed illness severity in irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 2536–2543 (2008).
80. Wilson A, Longstreth G, Knight K, et al. Quality of life in managed care patients with irritable bowel syndrome. *Manag Care Interface* 2004; 17: 24–8.
81. Levy RL, Von Korff M, Whitehead WE, et al. Costs of care for irritable bowel syndrome patients in a health maintenance organization. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(11):3122-29.
82. Sandler, R. S. et al. The burden of selected digestive diseases in the United States. *Gastroenterology* 122, 1500–1511 (2002).
83. Leong SA, Barghout V, Birnbaum HG, et al. The economic consequences of irritable bowel syndrome: a US employer perspective. *Arch Intern Med.* 2003;163(8):929-35.
84. Longstreth GF, Wilson A, Knight K, et al: Irritable bowel syndrome, health care, and costs: a U.S. managed care perspective. *Am J Gastroenterol.* 2003, 98: 600-607.
85. Masion-Bergemann, S., Thielecke, F., Abel, F. & Bergemann, R. Costs of irritable bowel syndrome in the UK and US. *Pharmacoeconomics* 24, 21–37 (2006).
86. Drossman DA, Li Z, Andruzzi E, et al. US House-holder survey of functional gastrointestinal disorders: prevalence, sociodemography and health impact. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 1569–80.

87. Sethi S, Wadhwa V, LeClair J, et al. In-patient discharge rates for the irritable bowel syndrome – an analysis of national trends in the United States from 1997 to 2010. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2013;38:1338–46.
88. Mitra D, Davis KL, Baran RW. All-cause health care charges among managed care patients with constipation and comorbid irritable bowel syndrome. *Postgrad Med.* 2011;123(3):122–32.
89. Doshi JA, Cai Q, Buono JL, Spalding WM, Sarocco P, Tan H, Stephenson JJ, Carson RT. Economic burden of irritable bowel syndrome with constipation: a retrospective analysis of health care costs in a commercially insured population. *Health care costs : J Manag Care Spec Pharm.* 2014 Apr;20(4):382-90.
90. Fortea J, Prior M. Irritable bowel syndrome with constipation: a European focused systematic literature review of disease burden. *Journal of Medical Economics* 2013;16:329–41.
91. Longstreth, G. F. et al. Irritable bowel syndrome, health care use, and costs: a US managed care perspective. *Am. J. Gastroenterol.* 98, 600–607 (2003).
92. Spiegel, B. M., Kanwal, F., Naliboff, B. & Mayer, E. The impact of somatization on the use of gastrointestinal health-care resources in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 100, 2262–2273 (2005).
93. Longstreth, G. F. & Yao, J. F. Irritable bowel syndrome and surgery: a multivariable analysis. *Gastroenterology* 126, 1665–1673 (2004).
94. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010; 90: 859-904 [PMID: 20664075 DOI: 10.1152/physrev.00042.2009].
95. Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G. Irritable bowel syndrome: a microbiome-gut-brain axis disorder? *World J Gastroenterol* 2014; 20: 14105-14125 [PMID: 25339800].
96. Ferreira CM, Vieira AT, Vinolo MA, Oliveira FA, Curi R, Martins Fdos S. The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *J Immunol Res* 2014; 2014: 689492 [PMID: 25309932].
97. Karlsson F, Tremaroli V, Nielsen J, Bäckhed F. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes* 2013; 62: 3341-3349 [PMID: 24065795 DOI: 10.2337/db13-0844].
98. Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, Chawes BL, Skov T, Paludan- Müller G, Stokholm J, Smith B, Krogfelt KA. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 646-652.e1-5 [PMID: 21782228 DOI:10.1016/j.jaci.2011.04.060].

99. Finegold SM, Attebery HR, Sutter VL. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. *Am J Clin Nutr.* 1974 Dec;27(12):1456-69.
100. Moore WEC, Holdeman LV. Human Fecal Flora: The Normal Flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Applied Microbiology.* 1974;27(5):961-979.
101. Holdeman LV, Good IJ, Moore WE. Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl Environ Microbiol.* 1976 Mar;31(3):359-75.
102. Moore WE, Cato EP, Holdeman LV. Some current concepts in intestinal bacteriology. *Am J Clin Nutr.* 1978 Oct;31(10 Suppl):S33-42.
103. Good IJ. The Population Frequencies of Species and the Estimation of Population Parameters. *Biometrika*, Vol. 40, No. 3/4. (Dec., 1953), pp. 237-264.
104. Wilson KH, Blichington RB. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(7):2273-2278.
105. Zoetendal EG, Akkermans ADL, De Vos WM. Temperature Gradient Gel Electrophoresis Analysis of 16S rRNA from Human Fecal Samples Reveals Stable and Host-Specific Communities of Active Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(10):3854-3859.
106. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut.* 2003;52(2):237-242.
107. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Takada T, Tanaka R. Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Human Feces. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(12):7220-7228.
108. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Doré J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Nov;65(11):4799-807.
109. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308:1635-1638.
110. Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA, Parfrey LW, Clemente JC, Gevers D, Knight R. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet.* 2011 Dec 16;13(1):47-58. doi: 10.1038/nrg3129.
111. Van den Bogert B, De Vos WM, Zoetendal EG, Kleerebezem M. Microarray analysis and barcoded pyrosequencing provide consistent microbial profiles depending on the source of human intestinal samples. *Appl Environ Microbiol.* 2011 ;77(6):2071–2080.
112. Zoetendal EG, Rajilic'-Stojanovic' M, De Vos WM. Highthroughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut.* 2008; 57(11):1605–1615

113. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug 7;21(29):8787-803. doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8787.
114. Peterson DA, Frank DN, Pace NR, Gordon JI. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe* 2008; 3: 417-427 [PMID: 18541218 DOI: 10.1016/j.chom.2008.05.001].
115. Hamady M, Walker JJ, Harris JK, Gold NJ, Knight R. Error correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nat Methods* 2008; 5: 235-237 [PMID:18264105 DOI: 10.1038/nmeth.1184]
116. Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A. et al. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* 2007; 14: 169–181.
117. Turnbaugh, P., Ridaura, V., Faith, J., Rey, F., Knight, R. and Gordon, J. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 2009; 1: 6ra14.
118. Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K., Manichanh, C. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464:59–65.
119. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, Bertoni A, Swerdlow HP, Gu Y. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 2012;13: 341
120. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 251364 [PMID: 22829749 DOI:10.1155/2012/251364]
121. Schirmer M, Ijaz UZ, D'Amore R, Hall N, Sloan WT, Quince C. Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: e37[PMID: 25586220 DOI: 10.1093/nar/gku1341]
122. Kim M, Yu Z. Variations in 16S rRNA-based microbiome profiling between pyrosequencing runs and between pyrosequencing facilities. *J Microbiol* 2014; 52: 355-365 [PMID: 24723104 DOI:10.1007/s12275-014-3443-3]
123. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006; 312: 1355-1359 [PMID: 16741115 DOI: 10.1126/science.1124234]
124. Ramakrishna B, Krishnan S. The normal bacterial flora of the human intestine and its regulation. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: S2-S6

125. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 13780-13785 [PMID:17699621]
126. Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473: 174–180.
127. Human Microbiome Project (HMP) Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012 486: 207–214.
128. Human Microbiome Project (HMP) Consortium. A framework for the human microbiome research. *Nature* 2012; 486: 215–221.
129. Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F. et al. (2012) A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490: 55–60.
130. Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J. et al. (2009) Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol* 11: 2574–2584.
131. Turnbaugh, P., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B., Duncan, A., Ley, R. et al. (2009a) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457: 480–484.
132. Claesson, M., O’Sullivan, O., Wang, Q., Nikkila, J., Marchesi, J., Smidt, H. et al. (2009) Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS One* 4: e6669.
133. Hamady, M. and Knight, R. (2009) Microbial community profiling for human microbiome projects: tools, techniques, and challenges. *Genome Res* 19: 1141–1152.
134. Wooley, J. and Ye, Y. (2009) Metagenomics: facts and artifacts, and computational challenges. *J Comput Sci Technol* 25: 71–81.
135. Turnbaugh, P., Quince, C., Faith, J., McHardy, A., Yatsunencko, T., Niazi, F. et al. Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 7503–7508.
136. Caporaso, J., Lauber, C., Costello, E., Berg-Lyons, D., Gonzalez, A., Stombaugh, J. et al. Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol* 2011; 12: R50.
137. Costello, E., Lauber, C., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. and Knight, R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 2009; 326: 1694–1697.
138. Jalanka-Tuovinen, J., Salonen, A., Nikkila, J., Immonen, O., Kekkonen, R., Lahti, L. et al. Intestinal microbiota in healthy adults: temporal analysis reveals individual and common core and relation to intestinal symptoms. *PLoS One* 2011; 6(7): e23035.
139. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(3):732-737. doi:10.1073/pnas.0506655103.

140. Tremaroli, V. and Backhed, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 2012; 489: 242–249.
141. O’Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006; 7: 688-693 [PMID: 16819463]
142. Pei Z, Bini EJ, Yang L, Zhou M, Francois F, Blaser MJ. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101: 4250-4255 [PMID: 15016918]
143. Justesen T, Nielsen OH, Jacobsen IE, Lave J, Rasmussen SN. The normal cultivable microflora in upper jejunal fluid in healthy adults. *Scand J Gastroenterol* 1984; 19: 279-282 [PMID: 6372075]
144. Blaser MJ. Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. *J Infect Dis* 1999; 179: 1523-1530 [PMID: 10228075]
145. Andersson AF, Lindberg M, Jakobsson H, Bäckhed F, Nyrén P, Engstrand L. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One* 2008; 3: e2836 [PMID:18665274 DOI: 10.1371/journal.pone.0002836]
146. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6578–6583.
147. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006; 124:837–848.
148. Ley, R., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C., Knight, R. and Gordon, J. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 11070–11075.
149. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006; 444: 1022-1023 [PMID: 17183309]
150. Jeffery, I., O’Toole, P., Ohman, L., Claesson, M., Deane, J., Quigley, E. et al. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut* 2012; 61: 997–1006.
151. Gillespie JJ, Wattam AR, Cammer SA, Gabbard JL, Shukla MP, Dalay O, Driscoll T, Hix D, Mane SP, Mao C, Nordberg EK, Scott M, Schulman JR, Snyder EE, Sullivan DE, Wang C, Warren A, Williams KP, Xue T, Yoo HS, Zhang C, Zhang Y, Will R, Kenyon RW, Sobral BW. PATRIC: the comprehensive bacterial bioinformatics resource with a focus on human pathogenic species. *Infect Immun* 2011; 79: 4286-4298 [PMID: 21896772 DOI: 10.1128/IAI.00207-11]
152. Hollister EB, Gao C, Versalovic J. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology* 2014; 146: 1449-1458 [PMID: 24486050 DOI: 10.1053/j.gastro.2014.01.052]
153. Jeffery, I., Claesson, M., O’Toole, P. and Shanahan, F. Categorization of the gut microbiota: enterotypes or gradients? *Nat Rev Microbiol* 2012; 10:591–592.

