

Probiotiques et infections entériques

Durée : 06/2000 – 06/2002

RÉSUMÉ

Le secteur des probiotiques est en pleine effervescence compte tenu des divers effets thérapeutiques et prophylactiques qui ont été associés à la consommation de ces produits. Toutefois, et malgré ces nombreuses allégations, le marché des probiotiques n'a jamais connu le niveau de popularité escompté. En effet, très peu de preuves scientifiques ont été rapportées dans la littérature pour valider les allégations santé souvent revendiquées pour ces produits. Des études plus rigoureuses, susceptibles de confirmer ces allégations, sont une priorité pour le secteur des probiotiques et une condition nécessaire à son éclosion et à sa croissance. L'objectif du présent projet est de démontrer, à travers des modèles *in vivo* bien définis, le potentiel de certaines souches de bactéries probiotiques à prévenir et à contrôler certaines infections entériques, bactériennes ou virales.

Des souches de bifidobactéries ont été isolées à partir des échantillons de matière fécale de bébés. Le potentiel probiotique de ces souches a été ensuite évalué *in vitro* par la détermination de la résistance à différentes conditions d'acidité et de concentrations en sels biliaires, en H₂O₂ et en lysozymes ainsi que par la détermination du pouvoir d'adhésion aux cellules intestinales (Caco-2). Les souches sélectionnées ont été testées pour leur capacité à inhiber *in vitro* différents pathogènes entériques notamment *E. coli* O157 : H7. L'efficacité des souches sélectionnées a ensuite été validée *in vivo* en utilisant un modèle murin simulant une infection entérique à *E. coli* O157 : H7.

OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIE

Objectif spécifique 1 :

Isoler et caractériser des souches de bifidobactéries à fort potentiel probiotique à partir de matières fécales de nouveau-nés.

Objectif spécifique 2 :

Étudier *in vitro* le potentiel des souches de bifidobactéries d'origine humaine isolées à inhiber certains pathogènes entériques.

Objectif spécifique 3 :

Étudier *in vivo* le potentiel de souches de bifidobactéries d'origine humaine sélectionnées à contrôler une infection entérique à *E. coli* O157 : H7.

RÉSULTATS ET APPLICATIONS

Objectif spécifique 1 :

Isolement et caractérisation des souches de bifidobactéries ayant une activité inhibitrice contre des pathogènes entériques (complété à 100 %).

Une centaine de souches de bifidobactéries ont été isolées sur différents milieux sélectifs à partir de matières fécales de nouveau-nés. Des souches ATCC ont été considérées comme souches de référence lors de cette étude. Le genre *Bifidobacterium* a été confirmé par le test du fructose-6 phosphokétolase, par un test immunoenzymatique de type « dot blot » utilisant des anticorps polyclonaux antibifidobactéries spécifiques et par PCR, en ciblant une séquence spécifique aux bifidobactéries. Les souches isolées ont subi une première caractérisation biochimique qui comprenait la détermination du profil de fermentation de certains sucres, la résistance à certaines conditions physiologiques du tube digestif notamment au pH (4, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8, 5 et 5,5), à des concentrations de sels biliaires (0,3 %), de H₂O₂ (50, 100, 200, et 300 µg/ml) et de lysozyme (100, 200 et 300 µg/ml). De plus, la sensibilité de ces souches à différents antibiotiques a été également examinée. Les souches sélectionnées présentant un fort potentiel probiotique ont été soumises à une deuxième série de caractérisation qui comprenait l'évaluation du pouvoir d'adhésion *in vitro* à une lignée de cellules intestinales (Caco-2) et de leur capacité à produire certains métabolites, notamment des exopolysaccharides et certaines enzymes protéolytiques et peptidasiques. Pour

l'évaluation du pouvoir d'adhésion, une approche immunologique très originale a été développée. Cette approche semi-quantitative utilise les anticorps antibifidobactéries spécifiques. La détection des bactéries adhérentes se fait à l'aide d'un deuxième anticorps commercial marqué à un fluorochrome (Alexa, Molecular probes, Netherland) combiné à des observations en microscopie à fluorescence. Un test ELISA quantitatif utilisant un substrat chromogène soluble a également été développé pour la détermination du pouvoir d'adhésion (exprimé en pourcentage). Les résultats obtenus avec cette méthode ont permis de sélectionner les souches montrant le pourcentage d'adhésion le plus élevé. De plus, les résultats sont en parfaite corrélation avec ceux obtenus par la méthode traditionnelle utilisant un dénombrement microbien sur milieux sélectifs.

Objectif spécifique 2 :

Étude in vitro du potentiel des souches de bifidobactéries d'origine humaine à inhiber certains pathogènes entériques (complété à 100 %).

Dans un premier temps, l'inhibition de pathogènes entériques tels que *E. coli* O157 : H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* par des souches humaines de *Bifidobacterium sp.* a été étudiée *in vitro* à l'aide du « spot test » et du test de diffusion différée sur gélose tels que décrits par Gagnon et al. (2001). Les résultats obtenus à la suite de cette première étape nous ont permis de sélectionner ►

RÉSULTATS ET APPLICATIONS (suite)

cinq souches de bifidobactéries d'origine humaine dont une (UL4) potentiellement active contre *E. coli* O157 : H7. Dans un deuxième temps, la compétition au niveau de l'adhésion aux cellules Caco-2 entre la souche UL4 et *E. coli* O157 : H7 a été étudiée en utilisant la méthode d'immunofluorescence décrite dans l'objectif 2. Dans ce cas, un système à double marquage utilisant deux anticorps spécifiques, antibifidobactéries et anti-*E. coli*, ainsi que deux fluorochromes (Alexa 488 et Alexa 568) qui absorbent et émettent à différentes longueurs d'ondes, a été développé. L'utilisation de ce système a démontré que la souche de bifidobactéries UL4 réduit considérablement la capacité de *E. coli* O157 : H7 à adhérer aux cellules Caco-2. Cet effet dépend du pH et de la concentration initiale de UL4, un maximum de 40 % d'inhibition était obtenu à une concentration de 10^8 CFU/ml. La souche UL4 a donc été retenue pour les études *in vivo*.