154. Wu, G., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y., Keilbaugh, S. et al. Linking long term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011; 334: 105–108.
155. Bäckhed F, Fraser CM, Ringel Y, Sanders ME, Sartor RB, Sherman PM, Versalovic J, Young V, Finlay BB. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host Microbe* 2012; 12: 611-622 [PMID: 23159051 DOI: 10.1016/j.chom.2012.10.012]
156. Lepage P, Seksik P, Sutren M, de la Cochetière MF, Jian R, Marteau P, Doré J. Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2005 May;11(5):473-80.
157. Claesson MJ, Cusack S, O’Sullivan O, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:4586–91.
158. Flint HJ, Scott KP, Louis P, et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:577–89.
159. Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;6:306-314.
160. Mayer EA, Savidge T, Shulman RJ. Brain-gut microbiome interactions and functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2014;146:1500-1512.
161. Macfarlane, G. T., and G. R. Gibson. 1996. Carbohydrate fermentation, energy transduction and gas metabolism in the human large intestine, p. 269–318. In R. I. Mackie and B. A. White (ed.), *Ecology and physiology of gastrointestinal microbes*, vol. 1. *Gastrointestinal fermentations and ecosystem*. Chapman & Hall, New York, N.Y.
162. Zoetendal EG, Raes J, van den Bogert B, et al. The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. *ISME J* 2012;6:1415–26.
163. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GD, Hirschfield GM, Hold G, Quraishi MN, Kinross J, Smidt H, Tuohy KM, Thomas LV, Zoetendal EG, Hart A. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 2016 Feb;65(2):330-9. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309990.
164. Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P, Forano E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes* 2012;3:289–306.
165. Macfarlane GT, Macfarlane S. Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. *J Clin Gastroenterol* 2011;45(Suppl):S120–7.
166. Arpaia N, Campbell C, Fan X, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 2013;504:451–5.
167. Ze X, Le Mougou F, Duncan SH, et al. Some are more equal than others: the role

- of “keystone” species in the degradation of recalcitrant substrates. *Gut Microbes* 2013;4:236–40.
168. Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 2003; 62: 67-72 [PMID: 12740060]
169. Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 2002 Dec; 17;217(2):133-9.
170. Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Lactate-Utilizing Bacteria, Isolated from Human Feces, That Produce Butyrate as a Major Fermentation Product. *Applied and Environmental Microbiology* 2004;70(10):5810-5817. doi:10.1128/AEM.70.10.5810-5817.2004.
171. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15718–15723, 2004.
172. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 291: 881–884, 2001.
173. Fukuya S, Arata M, Kawashima H, Yoshida D, Kaneko M, Minamida K, Watanabe J, Ogura Y, Uchida K, Itoh K, Wada M, Ito S, Yokota A. Conversion of cholic acid and chenodeoxycholic acid into their 7-oxo derivatives by *Bacteroides intestinalis* AM-1 isolated from human feces. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 293: 263-270 [PMID: 19243441 DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01531.x]
174. Oh DK, Hong GH, Lee Y, Min S, Sin HS, Cho SK. Production of conjugated linoleic acid by isolated *Bifidobacterium* strains. *World J Microbiol Biotechnol* 2003; 19: 907–912.
175. Ramakrishna BS. Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Dec;28 Suppl 4:9-17. doi: 10.1111/jgh.12294.
176. Battault S, Whiting SJ, Peltier SL, Sadrin S, Gerber G, Maixent JM. Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. *Eur J Nutr*. 2013 Mar;52(2):429-41. doi: 10.1007/s00394-012-0430-5. Epub 2012 Aug 12.
177. Liu W, Chen Y, Golan MA, Annunziata ML, Du J, Dougherty U, et al. Intestinal epithelial vitamin D receptor signaling inhibits experimental colitis. *J Clin Invest*. 2013;123(9):3983–96.
178. Cantorna MT, McDaniel K, Bora S, Chen J, James J. Vitamin D, immune regulation, the microbiota, and inflammatory bowel disease. *Exp Biol Med* (Maywood). 2014 Nov;239(11):1524-30. doi: 10.1177/1535370214523890. Epub 2014 Mar 25.
179. Del Pinto R, Pietropaoli D, Chandar AK, Ferri C, Cominelli F. Association Between Inflammatory Bowel Disease and Vitamin D Deficiency: A Systematic Review and Meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;Nov;21(11):2708-17. doi: 10.1097/MIB.0000000000000546.

180. Khayyat Y, Attar S. Vitamin D Deficiency in Patients with Irritable Bowel Syndrome: Does it Exist? *Oman Med J*. 2015 Mar;30(2):115-8. doi: 10.5001/omj.2015.25.
181. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:230S-242S [PMID: 15640486]
182. Monagas M, Urpi-Sarda M, Sánchez-Patán F, Llorach R, Garrido I, Gómez-Cordovés C, Andres-Lacueva C, Bartolomé B. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food Funct* 2010; 1: 233-253 [PMID: 21776473 DOI: 10.1039/c0fo00132e]
183. Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 905215 [PMID: 25802870]
184. Li M, Wang B, Zhang M, Rantalainen M, Wang S, Zhou H, Zhang Y, Shen J, Pang X, Wei H, Chen Y, Lu H, Zuo J, Su M, Qiu Y, Jia W, Xiao C, Smith LM, Yang S, Holmes E, Tang H, Zhao G, Nicholson JK, Li L, Zhao L. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 2117–2122, 2008.
185. Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat Rev Microbiol* 3: 431–438, 2005.
186. Saha JR, Butler VP, Neu HC, Lindenbaum J. Digoxin-inactivating bacteria: identification in human gut flora. *Science* 1983; 220: 325-327 [PMID: 6836275]
187. Wallace BD, Wang H, Lane KT, Scott JE, Orans J, Koo JS, Venkatesh M, Jobin C, Yeh LA, Mani S, Redinbo MR. Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme. *Science* 2010; 330: 831-835 [PMID: 21051639 DOI:10.1126/science.1191175]
188. Clayton TA, Baker D, Lindon JC, Everett JR, Nicholson JK. Pharmacometabonomic identification of a significant host microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 14728-14733 [PMID: 19667173 DOI: 10.1073/pnas.0904489106]
189. Peterson LW & Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology* 14, 141–153 (2014) doi:10.1038/nri3608
190. Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 2010; 12: 319-330 [PMID: 20703838 DOI: 10.1007/s11894-010-0131-2]
191. Gallo, R. L. & Hooper, L. V. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nature Rev. Immunol.* 12, 503–516 (2012).
192. Johansson ME, Larsson JM, Hansson GC. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc*

- Natl Acad Sci USA* 2011; 108 Suppl 1: 4659-4665 [PMID: 20615996 DOI:10.1073/pnas.1006451107]
193. Martens, E. C., Koropatkin, N. M., Smith, T. J. & Gordon, J. I. Complex glycan catabolism by the human gut microbiota: The Bacteroidetes sus like paradigm. *J. Biol. Chem* 2009; 284, 24673–24677.
  194. Kaiser V, Diamond G. Expression of mammalian defensin genes. *J Leukoc Biol* 2000; 68:779–84.
  195. Bevins, C. L. & Salzman, N. H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Rev. Microbiol.* 9, 356–368 (2011).
  196. Mukherjee, S. et al. Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature* 505, 103–107 (2014).
  197. Vaishnava, S. et al. The antibacterial lectin RegIII $\gamma$  promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* 334, 255–258 (2011).
  198. Johansen, F.-E. & Kaetzel, C. S. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 4, 598–602 (2011).
  199. Mabbott, N. A., Donaldson, D. S., Ohno, H., Williams, I. R. & Mahajan, A. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol.* 6, 666–677 (2013).
  200. Hase, K. et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH<sup>+</sup> bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462, 226–230 (2009).
  201. McDole, J. R. et al. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103<sup>+</sup> dendritic cells in the small intestine. *Nature* 483, 345–349 (2012).
  202. Fukata M, Arditi M. The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 2013 May;6(3):451-63. doi: 10.1038/mi.2013.13.
  203. Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses.* 2011; 3:920–940. [PubMed: 21994762]
  204. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140: 805-820 [PMID: 20303872 DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.022]
  205. Carvalho FA, Aitken JD, Vijay-Kumar M, Gewirtz AT. Toll-like receptor-gut microbiota interactions: perturb at your own risk! *Annu Rev Physiol* 2012; 74: 177-198 [PMID: 22035346 DOI: 10.1146/annurev-physiol-020911-153330]
  206. Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. & Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229–241 (2004).

207. Hooper LV. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 367-374 [PMID: 19369952 DOI: 10.1038/nrmicro2114]
208. Nagler-Anderson C. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nat Rev Immunol*. 2001;1(1):59–67.
209. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(10):667–85.
210. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*. 2008;320(5883):1647–51.
211. Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, Beraudi A, Casadei R, Frabetti F, et al. An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol*. 2013;40(6):463–71.
212. Lim ES, Zhou Y, Zhao G, Bauer IK, Droit L, Ndao IM, et al. Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nat Med*. 2015;
213. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest*. 2005; 115:66–75. [PubMed: 15630445]
214. Wu HJ, Wu E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes*. 2012 Jan-Feb;3(1):4-14. doi: 10.4161/gmic.19320. Epub 2012 Jan 1.
215. Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol* 2007; 19: 70-83 [PMID: 17485224]
216. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 2006; 313: 1126-1130 [PMID: 16931762]
217. Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JI. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol* 2003; 4: 269-273 [PMID: 12548285]
218. López-Boado YS, Wilson CL, Hooper LV, Gordon JI, Hultgren SJ, Parks WC. Bacterial exposure induces and activates matrilysin in mucosal epithelial cells. *J Cell Biol* 2000; 148: 1305-1315 [PMID:10725342]
219. Lievin-Le Moal V, Servin AL: The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms:mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev* 2006, 19:315–337.
220. Smirnova, M. G., L. Guo, J. P. Birchall, and J. P. Pearson. 2003. LPS up-regulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells. *Cell Immunol*. 221:42–49.

221. Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med* 2010; 16:228-31; PMID:20081863; <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2087>
222. Sansonetti PJ. To be or not to be a pathogen: that is the mucosally relevant question. *Mucosal Immunol.* 2011;4(1):8–14.
223. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 2011;331:337-41; PMID:21205640; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1198469>
224. Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, Nutsch K, Lio CW, Santacruz N, et al. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* 2011; 478:250-4; PMID:21937990; <http://dx.doi.org/10.1038/nature10434>
225. Suzuki K, Maruya M, Kawamoto S, Sitnik K, Kitamura H, Agace WW, Fagarasan S. The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* 2010; 33: 71-83 [PMID: 20643338 DOI:10.1016/j.immuni.2010.07.003]
226. He B, Xu W, Santini PA, Polydorides AD, Chiu A, Estrella J, Shan M, Chadburn A, Villanacci V, Plebani A, Knowles DM, Rescigno M, Cerutti A. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* 2007; 26: 812-826 [PMID: 17570691]
227. Cario, E., Gerken, G. & Podolsky, D. K. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology* 127, 224–238 (2004).
228. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2007; 132: 1359-1374 [PMID: 17408640]
229. Lutgendorff F, Akkermans LM, Söderholm JD. The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastro-intestinal damage. *Curr Mol Med* 2008; 8: 282-298 [PMID: 18537636]
230. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15451-15455 [PMID: 12432102]
231. Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001; 292: 1115-1118 [PMID: 11352068]
232. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, et al. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature.* 2008;455(7214):808–12.

233. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461(7268):1282–6.
234. Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, Brady E, Padia R, Shi H, et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity*. 2014;40(1):128–39.
235. Piot P, Abdool Karim SS, Hecht R, Legido-Quigley H, Buse K, Stover J, et al. Defeating AIDS – advancing global health. *Lancet*. 2015;386(9989):171–218.
236. Donohoe DR, Garge N, Zhang X, Sun W, O’Connell TM, Bunger MK, et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab*. 2011;13(5):517–26.
237. Ogawa H, Rafiee P, Fisher PJ, Johnson NA, Otterson MF, Binion DG. Butyrate modulates gene and protein expression in human intestinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309: 512-519 [PMID: 12963019 DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.08.026]
238. Gaudier E, Jarry A, Blottière HM, de Coppet P, Buisine MP, Aubert JP, Laboisie C, Cherbut C, Hoebler C. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G1168-G1174 [PMID: 15308471 DOI: 10.1152/ajpgi.00219.2004]
239. Zuniga J, Cancino M, Medina F, Varela P, Vargas R, Tapia G, et al. N-3 PUFA supplementation triggers PPAR-alpha activation and PPARalpha/NF-kappaB interaction: anti-inflammatory implications in liver ischemia-reperfusion injury. *PLoS One*. 2011;6(12):e28502.
240. Vavassori P, Mencarelli A, Renga B, Distrutti E, Fiorucci S. The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity. *J Immunol*. 2009;183(10):6251–61.
241. Haselow K, Bode JG, Wammers M, Ehling C, Keitel V, Kleinebrecht L, et al. Bile acids PKA-dependently induce a switch of the IL-10/IL-12 ratio and reduce proinflammatory capability of human macrophages. *J Leukoc Biol*. 2013;94(6):1253–64.
242. Schaubert J, Svanholm C, Termén S, Iffland K, Menzel T, Scheppach W, Melcher R, Agerberth B, Lühns H, Gudmundsson GH. Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut* 2003; 52: 735-741 [PMID: 12692061]
243. Termén S, Tollin M, Rodriguez E, Sveinsdóttir SH, Jóhannesson B, Cederlund A, Sjövall J, Agerberth B, Gudmundsson GH. PU.1 and bacterial metabolites regulate the human gene CAMP encoding antimicrobial peptide LL-37 in colon epithelial cells. *Mol Immunol* 2008; 45: 3947-3955 [PMID: 18657865]

244. Alakomi HL, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 2001-2005 [PMID: 10788373]
245. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol.* 2013;34(3):137–43.
246. Sonnenberg GF, Artis D. Innate lymphoid cell interactions with microbiota: implications for intestinal health and disease. *Immunity* 2012; 37: 601-610 [PMID: 23084357 DOI: 10.1016/j.immuni.2012]
247. Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, De Luca A, Giovannini G, Pieraccini G, et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity.* 2013;39(2):372–85.
248. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol.* 2006;176(11):6752–61.
249. Diegelmann J, Olszak T, Goke B, Blumberg RS, Brand S. A novel role for interleukin-27 (IL-27) as mediator of intestinal epithelial barrier protection mediated via differential signal transducer and activator of transcription (STAT) protein signaling and induction of antibacterial and anti-inflammatory proteins. *J Biol Chem.* 2012;287(1):286–98.
250. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, Geurts L, Naslain D, Neyrinck A, Lambert DM, Muccioli GG, Delzenne NM. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 2009; 58:1091-1103 [PMID: 19240062]
251. Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol.* 2015 Apr-Jun;28(2):203-209.
252. Collins SM, Surette M, Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10: 735-742 [PMID: 23000955 DOI: 10.1038/nrmicro2876]
253. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 2002;53:865-871.
254. Simrén M, Barbara G, Flint HJ, et al. Rome Foundation Committee. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut* 2013;62:159-176.
255. Mayer EA, Tillisch K. The brain-gut axis in abdominal pain syndromes. *Annu Rev Med* 2011;62:381-396.