Objectif spécifique 3 :

Étude in vivo du potentiel des souches de bifidobactéries d'origine humaine dans le contrôle d'une infection entérique à E. coli O157 : H7 (complété à 50 %).

Un modèle murin d'infection entérique à *E. coli* O157 : H7 a été développé et caractérisé. Des souris Balb/c ont reçu, par gavage, différentes doses (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 CFU/ml) de *E. coli* O157 : H7 issu d'une culture pure, deux fois à 24 heures d'intervalle. Les souris ont ensuite été placées pendant 3 semaines dans des cages calorimétriques à circuit ouvert équipées d'un système informatique pour la collecte de différents paramètres physiologiques, notamment la consommation d'oxygène, la prise alimentaire, le poids et la température rectale. Les résultats obtenus ont démon-

tré que la dose de 10^8 CFU/ml permettait d'obtenir une infection avec un tableau clinique typique, caractérisé par une perte significative du poids corporel et une diminution de la consommation d'oxygène au cours des sept premiers jours post-infection. Une deuxième expérience d'infection a également été réalisée dans le but d'évaluer l'effet de l'infection à *E. coli* O157 : H7 sur certains paramètres immunologiques, tels que la production d'anticorps anti-*E. coli* O157 : H7 aux niveaux plasmatique (IgG et IgM) et digestif (IgA). Différentes méthodes ont alors été développées pour réaliser ces différents dosages. Des tests ELISA quantitatifs, utilisant des anticorps spécifiques (Biolynx, ON), ont été développés pour le dosage des différentes immunoglobulines. De façon générale, l'infection à *E. coli* O157 : H7 s'accompagne d'une perturbation des différents mécanismes de la réponse immunitaire. Des études histologiques ont également mis en évidence une réaction inflammatoire caractéristique de la muqueuse intestinale à la suite de l'infection. De plus, des essais d'hybridation *in situ* ont révélé une sur-expression des gènes codant pour certains marqueurs tissulaires de stress notamment les UCP et le Foss.

Des études sont en cours pour valider l'effet anti-*E. coli* O157 : H7 de la souche de bifidobactéries UL4 dans le modèle murin d'infection. L'effet préventif est étudié sur un groupe de souris ayant reçu sept doses de bifidobactéries à raison de 10^8 CFU par dose, pendant sept jours avant l'infection. L'effet curatif est étudié sur des souris infectées et ayant reçu pendant les sept jours suivant l'infection des doses de bifidobactéries, à raison de 10^8 CFU par dose. Les effets obtenus seront évalués par la mesure des différents paramètres microbiologiques, immunologiques, histologiques et métaboliques tel que décrit précédemment.

TRANSFERT DES RÉSULTATS

La mise en évidence d'un éventuel effet thérapeutique et/ou prophylactique des souches probiotiques permettra de développer de nouveaux produits à forte valeur ajoutée et de créer de nouveaux marchés dans les secteurs fort lucratifs de la pharmaceutique et de la cosmétique. Ceci aura inévitablement des retombées considérables pour le secteur bio-alimentaire. La réalisation de ce projet se fait en étroite collaboration avec des partenaires industriels, notamment l'Institut Rosell-Lallemand, un important producteur de probiotiques à l'échelle mondiale. L'identification de souches à fort potentiel probiotique de même que la démonstration *in vivo* des effets santé constitueront des atouts majeurs pour l'industrie et

favoriseront une utilisation plus efficace et mieux ciblée de ces souches. De plus, les souches naturelles qui ont été isolées et caractérisées dans le cadre de cette étude constituent un matériel biologique à haute valeur ajoutée, facilement exploitable aussi bien par les producteurs de ferments que par les transformateurs actifs dans le domaine de la production d'aliments probiotiques.

Au cours de ce projet, plusieurs tests *in vitro* ont été développés notamment pour l'identification rapide et la caractérisation de souches à fort potentiel probiotique. Ces tests pourront également être transférés à l'industrie.

PARTENAIRES FINANCIERS

Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies

Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec

Novalait inc.

BUDGET TOTAL : 100 000 \$



2750, rue Einstein, bureau 220-A
Sainte-Foy (Québec) G1P 4R1

Téléphone : (418) 527-7947
Télécopieur : (419) 527-5957
Courriel : novalait@novalait.ca

POINT DE CONTACT

Responsable du projet :

Ismail Fliss, Université Laval

Centre de recherche en sciences et technologie du lait

Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation

Département des sciences des aliments et de nutrition

Sainte-Foy (Québec) G1K 7P4

Téléphone : (418) 656-2131, poste 6825

Télécopieur : (418) 656-3353 • Courriel : Ismail.fliss@al.n.ulaval.ca

Collaborateurs :

Yvan Boutin, Cécep Lévis-Lauzon

André Darveau, Université Laval,

Département de biochimie et de microbiologie

Jacques Goulet, Institut Rosell-Lallemand

Denis Richard, Université Laval, Département d'anatomie

et de physiologie