256. Berrill JW, Gallacher J, Hood K, et al. An observational study of cognitive function in patients with irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. *Neurogastroenterol Motil* 2013;25:918-e704.
257. Bravo JA, Julio-Pieper M, Forsythe P, et al. Communication between gastrointestinal bacteria and the nervous system. *Curr Opin Pharmacol* 2012;12:667-672.
258. Stilling RM, Dinan TG, Cryan JF. Microbial genes, brain and behaviour - epigenetic regulation of the gut-brain axis. *Genes Brain Behav* 2014;13:69-86.
259. Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and Behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:3047-3052.
260. Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Reduced anxiety like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterol Motil* 2011;23:255-264.
261. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* 2004;558:263-275.
262. Gareau MG, Wine E, Rodrigues DM, et al. Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut* 2011;60:307-317.
263. Bercik P, Denou E, Collins J, et al. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* 2011;141:599-609.
264. Distrutti E, O'Reilly JA, McDonald C, et al. Modulation of intestinal microbiota by the probiotic VSL#3 resets brain gene expression and ameliorates the age-related deficit in LTP. *PLoS One* 2014;9:e106503.
265. Bercik P, Park AJ, Sinclair D, et al. The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterol Motil* 2011;23:1132-1139.
266. Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:16050-16055.
267. Ait-Belgnaoui A, Colom A, Braniste V, et al. Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *Neurogastroenterol Motil* 2014;26:510-520.
268. Kunze WA, Mao YK, Wang B, et al. *Lactobacillus reuteri* enhances excitability of colonic AH neurons by inhibiting calcium-dependent potassium channel opening. *J Cell Mol Med* 2009;13:2261-2270.
269. Sobko T, Huang L, Midtvedt T, et al. Generation of NO by probiotic bacteria in the gastrointestinal Tract. *Free Radic Biol Med* 2006;41:985-991.

270. Schicho R, Krueger D, Zeller F, et al. Hydrogen sulfide is a novel prosecretory neuromodulator in the Guinea-pig and human colon. *Gastroenterology* 2006;131:1542-1552.
271. Lee KN, Lee OY. Intestinal microbiota in pathophysiology and management of irritable bowel syndrome. *World Journal of Gastroenterology* 2014;20: 8886–97.
272. Galley JD, Nelson MC, Yu Z, et al. Exposure to a social stressor disrupts the community structure of the colonic mucosa-associated microbiota. *BMC Microbiol* 2014;14:189.
273. Macfarlane S, Dillon JF. Microbial biofilms in the human gastrointestinal Tract. *J Appl Microbiol* 2007;102:1187-1196.
274. Demaude J, Salvador-Cartier C, Fioramonti J, Ferrier L, Bueno L. Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. *Gut* 2006;55:655-661.
275. Koloski NA, Jones M, Kalantar J, Weltman M, Zaguirre J, Talley NJ. The brain-gut pathway in functional gastrointestinal disorders is bidirectional: a 12-year prospective population-based study. *Gut* 2012;61:1284-1290.
276. Distrutti E, Monaldi L, Ricci P, Fiorucci S. Gut microbiota role in irritable bowel syndrome: New therapeutic strategies. *World J Gastroenterol*. 2016 Feb 21;22(7):2219-41. doi: 10.3748/wjg.v22.i7.2219.
277. Dupont HL. Review article: evidence for the role of gut microbiota in irritable bowel syndrome and its potential influence on therapeutic targets. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;39:1033-1042.
278. Spiller R, Lam C. An Update on Post-infectious Irritable Bowel Syndrome: Role of Genetics, Immune Activation, Serotonin and Altered Microbiome. *J Neurogastroenterol Motil* 2012;18:258-268.
279. Quigley EM. Small intestinal bacterial overgrowth: what it is and what it is not. *Curr Opin Gastroenterol* 2014;30:141-146.
280. Pimentel M, Lembo A, Chey WD, et al; TARGET Study Group. Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation. *N Engl J Med* 2011;364:22-32.
281. Crouzet L, Gaultier E, Del’Homme C, et al. The hypersensitivity to colonic distension of IBS patients can be transferred to rats through their fecal microbiota. *Neurogastroenterol Motil* 2013;25:e272-e282.
282. Collins SM, Bercik P. The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology* 2009;136:2003-2014.
283. Theodorou V, Ait Belgnaoui A, Agostini S, Eutamene H. Effect of commensals and probiotics on visceral sensitivity and pain in irritable bowel syndrome. *Gut Microbes* 2014;5:430-436.

284. Mulak A, Bonaz B. Irritable bowel syndrome: a model of the brain-gut interactions. *Med Sci Monit.* 2004 Apr;10(4):RA55-62.
285. Rajilić-Stojanović M, Biagi E, Heilig HG, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, de Vos WM. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011; 141: 1792-1801 [PMID: 21820992 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.07.043]
286. Jeffery IB, O'Toole PW, Öhman L, Claesson MJ, Deane J, Quigley EM, Simrén M. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut* 2012; 61: 997-1006 [PMID: 22180058 DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301501]
287. Rajilić-Stojanović M, Jonkers DM, Salonen A, Hanevik K, Raes J, Jalanka J, de Vos WM, Manichanh C, Golic N, Enck P, Philippou E, Iraqi FA, Clarke G, Spiller RC, Penders J. Intestinal microbiota and diet in IBS: causes, consequences, or epiphenomena? *Am J Gastroenterol* 2015; 110: 278-287 [PMID: 25623659]
288. Gibson, P. R. & Shepherd, S. J. Evidence-based dietary management of functional gastrointestinal symptoms: The FODMAP approach. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25, 252–258 (2010).
289. Ong DK, Mitchell SB, Barrett JS, et al. Manipulation of dietary short chain carbohydrates alters the pattern of gas production and genesis of symptoms in irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25(8):1366–1373.
290. Brint EK, MacSharry J, Fanning A, Shanahan F, Quigley EM. Differential expression of toll-like receptors in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2011; 106:329-336 [PMID: 21102570 DOI: 10.1038/ajg.2010.438]
291. Schoepfer AM, Schaffer T, Seibold-Schmid B, Müller S, Seibold F. Antibodies to flagellin indicate reactivity to bacterial antigens in IBS patients. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 1110-1118 [PMID: 18694443 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2008.01166.x]
292. Langhorst J, Junge A, Rueffer A, Wehkamp J, Foell D, Michalsen A, Musial F, Dobos GJ. Elevated human beta defensin-2 levels indicate an activation of the innate immune system in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 404-410 [PMID: 19174795 DOI:10.1038/ajg.2008.86]
293. Lee KJ, Kim YB, Kim JH, Kwon HC, Kim DK, Cho SW. The alteration of enterochromaffin cell, mast cell, and lamina propria T lymphocyte numbers in irritable bowel syndrome and its relationship with psychological factors. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1689-1694 [PMID: 19120860 DOI:10.1111/j.1440-1746.2008.05574.x]
294. Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, Pasquinelli G, Morselli-Labate AM, Grady EF, Bunnett NW, Collins SM, Corinaldesi R. Activated mast

- cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004;126: 693-702 [PMID: 14988823]
295. Piche T, Barbara G, Aubert P, Bruley des Varannes S, Dainese R, Nano JL, Cremon C, Stanghellini V, De Giorgio R, Galmiche JP, Neunlist M. Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* 2009; 58: 196-201 [PMID: 18824556 DOI: 10.1136/gut.2007.140806]
296. Martínez C, Vicario M, Ramos L, Lobo B, Mosquera JL, Alonso C, Sánchez A, Guilarte M, Antolín M, de Torres I, González-Castro AM, Pigrau M, Saperas E, Azpiroz F, Santos J. The jejunum of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome shows molecular alterations in the tight junction signaling pathway that are associated with mucosal pathobiology and clinical manifestations. *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 736-746 [PMID: 22415197 DOI: 10.1038/ajg.2011.472]
297. Gecse K, Róka R, Séra T, Rosztóczy A, Annaházi A, Izbéki F, Nagy F, Molnár T, Szepes Z, Pávics L, Bueno L, Wittmann T. Leaky gut in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and inactive ulcerative colitis. *Digestion* 2012; 85: 40-46 [PMID: 22179430 DOI: 10.1159/000333083]
298. Gecse K, Róka R, Ferrier L, Leveque M, Eutamene H, Cartier C, Ait-Belgnaoui A, Rosztóczy A, Izbéki F, Fioramonti J, Wittmann T, Bueno L. Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut* 2008; 57:591-599 [PMID: 18194983 DOI: 10.1136/gut.2007.140210]
299. Vivinus-Nébot M, Dainese R, Anty R, Saint-Paul MC, Nano JL, Gonthier N, Marjoux S, Frin-Mathy G, Bernard G, Hébuterne X, Tran A, Theodorou V, Piche T. Combination of allergic factors can worsen diarrheic irritable bowel syndrome: role of barrier defects and mast cells. *Am J Gastroenterol* 2012;107: 75-81 [PMID: 21931380 DOI: 10.1038/ajg.2011.315]
300. Villani AC, Lemire M, Thabane M, Belisle A, Geneau G, Garg AX, Clark WF, Moayyedi P, Collins SM, Franchimont D, Marshall JK. Genetic risk factors for post-infectious irritable bowel syndrome following a waterborne outbreak of gastroenteritis. *Gastroenterology* 2010; 138: 1502-1513 [PMID:20044998 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.12.049]
301. Vasina V, Barbara G, Talamonti L, Stanghellini V, Corinaldesi R, Tonini M, De Ponti F, De Giorgio R. Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. *Auton Neurosci* 2006; 126-127:264-272 [PMID: 16624634 DOI: 10.1016/j.autneu.2006.02.025]
302. Barbara G, Stanghellini V, Brandi G, Cremon C, Di Nardo G, De Giorgio R, Corinaldesi R. Interactions between commensal bacteria and gut sensorimotor function in health and disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2560-2568 [PMID: 16279914 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.00230.x]

303. Bueno L, Fioramonti J: Visceral perception: inflammatory and noninflammatory mediators. *Gut* 2002, 51(Suppl 1):i19-23.
304. Kellow JE, Azpiroz F, Delvaux M, Gebhart GF, Mertz HR, Quigley EM, Smout AJ. Applied principles of neurogastroenterology: physiology/motility sensation. *Gastroenterology* 2006; 130:1412-1420 [PMID: 16678555 DOI: 10.1053/j.gastro.2005.08.061]
305. Mayer EA. Emerging disease model for functional gastrointestinal disorders. *Am J Med* 1999; 107: 12S-19S [PMID: 10588168 DOI: 10.1016/S0002-9343(99)00277-6]
306. Grundy D, Al-Chaer ED, Aziz Q, Collins SM, Ke M, Taché Y, Wood JD. Fundamentals of neurogastroenterology: basic science. *Gastroenterology* 2006; 130: 1391-1411 [PMID: 16678554 DOI:10.1053/j.gastro.2005.11.060]
307. Feng B, La JH, Schwartz ES, Gebhart GF. Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. Neural and neuro-immune mechanisms of visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 302: G1085-G1098 [PMID: 22403791 DOI: 10.1152/ajpgi.00542.2011]
308. Distrutti E, Salvioli B, Azpiroz F, Malagelada JR. Rectal function and bowel habit in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 131-137 [PMID: 14687154]
309. Aguilera M, Cerdà-Cuéllar M, Martínez V. Antibiotic-induced dysbiosis alters host-bacterial interactions and leads to colonic sensory and motor changes in mice. *Gut Microbes* 2015; 6: 10-23 [PMID: 25531553 DOI: 10.4161/19490976.2014.990790]
310. Aguilera M, Vergara P, Martínez V. Stress and antibiotics alter luminal and wall-adhered microbiota and enhance the local expression of visceral sensory-related systems in mice. *Neurogastroenterol Motil* 2013; 25: e515-e529 [PMID: 23711047 DOI: 10.1111/nmo.12154]
311. Theodorou V, Ait Belgnaoui A, Agostini S, Eutamene H. Effect of commensals and probiotics on visceral sensitivity and pain in irritable bowel syndrome. *Gut Microbes* 2014; 5: 430-436 [PMID:25184834 DOI: 10.4161/gmic.29796]
312. Mao YK, Kasper DL, Wang B, Forsythe P, Bienenstock J, Kunze WA. Bacteroides fragilis polysaccharide A is necessary and sufficient for acute activation of intestinal sensory neurons. *Nat Commun* 2013; 4: 1465 [PMID: 23403566 DOI:10.1038/ncomms2478]
313. Suttor VP, Prott GM, Hansen RD, Kellow JE, Malcolm A. Evidence for pelvic floor dyssynergia in patients with irritable bowel syndrome. *Dis Colon Rectum* 2010; 53: 156-160 [PMID:20087090 DOI: 10.1007/DCR.0b013e3181c188e8]
314. Serra J, Villoria A, Azpiroz F, Lobo B, Santos J, Accarino A, Malagelada JR. Impaired intestinal gas propulsion in manometrically proven dysmotility and in irritable bowel

- syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 401-406, e91-e92 [PMID: 20047636 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2009.01447]
315. Cogliandro RF, Antonucci A, De Giorgio R, Barbara G, Cremon C, Cogliandro L, Frisoni C, Pezzilli R, Morselli-Labate AM, Corinaldesi R, Stanghellini V. Patient-reported outcomes and gut dysmotility in functional gastrointestinal disorders. *Neurogastroenterol Motil* 2011; 23: 1084-1091 [PMID: 21917083 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2011.01783]
316. Lindfors P, Törnblom H, Sadik R, Björnsson ES, Abrahamsson H, Simrén M. Effects on gastrointestinal transit and antroduodenal manometry after gut-directed hypnotherapy in irritable bowel syndrome (IBS). *Scand J Gastroenterol* 2012; 47: 1480-1487 [PMID: 23094932 DOI: 10.3109/00365521.2012.733955]
317. Collins S, Verdù E, Denou E, Bercik P. The role of pathogenic microbes and commensal bacteria in irritable bowel syndrome. *Dig Dis* 2009; 27 Suppl 1: 85-89 [PMID: 20203502 DOI:10.1159/000268126]
318. Husebye E, Hellström PM, Midtvedt T. Intestinal microflora stimulates myoelectric activity of rat small intestine by promoting cyclic initiation and aboral propagation of migrating myoelectric complex. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 946-956 [PMID: 8174436]
319. Husebye E, Hellström PM, Sundler F, Chen J, Midtvedt T. Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G368-G380 [PMID: 11171619]
320. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001; 291: 881-884 [PMID: 11157169 DOI:10.1126/science.291.5505.881]
321. Kashyap PC, Marcobal A, Ursell LK, Larauche M, Duboc H, Earle KA, Sonnenburg ED, Ferreyra JA, Higginbottom SK, Million M, Tache Y, Pasricha PJ, Knight R, Farrugia G, Sonnenburg JL. Complex interactions among diet, gastrointestinal transit, and gut microbiota in humanized mice. *Gastroenterology* 2013; 144: 967-977 [PMID: 23380084 DOI: 10.1053/j.gastro.2013.01.047]
322. Wu RY, Pasyk M, Wang B, Forsythe P, Bienenstock J, Mao YK, Sharma P, Stanisz AM, Kunze WA. Spatiotemporal maps reveal regional differences in the effects on gut motility for *Lactobacillus reuteri* and *rhamnosus* strains. *Neurogastroenterol Motil* 2013; 25: e205-e214 [PMID: 23316914 DOI:10.1111/nmo.12072]
323. Carvalho FA, Aitken JD, Vijay-Kumar M, Gewirtz AT. Toll-like receptor-gut microbiota interactions: perturb at your own risk! *Annu Rev Physiol* 2012; 74: 177-198 [PMID: 22035346 DOI: 10.1146/annurev-physiol-020911-153330]
324. Pimentel M, Lin HC, Enayati P, van den Burg B, Lee HR, Chen JH, Park S, Kong Y, Conklin J. Methane, a gas produced by enteric bacteria, slows intestinal transit and

- augments small intestinal contractile activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G1089-G1095 [PMID: 16293652 DOI: 10.1152/ajpgi.00574.2004]
325. Dhaese I, Van Colen I, Lefebvre RA. Mechanisms of action of hydrogen sulfide in relaxation of mouse distal colonic smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 2010; 628: 179-186 [PMID: 19919833 DOI: 10.1016/j.ejphar.2009.11.024]
326. Fukumoto S, Tatewaki M, Yamada T, Fujimiya M, Mantyh C, Voss M, Eubanks S, Harris M, Pappas TN, Takahashi T. Short-chain fatty acids stimulate colonic transit via intraluminal 5-HT release in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: R1269-R1276 [PMID: 12676748 DOI: 10.1152/ajpregu.00442.2002]
327. Takaki M, Mawe GM, Barasch JM, Gershon MD, Gershon MD. Physiological responses of guinea-pig myenteric neurons secondary to the release of endogenous serotonin by tryptamine. *Neuroscience* 1985; 16: 223-240 [PMID: 2940472]
328. Sayin SI, Wahlström A, Felin J, Jäntti S, Marschall HU, Bamberg K, Angelin B, Hyötyläinen T, Orešič M, Bäckhed F. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab* 2013; 17: 225-235 [PMID: 23395169 DOI: 10.1016/j.cmet.2013.01.003]
329. Yurdaydin C, Walsh TJ, Engler HD, Ha JH, Li Y, Jones EA, Basile AS. Gut bacteria provide precursors of benzodiazepine receptor ligands in a rat model of hepatic encephalopathy. *Brain Res* 1995; 679: 42-48 [PMID: 7648264]
330. Drossman, D. A. & Thompson, W. G. The irritable bowel syndrome: review and a graduated multicomponent treatment approach. *Ann. Intern. Med.* 116, 1009–1016 (1992).
331. Grunkemeier DM, Cassara JE, Dalton CB, Drossman DA. The narcotic bowel syndrome: clinical features, pathophysiology, and management. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007 Oct;5(10):1126-39; quiz 1121-2.
332. Stewart, M., Meredith, L., Brown, J. B. & Galajda, J. The influence of older patient–physician communication on health and health-related outcomes. *Clin. Geriatr. Med.* 16, 25–36,vii–viii (2000).
333. Drossman, D. A. et al. A focus group assessment of patient perspectives on irritable bowel syndrome and illness severity. *Dig. Dis. Sci.* 54, 1532–1541 (2009).
334. Halpert, A. et al. Irritable bowel syndrome patients’ ideal expectations and recent experiences with healthcare providers: a national survey. *Dig. Dis. Sci.* 55, 375–383 (2010).
335. Halpert, A. et al. What patients know about irritable bowel syndrome (IBS) and what they would like to know. National Survey on Patient Educational Needs in IBS and development and validation of the Patient Educational Needs Questionnaire (PEQ). *Am. J. Gastroenterol.* 102,1972–1982 (2007).

336. Locke, G. R. 3rd, Zinsmeister, A. R., Talley, N. J., Fett, S. L. & Melton, L. J. Risk factors for irritable bowel syndrome: role of analgesics and food sensitivities. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 157–165 (2000).
337. Bischoff, S. C., Mayer, J. H. & Manns, M. P. Allergy and the gut. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 121, 270–283 (2000).
338. Wahnschaffe, U., Schulzke, J. D., Zeitz, M. & Ullrich, R. Predictors of clinical response to gluten-free diet in patients diagnosed with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 5, 844–850 (2007).
339. Vazquez-Roque, M.I.; Camilleri, M.; Smirk, T.; Murray, J.A.; Marietta, E.; O'Neill, J.; Carlson, P.; Lamsam, J. A controlled trial of gluten-free diet in patients with irritable bowel syndrome-diarrhea: Effects on bowel frequency and intestinal function. *Gastroenterology* 2013, 144, 903–911.
340. Aziz I, Trott N, Briggs R, North JR, Hadjivassiliou M, Sanders DS. Efficacy of a Gluten-Free Diet in Subjects With Irritable Bowel Syndrome-Diarrhea Unaware of Their HLA-DQ2/8 Genotype. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016 May;14(5):696-703.e1. doi: 10.1016/j.cgh.2015.12.031. Epub 2015 Dec 31.
341. Shepherd, S. J. & Gibson, P. R. Fructose malabsorption and symptoms of irritable bowel syndrome: guidelines for effective dietary management. *J. Am. Diet. Assoc.* 106,1631–1639 (2006).
342. Parker K, Salas M, Nwosu VC. High fructose corn syrup: production, uses and public health concerns. *Biotechnol Mol Biol Rev* 2010;5:71–78.
343. Central Clinical School, Monash University and The Alfred Hospital. The Monash University Low FODMAP Diet. 4th ed. Melbourne, Australia: Monash University; 2012.
344. Staudacher HM, Whelan K, Irving PM, Lomer MC. Comparison of symptom response following advice for a diet low in fermentable carbohydrates (FODMAPs) versus standard dietary advice in patients with irritable bowel syndrome. *J Hum Nutr Diet.* 2011 Oct;24(5):487-95. doi: 10.1111/j.1365-277X.2011.01162.x. Epub 2011 May 25.
345. Staudacher HM, Lomer MC, Anderson JL, Barrett JS, Muir JG, Irving PM, Whelan K. Fermentable carbohydrate restriction reduces luminal bifidobacteria and gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *J Nutr.* 2012 Aug;142(8):1510-8. doi: 10.3945/jn.112.159285. Epub 2012 Jun 27.
346. Halmos EP, Power VA, Shepherd SJ, Gibson PR, Muir JG. A diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2014 Jan;146(1):67-75.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2013.09.046. Epub 2013 Sep 25.

347. Böhn L, Störsrud S, Liljebo T, Collin L, Lindfors P, Törnblom H, Simrén M. Diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome as well as traditional dietary advice: a randomized controlled trial. *Gastroenterology*. 2015 Nov;149(6):1399-1407.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2015.07.054. Epub 2015 Aug 5.
348. Pedersen N, Andersen NN, Végh Z, Jensen L, Ankersen DV, Felding M, Simonsen MH, Burisch J, Munkholm P. Ehealth: low FODMAP diet vs Lactobacillus rhamnosus GG in irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*. 2014 Nov 21;20(43):16215-26. doi: 10.3748/wjg.v20.i43.16215.
349. Tuck CJ, Muir JG, Barrett JS, Gibson PR. Fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols: role in irritable bowel syndrome. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Sep;8(7):819-34. doi: 10.1586/17474124.2014.917956. Epub 2014 May 15.
350. Staudacher HM, Irving PM, Lomer MC, Whelan K. Mechanisms and efficacy of dietary FODMAP restriction in IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Apr;11(4):256-66. doi: 10.1038/nrgastro.2013.259. Epub 2014 Jan 21.
351. Shepherd SJ, Halmos E, Glance S. The role of FODMAPs in irritable bowel syndrome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2014 Nov;17(6):605-9. doi:10.1097/MCO.0000000000000116.
352. Halmos EP, Christophersen CT, Bird AR, Shepherd SJ, Gibson PR, Muir JG. Diets that differ in their FODMAP content alter the colonic luminal microenvironment. *Gut*. 2015 Jan;64(1):93-100. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307264. Epub 2014 Jul 12.
353. Ford, A. C. et al. Effect of fibre, antispasmodics, and peppermint oil in the treatment of irritable bowel syndrome: systematic review and metaanalysis. *BMJ* 337, a2313 (2008).
354. Bijkerk, C. J. et al. Soluble or insoluble fibre in irritable bowel syndrome in primary care? Randomised placebo controlled trial. *BMJ* 339, b3154 (2009).
355. Khoshoo, V., Armstead, C. & Landry, L. Effect of a laxative with and without tegaserod in adolescents with constipation predominant irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 23, 191–196 (2006).
356. Awad, R. A. & Camacho, S. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of polyethylene glycol effects on fasting and postprandial rectal sensitivity and symptoms in hypersensitive constipation-predominant irritable bowel syndrome. *Colorectal Dis*. doi:10.1111/j.146301318.2009.01990.x.
357. Pimentel, M. et al. Rifaximin treatment for 2 weeks provides acute and sustained relief over 12 weeks of IBS symptoms in non-constipated irritable bowel syndrome: results from 2 North American phase 3 trials (Target 1 and Target 2). *Gastroenterology* 138 (Suppl. 1), S-64–S-65 (2010).

358. Sharara, A. I. et al. A randomized double-blind placebo-controlled trial of rifaximin in patients with abdominal bloating and flatulence. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 326–333 (2006).
359. Tursi, A., Brandimarte, G., Giorgetti, G. M. & Elisei, W. Assessment of small intestinal bacterial overgrowth in uncomplicated acute diverticulitis of the colon. *World J. Gastroenterol.* 11, 2773–2776 (2005).
360. Darvish-Damavandi, M., Nikfar, S. & Abdollahi, M. A systematic review of efficacy and tolerability of mebeverine in irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol.* 16, 547–553 (2010).
361. Ford, A. C., Talley, N. J., Schoenfeld, P. S., Quigley, E. M. & Moayyedi, P. Efficacy of antidepressants and psychological therapies in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Gut* 58, 367–378 (2009).
362. Grover, M. & Drossman, D. A. Psychotropic agents in functional gastrointestinal disorders. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8, 715–723 (2008).
363. Lim, B. et al. Acupuncture for treatment of irritable bowel syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 4. Art. No.: CD005111. doi:10.1002/14651858.CD005111.pub2 (2006).
364. Lembo, A. J. et al. A treatment trial of acupuncture in IBS patients. *Am. J. Gastroenterol.* 104, 1489–1497 (2009).
365. Kaptchuk, T. J. et al. Components of placebo effect: randomised controlled trial in patients with irritable bowel syndrome. *BMJ* 336, 999–1003 (2008).
366. Liu, J. P., Yang, M., Liu, Y. X., Wei, M. L. & Grimsgaard, S. Herbal medicines for treatment of irritable bowel syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 1. Art. No.: CD004116. doi:10.1002/14651858.CD004116.pub2 (2006).
367. Pineiro M, Asp NG, Reid G, Macfarlane S, Morelli L, Brunser O, Tuohy K. FAO Technical meeting on prebiotics. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42 Suppl 3 Pt 2: S156-S159 [PMID: 18685504 DOI: 10.1097/MCG.0b013e31817f184e]
368. Roberfroid MB. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *Br J Nutr* 2002; 87 Suppl 2: S139-S143 [PMID: 12088510 DOI: 10.1079/BJN/2002529]
369. Boehm G, Stahl B, Jelinek J, Knol J, Miniello V, Moro GE. Prebiotic carbohydrates in human milk and formulas. *Acta Paediatr Suppl* 2005; 94: 18-21 [PMID: 16214760]
370. Chatchatee P, Lee WS, Carrilho E, Kosuwon P, Simakachorn N, Yavuz Y, Schouten B, Graaff PL, Szajewska H. Effects of growingup milk supplemented with prebiotics and LCPUFAs on infections in young children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; 58: 428-437 [PMID: 24614142 DOI: 10.1097/MPG.0000000000000252]

371. Hunter JO, Tuffnell Q, Lee AJ. Controlled trial of oligofructose in the management of irritable bowel syndrome. *J Nutr* 1999; 129:1451S-1453S [PMID: 10395619]
372. Olesen M, Gudmand-Hoyer E. Efficacy, safety, and tolerability of fructooligosaccharides in the treatment of irritable bowel syndrome. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 1570-1575 [PMID: 11101487]
373. Paineau D, Payen F, Panserieu S, Coulombier G, Sobaszek A, Lartigau I, Brabet M, Galmiche JP, Tripodi D, Sacher-Huvelin S, Chapalain V, Zourabichvili O, Respondek F, Wagner A, Bornet FR. The effects of regular consumption of short-chain fructooligosaccharides on digestive comfort of subjects with minor functional bowel disorders. *Br J Nutr* 2008; 99: 311-318 [PMID:17697398 DOI: 10.1017/S000711450779894X]
374. Silk DB, Davis A, Vulevic J, Tzortzis G, Gibson GR. Clinical trial:the effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 29: 508-518 [PMID: 19053980]
375. Hasler WL. Lactulose breath testing, bacterial overgrowth,and IBS: just a lot of hot air? *Gastroenterology* 2003; 125:1898-1900; discussion 1900 [PMID: 14724846 DOI: 10.1053/j.gastro.2003.08.038]
376. Snook J, Shepherd HA. Bran supplementation in the treatment of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 1994; 8:511-514 [PMID: 7865643 DOI: 10.1111/j.1365-2036.1994.tb00323.x]
377. Badiali D, Corazziari E, Habib FI, Tomei E, Bausano G, Magrini P, Anzini F, Torsoli A. Effect of wheat bran in treatment of chronic nonorganic constipation. A double-blind controlled trial. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 349-356 [PMID: 7851201]
378. Nelis GF, Vermeeren MA, Jansen W. Role of fructose-sorbitol malabsorption in the irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1990; 99: 1016-1020 [PMID: 2394324]
379. Symons P, Jones MP, Kellow JE. Symptom provocation in irritable bowel syndrome. Effects of differing doses of fructose-sorbitol. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 940-944 [PMID: 1455191]
380. Metchnikoff, E. *The Prolongation of Life. Optimistic Studies.* William Heinemann, London, UK, 1907.
381. Gordon S. Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *Eur J Immunol.* 2008 Dec;38(12):3257-64. doi: 10.1002/eji.200838855.
382. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics and prebiotics October 2011. Guarner F1, Khan AG, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, Krabshuis J, Lemair T, Kaufmann P, de Paula JA, Fedorak R, Shanahan F, Sanders ME, Szajewska H,

- Ramakrishna BS, Karakan T, Kim N; World Gastroenterology Organization. *J Clin Gastroenterol*. 2012 Jul;46(6):468-81. doi: 10.1097/MCG.0b013e3182549092.
383. Vaughan, R.B. The romantic rationalist: a study of Elie Metchnikoff. *Med Hist*. 1965 9: 201-215.
384. FAO/WHO (2001). Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health, and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria (Córdoba: Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization).
385. Hill,C.,Guarner,F.,Reid,G.,Gibson,G.R.,Merenstein,D.J.,Pot,B.,etal. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotic sconsensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2014 11, 506–514.doi: 10.1038/nrgastro.2014.66
386. FAO/WHO, Guidelines for the evaluation of probiotics in food – Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Meeting Report, London Ontario, Canada, 2002.
387. FAO/WHO, “Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation,” in FAO Food and Nutrition Paper no. 85 Roma, Italy, 2006.
388. Ministero della Salute Italiano. Linee guida probiotici e prebiotici; 2005.
389. Regulation (EC) n. 1924/2006 of the European parliament and of the council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. Official Journal of the European Union L 404 of 30 December 2006.
390. Aureli P, Capurso L, Castellazzi AM, Clerici M, Giovannini M, Morelli L, Poli A, Pregliasco F, Salvini F, Zuccotti GV. Probiotics and health: an evidence-based review. *Pharmacol Res*. 2011 May; 63(5):366-76.doi: 10.1016/j.phrs.2011.02.006. Epub 2011 Feb 22.
391. AFFSA. Effects of probiotics and prebiotics on flora and immunity in adults. 2005. Last access 13 january 2016:<https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT-Ra-PreprobiotiqEN.pdf>
392. Galdeano CM, Perdigón G. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *J Appl Microbiol*. 2004;97(4):673-81.
393. Kosin, B. and Rakshit S. K. Microbial and Processing Criteria for Production of probiotics : A Review. *Food Technology Biotechnology*, 2006; 44 (3): 371–379.
394. Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clin Infect Dis*. 2008 Feb 1;46 Suppl 2:S58-61; discussion S144-51. doi: 10.1086/523341.
395. Salminen S, Ouwehand A C, Benno Y, Lee Y K. Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Sci Technol*. 1999;10:107–110.

396. Lahtinen SJ. Probiotic viability – does it matter? *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2012;23:10.3402/mehd.v23i0.18567. doi:10.3402/mehd.v23i0.18567.
397. Samadikuchaksaraei A, Gholipourmalekabadi M, Saberian M, Abdollahpour Alitappeh M, Shahidi Delshad E. How does the supernatant of *Lactobacillus acidophilus* affect the proliferation and differentiation activities of rat bone marrow-derived stromal cells? *Cell Mol Biol* 2016;62:1-6.
398. Medina M, Izquierdo E, Ennahar S, Sanz Y. Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium logum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clin Exp Immunol* 2007;150:531–8.
399. Jacobsen CN, Rosenfeldt Nielsen V, Hayford AE, Moller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A, et al. 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. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:4949–56.
400. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to non-characterised micro-organisms pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 2012;10(8):2854. [36 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2012.2854. Available online: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal)
401. Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2015 on novel foods, amending Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council and repealing Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council and Commission Regulation (EC) No 1852/2001. *Official Journal of the European Union* L 404 of 11 December 2015.
402. European Food Safety Authority (EFSA) (2005a) Qualified presumption of safety of micro organisms in food and feed. EFSA Scientific Colloquium Summary Report, October 2005.
403. EFSA. Opinion of the scientific committee on introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J* 2007;587: 1e-16.4.
404. Jansen WT, van der Bruggen JT, Verhoef J, Fluit AC. Bacterial resistance: a sensitive issue complexity of the challenge and containment strategy in Europe. *Drug Resist Updat* 2006;9:123–33.
405. SCAN (2002) Opinion of the scientific committee on animal nutrition on the criteria for assessing the safety of micro-organisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. European Commission. Health and Consumer Protection Directorate General; Directorate C-Scientific Opinions, 18 April.
406. European Food Safety Authority (EFSA) (2005b) Opinion of the scientific panel on additives and products in substances used in animal feed on the updating of criteria used in

- the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J* 223. 1-12.
407. European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP); Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J* 2012;10 (6):2740. [10 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2740.
408. Vasiljevic T, Shah NP. Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. *Int Dairy J*. 2008;18(7):714–28.
409. Mercenier A, Lenior-Wijnkoop I, Sanders ME. 2008. Physiological and functional properties of probiotics. *Bulletin of the International Dairy Federation* 429/2008.
410. Thomas CM, Versalovic J. Probiotics-host communication: modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes* 2010;1:1–16.
411. Rijkers GT, Bengmark S, Enck P, Haller D, Herz U, Kalliomaki M, Kudo S, Lenoir-Wijnkoop I, Mercenier A, Myllyluoma E, Rabot S, Rafter J, Szajewska H, Watzl B, Wells J, Wolvers D, Antoine JM (2010) Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research. *J Nutr* 140(3):671S–676S.
412. Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, de Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes & Nutrition*. 2011;6(3):209-240. doi:10.1007/s12263-011-0229-7.
413. McNaught CE, MacFie J. Probiotics in clinical practice: a critical review of the evidence. *Nutrition Research*. 2001;21(1-2):343–353.
414. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: Effects on immunity. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(2 Suppl):444S–50S.
415. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003 Feb 8;361(9356):512-9.
416. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr*. 2001 Feb;73(2 Suppl):365S-373S.
417. Bourdichon F, Casaregola S, Farrokh C, Frisvad JC, Gerds ML, Hammes WP, Harnett J, Huys G, Laulund S, Ouwehand A, Powell IB, Prajapati JB, Seto Y, Ter Schure E, Van Boven A, Vankerckhoven V, Zgoda A, Tuijelaars S, Hansen EB. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Int J Food Microbiol*. 2012 Mar 15;154(3):87-97. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030. Epub 2011 Dec 31.
418. Mattarelli, P., Biavati, B., Hammes, W. and H. Holzapfel, W. (2014) Guidelines for characterizing LAB, bifidobacteria and related genera for taxonomic purposes, in Lactic

- Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy (eds W. H. Holzapfel and B. J.B. Wood), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. doi: 10.1002/9781118655252.app1
419. Wells JM. Immunomodulatory mechanisms of Lactobacilli. *Microb Cell Fact* 2011;10 Suppl 1:S17.
420. Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005 Sep 15;22(6):495-512.
421. Varankovich NV, Nickerson MT, Korber DR. Probiotic-based strategies for therapeutic and prophylactic use against multiple gastrointestinal diseases. *Frontiers in Microbiology* 2015;6:685. doi:10.3389/fmicb.2015.00685.
422. Hayek S.A. and Ibrahim S.A. Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences* 2013; 4, 73-87.
423. Morelli, L., Calleagri, M.L., Vogensen, F.K. and von Wright, A. (2012) Genetics of Lactic Acid Bacteria. In: Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S. and von Wright, A., Eds., Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 4th Edition, Taylor & Francis Group LLC, CRC Press, Boca Raton, 17-38.
424. Alakomi HL, Skytta E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM: Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66:2001-5.
425. Duncan SH, Louis P, Thomson JM, Flint HJ. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environ Microbiol.* 2009 Aug;11(8):2112-22. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01931.x. Epub 2009 Apr 21.
426. Hempel, S., Newberry, S., Ruelaz, A., Wang, Z. et al., Safety of probiotics used to reduce risk and prevent or treat disease: State of the research. Evidence Report/Technology Assessment No. HHS A290-2007-10062-I. AHRQ Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality. Available from: <http://www.ahrq.gov/clinic/tp/probioctp.htm>
427. Quinto E.J., Jiménez P., Caro I., Tejero J., Mateo J. and Girbés T. Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences* 2014;5, 1765-1775. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2014.518190>.
428. Reid G. Probiotics and prebiotics—progress and challenges. *Int Dairy J* 2008;18:969-75.
429. Reid G, Younes JA, Van der Mei HC, Gloor GB, Knight R, Busscher HJ. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol* 2011 Jan;9(1):27e38. PubMed PMID: 21113182.
430. Ringel Y, Quigley EMM, and Lin HC. Using probiotics in gastrointestinal disorders. *American Journal of Gastroenterology Supplements* 1 2012; 34–40.

431. Floch MH, Walker WA, Sanders ME, Nieuwdorp M, Kim AS, Brenner DA, et al. Recommendations for probiotic use-2015 update: proceedings and consensus opinion. *J Clin Gastroenterol* 2015 Nov-Dec;49(Suppl. 1):S69e73. PubMed PMID: 26447969.
432. Hod K, Ringel Y. Probiotics in functional bowel disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2016 Feb;30(1):89-97. doi: 10.1016/j.bpg.2016.01.003. Epub 2016 Jan 14.
433. Allen SJ, Okoko B, Martinez E, Gregorio G, Dans LF. Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;(2):CD003048.
434. Allen SJ, Martinez EG, Gregorio GV, Dans LF. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Nov 10;(11):CD003048. doi:10.1002/14651858.CD003048.pub3.
435. Sazawal S, Hiremath G, Dhingra U, Malik P, Deb S, Black RE. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infect Dis* 2006;6:374–82.
436. Szajewska H, Mrukowicz JZ. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2001 Oct; 33 Suppl 2:S17-25.
437. Huang JS, Bousvaros A, et al. Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis. *Dig Dis Sci*. 2002 Nov;47(11):2625-34.
438. Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, Christakis DA. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 2002;109:678-84.
439. Hickson M, D'Souza AL, Muthu N, Rogers TR, Want S, Rajkumar C, et al. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ* 2007;335:80.
440. Hempel S, Newberry SJ, Maher AR, Wang Z, Miles JN, Shanman R, Johnsen B, Shekelle PG. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2012 May 9;307(18):1959-69. doi: 10.1001/jama.2012.3507.
441. De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. Probiotics--compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr*. 2001 Feb;73(2 Suppl):421S-429S.
442. Sang LX, Chang B, Zhang WL, Wu XM, Li XH, Jiang M. Remission induction and maintenance effect of probiotics on ulcerative colitis: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2010 Apr 21;16(15):1908-15.
443. Naidoo K, Gordon M, Fagbemi AO, Thomas AG, Akobeng AK. Probiotics for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; (12): CD007443 [PMID:22161412 DOI: 10.1002/14651858.CD007443.pub2]

444. Holubar SD, Cima RR, Sandborn WJ, Pardi DS. Treatment and prevention of pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Jun 16;(6):CD001176. doi: 10.1002/14651858.CD001176.pub2.
445. Rahimi R, Nikfar S, Rahimi F, Elahi B, Derakhshani S, Vafaie M, Abdollahi M. A meta-analysis on the efficacy of probiotics for maintenance of remission and prevention of clinical and endoscopic relapse in Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 2008 Sep;53(9):2524-31. doi: 10.1007/s10620-007-0171-0. Epub 2008 Feb 14.
446. Johannsen H, Prescott SL. Practical prebiotics, probiotics and synbiotics for allergists: how useful are they? *Clin Exp Allergy* 2009;39:1801–14.
447. Yao TC, Chang CJ, Hsu YH, Huang JL. Probiotics for allergic diseases: realities and myths. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21:900–19.
448. Boyle RJ, Bath-Hextall FJ, Leonardi-Bee J, Murrell DF, Tang ML. Probiotics for the treatment of eczema: a systematic review. *Clin Exp Allergy*. 2009;39:1117–27.
449. Van der Aa LB, Heymans HS, van Aalderen WM, Sprickelman AB. Probiotics and prebiotics in atopic dermatitis: review of the theoretical background and clinical evidence. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21:e355–67.
450. Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006;130:1377-1390.
451. McFarland LV, Dublin S. Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2008 May 7;14(17):2650e61. PubMed PMID: 18461650.
452. Hoveyda N, Heneghan C, Mahtani KR, Perera R, Roberts N, Glasziou P. A systematic review and meta-analysis: probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol* 2009;9:15. PubMed PMID: 19220890.
453. Brenner DM, Moeller MJ, Chey WD, Schoenfeld PS. The utility of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Am J Gastroenterol*. 2009 Apr;104(4):1033-49; quiz 1050. doi: 10.1038/ajg.2009.25. Epub 2009 Mar 10.
454. Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, Cremonini F, Foxx-Orenstein AE, Brandt LJ, Quigley EM. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut* 2010; 59: 325-332 [PMID: 19091823 DOI: 10.1136/gut.2008.167270]
455. Clarke G, Cryan JF, Dinan TG, Quigley EM. Review article: probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome-- focus on lactic acid bacteria. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 35: 403-413 [PMID: 22225517 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2011.04965.x]
456. Ortiz-Lucas M, Tobias A, Saz P, Sebastian JJ. Effect of probiotic species on irritable bowel syndrome symptoms: a bring up to date meta-analysis. *Rev Esp Enferm Dig* 2013 Jan;105(1):19e36. PubMed PMID: 23548007.

457. Hungin AP, Mulligan C, Pot B, Whorwell P, Agreus L, Fracasso P, et al. Systematic review: probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms in clinical practice and an evidence-based international guide. *Aliment Pharmacol Ther* 2013 Oct;38(8):864e86. PubMed PMID: 23981066. Pubmed Central PMCID: 3925990.
458. Didari T, Mozaffari S, Nikfar S, Abdollahi M. Effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome: updated systematic review with meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2015 Mar 14;21(10):3072e84. PubMed PMID: 25780308. Pubmed Central PMCID: 4356930.
459. Ford AC, Quigley EM, Lacy BE, Lembo AJ, Saito YA, Schiller LR, et al. Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014 Oct;109(10):1547e61. quiz 6, 62. PubMed PMID: 25070051.
460. Enck P, Zimmermann K, Menke G, Müller-Lissner S, Martens U, Klosterhalfen S. A mixture of *Escherichia coli* (DSM 17252) and *Enterococcus faecalis* (DSM 16440) for treatment of the irritable bowel syndrome--a randomized controlled trial with primary care physicians. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 1103-1109 [PMID:18565142 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2008.01156.x]
461. Enck P, Zimmermann K, Menke G, Klosterhalfen S. Randomized controlled treatment trial of irritable bowel syndrome with a probiotic *E.-coli* preparation (DSM17252) compared to placebo. *Z Gastroenterol* 2009; 47: 209-214 [PMID: 19197823 DOI: 10.1055/s-2008-1027702]
462. Zeng J, Li YQ, Zuo XL, Zhen YB, Yang J, Liu CH. Clinical trial: effect of active lactic acid bacteria on mucosal barrier function in patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 994-1002 [PMID: 18671775 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2008.03818.x]
463. Kajander K, Myllyluoma E, Rajilic-Stojanovic M, Kyrönpalo S, Rasmussen M, Järvenpää S, Zoetendal EG, de Vos WM, Vapaatalo H, Korpela R. Clinical trial: multispecies probiotic supplementation alleviates the symptoms of irritable bowel syndrome and stabilizes intestinal microbiota. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 48-57 [PMID: 17919270]
464. Drouault-Holowacz S, Bieuvelet S, Burckel A, Cazaubiel M, Dray X, Marteau P. A double blind randomized controlled trial of a probiotic combination in 100 patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterol Clin Biol* 2008; 32: 147-152 [PMID:18387426 DOI: 10.1016/j.gcb.2007.06.001]
465. Williams EA, Stimpson J, Wang D, Plummer S, Garaiova I, Barker ME, Corfe BM. Clinical trial: a multistrain probiotic preparation significantly reduces symptoms of irritable bowel syndrome in a double-blind placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 29: 97-103 [PMID: 18785988 DOI:10.1111/j.1365-2036.2008.03848.x]

466. Simrén M, Ohman L, Olsson J, Svensson U, Ohlson K, Posserud I, Strid H. Clinical trial: the effects of a fermented milk containing three probiotic bacteria in patients with irritable bowel syndrome -a randomized, double-blind, controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31: 218-227 [PMID: 19863495 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2009.04183.x]
467. Søndergaard B, Olsson J, Ohlson K, Svensson U, Bytzer P, Ekesbo R. Effects of probiotic fermented milk on symptoms and intestinal flora in patients with irritable bowel syndrome: a randomized, placebo-controlled trial. *Scand J Gastroenterol* 2011;46: 663-672 [PMID: 21443416 DOI: 10.3109/00365521.2011.565066]
468. Kruis W, Chrubasik S, Boehm S, Stange C, Schulze J. A double blind placebo-controlled trial to study therapeutic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in subgroups of patients with irritable bowel syndrome. *Int J Colorectal Dis* 2012; 27: 467-474 [PMID: 22130826 DOI: 10.1007/s00384-011-1363-9]
469. Sinn DH, Song JH, Kim HJ, Lee JH, Son HJ, Chang DK, Kim YH, Kim JJ, Rhee JC, Rhee PL. Therapeutic effect of *Lactobacillus acidophilus*-SDC 2012, 2013 in patients with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2714-2718 [PMID: 18274900 DOI: 10.1007/s10620-007-0196-4]
470. Guglielmetti S, Mora D, Gschwender M, Popp K. Randomised clinical trial: *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 significantly alleviates irritable bowel syndrome and improves quality of life-a double-blind, placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 33: 1123-1132 [PMID: 21418261 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2011.04633.x]
471. Ducrotté P, Sawant P, Jayanthi V. Clinical trial: *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 4012-4018 [PMID: 22912552 DOI: 10.3748/wjg.v18.i30.4012]
472. Ki Cha B, Mun Jung S, Hwan Choi C, Song ID, Woong Lee H, Joon Kim H, Hyuk J, Kyung Chang S, Kim K, Chung WS, Seo JG. The effect of a multispecies probiotic mixture on the symptoms and fecal microbiota in diarrhea-dominant irritable bowel syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Gastroenterol* 2012; 46: 220-227 [PMID: 22157240 DOI:10.1097/MCG.0b013e31823712b1]
473. Dapoigny M, Piche T, Ducrotte P, Linaud B, Cardot JM, Bernalier-Donadille A. Efficacy and safety profile of LCR35 complete freeze-dried culture in irritable bowel syndrome: a randomized, double-blind study. *World J Gastroenterol* 2012; 18:2067-2075 [PMID: 22563194 DOI: 10.3748/wjg.v18.i17.2067]
474. Roberts LM, McCahon D, Holder R, Wilson S, Hobbs FD. A randomised controlled trial of a probiotic 'functional food' in the management of irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol* 2013; 13: 45 [PMID: 23496803 DOI: 10.1186/1471-230X-13-45]

475. Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, McQuay HJ. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials* 1996; 17: 1-12 [PMID: 8721797]
476. O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, Hurley G, Luo F, Chen K, et al. Lactobacillus and Bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* 2005 Mar;128(3):541e51. PubMed PMID: 15765388.
477. Whorwell PJ, Altringer L, Morel J, Bond Y, Charbonneau D, O'Mahony L, et al. Efficacy of an encapsulated probiotic Bifidobacterium infantis 35624 in women with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2006 Jul;101(7):1581e90. PubMed PMID: 16863564.
478. Kajander K, Hatakka K, Poussa T, Färkkilä M, Korpela R. A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: a controlled 6-month intervention. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005 Sep 1;22(5):387-94.
479. Kim HJ, Camilleri M, McKinzie S, Lempke MB, Burton DD, Thomforde GM, et al. A randomized controlled trial of a probiotic, VSL#3, on gut transit and symptoms in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2003 Apr 1;17(7):895e904. PubMed PMID: 12656692.
480. Kim HJ, Vazquez Roque MI, Camilleri M, Stephens D, Burton DD, Baxter K, et al. A randomized controlled trial of a probiotic combination VSL# 3 and placebo in irritable bowel syndrome with bloating. *Neurogastroenterol Motil* 2005 Oct;17(5):687e96. PubMed PMID: 16185307.
481. Guandalini S, Magazzu G, Chiaro A, La Balestra V, Di Nardo G, Gopalan S, et al. VSL#3 improves symptoms in children with irritable bowel syndrome: a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010 Jul;51(1):24e30. PubMed PMID: 20453678.
482. Michail S, Kenche H. Gut microbiota is not modified by randomized, double-blind, placebo-controlled trial of VSL#3 in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2011 Mar;3(1):1e7. PubMed PMID:22247743. Pubmed Central PMCID: 3255476.
483. DiBaise JK, Lof J, Taylor K, Quigley EM. Lactobacillus plantarum 299V in the irritable bowel syndrome: A randomized, double-blind, placebo-controlled crossover study. *Gastroenterology* 2000; 118 Suppl 2: A3163.
484. Sen S, Mullan MM, Parker TJ, Woolner JT, Tarry SA, Hunter JO. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on colonic fermentation and symptoms of irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci*. 2002 Nov;47(11):2615-20.

485. Nobaek S, Johansson ML, et al. Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:1231-8.
486. Niedzielin K, Kordecki H, Birkenfeld B. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:1143-7.
487. Simren M, Syrous A, Lindh A, Abrahamsson H. Effects of *Lactobacillus plantarum* 299v on symptoms and rectal sensitivity in patients with irritable bowel syndrome (IBS) - A randomized, double-blind controlled trial. *Gastroenterology* 2006; 130 Suppl 2: A600.
488. Dolin BJ. Effects of a proprietary *Bacillus coagulans* preparation on symptoms of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2009; 31: 655-659 [PMID:20140275 DOI: 10.1358/mf.2009.31.10.1441078]
489. Hun L. *Bacillus coagulans* significantly improved abdominal pain and bloating in patients with IBS. *Postgrad Med* 2009; 121:119-124 [PMID: 19332970 DOI: 10.3810/pgm.2009.03.1984]
490. Agrawal A, Houghton LA, Morris J, Reilly B, Guyonnet D, Goupil Feuillerat N, et al. Clinical trial: the effects of a fermented milk product containing *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 on abdominal distension and gastrointestinal transit in irritable bowel syndrome with constipation. *Aliment Pharmacol Ther* 2009 Jan 29(1):104e14. PubMed PMID: 18801055.
491. Guyonnet D, Chassany O, Ducrotte P, Picard C, Mouret M, Mercier CH, et al. Effect of a fermented milk containing *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: a multicentre, randomized, double-blind, controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2007 Aug 1;26(3):475e86. PubMed PMID: 17635382.
492. Guandalini S, Magazzu G, Chiaro A, La Balestra V, Di Nardo G, Gopalan S, et al. VSL#3 improves symptoms in children with irritable bowel syndrome: a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010 Jul;51(1):24e30. PubMed PMID: 20453678.
493. Gawronska A, Dziechciarz P, Horvath A, Szajewska H. A randomized double-blind placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG for abdominal pain disorders in children. *Aliment Pharmacol Ther* 2007 Jan;15;25(2):177e84. PubMed PMID:17229242.
494. Francavilla R, Miniello V, Magista AM, De Canio A, Bucci N, Gagliardi F, et al. A randomized controlled trial of *Lactobacillus* GG in children with functional abdominal pain. *Pediatrics* 2010 Dec;126(6):e1445e52. PubMed PMID: 21078735.

495. Bauserman M, Michail S. The use of Lactobacillus GG in irritable bowel syndrome in children: a double-blind randomized control trial. *J Pediatr* 2005 Aug;147(2):197e201. PubMed PMID: 16126049.
496. Simrén M, Barbara G, Flint HJ, Spiegel BM, Spiller RC, Vanner S, Verdù EF, Whorwell PJ, Zoetendal EG. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut* 2013;62: 159-176 [PMID: 22730468 DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302167]
497. Tsuchiya J, Barreto R, Okura R, Kawakita S, Fesce E, Marotta F. Single-blind follow-up study on the effectiveness of a symbiotic preparation in irritable bowel syndrome. *Chin J Dig Dis* 2004; 5: 169-174 [PMID: 15612887 DOI: 10.1111/j.1443-9573.2004.00176.x]
498. Bittner AC, Croffut RM, Stranahan MC. Prescript-Assist probiotic-prebiotic treatment for irritable bowel syndrome: a methodologically oriented, 2-week, randomized, placebocontrolled, double-blind clinical study. *Clin Ther* 2005; 27:755-761 [PMID: 16117982 DOI: 10.1016/j.clinthera.2005.06.005]
499. Colecchia A, Vestito A, La Rocca A, et al. Effect of a symbiotic preparation on the clinical manifestations of irritable bowel syndrome, constipation-variant. Results of an open, uncontrolled multicenter study. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2006; 52:349e58.
500. Bittner AC, Croffut RM, Stranahan MC, et al. Prescript-assist probiotic-prebiotic treatment for irritable bowel syndrome: an open-label, partially controlled, 1-year extension of a previously published controlled clinical trial. *Clin Ther* 2007; 29:1153e60.
501. Andriulli A, Neri M, Loguercio C, et al. Clinical trial on the efficacy of a new symbiotic formulation, flortec, in patients with irritable bowel syndrome: a multicenter, randomized study. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42(Suppl 3):S218e23.
502. Cappello C, Tremolterra F, Pascariello A, Ciacci C, Iovino P. A randomised clinical trial (RCT) of a symbiotic mixture in patients with irritable bowel syndrome (IBS): effects on symptoms, colonic transit and quality of life. *Int J Colorectal Dis* 2013; 28: 349. doi:10.1007/s00384-012-1552-1
503. Rogha M, Esfahani MZ, Zargarzadeh AH. The efficacy of a synbiotic containing Bacillus Coagulans in treatment of irritable bowel syndrome: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2014;7:156-163 [PMID:25120896]
504. Saneian H, Pourmoghaddas Z, Roohafza H, Gholamrezaei A. Synbiotic containing Bacillus coagulans and fructo-oligosaccharides for functional abdominal pain in children. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2015; 8: 56-65 [PMID: 25584177]
505. Drossman, D. A. & Thompson, W. G. The irritable bowel syndrome: review and a graduated multicomponent treatment approach. *Ann. Intern. Med.* 1992;116, 1009–1016.
506. Mertz HR. Irritable bowel syndrome. *N Engl J Med* 2003; 349(22):2136–46.

507. Kajander K, Krogius-Kurikka L, Rinttilä T, Karjalainen H, Palva A, Korpela R. Effects of multispecies probiotic supplementation on intestinal microbiota in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Aug 1;26(3):463-73.
508. Lyra A, Krogius-Kurikka L, Nikkilä J, et al. Effect of a multispecies probiotic supplement on quantity of irritable bowel syndrome-related intestinal microbial phylotypes. *BMC Gastroenterology.* 2010;10:110. doi:10.1186/1471-230X-10-110.
509. Verdú EF, Bercik P, Verma-Gandhu M, et al. Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice. *Gut* 2006;55:182-190.
510. Kamiya T, Wang L, Forsythe P, et al. Inhibitory effects of *Lactobacillus reuteri* on visceral pain induced by colorectal distension in Sprague-Dawley rats. *Gut.* 2006;55(2):191-196. doi:10.1136/gut.2005.070987.
511. Johnson AC, Greenwood-Van Meerveld B, McRorie J. Effects of *Bifidobacterium infantis* 35624 on post-inflammatory visceral hypersensitivity in the rat. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 3179-3186 [PMID:21562785 DOI: 10.1007/s10620-011-1730-y]
512. Distrutti E, Cipriani S, Mencarelli A, Renga B, Fiorucci S. Probiotics VSL#3 protect against development of visceral pain in murine model of irritable bowel syndrome. *PLoS One* 2013; 8:e63893 [PMID: 23691109 DOI: 10.1371/journal.pone.0063893]
513. Rousseaux C, Thuru X, Gelot A, Barnich N, Neut C, Dubuquoy L, Dubuquoy C, Merour E, Geboes K, Chamailard M, Ouwehand A, Leyer G, Carcano D, Colombel JF, Ardid D, Desreumaux P. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat Med* 2007; 13: 35-37 [PMID:17159985 DOI: 10.1038/nm1521]
514. Tillisch K, Labus J, Kilpatrick L, et al. Consumption of Fermented Milk Product With Probiotic Modulates Brain Activity. *Gastroenterology.* 2013;144(7):10.1053/j.gastro.2013.02.043. doi:10.1053/j.gastro.2013.02.043.
515. Ludidi S, Jonkers DM, Koning CJ, Kruimel JW, Mulder L, van der Vaart IB, Conchillo JM, Masclee AA. Randomized clinical trial on the effect of a multispecies probiotic on visceroperception in hypersensitive IBS patients. *Neurogastroenterol Motil* 2014; 26:705-714 [PMID: 24588932 DOI: 10.1111/nmo.12320]
516. Waller PA, Gopal PK, Leyer GJ, et al. Dose-response effect of *Bifidobacterium lactis* HN019 on whole gut transit time and functional gastrointestinal symptoms in adults. *Scandinavian Journal of Gastroenterology.* 2011;46(9):1057-1064. doi:10.3109/00365521.2011.584895.
517. Eskesen D, Jespersen L, Michelsen B, Whorwell PJ, Müller-Lissner S, Morberg CM. Effect of the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, on defecation frequency in healthy subjects with low defecation frequency and abdominal discomfort: a

- randomised, double-blind, placebocontrolled, parallel-group trial. *Br J Nutr* 2015; 114: 1638-1646 [PMID: 26382580 DOI: 10.1017/S0007114515003347]
518. Massi M, Ioan P, Budriesi R, et al. Effects of probiotic bacteria on gastrointestinal motility in guinea-pig isolated tissue. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2006;12(37):5987-5994. doi:10.3748/wjg.v12.i37.5987.
519. Wu RY, Pasyk M, Wang B, Forsythe P, Bienenstock J, Mao YK, Sharma P, Stanisz AM, Kunze WA. Spatiotemporal maps reveal regional differences in the effects on gut motility for *Lactobacillus reuteri* and *rhamnosus* strains. *Neurogastroenterol Motil* 2013; 25: e205-e214 [PMID: 23316914 DOI:10.1111/nmo.12072]
520. Paturi G, Phillips M, Jones M, Kailasapathy K. Immune enhancing effects of *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 and *Lactobacillus paracasei* LAFTI L26 in mice. *Int J Food Microbiol* 2007;115:115-8.
521. Paturi G, Phillips M, Kailasapathy K. Effect of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 and *Lactobacillus paracasei* LAFTI L26 on systemic immune functions and bacterial translocation in mice. *J Food Prot* 2008;71:796-801.
522. Abbas Z, Yakoob J, Jafri W, Ahmad Z, Azam Z, Usman MW, Shamim S, Islam M. Cytokine and clinical response to *Saccharomyces boulardii* therapy in diarrhea-dominant irritable bowel syndrome: a randomized trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2014; 26: 630-639 [PMID: 24722560 DOI: 10.1097/MEG.0000000000000094]
523. Pineton de Chambrun G, Neut C, Chau A, Cazaubiel M, Pelerin F, Justen P, Desreumaux P. A randomized clinical trial of *Saccharomyces cerevisiae* versus placebo in the irritable bowel syndrome. *Dig Liver Dis*. 2015 Feb;47(2):119-24. doi: 10.1016/j.dld.2014.11.007. Epub 2014 Nov 13.
524. Yan F, Cao H, Cover TL, Washington MK, Shi Y, Liu L, Chaturvedi R, Peek RM, Wilson KT, Polk DB. Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2011; 121: 2242-2253 [PMID: 21606592 DOI: 10.1172/JCI44031]
525. Gareau MG, Jury J, MacQueen G, Sherman PM, Perdue MH. Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. *Gut* 2007; 56: 1522-1528 [PMID: 17339238 DOI:10.1136/gut.2006.117176]
526. Barouei J, Moussavi M, Hodgson DM. Effect of maternal probiotic intervention on HPA axis, immunity and gut microbiota in a rat model of irritable bowel syndrome. *PLoS One* 2012; 7:e46051 [PMID: 23071537 DOI: 10.1371/journal.pone.0046051]

527. Savignac HM, Tramullas M, Kiely B, Dinan TG, Cryan JF. Bifidobacteria modulate cognitive processes in an anxious mouse strain. *Behav Brain Res* 2015; 287: 59-72 [PMID: 25794930 DOI:10.1016/j.bbr.2015.02.044]
528. Maixent JM. Opinion paper food supplements: the European regulation and its application in France. Thoughts on safety of food supplements. *Cell Mol Biol* 2012;58 Suppl:OL1720-9.
529. Richardson. D.P., Affertsholt. T., Asp. N., Bruce. A., Grossklaus. R., Howlett. J., Pannemans. D., Ross. R., Verhagen. H. and Viechtbauer.V. PASSCLAIM - Synthesis and review of existing processes. *Eur J Nutr* 2003, 42 Suppl 1: I96-111.
530. Aggett. P.J., Antoine. J., Asp. N., Bellisle. F., Contor. L., Cummings. J.H., Howlett. J., Muller. D.J.G., Persin. C., Pijls. L.T.J., Rechkemmer. G., Tuijelaars. S. and Verhagen.H. PASSCLAIM: consensus on criteria. *Eur J Nutr* 2005, 44 Suppl 1: i5-30.
531. Asp. N. and Bryngelsson.S. Health claims in Europe: new legislation and PASSCLAIM for substantiation. *J. Nutr.* 2008, 138: 1210S-5S.
532. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Guidance on the scientific requirements for health claims related to the immune system, the gastrointestinal tract and defence against pathogenic microorganisms. *EFSA Journal* 2016;14(1):4369.
533. Salminen S, van Loveren H. Probiotics and prebiotics: health claim substantiation. *Microbial Ecology in Health and Disease.* 2012;23:10.3402/mehd.v23i0.18568. doi:10.3402/mehd.v23i0.18568.
534. Niv E, Naftali T, Hallak R, Vaisman N. The efficacy of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the treatment of patients with irritable bowel syndrome – a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *Clin Nutr* 2005;24:925-31.
535. Sanders ME, Klaenhammer TR. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J Dairy Sci* 2001;84:319-31.
536. Welin A, Henriksson A. Survival of *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 and *Lactobacillus casei* LAFTI L26 in the human gastrointestinal tract and perceived effects on health, conducted at University of New South Wales (UNSW), Australia, January-September 2003 and approved by the UNSW Human Ethics Committee. Internal DSM report (2004).
537. Mahoney M, Henriksson A. The effect of processed meat and meat starter cultures on gastrointestinal colonization and virulence of *Listeria monocytogenes* in mice. *Int J Food Microbiol* 2003;84:255-61.
538. Katan MB. Why the European Food Safety Authority was right to reject health claims for probiotics. *Benef Microbes.* 2012 Jun 1;3(2):85-9. doi: 10.3920/BM2012.0008.
539. Cheung CK, Wu JC. Genetic polymorphism in pathogenesis of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2014;20:17693-8.

540. Surdea-Blaga T, Băban A, Dumitrascu DL. Psychosocial determinants of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2012;18:616-26.
541. Lyra A, Hillilä M, Huttunen T, et al. Irritable bowel syndrome symptom severity improves equally with probiotic and placebo. *World J Gastroenterol* 2016; 22(48):10631-10642. doi:10.3748/wjg.v22.i48.10631.
542. Higgins JPT, Altman DG, Sterne, JAC (editors). Chapter 8: Assessing risk of bias in included studies. In: Higgins JPT, Green S (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011.
543. Azpiroz F, Bouin M, Camilleri M, Mayer EA, Poitras P, Serra J, Spiller RC. Mechanisms of hypersensitivity in IBS and functional disorders. *Neurogastroenterol Motil*. 2007 Jan;19(1 Suppl):62-88.
544. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Irritable Bowel Syndrome - Clinical Evaluation of Products for Treatment. May 2012. <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.
545. Ford AC, Moayyedi P. Meta-analysis: factors affecting placebo response rate in the irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;32:144-158.
546. Irvine EJ, Whitehead WE, Chey WD, Matsueda K, Shaw M, Talley NJ, Veldhuyzen van Zanten SJ : Design of Treatment Trials Committee. Design of treatment trials for functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology*. 2006 Apr;130(5):1538-51.
547. Musial F, Klosterhalfen S, Enck P. Placebo responses in patients with gastrointestinal disorders. *World J Gastroenterol* 2007;13: 3425–9.
548. Shah E, Pimentel M. Placebo Effect in Clinical Trial Design for Irritable Bowel Syndrome. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. 2014;20(2):163-170. doi:10.5056/jnm.2014.20.2.163.
549. Philippe D, Dubuquoy L, Groux H, Brun V, Chuoï-Mariot MT, Gaveriaux-Ruff C, Colombel JF, Kieffer BL, Desreumaux P. Anti-inflammatory properties of the mu opioid receptor support its use in the treatment of colon inflammation. *J Clin Invest*. 2003 May;111(9):1329-38.
550. Hillsley K, McCaul C, Aerssens J, Peeters PJ, Gijssen H, Moechars G et al. (2007). Activation of the cannabinoid 2 (CB2) receptor inhibits murine mesenteric afferent nerve activity. *Neurogastroenterol Motil* e-pub ahead of print 21 May 2007.
551. Ringel-Kulka T, Palsson OS, Maier D, Carroll I, Galanko JA, Leyer G, Ringel Y. Probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium lactis* Bi-07 versus placebo

- for the symptoms of bloating in patients with functional bowel disorders: a double-blind study. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45: 518-525 [PMID:21436726 DOI: 10.1097/MCG.0b013e31820ca4d6]
552. D'Souza B, Slack T, Wong SW, Lam F, Muhlmann M, Koestenbauer J, Dark J, Newstead G. Randomized controlled trial of probiotics after colonoscopy. *ANZ J Surg* 2015; Epub ahead of print [PMID: 26183594 DOI: 10.1111/ans.13225]
553. Ringel-Kulka T, Goldsmith JR, Carroll IM, Barros SP, Palsson O, Jobin C, Ringel Y. *Lactobacillus acidophilus* NCFM affects colonic mucosal opioid receptor expression in patients with functional abdominal pain - a randomised clinical study. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 40: 200-207 [PMID: 24853043 DOI: 10.1111/apt.12800]
554. Agrawal A, Houghton LA, Lea R, Morris J, Reilly B, Whorwell PJ. Bloating and distention in irritable bowel syndrome: the role of visceral sensation. *Gastroenterology* 2008;134:1882
555. Pimentel M, Talley NJ, Quigley EM, Hani A, Sharara A, Mahachai V. Report from the multinational irritable bowel syndrome initiative 2012. *Gastroenterology* 2013;144:e1-e5.
556. Villoria A, Azpiroz F, Burri E, Cisternas D, Soldevilla A, Malagelada JR. Abdomino-phrenic dyssynergia in patients with abdominal bloating and distension. *Am J Gastroenterol*. 2011 May;106(5):815-9. doi: 10.1038/ajg.2010.408.
557. Bull M, Plummer S, Marchesi J, Mahenthiralingam E. The life history of *Lactobacillus acidophilus* as a probiotic: a tale of revisionary taxonomy, misidentification and commercial success. *FEMS Microbiol Lett*. 2013 Dec;349(2):77-87. doi: 10.1111/1574-6968.12293. Epub 2013 Oct 24.
558. King TS, Elia M, Hunter JO. Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome. *Lancet* 1998; 352:1187±1189.
559. Salonen A, Nikkilä J, Jalanka-Tuovinen J, Immonen O, Rajilić-Stojanović M, Kekkonen RA, Palva A, de Vos WM. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *J Microbiol Methods*. 2010 May;81(2):127-34. doi: 10.1016/j.mimet.2010.02.007. Epub 2010 Feb 19.
560. Lagier JC, Million M, Hugon P, Armougom F, Raoult D. Human gut microbiota: repertoire and variations. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012 Nov 2;2:136. doi: 10.3389/fcimb.2012.00136. eCollection 2012.
561. Kim M, Yu Z. Variations in 16S rRNA-based microbiome profiling between pyrosequencing runs and between pyrosequencing facilities. *J Microbiol* 2014; 52: 355-365 [PMID: 24723104 DOI:10.1007/s12275-014-3443-3]

562. Trentacosti AM, He R, Burke LB, Griebel D, Kennedy DL. Evolution of clinical trials for irritable bowel syndrome: issues in end points and study design. *Am J Gastroenterol* 2010;105:731-735.
563. Engsbro AL, Simren M, Bytzer P. Short-term stability of subtypes in the irritable bowel syndrome: prospective evaluation using the Rome III classification. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 35:350-359 [PMID: 22176384 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2011.04948.x]
564. Lackner JM, Jaccard J, Keefer L, Firth R, Carosella AM, Sitrin M, Brenner D. The accuracy of patient-reported measures for GI symptoms: a comparison of real time and retrospective reports. *Neurogastroenterol Motil* 2014; 26: 1802-1811 [PMID: 25424582 DOI: 10.1111/nmo.12466]
565. Zia J, Schroeder J, Munson S, et al. Feasibility and Usability Pilot Study of a Novel Irritable Bowel Syndrome Food and Gastrointestinal Symptom Journal Smartphone App. *Clinical and Translational Gastroenterology*. 2016;7(3):e147-. doi:10.1038/ctg.2016.9.
566. Kontula P, Suihko ML, Von Wright A, Mattila-Sandholm T. The effect of lactose derivatives on intestinal lactic acid bacteria. *J Dairy Sci*. 1999 Feb;82(2):249-56.
567. Altermann E, Russell WM, Azcarate-Peril MA, Barrangou R, Buck BL, McAuliffe O, Souther N, Dobson A, Duong T, Callanan M, Lick S, Hamrick A, Cano R, Klaenhammer TR. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3906-3912 [PMID: 15671160 DOI: 10.1073/pnas.0409188102]
568. Ouwehand AC, Tiihonen K, Saarinen M, Putaala H, Rautonen N. Influence of a combination of *Lactobacillus acidophilus* NCFM and lactitol on healthy elderly: intestinal and immune parameters. *Br J Nutr*. 2009 Feb;101(3):367-75.
569. Huq T, Khan A, Khan RA, Riedl B, Lacroix M. Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013;53(9):909-16. doi: 10.1080/10408398.2011.573152. Epub 2008 Jul 18.
570. Jiang Y, Zheng Z, Zhang T, Hendricks G, Guo M. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCFM using polymerized whey proteins as wall material. *Int J Food Sci Nutr*. 2016 Sep;67(6):670-7. doi: 10.1080/09637486.2016.1194810. Epub 2016 Jun 16.
571. Blackshaw LA, Brookes SJH, Grundy D, Schemann M (2007). Sensory transmission in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 19 (Suppl 1): 1–19.
572. Bellini M, Gambaccini D, Stasi C, et al. Irritable bowel syndrome: a disease still searching for pathogenesis, diagnosis and therapy. *World Journal of Gastroenterology* 2014;20:8807–20.
573. Elsenbruch S, Rosenberger C, Bingel U, Forsting M, Schedlowski M, Gizewski ER. Patients with irritable bowel syndrome have altered emotional modulation of neural

- responses to visceral stimuli. *Gastroenterology*. 2010 Oct;139(4):1310-9. doi: 10.1053/j.gastro.2010.06.054. Epub 2010 Jun 22.
574. Elsenbruch S. Abdominal pain in Irritable Bowel Syndrome: a review of putative psychological, neural and neuro-immune mechanisms. *Brain Behav Immun*. 2011 Mar;25(3):386-94. doi: 10.1016/j.bbi.2010.11.010. Epub 2010 Nov 20.
575. Fukudo S. Stress and visceral pain: focusing on irritable bowel syndrome. *Pain*. 2013 Dec;154 Suppl 1:S63-70. doi: 10.1016/j.pain.2013.09.008. Epub 2013 Sep 8.
576. Böhn L, Störsrud S, Törnblom H, Bengtsson U, Simrén M. Self-reported food-related gastrointestinal symptoms in IBS are common and associated with more severe symptoms and reduced quality of life. *Am J Gastroenterol*. 2013 May;108(5):634-41. doi: 10.1038/ajg.2013.105.
577. Hall KT, Lembo AJ, Kirsch I, Ziogas DC, Douaiher J, Jensen KB, Conboy LA, Kelley JM, Kokkotou E, Kaptchuk TJ. Catechol-O-methyltransferase val158met polymorphism predicts placebo effect in irritable bowel syndrome. *PLoS One*. 2012;7(10):e48135. doi: 10.1371/journal.pone.0048135. Epub 2012 Oct 23.
578. Mearin F, Lacy BE, Chang L, Chey WD, Lembo AJ, Simren M, Spiller R. Bowel Disorders. *Gastroenterology*. 2016 Feb 18. pii: S0016-5085(16)00222-5. doi: 10.1053/j.gastro.2016.02.031. [Epub ahead of print]

## Résumé / Abstract

---

**Evaluation du bénéfice chez l'homme des probiotiques dans la prise en charge du syndrome de l'intestin irritable, méthodologie de l'essai contrôlé randomisé et allégations nutritionnelles et de santé**

Une allégation de santé dans l'UE nécessite des preuves cliniques de l'efficacité et de la sécurité d'une supplémentation nutritionnelle. Les probiotiques, en particulier les bactéries lactiques, rentrent dans ce cadre réglementaire dans lequel l'EFSA indique que les preuves obtenues chez des patients avec des troubles fonctionnels intestinaux sont transposables chez une population de sujets sains. Le protocole LAPIBSS est un essai clinique de haute qualité méthodologique évaluant l'efficacité de 2 souches de *Lactobacillus acidophilus* à diminuer la sévérité des symptômes du syndrome de l'intestin irritable. Les résultats confirment la sécurité d'emploi des souches utilisées mais ne montrent pas une diminution significative des symptômes comparée au placebo après 8 semaines. L'effet global du traitement est statistiquement significatif sur le score de flatulence. Un effet placebo et l'hétérogénéité importante de la sévérité des symptômes à l'inclusion pourraient expliquer nos résultats. Une meilleure compréhension des effets physiologiques des probiotiques chez l'homme pourrait améliorer le rationnel de leur utilisation en recherche clinique.

**Mot clés:** Allégation de santé, Probiotiques, Essais cliniques.

**Assessment of benefit in human of probiotics in the irritable bowel syndrome management, randomized controlled trial methodology and nutrition and health claims**

A health claim across the EU requires clinical evidence about the efficacy and safety of a nutritional supplementation. Probiotics, especially lactic acid bacteria, fall within this regulatory framework in which EFSA indicates that the evidence from patients with functional gastrointestinal disorder are transferable in a population of healthy subjects. The LAPIBSS protocol is a high-quality clinical trial assessing the efficacy of 2 strains of *Lactobacillus acidophilus* to reduce the irritable bowel syndrome symptoms severity. Results confirm the safety of strains used but do not show a significant decrease of symptoms compared with placebo after 8 weeks. The overall treatment effect is statistically significant on the flatus score. A placebo effect and the considerable heterogeneity of symptoms severity at baseline would explain our results. A better understanding of physiological effects of probiotics in human would be needed to upgrade the rationale for their use in clinical research.

**Keywords:** Health claim, Probiotiques, Clinical trials.